

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Filogenia de *Passiflora* L. (Passifloraceae):  
questões infra-subgenéricas

PRISCILLA MENA ZAMBERLAN

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientação: Loreta Brandão de Freitas

Porto Alegre, março de 2007.

*entre  
a água  
e o chá  
desab  
rocha  
o maracujá*

Poema de Paulo Leminski

## AGRADECIMENTOS

À professora Loreta, por todo o seu trabalho.

Ao professor F. M. Salzano pelo grande exemplo profissional.

Aos amigos e colegas do LEM: Aline Lorenz, Aline Ramos, Carol, Cláudia, Clênio, Geraldo, Jéferson, Pakisa, Raquel e Tielli, por compartilharem seu conhecimento comigo.

À ex-colega e sobretudo amiga Valéria Muschner pelo auxílio ao longo do desenvolvimento do trabalho, pelo exemplo e pela incansável e divertida amizade.

Aos amigos conquistados ao longo dos anos e aulas no Departamento de Genética.

Ao Elmo e à Laci, por toda a ajuda.

À minha família, por tudo. Mesmo.

Ao João Marcelo e à sua família por tudo, principalmente o suporte durante o período de conclusão desta dissertação e auxílio na formatação das imagens.

Aos meus amigos da prática de ensino, pela diversão e estímulo em nossos encontros mensais. Às amigas periquitas Luciana e Melina, pelo incentivo constante, mesmo com a distância.

O presente trabalho foi executado no Laboratório de Evolução Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal no Rio Grande do Sul. As reações de seqüenciamento foram realizadas no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

As fontes financiadoras foram:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ - UFRGS)

## SUMÁRIO

RESUMO	7
SUMMARY	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 A família Passifloraceae	9
1.2 O gênero <i>Passiflora</i>	11
1.3 Os subgêneros de <i>Passiflora</i>	12
1.4 Estudos filogenéticos em <i>Passiflora</i>	14
1.5 Marcadores moleculares para filogenia de plantas	15
1.5.1 Espaçadores internos transcritos do rDNA nuclear	17
1.5.2 Introns do grupo II e sua utilidade filogenética	20
1.5.3 <i>rpoC1</i>	22
1.5.4 <i>rpl16</i>	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Material vegetal	26
3.2 Extração de DNA	33
3.3 Amplificações	33
3.4 Seqüenciamento automático	38
3.5 Análises filogenéticas	38
3.5.1 Conjuntos de dados	38
3.5.2 Visualização, alinhamento e caracterização das seqüências	47
3.5.3 Modelos evolutivos	47
3.5.4 Análises de distância	48
3.5.5 Análises de parcimônia	48
3.5.6 Análises de máxima verossimilhança	49
3.5.7 Análise bayesiana	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Amplificação, seqüenciamento, alinhamento e caracterização das seqüências	50
4.2 Análises filogenéticas	56
4.3 Análises filogenéticas: subgênero <i>Astrophea</i>	57
4.4 Análises filogenéticas: subgênero <i>Decaloba</i>	68
4.5 Análises filogenéticas: subgênero <i>Passiflora</i>	79
4.6 Análises filogenéticas: subgênero <i>Deidamioides</i>	89

4.7 Análises filogenéticas: introns do grupo II	90
5. CONCLUSÕES	94
6. PERSPECTIVAS	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

## RESUMO

O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) é composto por mais de 520 espécies, classificadas em quatro subgêneros: *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*. Embora algumas análises filogenéticas tenham sido realizadas nos últimos anos, sua classificação infra-subgenérica permanece em aberto. Com o objetivo de auxiliar na elucidação destas questões e caracterizar novos marcadores filogenéticos para o gênero *Passiflora*, análises com seqüências do gene plastidial que codifica a maior subunidade da enzima RNA-polimerase de cloroplasto (*rpoC1*), dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (ITS1 e ITS2) e do íntron b-c do gene *nad1* do genoma mitocondrial, foram desenvolvidas para 121 espécies de *Passiflora*. As análises foram realizadas usando métodos de distância, máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana para cada subgênero em separado e para o conjunto total de dados. A monofilia dos subgêneros *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora* foi confirmada, embora a monofilia do subgênero *Deidamioides* permaneça em aberto. Os resultados suportam, ainda, a existência de um quinto subgênero, *Tryphostemmatoides*. Análises realizadas para cada subgênero em separado demonstraram que esta estratégia é um método eficiente para a análise de marcadores com alta variabilidade entre os grupos, como é o caso dos subgêneros de *Passiflora*. ITS1 e ITS2 foram os marcadores moleculares mais informativos. Em geral, as superseções, seções e séries dos quatro subgêneros foram não-monofiléticas, sugerindo a necessidade de uma revisão cuidadosa dos caracteres morfológicos tipicamente usados em sua delimitação.

## SUMMARY

The *Passiflora* L. (Passifloraceae) genus is composed of more than 520 species, classified in four subgenera: *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* and *Passiflora*. Although some molecular phylogenetic analyses have been carried out in the last years, its infra-subgeneric classification remains open. With the intent to help to elucidate these issues and to characterize new phylogenetic markers for the *Passiflora* genus, analyses with sequences of the plastidial gene that codifies the biggest subunit of the RNA-polymerase enzyme of chloroplast (*rpoC1*), the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS1 and ITS2), and *nad1* b-c intron of the mitochondrial genome have been carried out in 121 *Passiflora*'s species. The analyses have been conducted using distance, parsimony, maximum likelihood, and Bayesian methods for each subgenus separately and for the whole data. The *Astrophea*, *Decaloba* and *Passiflora* subgenera monophyly were confirmed, although the *Deidamioides* monophyly remains open. The results also support the existence of a fifth subgenus, *Tryphostemmatoides*. Separated analyses for each subgenus demonstrated to be an efficient method for analysis of markers with high variability between groups, as it is the case of the *Passiflora*'s subgenera. The ITS1 and ITS2 have been the more informative molecular markers. In general, the supersections, sections and series of the four subgenera were found non-monophyletic, suggesting the need of a careful revision of the morphologic characters typically used for their delimitation.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A família Passifloraceae

A família Passifloraceae A.L. de Jussieu ex Kunth é composta por mais de 15 gêneros e cerca de 650 espécies, sendo *Passiflora* L. o gênero mais representativo. A característica morfológica mais marcante da família é a presença de uma coroa de filamentos nas flores, o que, segundo Judd *et al.* (1999), sustenta a monofilia do grupo.

As passifloráceas são trepadeiras e lianas com gavinhas axilares ou, ocasionalmente, arbustos e árvores sem gavinhas. Elas usualmente apresentam glicosídeos cianogênicos e alcalóides entre seus metabólitos secundários. Suas folhas são sempre alternas, freqüentemente simples e lobadas, com venação palmada e nectários presentes no pecíolo. As flores podem ter uma ampla gama de cores, e são geralmente bissexuais, de simetria radial. A coroa consiste de uma até várias linhas de filamentos, projeções ou membranas, e nasce no ápice da superfície interna do hipanto, sendo usualmente colorida, o que atrai polinizadores. Há um disco nectarífero na base do hipanto. Os componentes de uma flor de *Passiflora* são destacados na figura 1. Os frutos, tipo cápsula ou baga, com arilos carnosos e coloridos ao redor das sementes, geralmente são dispersos por pássaros (Killip 1938; Judd *et al.* 1999).



Figura 1. Corte longitudinal de flor de *P. alata*  
Fotografia de J.M. MacDougal, disponível no site do "Missouri Botanical Garden" (<http://www.mobot.org/mobot/photoessays/intro.asp?fldrloc=passiflora>).  
A. Coroa de filamentos  
B. Estigma  
C. Ovário  
D. Antera  
E. Coluna do androginóforo  
F. Límen  
G. Pétala (corola)  
H. Sépala (cálice)  
I. Opérculo  
J. Tubo do cálice

Segundo Escobar (1988), a família Passifloraceae está dividida em duas tribos, Paropsieae e Passiflorieae. As espécies da tribo Paropsieae, arbustos e árvores sem gavinhas, são consideradas por Judd *et al.* (1999) como representantes de um complexo basal parafilético na família. Passiflorieae, ao contrário, é claramente monofilética, segundo os mesmos autores, como evidenciado por seu hábito escandente, gavinhas axilares e flores especializadas. Cervi (1997) descreveu a tribo Paropsieae como sendo

composta por seis gêneros: *Androsiphonia* Stapf, *Viridivia* J.H. Hemsl. & Verdc., *Smeathmannia* Sol. ex R. Br., *Barteria* Hook. f., *Paropsiopsis* Engl. e *Paropsia* Noronha ex Thouars. Segundo o mesmo autor, a tribo Passiflorieae é representada por 14 gêneros: *Adenia* Forssk., *Ancistrothyrsus* Harms, *Basananthe* Peyr. *Crossostemma* Planch. ex Hook., *Deidamia* E.A. Noronha ex Thouars, *Dilkea* Mast., *Hollrungia* K. Schum., *Efulensia* C.H. Wright, *Mitostemma* Mast., *Passiflora*, *Schlechterina* Harms, *Tetraphaeta* (DC.) Rchb., *Tetrastylis* Barb. Rodr. e *Tryphostemma* Harv. Recentemente os gêneros *Tetraphaeta* e *Hollrungia* foram incluídos no gênero *Passiflora*, com base no resultado de análises filogenéticas realizadas por Krosnick e Freudenstein (2005). O gênero *Tetrastylis* também foi reposicionado e seu caso específico será abordado ainda neste tópico.

De acordo com Soltis *et al.* (2005), a tribo Paropsieae é o grupo irmão de um clado composto pelas famílias Malesherbiaceae e Turneraceae, as demais espécies de Passifloraceae e pelo gênero *Medusandra* Brenan. *Medusandra* é o único gênero da família Medusandraceae, classificada como *incerta sedis* na APG I (1998). Na APG II (2003) Medusandraceae não é mais reconhecida e o gênero não é incluído em nenhuma outra família ou ordem. Com base em dados não publicados de M. W. Chase e L. W. Chatrou (Soltis *et al.* 2005; M. W. Chase, comunicação pessoal), foi recomendada a combinação das famílias Passifloraceae, Turneraceae, Malesherbiaceae e Medusandraceae em uma única família, Passifloraceae.

A família Passifloraceae está incluída na ordem Malpighiales (Judd *et al.* 1999, APG II 2003, Soltis *et al.* 2005). Estima-se que todas as linhagens desta ordem tenham surgido antes do Terciário, em sua maioria durante os períodos Albiano e Cenomaniano, entre 112 e 94 milhões de anos atrás (Davis *et al.* 2005). Segundo análises filogenéticas realizadas com o gene plastidial *rbcL* (que codifica a subunidade maior da enzima RuBisCo), Passifloraceae está bastante próxima das famílias Violaceae e Flacourtiaceae (Chase *et al.* 2002). Na APG II (2003), as famílias Malesherbiaceae e Turneraceae foram incluídas em Passifloraceae, devido à presença de glicosídeos cianogênicos similares (também relatada por Clausen *et al.* 2002 e Judd & Olmstead 2004). Reforçam esta proposição os fatos de que Turneraceae e Passifloraceae possuem glândulas foliares e ambas têm herança plastidial paterna ou biparental para algumas espécies – representantes de Malesherbiaceae não foram examinados (Soltis *et al.* 2005; Muschner *et al.* 2006). Um relacionamento próximo entre estas três famílias já havia sido reconhecido por Cronquist (1981) e Takhtajan (1991), baseados apenas em caracteres morfológicos.

A família Passifloraceae tem ampla distribuição, desde regiões de clima tropical até temperado quente. Na América do Sul há registros da ocorrência dos gêneros *Ancistrothyrsus* (duas espécies), *Dilkea* (seis espécies), *Mitostemma* (três espécies), *Passiflora* (mais de 400 espécies) e *Tetrastylis* (Cervi 1997). Este último foi reposicionado em *Passiflora* segundo dados morfológicos (Feuillet & MacDougal 2003) e moleculares (Muschner *et al.* 2003), e sua única espécie passou a se chamar *Passiflora ovalis* Vell: ex Roemer, incluída na seção *Tetrastylis* do subgênero Deidamioides. Recentemente foi descrita uma segunda espécie para esta seção, *Passiflora contracta* Vitta (Vitta & Bernacci 2004). Segundo os autores, *P. ovalis* e *P. contracta* são indistinguíveis através de caracteres vegetativos; as diferenças entre ambas residem na estrutura da inflorescência e no indumento, além da distribuição disjunta. Entretanto, as duas espécies foram sinonimizadas por Cervi (2006). Na tentativa de elucidar esta questão, estão em andamento estudos moleculares realizados por nosso grupo sobre a estrutura populacional de *P. ovalis* e sobre a validade taxonômica de *P. contracta* (Dutra *et al.* 2006).

No Brasil, ocorrem aproximadamente 140 espécies de *Passiflora* (Cervi 2006). Somente após o ano de 1950, foram publicadas 25 descrições de espécies e sinonimizações. Para o Rio Grande do Sul são descritas 15 espécies do gênero: as 14 listadas por Mondin (2001) como de ocorrência seguramente natural, acrescidas de *Passiflora alata* Curtis, uma espécie invasora comprovadamente subespontânea (Mondin 2001; Koehler-Santos *et al.* 2006). Está em andamento uma revisão da lista de espécies que ocorrem no Estado (G. Mäder, comunicação pessoal).

## 1.2 O gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* foi estabelecido por Linnaeu, em 1735. A primeira espécie descrita foi *Passiflora incarnata* L., em cujas flores os missionários espanhóis que vieram à América identificaram semelhanças com símbolos da crucificação de Cristo. Essa é a origem das denominações popular, “flor-da-paixão”, e científica, *Passiflora*, do grupo (Killip 1938; Cervi 1997). O gênero *Passiflora* L. é composto por 520-525 espécies (Ulmer & MacDougal 2004). Várias espécies de *Passiflora* têm frutos comestíveis, enquanto outras tantas são cultivadas como ornamentais por suas flores vistosas. Seus representantes têm hábito arbóreo, arbustivo ou escandente. As flores apresentam as características morfológicas mais marcantes: têm simetria radial, possuem disco nectarífero na base do hipanto e apresentam corona de filamentos distribuídos em uma a seis fileiras, projeções ou membranas. As folhas são sempre alternas, geralmente

simples e de morfologia bastante variável (Judd *et al.* 1999; Ulmer & MacDougal 2004).

As flores de *Passiflora* atraem uma ampla gama de polinizadores: desde abelhas e vespas, borboletas e mariposas, até vertebrados como morcegos e pássaros. As variadas síndromes florais estão presentes nos diversos subgêneros, tendo surgido, portanto, mais de uma vez no grupo (Muschner 2005). As folhas, por sua vez, servem de alimento a larvas de borboleta (Judd *et al.* 1999). As plantas da família Passifloraceae e, especialmente, do gênero *Passiflora*, são as únicas hospedeiras das larvas das borboletas do gênero *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae), sendo muitos destes relacionamentos espécie-específicos (Benson *et al.* 1975). Em função disso, este grupo compõe um sistema modelo de co-evolução entre borboletas e plantas.

As espécies de *Passiflora* com contagem cromossômica já realizada foram divididas em quatro grupos: a)  $2n=12, 24, 36$ ; b)  $2n= 24$ ; c)  $2n=18, 72$ ; e d)  $2n=20$  (De Melo *et al* 2001). Entretanto, ainda há controvérsias quanto ao número cromossômico básico do gênero. De Melo *et al.* (2001) propuseram  $x = 6$  como número cromossômico básico, com  $x=9$ ,  $x=10$  e  $x=12$  sendo considerados números básicos secundários. Já Hansen *et al.* (2006) sugeriram  $x=2$ , uma vez que  $n=6$  é encontrado somente no subgênero *Decaloba*, levando a crer que o mesmo originou-se uma única vez, no ancestral direto deste subgênero. Isso descartou, de acordo com os autores, a hipótese de  $x=6$  ser o número cromossômico básico do gênero. As contagens cromossômicas disponíveis para outros gêneros da família Passifloraceae,  $n=11$  e  $n=12$ , também suportariam a hipótese de  $x=12$ . Por outro lado, o número e a localização de sítios 5S e 45S do DNA nuclear ribossomal são consistentes com a hipótese de  $x=6$  como ancestral no gênero (De Melo & Guerra 2003).

### 1.3 Os subgêneros de *Passiflora*

Em 1938 E. P. Killip publicou uma complexa proposição de classificação infragenérica para *Passiflora*, dividindo o grupo em 22 subgêneros, compostos por várias seções e séries. Escobar (1989) adicionou mais um subgênero a esta classificação.

Como alternativa para estes 23 subgêneros (Killip 1938; Escobar 1989), Feuillet e MacDougal (2003) sugeriram o agrupamento das espécies de *Passiflora* em apenas quatro subgêneros: *Astropheia* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora*. Estas proposições são baseadas, exclusivamente em caracteres morfológicos e ecológicos. Trabalhos recentes de sistemática filogenética, utilizando marcadores moleculares, corroboraram total ou parcialmente a nova classificação infragenérica do gênero (Muschner *et al.* 2003; Yockteng & Nadot 2004; Muschner 2005;

Hansen *et al.* 2006). Yockteng e Nadot (2004) reconheceram os quatro subgêneros propostos e sugeriram a manutenção dos subgêneros *Polyanthea*, *Dysosmia* e *Tetrapathea* de Killip (1938). Três dos subgêneros propostos por Feuillet e MacDougal são fortemente sustentados nas diversas análises realizadas por Muschner *et al.* (2003) e por Muschner (2005): *Passiflora*, *Decaloba* e *Astrophea*.

Outra evidência significativa da validade dos subgêneros propostos por Feuillet e MacDougal (2003) diz respeito à herança organelar. Muschner *et al.* (2006) investigaram a herança organelar no gênero *Passiflora* através da análise de quatro marcadores plastidiais, um mitocondrial e um nuclear em cinco híbridos interespecíficos (quatro com parentais do subgênero *Passiflora* e um do subgênero *Decaloba*). Todos os genomas mitocondriais apresentaram herança materna. Já a herança do cloroplasto variou de acordo com os subgêneros: nos híbridos derivados de espécies pertencentes ao subgênero *Passiflora*, a herança plastidial é paterna, enquanto no híbrido de espécies do subgênero *Decaloba* as evidências indicam transmissão materna.

O subgênero *Astrophea* abrange 57 espécies de arbustos e lianas lenhosas. As espécies que o compõem são as mais diferenciadas morfologicamente, guardando pequena semelhança com as passifloras típicas. A maioria das espécies do grupo ocorre em regiões de baixa altitude no norte da América do Sul, mas existem registros para o Brasil, Andes e América Central, esta última com apenas duas espécies, *Passiflora pittieri* Mast. e *Passiflora tica* Gómez-L. & L.D. Gómez (Ulmer & MacDougal 2004). Feuillet e MacDougal (2003) organizaram este subgênero em duas superseções: *Astrophea*, com três seções, e *Pseudosastrophea*, com duas.

O subgênero *Deidamioides* é composto por apenas 13 espécies. Em 11 destas, as flores se originam diretamente das gavinhas, uma característica rara e considerada ancestral para o gênero. *Deidamioides* é subdividido em cinco seções, duas das quais são monoespecíficas. Sua distribuição é sul-americana, localizada no noroeste da América do Sul. Segundo Ulmer e MacDougal (2004), esta região é o centro de diversidade do gênero, pois lá são encontradas diversas espécies de *Passiflora*, além das pertencentes ao subgênero *Deidamioides*, de morfologia bastante ancestral.

O subgênero *Decaloba* contém 214 espécies distribuídas nas Américas do Sul e do Norte, no sudeste do continente asiático e na Austrália. As espécies de *Decaloba* ocorrem desde o nível do mar até 300 metros de altitude. A maioria tem pequeno porte e hábito escandente, com flores diminutas geralmente brancas ou esverdeadas e frutos pequenos (Ulmer & MacDougal 2004). Conforme a proposição de Feuillet e MacDougal (2003), as espécies do subgênero *Decaloba* estão distribuídas em oito superseções,

sendo *Decaloba* a maior delas, com 120 espécies.

O maior subgênero é *Passiflora*, com 236 espécies. Morfologicamente, este é o subgênero que agrupa as espécies tipicamente reconhecidas como pertencentes ao gênero *Passiflora*. Sua área de distribuição abrange a metade sul dos Estados Unidos, a América Central e a América do Sul, exceto seu extremo sul. As espécies de *Passiflora* com maior importância econômica, *P. edulis* Sims, *P. ligularis* Juss., *P. tarminiana* Coppens & V. Barney (no hemisfério norte), *P. alata* Curtis e *P. incarnata* (no hemisfério sul) pertencem a este subgênero. Elas são cultivadas para obtenção do fruto (maracujá) e extratos para a indústria farmacêutica (Ortega & Schmidt 1995).

#### 1.4 Estudos filogenéticos em *Passiflora*

A primeira análise filogenética do gênero *Passiflora* foi realizada por Muschner *et al.* (2003), utilizando três marcadores moleculares: os espaçadores internos transcritos do DNA nuclear ribossomal (nrDNA), ITS1 e ITS2; a região espaçadora plastidial entre os genes de RNA transportador de leucina e de fenilalanina (*trnL-trnF*); e o gene plastidial que codifica a pequena proteína ribossomal 4 (*rps4*). Foram analisadas 61 espécies, representando 11 dos 23 subgêneros descritos por Killip (1938) e Escobar (1989). Os cladogramas resultantes das análises foram compatíveis com a proposição taxonômica de Feuillet e MacDougal (2003) para os subgêneros de *Passiflora*, divulgada dois meses antes da publicação de Muschner *et al.* Os resultados obtidos neste trabalho também apontaram a necessidade de continuar a revisão da classificação infragenérica do grupo.

Yockteng e Nadot (2004) utilizaram o gene nuclear que codifica a glutamina sintase expressa no cloroplasto (*ncpGS*) como marcador molecular para o estabelecimento de filogenias das espécies do gênero *Passiflora*. As autoras sugeriram a manutenção de oito subgêneros: *Astropheia*, *Deidamioides*, *Dysosmia*, *Granadilla*, *Plectostema*, *Polyanthea*, *Tetrapathea* e *Tryphostemmatoides*, em desacordo com as proposições Feuillet e MacDougal (2003) e Muschner *et al.* (2003). Análises desenvolvidas posteriormente também não corroboraram esta proposição (Muschner 2005).

O relacionamento filogenético entre as espécies do gênero *Passiflora* também foi analisado através da seqüência do espaçador plastidial entre os genes de RNA transportador de treonina e de leucina (*trnT-trnL*) (Hansen *et al.* 2006). Foram incluídas nas análises seqüências de 61 espécies do gênero. Os resultados deste trabalho também corroboraram a redução do número de subgêneros dos 22 de Killip (1938) para os quatro de Feuillet e MacDougal (2003).

A análise filogenética mais abrangente do gênero *Passiflora* foi realizada por Muschner (2005) e conta com 104 espécies, representando 19 dos 23 subgêneros de acordo com Killip (1938) e Escobar (1989) e os quatro subgêneros de Feuillet e MacDougal (2003). Foram analisados sete marcadores moleculares, sendo quatro do genoma plastidial (os genes *rbcL* e *rps4*, o íntron do gene *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-trnF*), dois do DNA mitocondrial (os introns b/c do gene da subunidade 1 da enzima NADH desidrogenase, *nad1*, e d/e do gene da subunidade 5 da NADH desidrogenase, *nad5*) e um nuclear, a seqüência parcial do gene que codifica a subunidade 26S do nrDNA, totalizando 6382 pares de bases (pb). A monofilia dos subgêneros *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora* foi fortemente corroborada pelas análises realizadas. Já o subgênero *Deidamioides* foi considerado polifilético. Um quinto subgênero, *Trhyphostemmatoides*, foi proposto neste trabalho, mas o mesmo foi descartado posteriormente pela autora, em função de incertezas quanto à correta identificação das amostras das espécies que o compunham (V.C. Muschner, comunicação pessoal).

Apenas um estudo publicado até o momento enfatizou as relações infra subgenéricas em *Passiflora*. Krosnick e Freudenstein (2005) investigaram as relações entre as espécies da superseção *Disemma* (subgênero *Decaloba*), que ocorrem somente na África e na Ásia. Analisando a morfologia floral e os marcadores moleculares ITS e *trnL-trnF*, os autores concluíram que a superseção *Disemma* é monofilética, formada por duas linhagens distintas, uma asiática e outra australiana. Além disso, os gêneros monotípicos *Hollrungia* K. Schum. e *Tetraphathaea* (DC.) Rchb. foram incluídos no gênero *Passiflora*, embora ainda não posicionados em subgênero algum. Esses resultados foram corroborados pelo trabalho de Muschner (2005), que incluiu em suas análises espécies de *Decaloba* que ocorrem nas Américas.

### 1.5 Marcadores moleculares para filogenia de plantas

As publicações iniciais de análises filogenéticas em plantas enfocavam questões taxonômicas supragenéricas, como o relacionamento entre as principais linhagens de angiospermas. Os primeiros trabalhos, como os de Soltis *et al.* (1990) e Chase *et al.* (1993), utilizaram seqüências de *rbcL* e os trabalhos subseqüentes, genes como a subunidade F da enzima NADH desidrogenase (*ndhF*) e a subunidade  $\beta$  da proteína ATP sintase (*atpB*) (Hoot *et al.* 1995; Kim & Jansen 1995). Com a automatização do processo de seqüenciamento de DNA, as análises filogenéticas tornaram-se menos dispendiosas e mais rápidas, o que possibilitou a popularização desta abordagem.

A exploração das informações do genoma nuclear na análise filogenética de

plantas teve início com a utilização do marcador nuclear ITS e da subunidade 18S do nrDNA (Martin & Dowd 1991; Baldwin 1992; 1993; Chaw *et al.* 1993; Savard *et al.* 1993; Suh *et al.* 1993). A utilização de genes nucleares de cópia única, ou com poucas cópias, também é vantajosa. Esses genes podem ser particularmente úteis na resolução de relacionamentos entre espécies próximas, apesar das dificuldades decorrentes do conhecimento limitado sobre a evolução de famílias gênicas (revisado por Sang 2002). As seqüências do genoma mitocondrial foram incorporadas posteriormente (Hiesel *et al.* 1994; Duff & Nickrent 1999; Qiu *et al.* 1999; 2000; 2001), possivelmente em função de sua baixa taxa de substituição quando comparadas com as dos genomas nuclear e plastidial (Wolfe *et al.* 1987; Muse 2000).

Como as árvores filogenéticas das angiospermas disponíveis na década de 1990 eram congruentes, isto é, apresentavam resultados concordantes mesmo que construídas a partir de diferentes marcadores, uma nova classificação do grupo, baseada em análises filogenéticas, foi proposta. Diversos autores, conhecidos como o “Angiosperm Phylogeny Group” (APG) traduziram os dados filogenéticos disponíveis até o momento em um sistema de classificação hierárquico, tratando dos níveis de família e superiores. A primeira versão deste trabalho foi publicada em 1998 e a segunda, nomeada APG II, em 2003. Desde a publicação destes trabalhos, o volume de publicações na área cresce cada vez mais, embora grande parte das seqüências de angiospermas disponíveis em bancos de dados como o GenBank deva-se ao seqüenciamento do genoma de organismos modelos (Savolainen & Chase 2003).

Para estudos em níveis filogenéticos inferiores, que se tornaram de maior interesse nos últimos anos, são amplamente utilizadas seqüências não codificadoras do genoma plastidial, a partir do pressuposto de que regiões não codificadoras têm menos restrições funcionais que regiões codificadoras e, portanto, podem apresentar maiores níveis de variação (Gielly & Taberlet 1994; Shaw *et al.* 2005). Inicialmente, os marcadores moleculares utilizados foram os espaçadores intergênicos plastidiais *trnT-trnL*, *trnL-trnF*, *atpB-rbcL* e os íntrons do gene do RNA transportador de lisina (*trnK*) e da enzima maturase K (*matK*) (Johnson & Soltis 1994; Manem & Natali 1995; Kajita *et al.* 1998; por exemplo). Estas regiões são amplamente utilizadas até hoje, geralmente associadas a outros marcadores, como os íntrons plastidiais *rpl16* (do gene que codifica a proteína ribossomal L16) e *rpS16* (do gene da proteína ribossomal S16) (Meerow *et al.* 1999; Asmussen & Chase 2001; Goldblatt *et al.* 2002; Borsch *et al.* 2003; Arias *et al.* 2005; Kyndt *et al.* 2005; van den Berg *et al.* 2005; Moore & Jansen 2006, entre diversos outros).



Shaw *et al.* (2005) realizaram uma extensa revisão comparando a utilidade filogenética de 21 regiões não codificadoras do cpDNA. Os autores demonstraram que as taxas evolutivas das regiões estudadas são heterogêneas, mas, ainda assim, há regiões com taxas significativamente mais altas que as demais, como os espaçadores intergênicos plastidiais entre os genes do RNA transportador de asparagina e de treonina (*trnD-trnT*) e entre o gene da subunidade  $\beta$  da enzima RNA-polimerase (*rpoB*) e o gene do RNA transportador de cisteína (*trnC*). Além disso, eventos de inserção e deleção correspondem a cerca de 30% dos caracteres potencialmente informativos encontrados nas seqüências estudadas e, por isso, os mesmos podem ser de grande utilidade em estudos filogenéticos infragenéricos. A utilidade filogenética dos eventos de inserção e deleção (indels) também foi assinalada por Kelchner (2000a) e foi demonstrada, entre outros, através da análise do íntron mitocondrial *nad1b/c* na família Orchidaceae (Freudenstein & Chase 2001).

Nos últimos anos, com o número crescente de genomas completamente seqüenciados, a filogenômica tornou-se mais uma abordagem possível para análises filogenéticas em plantas e em outros organismos. O termo “filogenômica” compreende várias áreas de pesquisa cujos principais objetivos são subsidiar estudos de evolução molecular e inferir relacionamentos interespecíficos com grande quantidade de dados moleculares. Uma vantagem das análises filogenômicas é que as mesmas permitem a utilização de, além das seqüências de DNA, características dos próprios genomas, como seu repertório gênico, a ordem dos genes, a posição dos introns, a distribuição dos oligonucleotídeos e mudanças genômicas raras (indels, presença de retrotransposons e fusão e fissão gênicas). Estas características estão menos sujeitas a homoplasias que as seqüências, sem deixarem de ser informativas (Delsuc *et al.* 2005; Philippe *et al.* 2005). Como as análises filogenômicas servem para a resolução de divergências profundas, houve tentativas de identificar a angiosperma mais ancestral através da seqüência de genomas plastidiais completos (Goremykin *et al.* 2003; 2004; Soltis *et al.* 2004).

#### 1.5.1 Espaçadores internos transcritos do rDNA nuclear

Os genes que codificam rRNAs, exceto os que codificam o RNA de 5S, estão presentes em conjunto e em grande número de cópias no genoma dos organismos eucariotos. Estima-se que o número de conjuntos de genes para rRNA em milho (*Zea mays* L.) varie entre 3.000 e 9.000 cópias (Graur & Li 2000). Tais cópias são bastante similares entre si e estão arranjadas em tandem, constituindo o chamado DNA ribossomal nuclear (nrDNA). As unidades de repetição do nrDNA são compostas pelos

genes que codificam os rRNAs de 18S, 5,8S e 26S, pelos espaçadores internos transcritos (ITS) e espaçadores externos transcritos (ETS), que separam os genes (figura 2). Espaçadores externos não transcritos (NTS) separam uma unidade de repetição da outra. O gene que codifica o rRNA de 5S também está presente em múltiplas cópias, mas não faz parte deste arranjo (Ferreira 2003).

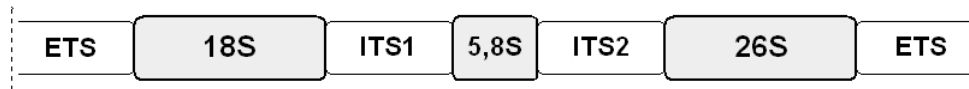


Figura 2. Representação esquemática de uma unidade de repetição do nrDNA, indicando as regiões gênicas (em cinza) e espaçadoras (branco). As linhas pontilhadas indicam que o segmento não está representado em toda a sua extensão. O tamanho das barras não é proporcional ao comprimento das seqüências.

O promotor da transcrição da unidade localiza-se no NTS, na região limítrofe ao primeiro espaçador externo transcrito. Os espaçadores transcritos, como seu nome indica, estão presentes, juntamente com os genes de rRNA, no RNA policistrônico gerado a partir da transcrição de cada unidade de repetição. O pré-rRNA resultante da transcrição é processado no próprio núcleo da célula para a remoção dos espaçadores e liberação dos rRNAs maduros (Ferreira 2003). Já foi demonstrado que deleções em certas regiões de ITS1 inibem a maturação das subunidades maior e menor dos rRNAs. Além disso, mutações de ponto ou deleções em ITS2 também inibem o processamento da subunidade maior do rRNA. Assim, há uma forte pressão de seleção agindo para que estas regiões mantenham-se relativamente conservadas, quando comparadas a espaçadores intergênicos e aos espaçadores externos não-transcritos (Goel *et al.* 2002). Entretanto, ITS1 e ITS2 divergem mais que as subunidades do nrDNA (26S, 18S e 5,8S) e são variáveis o suficiente para permitir a reconstrução filogenética em níveis taxonômicos abaixo de família (Baldwin 1995).

As muitas cópias do nrDNA são mantidas similares entre si através de um processo chamado evolução em concerto. A evolução em concerto é um processo biológico abrangente – a maioria das famílias gênicas repetitivas examinadas até o momento sofre sua ação – que se dá através de recombinações de DNA, reparo e mecanismos de replicação, como “crossing over” desigual entre unidades de repetição e conversão gênica (Liao 1999; Alvarez & Wendel 2003). Entretanto, há registro de casos

em que o nrDNA não evolui em concerto (Harpke & Peterson 2006), não ocorrendo a homogeneização entre as cópias. Algumas das cópias podem divergir, podendo se tornar pseudogenes. A não homogeneização das cópias pode ser detectada através de: a) alto conteúdo de A/T nas seqüências; b) taxas de substituição altas e grande número de indels em motivos estruturais conservados; c) estrutura de RNA com menor estabilidade termodinâmica (Mayol & Rosselló 2001; Razafimandimbison *et al.* 2004; Harpke & Peterson 2006).

Os primeiros trabalhos de filogenia de plantas utilizando o marcador ITS foram publicados a partir de 1990 (Baldwin 1992; 1993; Suh *et al.* 1993) e analisavam as relações evolutivas entre espécies de Asteraceae. De lá para cá, a popularidade do marcador aumentou. Uma busca realizada no site PubMed, em janeiro de 2007, com as palavras-chave “plant”, “phylogeny” e “Internal Transcribed Spacer” recuperou cerca de 300 publicações em revistas internacionais. Em 2003, segundo levantamento realizado por Alvarez e Wendel, cerca de dois terços dos artigos publicados entre os anos de 1998 e 2002, envolvendo análises filogenéticas em nível taxonômico de gênero ou inferior, utilizaram este marcador. Ainda segundo estes autores as propriedades que costumam justificar a ampla utilização das seqüências de ITS são: a) herança biparental, pois é um marcador nuclear; b) universalidade, pois “primers” que amplificam a região em organismos que vão desde fungos até angiospermas foram descritos por White *et al.* (1990); c) simplicidade, que resulta em facilidade de amplificação, pois o marcador apresenta numerosas cópias de pequeno tamanho: 500-700 pares de base (Baldwin *et al.* 1995) em angiospermas; d) uniformidade intragenômica, devida à evolução em concerto; e) variabilidade intergenômica: o nível de variabilidade das seqüências é suficiente para resolver relações genéricas e infragenéricas; e f) poucas restrições funcionais nas seqüências, o que permite altas taxas de substituição.

Além das vantagens já citadas, o marcador ITS é bastante versátil quanto a suas aplicações: já foi utilizado com bons resultados na filogenia de famílias (Goertzen *et al.* 2003; Kyndt *et al.* 2005; Fior *et al.* 2006, por exemplo), resolução de complexos taxonômicos (Goel *et al.* 2002; Grundt *et al.* 2004; González & Morton 2005; Devos *et al.* 2006), taxonomia infragenérica (Adams *et al.* 2000; Suh *et al.* 2000; Bellarosa *et al.* 2005, Huang *et al.* 2005; Ellison *et al.* 2006; Hidalgo *et al.* 2006) e até mesmo análises de tempo de divergência (Richardson *et al.* 2001).

### 1.5.2 Introns do grupo II e sua utilidade filogenética

Introns são segmentos de DNA que interrompem a seqüência codificadora de um gene, e que, embora transcritos, são removidos da molécula de RNA (Lewin 2001; Lehmann & Schmidt 2003). As seqüências que flanqueiam os introns, chamadas éxons, são unidas após a remoção destes. A retirada dos introns pode acontecer através da ação de um complexo protéico, o “spliceossomo”, ou através do mecanismo de “self-splicing” (ou autoprocessamento) (Lewin 2001). Os introns são classificados de acordo com os padrões de sua estrutura de RNA e mecanismos de “splicing”. Segundo Lehman e Schmidt (2003), são cinco as classes de introns: a) grupo I: encontrados em quase todos os organismos, exceto eucariotos mais derivados - para sua retirada ocorrem no mínimo duas reações de transesterificação; b) grupo II: ocorrem principalmente em organelas de angiospermas – também necessitam de duas reações de transesterificação para sua retirada, mas as mesmas diferem daquelas dos introns do grupo I; c) introns de RNAs transportadores do genoma nuclear; d) introns de arqueobactérias; e e) introns de RNAs mensageiros do DNA nuclear.

Até 2003, eram mais de 200 os introns de grupo II descritos. Eles foram encontrados em baixa freqüência no genoma mitocondrial de fungos, esporadicamente no genoma organelar de algas e são numerosos nos genomas organelares de angiospermas (Michel et al 1989; Lehman & Schmidt 2003). Os introns do grupo II presentes no genoma plastidial possuem ao menos 500 pb de extensão, o mínimo estimado para que ocorra o seu processamento. A estrutura secundária deste tipo de íntron caracteriza-se por seis componentes estruturais irradiados centralmente, denominados domínios I a VI (Michel *et al.* 1989). Em cada domínio há regiões em forma de grampo altamente conservadas e outras, similares a alças, menos conservadas.

As seqüências intrônicas plastidiais são ditas de evolução rápida, pois apresentam taxas de substituição nucleotídica elevadas e são propensas ao acúmulo de alterações na sua extensão (Gielly & Taberlet 1994; Downie *et al.* 1996b; Shaw *et al.* 2005). As mutações tipo indel são causadas principalmente por pareamento desigual durante a replicação do DNA, que ocorre em função do pareamento errôneo de seqüências repetitivas (mononucleotídicas ou de repetições “em tandem”) em uma única fita da molécula. Repetições mononucleotídicas, particularmente de A ou T, ocorrem freqüentemente em DNA plastidial não codificador. Uma estrutura secundária forma-se nos introns do grupo II quando, em fita simples, repetições invertidas pareiam e formam grampos e a região não repetitiva entre estas seqüências forma alças. As regiões de alça estão associadas a “hotspots” para mutações, tanto substituições nucleotídicas como

indels. As indels são mais comuns na região terminal da alça, mas podem ocorrer em qualquer lugar ao longo da estrutura secundária. Como os introns plastidiais do grupo II são regiões não codificadoras altamente estruturadas e seus elementos evoluem de maneira não independente, o conhecimento da estrutura secundária das moléculas de RNA é útil para o alinhamento das seqüências, permitindo acessar melhor as homologias (Kelchner 2000b; 2002).

Além disso, a taxa de substituição nucleotídica nos introns plastidiais do grupo II é mais elevada que a taxa média de substituição no genoma plastidial como um todo (Kelchner 2000b). Entretanto, em função das características da estrutura secundária do RNA, a probabilidade de uma substituição causar uma mutação não deletéria (e que, por isso, não seria eliminada na mesma geração em que surgiu) varia consideravelmente entre as regiões dos introns. Mutação deletéria é, por exemplo, qualquer uma que impeça a retirada do íntron. Portanto, essa probabilidade está relacionada à estrutura secundária deste (Downie *et al.* 1996b).

A ocorrência de alta taxa de substituição e a grande possibilidade do acúmulo de indels, aliadas ao fato dessas seqüências serem de difícil alinhamento, levaram à conclusão preliminar de que introns do genoma plastidial não contribuiriam efetivamente para inferências filogenéticas (Downie *et al.* 1996a). Entretanto, o grau de conservação da estrutura secundária nos introns plastidiais do grupo II sugere que a preservação dessa estrutura é necessária para o funcionamento correto do íntron e a utilidade filogenética dos introns do grupo II derivaria, então, de sua uniformidade estrutural e funcional. Além disso, a presença ou ausência de um íntron do grupo II em diversas linhagens também pode ser usada como informação para o estabelecimento de relações filogenéticas. O mecanismo de perda do íntron pode envolver transcrição reversa do gene e sua reintegração na mesma localização do genoma após o processo de retirada dos introns (Downie *et al.* 1996b; Wallace & Cota 1996).

Inicialmente, o uso de seqüências de introns plastidiais em estudos filogenéticos restringiu-se a dois genes de tRNA plastidiais, *trnL* e *trnV* (Downie *et al.* 1996a). Com o crescimento do interesse pela resolução das relações filogenéticas em níveis taxonômicos inferiores (infragenéricos), regiões não codificadoras, como os introns do grupo II passaram a ser consideradas como uma importante fonte de caracteres para a estimativa desses relacionamentos (Kelchner 2000b; 2002). Diversos estudos recentes utilizaram este tipo de marcador molecular com sucesso (Kelchner & Cleg 1997; Downie *et al.* 2000; Zhang 2000; Hosokawa *et al.* 2004; Löhne & Borsch 2005; Ronsted *et al.* 2005; Wanke *et al.* 2007).

### 1.5.3 *rpoC1*

A seqüência de DNA plastidial *rpoC*, análoga ao operon *rpoBC* da bactéria *Escherichia coli*, é composta por dois genes, *rpoC1* e *rpoC2*, e se localiza na maior região de cópia única do cpDNA da maioria das angiospermas. O gene *rpoC1* contém um único íntron, também referido como *rpoC1*, e codifica uma proteína análoga à extremidade N-terminal da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase bacteriana. Não ocorre processamento no gene *rpoC2* ou entre *rpoC1* e *rpoC2* (Hudson *et al.* 1988; Downie *et al.* 1996b). No genoma plastidial de tabaco, o íntron *rpoC1* tem 738 pares de bases (Shinozaki *et al.* 1986).

Downie *et al.* (1996b) identificaram a presença do íntron *rpoC1* em diversas angiospermas, dentre as quais a briófito *Marchantia polymorpha* L., a gimnosperma *Pinus thunbergii* Parl. e as angiospermas *Nicotiana tabacum* L. e *Spinacia oleracea* L. Os autores constataram também a ausência do íntron no cpDNA das seguintes espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*: *P. capsularis* L., *P. helleri* Peyr., *P. morifolia* Mast. e *P. suberosa* L., todas pertencentes ao subgênero *Decaloba* (de acordo com Feuillet & MacDougal, 2003). Além de Passifloraceae, os autores registram eventos de perda do íntron *rpoC1* no genoma plastidial de membros das famílias Aizoaceae, Fabaceae e Goodeniaceae. As famílias analisadas estão distantes filogeneticamente, de acordo com classificações morfológicas e moleculares, o que corrobora a hipótese de que tenham ocorrido eventos independentes de perda do íntron do gene *rpoC1* ao longo da evolução das angiospermas. Recentemente foi publicada uma extensa análise de presença/ausência do íntron *rpoC1* no gênero *Passiflora* (Hansen *et al.* 2006). Os autores relataram a ocorrência da perda do íntron ao menos duas vezes no grupo, ambas dentro do subgênero *Decaloba*.

Além da variação de presença/ausência do íntron *rpoC1*, sua seqüência tem sido utilizada para o estudo de relações filogenéticas em diversos níveis e grupos taxonômicos, como a ordem Poales (Katayama & Ogiwara 1996), as famílias Cactaceae (Wallace & Cota 1996) e Apiaceae (Downie *et al.* 2000), e o gênero *Medicago* L. (Downie *et al.* 1998), além de permitir inferências sobre a separação entre gimnospermas e angiospermas (Samigullin *et al.* 1999).

### 1.5.4 *rpl16*

O gene plastidial *rpl16* codifica a proteína ribossomal L16. Sua extensão é de aproximadamente 1,4 kilobase (kb). Na maioria das angiospermas, o gene é interrompido por um íntron de cerca de 1 kb. Em tabaco, o íntron tem precisamente 1.020 pb e está

localizado na região análoga aos operons S10 e *spc* de *Escherichia coli* (Tanaka *et al.* 1986).

Assim como *rpoC1*, o íntron *rpl16* enquadra-se na categoria de íntron do grupo II, de acordo com a classificação proposta por Michel *et al.* (1989). Campagna e Downie (1998) realizaram uma verificação sistemática da presença do íntron *rpl16* no genoma plastidial de angiospermas. Foi verificada a ausência deste íntron em algumas espécies das famílias Geraniaceae, Goodeniaceae e Plumbaginaceae. Na única espécie pertencente à família Passifloraceae avaliada neste estudo, *Passiflora incarnata*, o íntron está presente.

O íntron *rpl16* é uma das seqüências de evolução mais rápida no genoma plastidial, sendo utilizado na estimativa de filogenias nos níveis inter e infragenérico (Kelchner 2002). Este marcador molecular já foi utilizado com sucesso nas análises filogenéticas dos seguintes grupos: família Apiaceae e subfamília Apioideae (Downie *et al.* 2000); família Poaceae, com ênfase em Bambusoideae (Zhang 2000); ordem Laurales (Renner 1999); *Chusquea* Kunth (Poaceae), com ênfase em Bambusoideae (Kelchner & Clarck 1997) e nos gêneros *Fritillaria* L. e *Lilium* L. (ambos de Liliaceae) (Ronsted *et al.* 2005), além de contribuir para a diferenciação exata das espécies do gênero *Papaver* L. (Papaveraceae) (Hosokawa *et al.* 2004).

Apesar das diversas análises filogenéticas realizadas com o gênero *Passiflora* até o momento (Muschner *et al.* 2003; Yockteng & Nadot 2004; Krosnick e Freudenstein 2005; Muschner 2005; Hansen *et al.* 2006), algumas questões permanecem obscuras. Entre estas, destacam-se o “status” taxonômico do subgênero *Deidamioides* e o relacionamento entre as espécies de cada um dos subgêneros, classicamente divididos em inúmeras séries e seqões. Interessado nestas indagações remanescentes, nosso grupo de pesquisa realizou mais uma análise filogenética do grupo. Para tanto, buscamos marcadores moleculares altamente variáveis e com grande informação disponível, optando pelo marcador nuclear ITS e pelos íntrons plastidiais do grupo II *rpoC1* e *rpl16*. O íntron *rpoC1*, que possui variação de presença e ausência, tem uma seqüência altamente variável, ainda não utilizada para filogenia no gênero, assim como a do íntron *rpl16*. Outra vantagem é que os dados do íntron *rpoC1* puderam ser analisados em conjunto com seqüências de outro íntron do grupo II, o b/c do gene mitocondrial *nad1*, também obtidas por nosso grupo de pesquisa. Já para o marcador ITS, há seqüências de diversas espécies do gênero obtidas por grupos de pesquisa diferentes disponíveis, nunca

reunidas em uma análise filogenética conjunta. Além disso, em função da estrutura secundária conservada dos marcadores, os mesmos se prestam também para estudos de evolução molecular.



## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi contribuir para o esclarecimento das relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Passiflora* L. Como objetivos específicos teve-se:

1. determinar o grau de diversidade das seqüências estudadas, comparando os diferentes subgêneros analisados e as porções codificadoras e não codificadoras das mesmas, se existentes;
2. avaliar a utilidade dos introns do grupo II (*rpoC1*, *rpl16* e b-c do gene *nad1*) na resolução do relacionamento evolutivo entre espécies próximas do gênero *Passiflora*;
3. avaliar a utilidade do marcador molecular nuclear ITS na análise filogenética dos subgêneros de *Passiflora*;
4. contribuir para o esclarecimento das relações filogenéticas entre as espécies de cada um dos subgêneros analisados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Foram analisadas espécies do gênero *Passiflora* cujas amostras estão disponíveis no Laboratório de Evolução Molecular (LEM) da UFRGS. As amostras (tabela 1) provêm de coletas realizadas por nossa equipe, bem como do envio por parte de colaboradores: Dra. Alba Lins (Museu Paraense Emílio Goeldi), Dra. Alessandra Selbach (Universidade Estadual de Feira de Santana), Dr. Armando Carlos Cervi (Universidade Federal do Paraná), Dr. Cássio van den Berg (Universidade Estadual de Feira de Santana), Dr. Cláudio Mondim (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), Bel. Fernando Campos Neto (Universidade Federal de Minas Gerais), Dr. Luís Carlos Bernacci (Instituto Agronômico de Campinas), Dr. Mark Chase (Royal Botanical Garden, Kew, Reino Unido), Dr. Marcelo Carnier Dornelas (Universidade de Campinas), Dr. Maurizio Vecchia (Itália), Dr. Nataniel Franklin de Melo (EMBRAPA, Pernambuco), Dra. Roxana Yockteng (Universidade de Paris XI, França), Dra. Sophie Nadot (Universidade de Paris XI, França) e MSc. Teonildes Sacramento Nunes (Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana). As amostras consistiram de folhas jovens, desidratadas em sílica gel e pulverizadas com nitrogênio líquido, estocadas em congelador a -20°C. Sempre que possível foi confeccionada uma testemunha para depósito em herbário, na grande maioria das vezes vinculados às Instituições de origem dos respectivos pesquisadores ou no Herbário ICN, Instituto de Biociências, UFRGS.

Tabela 1. Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos para os quais foram obtidas seqüências durante o desenvolvimento deste trabalho, indicando se as seqüências foram dos marcadores *rpoC1* e/ou ITS.

<i>Subgênero, tribo ou família</i>	Espécie	ITS	<i>rpoC1</i>
<i>Astrophea</i>	<i>P. amoena</i> L. K. Escobar	X	X
	<i>P. candida</i> (P. & E.) Mast.		X
	<i>P. citrifolia</i> (Juss.) Mast.		X
	<i>P. haematostigma</i> Mast.		
	<i>P. kawensis</i> Feuillet		X
	<i>P. lindeniana</i> Tr. & Pl.	X	X
	<i>P. macrophylla</i> Spruce ex Mast.		X
<i>Decaloba</i>	<i>P. pittieri</i> Mast.	X	X
	<i>P. capsularis</i> L.		X
	<i>P. coriacea</i> Juss.		X
	<i>P. cuprea</i> L.		X
	<i>P. helleri</i> Peyr.		X
	<i>P. herbertiana</i> Ker Gawl		
	<i>P. lancetillensis</i> MacDougal & Meerman		X
	<i>P. leptoclada</i> Harms		X
	<i>P. lobbi</i> subsp. <i>ayacuchoensis</i> Skrabal & Weigend	X	X
	<i>P. lobbi</i> subsp. <i>obtusiloba</i> (Mast.) Skrabal & Weigend	X	X
	<i>P. micropetala</i> Mast.		X
	<i>P. misera</i> HBK.		X
	<i>P. morifolia</i> Mast. in Mart.		X

*continua*

Tabela 1 (cont.). Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos para os quais foram obtidas seqüências durante o desenvolvimento deste trabalho, indicando se as seqüências foram dos marcadores *rpoC1* e/ou ITS.

<i>Subgênero, tribo ou família</i>	Espécie	ITS	<i>rpoC1</i>
<i>Decaloba</i>	<i>P. multiflora</i> L.		X
	<i>P. murucuja</i> L.		X
	<i>P. organensis</i> Gardn.		X
	<i>P. ornithoura</i> Mast.		X
	<i>P. penduliflora</i> Bertero ex DC.		X
	<i>P. pohlii</i> Mast. in Mart.		X
	<i>P. punctata</i> L.		X
	<i>P. rovirosae</i> Killip	X	X
	<i>P. rufa</i> Feuillet		X
	<i>P. sanguinolenta</i> Mast.		X
	<i>P. sexflora</i> Juss.		X
	<i>P. suberosa</i> L.		X
	<i>P. tacsonioides</i> Griseb.		X
	<i>P. tamamancensis</i> Killip		X
	<i>P. tricuspis</i> Mast. in Mart.		X
	<i>P. truncata</i> Regel		X
	<i>P. tulae</i> Urban		X
<i>P. vespertilio</i> L.	X	X	
<i>P. xikzodz</i> MacDougal		X	

*continua*

Tabela 1 (cont.). Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos para os quais foram obtidas seqüências durante o desenvolvimento deste trabalho, indicando se as seqüências foram dos marcadores *rpoC1* e/ou ITS.

<u>Subgênero, tribo ou família</u>	Espécie	ITS	<i>rpoC1</i>
<i>Deidamioides</i>	<i>P. cirrhiflora</i> Juss.	X	X
	<i>P. deidamioides</i> Harms	X	X
	<i>P. discophora</i> Yorg. & Law	X	
	<i>P. ovalis</i> Vell.		X
<i>Passiflora</i>	<i>P. actinia</i> Hook		X
	<i>P. acuminata</i> DC.	X	X
	<i>P. alata</i> Curtis		X
	<i>P. ambigua</i> Hemsl.	X	X
	<i>P. amethystina</i> Mikan		X
	<i>P. antioquiensis</i> Karst.		X
	<i>P. caerulea</i> L.		X
	<i>P. campanulata</i> Mast.		X
	<i>P. chrysophylla</i> Chod.	X	X
	<i>P. cincinnata</i> Mast.		X
	<i>P. coccinea</i> Aubl.		X
	<i>P. edmundoi</i> Sacco		X
	<i>P. edulis</i> Sims		X
	<i>P. eichleriana</i> Mast.		X
	<i>P. elegans</i> Mast.		X
	<i>P. exura</i> Feuillet		X

continua

Tabela 1 (cont.). Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos para os quais foram obtidas seqüências durante o desenvolvimento deste trabalho, indicando se as seqüências foram dos marcadores *rpoC1* e/ou ITS.

<i>Subgênero, tribo ou família</i>	Espécie	ITS	<i>rpoC1</i>
<i>Passiflora</i>	<i>P. foetida</i> L.	X	X
	<i>P. gabrielliana</i> sp. nova		X
	<i>P. galbana</i> Mast.		X
	<i>P. garckeii</i> Mast.		X
	<i>P. gibertii</i> N. E. Brown		X
	<i>P. glandulosa</i> Cav.		X
	<i>P. hatsbachii</i> Cervi	X	
	<i>P. incarnata</i> L.		X
	<i>P. ischnoclada</i> Harms	X	X
	<i>P. cf. jervensis</i>	X	X
	<i>P. jilekii</i> Wawra		X
	<i>P. kermesina</i> Link & Otto	X	
	<i>P. laurifolia</i> L.	X	
	<i>P. ligularis</i> Juss.	X	
	<i>P. loefgrenii</i> Vitta	X	X
	<i>P. luetzelburgii</i> Harms		X
	<i>P. maliformis</i> L.		X
	<i>P. mathewsii</i> (Mast.) Killip	X	X
	<i>P. mendoncaei</i> Harms	X	
	<i>P. mixta</i> L. f.	X	X

continua

Tabela 1 (cont.). Tabela1. Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos para os quais foram obtidas seqüências durante o desenvolvimento deste trabalho, indicando se as seqüências foram dos marcadores *rpoC1* e/ou ITS.

<i>Subgênero, tribo ou família</i>	Espécie	ITS	<i>rpoC1</i>
<i>Passiflora</i>	<i>P. mucronata</i> Lam.		X
	<i>P. mucugeana</i> T.S. Nunes & L.Paganucci de Queiroz		X
	<i>P. nitida</i> Kunth	X	X
	<i>P. odontophylla</i> Harms ex Glaz.	X	X
	<i>P. palmeri</i> Killip	X	X
	<i>P. pilosicorona</i> Sacco	X	X
	<i>P. platyloba</i> Killip	X	X
	<i>P. quadrangularis</i> L.	X	
	<i>P. racemosa</i> Brot.	X	X
	<i>P. recurva</i> Mast. in Mart.		X
	<i>P. riparia</i> Mart.		X
	<i>P. serratifolia</i> L.		X
	<i>P. serratodigitata</i> L.		X
	<i>P. setacea</i> DC.		X
	<i>P. setulosa</i> Killip	X	
	<i>P. sidaefolia</i> M. Roemer		X
	<i>P. speciosa</i> Gardn.		X
	<i>P. sprucei</i> Mast.	X	X
	<i>P. tenuifila</i> Killip		X
	<i>P. trisecta</i> Mast.	X	

continua

Tabela 1 (cont.). Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos para os quais foram obtidas seqüências durante o desenvolvimento deste trabalho, indicando se as seqüências foram dos marcadores *rpoC1* e/ou ITS.

<u>Subgênero, tribo ou família</u>	Espécie	ITS	<i>rpoC1</i>
<i>Passiflora</i>	<i>P. umbilicata</i> (Griseb.) Harms		X
	<i>P. urubicensis</i> Cervi		X
	<i>P. villosa</i> Vell.		X
	<i>P. vitifolia</i> HBK.		X
	<i>P. watsoniana</i> Mast.	X	X
<u>Passifloreae</u>	<i>Dilkea johannesii</i> Barb. Rodr.		X
<u>Paropsieae</u>	<i>Paropsia madagascariensis</i> (Mast.) H. Perrier		X
<u>Turneraceae</u>	<i>Turnera subulata</i> Sm.		X



### 3.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído através da técnica descrita por Roy *et al.* (1992), modificada e adaptada para espécies de *Passiflora*. O protocolo executado foi o seguinte: adição de 600 µl de tampão de extração (100 mM TRIS-HCl; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoetanol; 2% PVP 40), 60 µl de β-mercaptoetanol e 6 µl de proteinase K (10 mg/ml) a 20 mg de material vegetal pulverizado; incubação a 65°C por 30 minutos, com agitação manual em intervalos de 10 minutos; emulsão com 600 µl de fenol-clorofórmio (1:1); agitação manual por 10 minutos; centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm; recolhimento da fase aquosa e estimativa de seu volume; precipitação do DNA com um volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio; armazenagem por 24 horas em congelador a -18°C; centrifugação por 20 minutos a 14000 rpm e descarte do sobrenadante; dupla lavagem do precipitado com 200 µl de etanol 70°GL; secagem a temperatura ambiente por 20 minutos; eluição do precipitado em 200 µl de água ultra pura estéril e tratamento com 2 µl de RNase (10 mg/ml).

Os produtos de extração foram verificados através de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Cada amostra foi quantificada através da comparação, em gel, com o marcador de peso e concentração “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen).

### 3.3 Amplificações

As seqüências dos marcadores foram amplificadas através da técnica de PCR (“Polimerase Chain Reaction”), em termocicladores automáticos MJ Res. Inc. e Eppendorf. Para o marcador *rpoC1*, foram utilizados dois conjuntos de “primers”, identificados na figura 3. Com o primeiro, 3´*rpoC1* e 5´*rpoC1*, de tamanho esperado de fragmento amplificado com 1100 pb (Downie *et al.* 1996b), obteve-se baixo sucesso nas amplificações. Por isso, foram desenhados “primers” específicos para o gênero *Passiflora*, a partir de seqüências obtidas com o conjunto anterior.

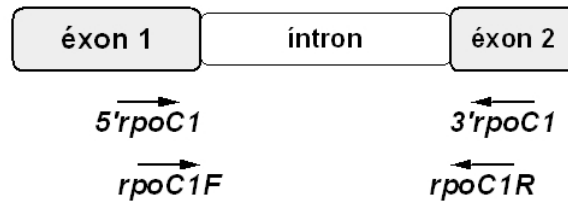


Figura 3. Representação esquemática do gene plastidial *rpoC1*, composto por dois exons e um íntron, indicando as regiões de anelamento dos primers 5'*rpoC1* e 3'*rpoC1* (Downie *et al.* 1996b) e *rpoC1F* e *rpoC1R*, desenhados para o gênero *Passiflora*.

As reações de PCR para amplificação do marcador ITS foram realizadas com os “primers” 92 e 75 (White *et al.* 1990). A utilização destes “primers” possibilitou a amplificação da região 5,8S do nrDNA, além dos espaçadores ITS1 e ITS2 (figura 4), com fragmento amplificado esperado em torno de 700 pb. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado às reações de PCR para evitar a amplificação de cópias menos freqüentes do nrDNA (Buckler *et al.* 1997; Fuertes Aguilar *et al.* 1999).

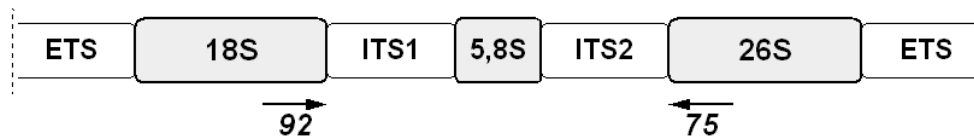


Figura 4. Representação esquemática de uma unidade de repetição do nrDNA, indicando as regiões gênicas (em cinza) e espaçadoras (branco), e os “primers” 92 e 75, White *et al.* 1990) utilizados para a amplificação do marcador ITS. As linhas pontilhadas indicam que o segmento não está representado em toda a sua extensão. O tamanho das barras não é proporcional à extensão das seqüências.

Dois conjuntos de “primers” foram testados para a amplificação do marcador *rpl16* em espécies de *Passiflora* (figura 5). Os “primers” *rps3* e *L16exon2* (Downie *et al.* 2000) amplificam um fragmento com tamanho esperado de 1400 pb, da mesma forma que o conjunto *rpl16F71* e *rpl16R1516* (Shaw *et al.* 2005).

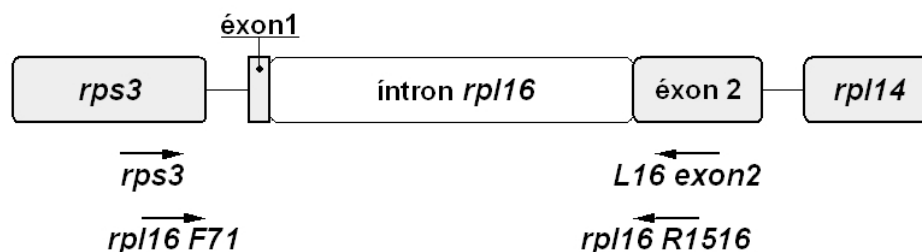


Figura 5. Representação esquemática de segmento do genoma plastidial contendo os genes *rps3*, *rpl16* e *rpl14*. Os exons estão representados em cinza e o íntron *rpl16* em branco. As linhas indicam regiões intergênicas. As setas representam a direção de amplificação dos “primers” utilizados: *rps3* e *L16exon2* (Downie *et al.* 2000) e *rpl16F71* e *rpl16R1516* (Shaw *et al.* 2005).

Os protocolos de amplificação e as seqüências dos “primers” específicos para cada marcador são listados na tabela 2. Todas as reações de PCR contaram com um controle negativo, sem adição de DNA, para possibilitar a constatação de eventual contaminação. As reações de amplificação do marcador *rpoC1* tiveram ainda dois outros controles: *Passiflora elegans* e *Passiflora lobbii* subsp. *ayacuchoensis*, com e sem o íntron do gene *rpoC1*, respectivamente.

As reações de PCR foram verificadas através de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Foram utilizados 3,5 µl do volume total de cada reação, com a adição de 2 µl de azul de bromofenol (glicerol 20%), para cada verificação.

Tabela 2. Protocolos de amplificação e seqüências de “primers” para os marcadores moleculares *rpoC1*, ITS e *rpl16*.

Marcador	Componentes da Reação de PCR		Condições de Amplificação	Seqüências dos “primers”	Fonte
<i>rpoC1</i>	Tampão	1X	94 °C por 5 min		Downie <i>et al.</i> 1996b
	dNTP	0,2 mM	30 ciclos de:	5' <i>rpoC1</i> 5' ACGTCTTCCTAGYTAYATHGC 3'	
	Primer 5' <i>rpoC1</i>	0,2 mM	94 °C por 1 min		
	Primer 3' <i>rpoC1</i>	0,2 mM	50 °C por 1 min	3' <i>rpoC1</i> 5' AATAGACAYAANACCATCCA 3'	
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM	72 °C por 2 min		
	Taq Polimerase	1 U	72 °C por 10 min		
	DNA	50 ng			
<i>rpoC1</i>	Tampão	1X	94 °C por 5 min		
	dNTP	0,2 mM	30 ciclos de:	<i>rpoC1F</i> 5' GAARGCCTAGTATACTKCGA 3'	
	Primer <i>rpoC1F</i>	0,2 mM	94 °C por 1 min		
	Primer <i>rpoC1R</i>	0,2 mM	57 °C por 1 min	<i>rpoC1R</i> 5' AGCTAATTCCAYGCGTCTAACC 3'	
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM	72 °C por 2 min		
	Taq Polimerase	1 U	72 °C por 10 min		
	DNA	50 ng			
ITS	Tampão	1X	94 °C por 3 min		White <i>et al.</i> 1999, modificado neste trabalho
	dNTP	0,2 mM	27 ciclos de:	92 5' AAGGTTTCCGTAGGTGAAC 3'	
	Primer 92	0,2 mM	94 °C por 45 s		
	Primer 75	0,2 mM	63 °C por 1 min	75 5'TATGCTTAAACTCAGCGGG 3'	
	MgCl <sub>2</sub>	mM	72 °C por 1 min 30 s		
	Betaína	1 M	72 °C por 10 min		
	Taq Polimerase	1 U			
	DNA	50 ng			

Tabela 2 (cont.). Protocolos de amplificação e seqüência de “primers” para os marcadores moleculares *rpoC1*, ITS e *rpl16*.

Marcador	Componentes da Reação de PCR		Condições de Amplificação	Seqüências dos “primers”	Fonte
<i>rpl16</i>	Tampão	1X	94°C por 3 min	<i>rps3</i> 5' TTTCTTTTCGAAAAGCAATG 3'	Downie <i>et al.</i> 2000
	dNTP	0,2mM			
	Primer <i>rps3</i>	0,2mM	30 ciclos de: 94°C por 45 s 58°C por 1 min 72°C por 1 min 30 s	<i>L16</i> exon2 5' TCTTCCTCTATGTTGTTTACG 3'	
	Primer <i>L16</i> exon2	0,2mM			
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM			
	Taq Polimerase	1U	72°C por 10 min		
	DNA	50ng			
<i>rpl16</i>	Tampão	1X	94°C por 5 min	<i>rpl16F71</i> 5' GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG 3'	Shaw <i>et al.</i> 2005; modificado neste trabalho
	dNTP	0,2 mM			
	Primer <i>rpl16F71</i>	0,2 mM	30 ciclos de: 94°C por 1min 56°C por 1 min 72°C por 1 min 30 s	<i>rpl16R1516</i> 5' CCCTTCATTCTTCCTCTATGTTG 3'	
	Primer <i>rpl16R1516</i>	0,2 mM			
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM			
	Taq Polimerase	1 U	72°C por 10 min		
	DNA	50 ng			

### 3.4 Seqüenciamento automático

Para que ocorresse a precipitação de moléculas de “primer” e dNTP não incorporadas nas reações de amplificação, os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol e cloreto de sódio, conforme o protocolo de Dunn e Blattner (1986). O seqüenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, GE Health Care), conforme os protocolos que acompanham o equipamento e o “DYEnamic™ET terminator sequencing premix kit”, com marcação terminal fluorescente. A composição e as condições da reação de seqüenciamento são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Composição e condições da reação de seqüenciamento.

Componentes da reação	Volume/massa	Condições de amplificação
“DYEnamic™ET terminator sequencing premix”	4 µl	35 ciclos:
Produto de PCR purificado	40 ng	95° C por 20s
“Primer”	5 µM	50° C por 15s
Água estéril	completar 10 µl	60° C por 1min

### 3.5 Análises filogenéticas

#### 3.5.1 Conjuntos de dados

Os conjuntos de dados para as análises filogenéticas foram formados a partir das seqüências do marcador *rpoC1* e do marcador ITS obtidas durante o desenvolvimento do presente trabalho. Além destas, foram incluídas, para fins de análise, seqüências depositadas no GenBank para o marcador ITS e de *nad1b-c* ainda não publicadas, cedidas por V.C. Muschner. Os números de acesso destas seqüências, bem como os nomes das espécies, estão listados na tabela 4. Embora as seqüências de ITS geradas para este trabalho contenham também a região 5,8S do nrDNA, a maioria das seqüências geradas por outros autores não a contém. Em função disso, a mesma foi excluída de nossas análises.

Foram analisados numerosos conjuntos de dados. O primeiro consistiu das seqüências do marcador *rpoC1*, incluindo o íntron e os exons. Para estas análises foram utilizadas como grupos externos três espécies: *Dilkea johannesii*, pertencente à tribo Passiflorieae (a mesma do gênero *Passiflora*), *Paropsia madagascariensis*, da tribo

Paropsiae e família Passifloraceae e *Turnera subulata*, da família Turneraceae, bastante próxima de Passifloraceae (Cervi 1997; Judd *et al.* 1999; APGII 2003; Soltis *et al.* 2005). Os mesmos grupos externos foram utilizados para as análises filogenéticas das seqüências do íntron *rpoC1* e das seqüências parciais dos exons do gene separadamente, bem como nas análises com as seqüências dos introns *rpoC1* e *nad1b-c*. Foi encontrada uma inserção de três pb no éxon 2 do gene *rpoC1* nas seqüências de duas espécies do gênero *Passiflora*, *P. micropetala* e *P. vespertilio*, e em dois dos grupos externos, *Paropsia madagascariensis* e *Turnera subulata*. As seqüências do marcador *rpoC1* foram analisadas também com a exclusão destas quatro espécies, para verificar possível influência das mesmas na topologia das árvores resultantes.

As demais análises filogenéticas foram conduzidas para cada subgênero em separado. Esta estratégia foi seguida em função da alta variabilidade dos marcadores, com indícios de saturação para o marcador *rpoC1*, que dificultou o alinhamento das seqüências. Além disso, Muschner *et al.* (2003) constataram saturação também nas seqüências de ITS1 e ITS2 quando os subgêneros eram analisados em conjunto. A estratégia de enraizamento de análises filogenéticas com espécies de outro subgênero já foi utilizada para *Passiflora* por Krosnick e Freudenstein (2005), que enraizaram árvores com espécies da superseção *Disemma* com espécies do subgênero *Deidamioides*.

Além de facilitar o alinhamento, realizar as análises por subgênero contribuiu para a diminuição das distâncias genéticas máximas em cada conjunto de dados. Sabe-se que grandes distâncias genéticas entre as seqüências levam a erros de alinhamento e de topologia nas árvores resultantes, sobretudo em alinhamentos que incluem espécies com diferentes comprimentos de ramos (Simmons & Ochoterena 2000; Ogden & Rosenberg 2006), que é o caso de *Passiflora* (Muschner 2005). Para resolver este problema, Simmons e Freudenstein (2003) propuseram incluir o maior número possível de seqüências no alinhamento, o que também para diminuiria o efeito da atração dos ramos longos. Entretanto como mesmo com um grande número de seqüências os subgêneros de *Passiflora* são marcadamente distintos, foi utilizada a estratégia de incluir o maior número possível de seqüências e separar os alinhamentos por subgênero.

O subgênero *Deidamioides* foi escolhido como grupo externo para as análises dos demais subgêneros isoladamente por mostrar-se basal em outras análises filogenéticas do gênero *Passiflora* (Muschner *et al.* 2003; Muschner 2005) e também por apresentar um pequeno número de espécies, facilitando o alinhamento entre as seqüências de dois subgêneros distintos. Além disso, a utilização do subgênero *Deidamioides* como grupo externo facilitou as análises das relações entre as espécies do mesmo, uma vez que o

subgênero é composto por apenas 13 espécies, das quais contamos com cinco, representando 38% do total. Para garantir a confiabilidade da estratégia escolhida foram realizadas análises filogenéticas através do método bayesiano para o marcador ITS utilizando as demais combinações de subgêneros, *Decaloba* e *Astrophea*, *Passiflora* e *Astrophea* e *Passiflora* e *Decaloba* (dados não mostrados). Tais análises resultaram em árvores em que os subgêneros formaram clados distintos. Assim, pode-se concluir que a separação entre os subgêneros verificada nas análises que tiveram espécies de *Deidamioides* como raiz não foi devida aos números amostrais discrepantes, e sim às diferenças existentes entre as seqüências.

Foram realizadas ainda análises filogenéticas com as seqüências dos marcadores ITS e *rpoC1* concatenadas. Espécies do subgênero *Deidamioides* foram utilizadas como grupo externo, uma vez que a abordagem por subgênero mostrou resultados satisfatórios nas análises para cada marcador isoladamente. Neste caso, o conjunto de dados continha um percentual elevado de dados faltantes (cerca de 30%). Roure *et al.* (2007) relataram a utilização de conjuntos de dados com até 30% de dados faltantes e conjuntos com até 40% de dados faltantes vêm sendo utilizados sem prejuízo à análise filogenética e às conclusões obtidas (E. Eizirik, comunicação pessoal). Esta abordagem não pôde ser utilizada com o subgênero *Decaloba*, devido à inclusão de diversas seqüências de ITS de espécies da superseção *Disemma*, do sudeste asiático, obtidas da literatura (Krosnick e Freudenstein 2005). Estas espécies, e algumas outras para as quais só dispúnhamos da seqüência de um marcador foram excluídas do conjunto de dados concatenados porque representavam, sozinhas, quase 50% de todas as informações.

Por último, seqüências dos introns do grupo II *nad1b-c* e *rpoC1* foram concatenadas. Nestas análises foram incluídas somente espécies para as quais havia seqüência dos dois marcadores disponíveis.



Tabela 4. Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos, cujas seqüências foram obtidas no GenBank para os marcadores ITS1, ITS2 e/ou *nad1b-c*, e os números de acesso no banco de dados correspondentes.

<i>Subgênero, tribo ou família</i>	Espécie	N° acesso GenBank ITS1	N° acesso GenBank ITS2	N° acesso GenBank ITS1, 5,8S e ITS2	N° acesso GenBank <i>nad1b-c</i>
<i>Astrophea</i>	<i>P. amoena</i> L. K. Escobar	-	-	-	DQ123214
	<i>P. candida</i> (P. & E.) Mast.	-	-	DQ521279	DQ123216
	<i>P. citrifolia</i> (Juss.) Mast.	AY210939	AY210920	-	DQ123218
	<i>P. haematostigma</i> Mast.	AY032835	AY032794	-	-
	<i>P. lindeniana</i> Tr. & Pl.	-	-	-	DQ123221
	<i>P. macrophylla</i> Spruce ex Mast.	AY210944	AY210925	-	DQ123222
	<i>P. mansoi</i> (Mart.) Mast.	AY102361	AY102381	-	-
	<i>P. pittieri</i> Mast.	-	-	-	DQ123224
<i>Decaloba</i>	<i>P. adenopoda</i> DC.	-	-	AY632702	-
	<i>P. aurantia</i> G. Forester	-	-	AY632704	-
	<i>P. auriculata</i> Kunth	-	-	DQ284532	-
	<i>P. biflora</i> Lam.	-	-	AY632705	-
	<i>P. capsularis</i> L.	AY032837	AY032796	-	-
	<i>P. cinnabarina</i> Lindl.	-	-	AY632706	-
	<i>P. coriacea</i> Juss.	AY210940	AY210923	-	-
	<i>P. cupiformis</i> Mast.	-	-	AY632708	-

*continua*

Tabela 4 (cont.). Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos, cujas seqüências foram obtidas no GenBank para os marcadores ITS1, ITS2 e/ou *nad1b-c*, e os números de acesso no banco de dados correspondentes.

<i>Subgênero, tribo ou família</i>	Espécie	N° acesso GenBank ITS1	N° acesso GenBank ITS2	N° acesso GenBank ITS1, 5,8S e ITS2	N° acesso GenBank <i>nad1b- c</i>
<i>Decaloba</i>	<i>P. cuprea</i> L.	AY210941	AY210922		-
	<i>P. guatemalensis</i> S. Watson	-	-	DQ087419	-
	<i>P. helleri</i> Peyr.	AY210942	AY210923	-	-
	<i>P. herbertiana</i> Lindl.	-	--	AY632711	-
	<i>P. jugorum</i> W.W. Smith	-	-	AY632712	-
	<i>P. lancetillensis</i> MacDougal & Meerman	AY210943	AY210924	-	DQ123242
	<i>P. lobata</i> (Killip) J. MacDougal	-	-	AF454808	-
	<i>P. lutea</i> L.	-	-	DQ006022	-
	<i>P. membranacea</i> Benth.	-	-	AY632701	-
	<i>P. mexicana</i> Juss.	-	-	AY632713	-
	<i>P. misera</i> HBK.	AY032838	AY032797		-
	<i>P. moluccana</i> var. <i>glaberrima</i> (Gagnep.) W.J. de Wilde	-	-	DQ284536	-
	<i>P. moluccana</i> var. <i>teysmanniana</i> (Miq.) W.J. de Wilde	-	-	AY632714	-

*continua*

Tabela 4 (cont.). Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos, cujas seqüências foram obtidas no GenBank para os marcadores ITS1, ITS2 e/ou *nad1b-c*, e os números de acesso no banco de dados correspondentes.

<u>Subgênero, tribo ou família</u>	Espécie	N° acesso GenBank ITS1	N° acesso GenBank ITS2	N° acesso GenBank ITS1, 5,8S e ITS2	N° acesso GenBank <i>nad1b-c</i>
<i>Decaloba</i>	<i>P. morifolia</i> Mast. in Mart.	AY032842	AY032798	-	-
	<i>P. multiflora</i> L.	AY210945	AY210926	-	DQ123211
	<i>P. murucuja</i> L.	-	-	AY648559	-
	<i>P. organensis</i> Gardn.	AY032839	AY032799	-	-
	<i>P. pohlii</i> Mast. In Mart.	AY032840	AY032799	-	-
	<i>P. punctata</i> L.	AY210946	AY210927	-	-
	<i>P. rubra</i> L.	AY032836	AY032795	-	-
	<i>P. rufa</i> Feuillet	AY210948	AY210929	-	-
	<i>P. sexflora</i> Juss.	AY210949	AY210930	-	-
	<i>P. siamica</i> Craib	-	-	AY632717	-
	<i>P. suberosa</i> L.	AY032841	AY032800	-	-
	<i>P. talamancensis</i> Killip	-	-	AF454809	-
	<i>P. tricuspis</i> Mast. in Mart.	AY102348	AY102368	-	-
	<i>P. truncata</i> Regel	AY102354	AY102374	-	-
	<i>P. tulae</i> Urban	AY102352	AY102372	-	-
<i>P. xiikzodz</i> MacDougal	AY210950	AY210931	-	-	
<i>Deidamioides</i>	<i>P. arbelaezii</i> Uribe	-	-	AY632703	-

continua

Tabela 4 (cont.). Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos, cujas seqüências foram obtidas no GenBank para os marcadores ITS1, ITS2 e/ou *nad1b-c*, e os números de acesso no banco de dados correspondentes.

<u>Subgênero, tribo ou família</u>	Espécie	N° acesso GenBank ITS1	N° acesso GenBank ITS2	N° acesso GenBank ITS1, 5,8S e ITS2	N° acesso GenBank <i>nad1b-c</i>
<i>Deidamioides</i>	<i>P. cirrhiflora</i> Juss.	-	-	-	DQ123273
	<i>P. ovalis</i> Vell. (ex <i>Tetrastylis ovalis</i> )	AY210955	AY210936	-	DQ123295
<i>Passiflora</i>	<i>P. actinia</i> Hook	AY032832	AY032791	-	DQ123257
	<i>P. alata</i> Curtis	AY032826	AY032785	-	DQ123258
	<i>P. ambigua</i> Hemsl.	-	-	-	DQ123259
	<i>P. amethystina</i> Mikan	AY102347	AY102367	-	-
	<i>P. antioquiensis</i> Karst.	-	-	-	DQ123252
	<i>P. caerulea</i> L.	AY032824	AY032782	-	DQ123260
	<i>P. campanulata</i> Mast.	AY032829	AY032788	-	DQ123249
	<i>P. cincinnata</i> Mast.	AY102363	AY102400	-	DQ123261
	<i>P. edmundoi</i> Sacco	AY102351	AY102371	-	DQ123262
	<i>P. edulis</i> Sims	AY032831	AY032790	-	DQ123263
	<i>P. eichleriana</i> Mast.	AY102346	AY102366	-	-
	<i>P. elegans</i> Mast.	AY032833	AY03792	-	DQ123264
	<i>P. foetida</i> L.	-	-	-	DQ123247
	<i>P. gabielliana</i> sp. nova	AY210953	AY210934	-	-
	<i>P. galbana</i> Mast.	AY032843	AY032784	-	DQ123265
	<i>P. garckeii</i> Mast.	AY210952	AY102377	-	-

*continua*

Tabela 4 (cont.). Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos, cujas seqüências foram obtidas no GenBank para os marcadores ITS1, ITS2 e/ou *nad1b-c*, e os números de acesso no banco de dados correspondentes.

<u>Subgênero, tribo ou família</u>	Espécie	N° acesso GenBank ITS1	N° acesso GenBank ITS2	N° acesso GenBank ITS1, 5,8S e ITS2	N° acesso GenBank <i>nad1b-c</i>
<i>Passiflora</i>	<i>P. incarnata</i> L.	AY032830	AY032789	-	DQ123266
	<i>P. jilekii</i> Wawra	AY102360	AY102387	-	DQ123267
	<i>P. kermesina</i> Link & Otto	AY032825	AY032783	-	-
	<i>P. luetzelburgii</i> Harms	-	-	-	DQ123281
	<i>P. maliformis</i> L.	AY210956	AY210937	-	DQ123268
	<i>P. mathewsii</i> (Mast.) Killip	-	-	-	DQ123277
	<i>P. miersii</i> Mast.	AY102350	AY102370	-	-
	<i>P. mucronata</i> Lam.	AY210951	AY210932	-	-
	<i>P. palmeri</i> Killip	-	-	-	DQ123248
	<i>P. platyloba</i> Killip	-	-	AF454798	-
	<i>P. quadrangularis</i> L.	AY032827	AY032786	-	-
	<i>P. racemosa</i> Brot.	-	-	-	DQ123225
	<i>P. recurva</i> Mast. in Mart.	AY102349	AY102369	-	-
	<i>P. reflexiflora</i> Cav.	AY210947	AY210928	-	-
	<i>P. serratifolia</i> L.	AY210954	AY210935	-	-
	<i>P. serratodigitata</i> L.	AY210957	AY210938	-	-
	<i>P. setacea</i> DC.	AY102356	AY102376	-	-

*continua*

Tabela 4 (cont.). Espécies de *Passiflora*, classificadas por subgênero, e grupos externos, cujas seqüências foram obtidas no GenBank para os marcadores ITS1, ITS2 e/ou *nad1b-c*, e os números de acesso no banco de dados correspondentes.

<u>Subgênero, tribo ou família</u>	Espécie	N° acesso GenBank ITS1	N° acesso GenBank ITS2	N° acesso GenBank ITS1, 5,8S e ITS2	N° acesso GenBank <i>nad1b-c</i>
<i>Passiflora</i>	<i>P. setulosa</i> Killip	AY032828	AY032787	-	-
	<i>P. sidaefolia</i> M. Roemer	AY102353	AY102373	-	DQ123270
	<i>P. speciosa</i> Gardn.	AY102362	AY102382	-	DQ123244
	<i>P. sprucei</i> Mast.	-	-	-	DQ123271
	<i>P. tenuifila</i> Killip	AY032823	AY032781	-	DQ123272
	<i>P. umbilicata</i> (Griseb.) Harms	-	-	-	DQ123284
	<i>P. urubicensis</i> Cervi	AY102355	AY102375	-	
	<i>P. villosa</i> Vell.	AY102357	AY102377	-	DQ123251
	<i>P. vitifolia</i> HBK.	-	-	AF454796	DQ123245
<u>Passifloreae</u>	<i>Dilkea johannesii</i> Barb. Rodr.	-	-	-	DQ123290
<u>Paropsieae</u>	<i>Paropsia madagascariensis</i> (Mast.) H. Perrier	-	-	-	DQ123293
<u>Turneraceae</u>	<i>Turnera subulata</i> Sm.	-	-	-	DQ123296

### 3.5.2 Visualização, alinhamento e caracterização das seqüências

As seqüências foram visualizadas no programa Chromas 2.0 (*Technelysium*, Helensvale, Australia). Para os marcadores *rpoC1* e *nad1b-c*, o alinhamento das mesmas foi realizado manualmente, com auxílio do programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997). As seqüências do marcador ITS foram alinhadas automaticamente através do programa ClustalX (Thompson *et al.* 1997), com os parâmetros padrão propostos pelos autores. Os alinhamentos foram refinados manualmente no programa GeneDoc. Os sítios variáveis e a composição nucleotídica foram estimados no programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004). As análises de saturação, através da comparação do número de transições e transversões, foram realizadas no programa DAMBE (Xia & Xie 2001).

### 3.5.3 Modelos evolutivos

Os modelos evolutivos utilizados nas análises de “neighbor-joining” e máxima verossimilhança foram obtidos no programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998). Para as inferências através de análise bayesiana foram utilizados modelos determinados pelo programa MrModeltest (Nylander 2004). Os modelos utilizados nas análises foram aqueles determinados, em ambos os programas, através do “Akaike Information Criterion” (Posada & Buckley 2004; Kelchner & Thomas 2007). Os modelos evolutivos selecionados para cada conjunto de dados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Modelos evolutivos (ME) selecionados através dos programas Modeltest e MrModeltest para os diferentes conjuntos de dados utilizados para as análises filogenéticas.

Conjunto de dados	ME Modeltest	ME MrModeltest
íntron e exons <i>rpoC1</i>	GTR+I+G	GTR+I+G
íntron <i>rpoC1</i>	K81uf+I+G	GTR+I+G
exons <i>rpoC1</i>	GTR+G	GTR+G
ITS subgêneros <i>Astrophea</i> e <i>Deidamioides</i>	GTR+G	GTR+G
ITS subgêneros <i>Decaloba</i> e <i>Deidamioides</i>	SYM+G	SYM+I+G
ITS subgêneros <i>Passiflora</i> e <i>Deidamioides</i>	GTR+I+G	GTR+I+G
<i>rpoC1</i> subgêneros <i>Astrophea</i> e <i>Deidamioides</i>	TrN+I	GTR+I+G
<i>rpoC1</i> subgêneros <i>Decaloba</i> e <i>Deidamioides</i>	TVM+G	GTR+G
<i>rpoC1</i> subgêneros <i>Passiflora</i> e <i>Deidamioides</i>	TVM+I+G	GTR+I+G
<i>rpoC1</i> e ITS subgêneros <i>Astrophea</i> e <i>Deidamioides</i>	HKY+G	HKY+G
<i>rpoC1</i> e ITS subgêneros <i>Decaloba</i> e <i>Deidamioides</i>	TrN+I+G	GTR+I+G
<i>rpoC1</i> e ITS subgêneros <i>Passiflora</i> e <i>Deidamioides</i>	GTR+I+G	GTR+I+G
introns <i>nad1b-c</i> e <i>rpoC1</i>	TVM+I+G	GTR+I+G

### 3.5.4 Análises de distância

As análises filogenéticas através de distância foram realizadas pelo método de “neighbor joining” (NJ) (Saitou & Nei 1987), no programa PAUP\* versão 4.0 (Swofford 1998) para Windows, com modelo evolutivo selecionado no programa Modeltest. As análises também foram realizadas com os “gaps” de cada conjunto de dados codificados conforme o modelo proposto por Simmons *et al.* (2001), implementado no programa GapCoder (Young & Healy 2003), uma vez que as seqüências dos marcadores *rpoC1*, *nad1b-c* e ITS são ricas em indels. Foram realizadas 1000 replicações de “bootstrap” (Felsenstein 1985) para cada análise.

### 3.5.5 Análises de parcimônia

As análises filogenéticas através do método de máxima parcimônia (MP) foram realizadas no programa PAUP\* versão 4.0 para Windows. Foi utilizada busca heurística, pois o número de *taxa* nas análises excedeu o número viável para busca exaustiva (onde todas as árvores possíveis são visitadas pelo programa em busca da mais parcimoniosa), com adição de *taxa* passo a passo (“stepwise addition”) e TBR (“Tree Bisection and



Reconnection”) como método de rearranjo dos ramos). Foram realizadas 1000 replicações de “bootstrap” para cada análise.

### 3.5.6 Análises de máxima verossimilhança

As análises filogenéticas de máxima verossimilhança (ML) foram realizadas no programa PhyML (Guindon & Gascuel 2003), com árvore inicial gerada pelo método de “neighbor-joining”. Os modelos evolutivos utilizados foram aqueles determinados pelo programa Modeltest. No caso de modelos selecionados não implementados no PhyML, foi utilizado o melhor modelo disponível, de acordo com o arquivo de saída do programa Modeltest. Foram realizadas 100 replicações de “bootstrap” para cada análise.

### 3.5.7 Análise bayesiana

As análises filogenéticas através de inferência bayesiana foram realizadas no programa MrBayes v3.0b4 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). As probabilidades *a priori* das frequências dos nucleotídeos, o modelo para variação das taxas de substituição entre os sítios e o número de tipos de substituição para cada conjunto de dados foram determinados no programa MrModeltest. Foram utilizadas quatro cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) para um milhão de gerações a cada análise. As árvores foram amostradas a cada 100 gerações e o número de gerações necessárias até que cada parâmetro se tornasse estável (“burn-in”) foi definido após inspeção visual de gráficos criados no programa Excel (Windows Office), com os valores de “log-likelihood” gerados pelo programa MrModeltest. Para determinar a probabilidade posterior de cada bipartição, uma árvore consenso foi construída no programa PAUP, utilizando a regra do consenso da maioria (“50% majority-rule consensus”).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amplificação, seqüenciamento, alinhamento e caracterização das seqüências

A proposição inicial do presente estudo incluía a análise de quatro marcadores, os: espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear, introns de grupo II dos genes plastidiais *rpoC1* e *rpl16* e o íntron de grupo II do gene mitocondrial *nad1* entre os exons b-c, em espécies do gênero *Passiflora*. As análises filogenéticas propostas visavam elucidar questões infra-subgenéricas ainda não respondidas em outras filogenias construídas para o gênero e também determinar o potencial de uso destes marcadores para esclarecer as relações evolutivas entre as espécies do gênero.

Como descrito no item Material e Métodos, foram seguidos protocolos clássicos, já bem estabelecidos na literatura, para a obtenção das seqüências dos marcadores a serem analisadas. Além destes, diversos testes foram desenvolvidos para ampliar a precisão metodológica.

Foram seqüenciadas 95 espécies de *Passiflora*, além de três grupos externos, para o marcador *rpoC1*, e 35 espécies para o marcador ITS sem que ajustes metodológicos marcantes fossem necessários.

Para as seqüências do íntron do gene *rpl16*, embora tenham sido empregados dois conjuntos de “primers”, não foi alcançado sucesso nas amplificações utilizando os “primers” *rps3* e *L16exon2* (Downie *et al.* 2000), nem no seqüenciamento, usando fragmentos obtidos com os “primers” *rpl16F71* e *rpl16R1516* (Shaw *et al.* 2005). Embora a maioria das reações de amplificação tenham resultado em fragmentos com o tamanho esperado, cerca de 1400 pb, fragmentos menores foram obtidos em algumas espécies. A ocorrência destes fragmentos menores foi atribuída a possíveis deleções na seqüência, a exemplo do que ocorre com outro íntron do grupo II, *nad1b-c*, no gênero *Passiflora* (Muschner 2005). Após o seqüenciamento de algumas amostras contemplando os diferentes tamanhos de fragmentos obtidos, ficou clara a impossibilidade de utilização destas seqüências nas análises, pois os eletroferogramas do “primer” *rpl16F71* perdiam a qualidade necessária para o correto “base calling” antes de atingir 300 nucleotídeos (figura 6). Este problema pode ter sido causado por eventos de inserção ou deleção na região poliA anterior, referidos como bastante comuns em introns do grupo II (Kelchner 2002). A amplificação e o seqüenciamento do íntron plastidial *rpl16* em *Passiflora* somente será possível com o desenho de “primers” específicos para estas espécies, bem como de “primers” internos que garantam a obtenção de toda a seqüência do marcador, o que deverá ser feito após a finalização desta dissertação. Assim, devido ao pequeno

volume de informações obtido para este marcador, ele não foi considerada na análise.

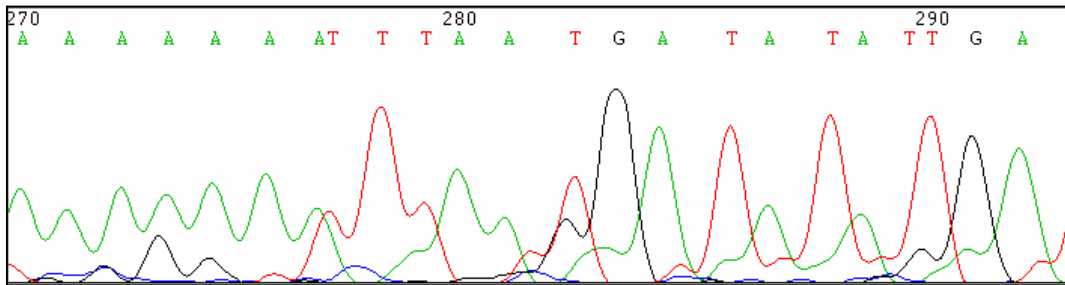


Figura 6. Eletroferograma da seqüência de *P. cirrhiflora* para o primer *rpl16F71*, indicando a perda de qualidade do seqüenciamento após a base 276.

Para o marcador *rpoC1*, na presença do íntron, foram amplificados aproximadamente 1200 pb, sendo 50 pb correspondentes ao éxon 1, região anterior à junção éxon 1/íntron, e 350 pb do éxon 2, na região posterior à junção íntron/éxon 2, com o conjunto de primers de Downie *et al.* (1996b). Com a utilização dos “primers” desenhados por nosso grupo para o gênero *Passiflora*, descritos neste trabalho, os fragmentos amplificados apresentaram cerca de 1000 pb, com redução na extensão de exons amplificada, uma vez que estes “primers” foram desenhados a partir de seqüências obtidas com os anteriores. Para o marcador ITS, os fragmentos amplificados apresentaram cerca de 700 pares de bases. A região ITS1 com aproximadamente 280 pb; o gene 5,8S, com 160 pb, e ITS2 com 250 pb. Para o marcador *nad1* b-c, as seqüências utilizadas foram obtidas de Muschner (2005). Informações sobre os alinhamentos e as seqüências são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Tamanho da seqüência (em pb), extensão do alinhamento, número de sítios variáveis e porcentagem média de guanina e citosina (G-C) para os marcadores *rpoC1* e ITS1 e ITS2 em diferentes conjuntos de dados.

Marcador	Tamanho da seqüência (pb)	Extensão alinhamento	Sítios variáveis	%G-C média
<i>rpoC1</i>				
exons	316 - 319	319	130	37,1
íntron	740 - 761	837	173	35,9
<i>Astrophea</i> *	1046 - 1065	1078	67	36,3
<i>Decaloba</i> *	316 - 1068	1078	83	36,3
<i>Deidamioides</i> *	973-1019	1069	23	36,2
<i>Passiflora</i> *	1056 - 1074	1117	139	36,3
ITS1				
<i>Astrophea</i>	275 – 280	288	68	63,7
<i>Decaloba</i>	260 – 278	306	227	52,9
<i>Deidamioides</i>	209 – 272	284	105	62,6
<i>Passiflora</i>	217 – 239	266	139	65,2
ITS2				
<i>Astrophea</i>	184 – 200	204	37	65,8
<i>Decaloba</i>	179 – 187	198	118	55,0
<i>Deidamioides</i>	171 – 198	201	49	66,2
<i>Passiflora</i>	164 – 207	218	118	69,1
introns				
<i>nad1b-c e rpoC1</i>	1904- 2358	2490	308	47,1

\* exons e íntron

Todos os alinhamentos apresentaram um grande número de “indels”, diversos dos quais com extensão variada entre as espécies. Em função disso tornou-se inviável a apresentação de uma tabela indicando as inserções e deleções que ocorreram em cada marcador e espécie. Para fins de publicação, os alinhamentos serão disponibilizados em um banco de dados “on line” como o TreeBASE.

A extensão dos alinhamentos, bem como o alto número de sítios variáveis verificados nos conjuntos de dados do marcador ITS estão de acordo com os dados da literatura, especialmente com os trabalhos de Muschner *et al.* (2003) e de Krosnick e Freudenstein (2005), que também utilizaram este marcador para inferências filogenéticas no gênero *Passiflora*. O conteúdo de G-C foi menor no subgênero *Decaloba* que nos demais. Outros autores já constataram diferenças significativas entre os subgêneros (Muschner *et al.* 2003, Mäder 2005) quanto a este parâmetro.

Muscher *et al.* (2003) verificaram saturação do marcador ITS em *Passiflora*, analisando o gênero como um todo. Em nossas análises não encontramos evidência de saturação para o marcador nos subgêneros *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora*, somente no subgênero *Deidamioides* (figura 7). Esta é uma evidência de que a variação das seqüências de ITS reside, em grande parte, entre os subgêneros. Em função disso, a estratégia de análise por subgênero mostrou-se eficiente para evitar problemas

decorrentes de saturação. Em trabalhos de genética populacional foi verificada a existência de variação intraespecífica em seqüências de ITS no gênero *Passiflora* e a presença de sítios heterozigotos (Lorenz-Lemke *et al.* 2005, Mäder 2005, Koehler-Santos *et al.* 2006). A presença destes sítos indica que, em uma determinada posição na seqüência, cópias parálogas do marcador possuem diferentes nucleotídeos e isto é um indicativo de não homogeneização das cópias. Neste trabalho, adicionamos DMSO às reações de amplificação de ITS, para impedir a amplificação de cópias presentes em baixo número, caso presentes. Exceto pelos trabalhos já citados, pouco se sabe sobre a evolução das cópias parálogas de nrDNA em *Passiflora*. Uma perspectiva interessante é a amplificação e posterior clonagem e seqüenciamento das mesmas em espécies de diferentes subgêneros. Assim, poderão ser esclarecidas quaisquer dúvidas quanto à validade das informações inferidas para o gênero *Passiflora* a partir de seqüências de ITS.

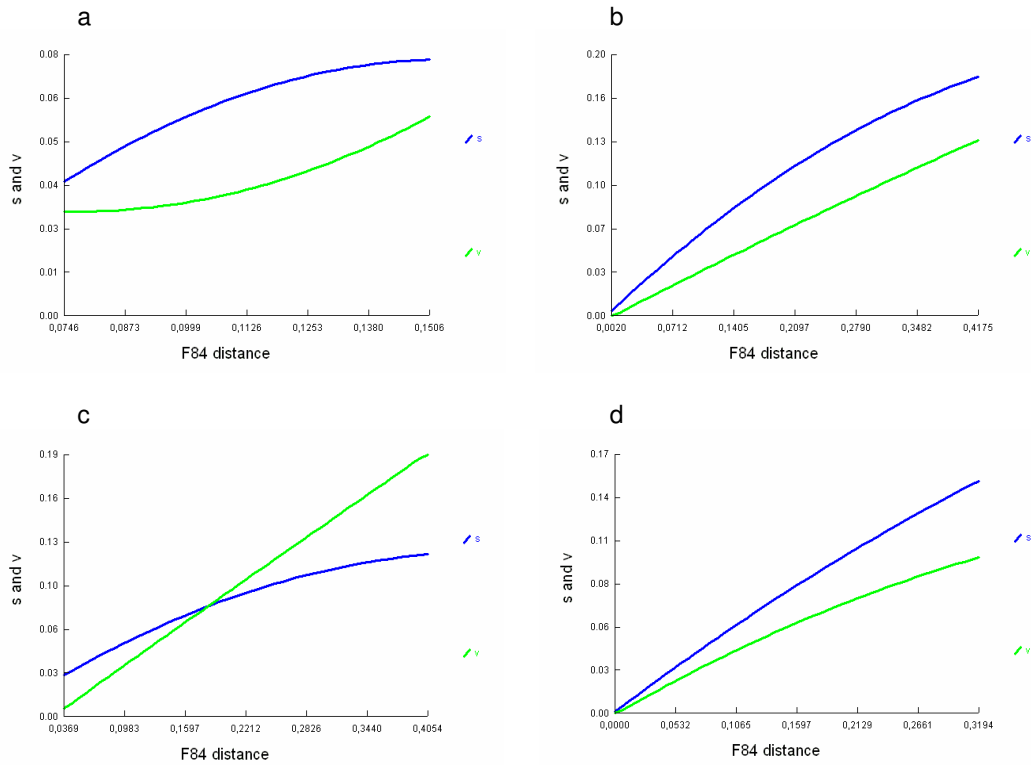


Figura 7. Gráficos de transição (s) e transversão (v) em função da distância (F84) obtidos no programa DAMBE, para o marcador ITS nos subgêneros *Astrophea* (a), *Decaloba* (b), *Deidamioides* (c) e *Passiflora* (d). Índices de transversões superiores aos de transições indicam saturação.

Quanto ao marcador *rpoC1*, a extensão das seqüências está de acordo com os dados da literatura (Wallace & Cota 1996, Downie *et al.* 1998, Downie *et al.* 2000). Não foi verificada saturação do marcador no subgênero *Passiflora*. Já nos subgêneros *Astrophea*, *Decaloba* e *Deidamioides* o marcador mostrou-se saturado, assim como quando analisadas todas as seqüências do íntron e dos exons (figura 8).

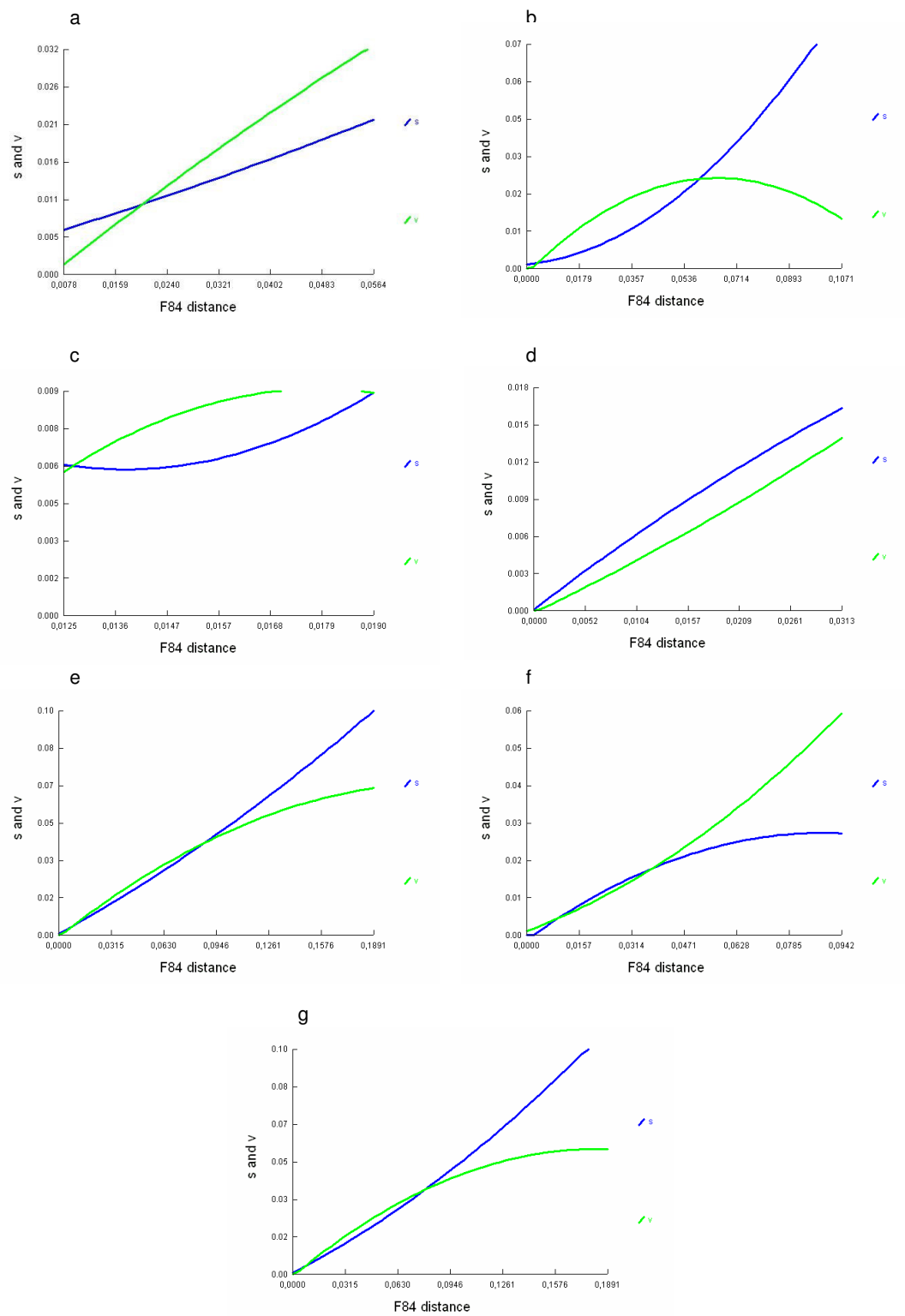


Figura 8. Gráficos de transição (s) e transversoão (v) em função da distância (F84) obtidos no programa DAMBE, para o marcador *rpoC1* (íntron e exons) nos subgêneros *Astrophea* (a), *Decaloba* (b), *Deidamioides* (c) e *Passiflora* (d), para os exons (e) e íntron (f) de todas as espécies, e para exons e íntron de todas as espécies amostradas (g). Índices de transversoões superiores aos de transições indicam saturação.

Foi verificada uma inserção de três nucleotídeos entre as posições 66 e 69 do alinhamento do éxon 2 do gene plastidial *rpoC1*. As amostras foram re-seqüenciadas e a presença da mesma foi confirmada. A inserção está presente em quatro espécies: *P. micropetala*, *P. vespertilio*, *Paropsia madagascariensis* e *Turnera subulata*, e se apresenta de duas formas: AAA, códon para lisina, em *Paropsia madagascariensis* e GAA, códon para glutamina, nas demais espécies. Após busca e alinhamento das seqüências disponíveis no GenBank, não foram encontradas quaisquer inserções nesta posição em *Amborella trichopoda* Baill., uma das angiospermas mais basais segundo Soltis *et al.* (2005), nem em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (da família Brassicaceae), *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae), *Gossypium barbadense* L. (Malvaceae), *Morus indica* L. (Moraceae), *Nymphaea Alba* L. (Nymphaeaceae), *Piper cenocladum* C. DC. (Piperaceae), *Ranunculus macranthus* Scheele (Ranunculaceae) e *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae), todas espécies cujo genoma plastidial já foi completamente seqüenciado. O fato da inserção não estar presente nas demais espécies de *Passiflora*, além de os nucleotídeos inseridos codificarem diferentes aminoácidos suporta a hipótese de que estas inserções não derivam de um ancestral comum. Devem ter acontecidos no mínimo três eventos independentes de inserção.

Outra característica marcante dos exons do gene plastidial *rpoC1*, ao menos das porções seqüenciadas, é o alto número de substituições nucleotídicas. Os números médios de substituições sinônimas e não sinônimas corrigidas (dS e dN, respectivamente) foram estimados no programa Mega 3.1 (dados não mostrados) e foram aparentemente diferentes entre os subgêneros. O subgênero *Astrophea* apresentou valor de dN maior que dS. Entretanto, o desvio padrão desta diferença foi elevado, provavelmente devido ao pequeno número de espécies deste subgênero na amostra. Taxas de substituição não sinônimas maiores que sinônimas são indicativas da ocorrência de seleção natural diversificadora (Nei & Kumar 2000), mas não temos indícios suficientes para inferir se está ocorrendo seleção diversificadora no segundo éxon do gene que codifica a maior subunidade da RNA-polimerase plastidial. Outras espécies do subgênero, bem como a totalidade do éxon, devem ser seqüenciadas para que possam ser feitas inferências mais fundamentadas sobre o tema.

#### 4.2 Análises filogenéticas

Numa abordagem filogenética, os diferentes autores não chegam a um consenso sobre qual o melhor método a ser utilizado. Além disso, aparentemente, o que serve para alguns gêneros não serve para outros. Sabe-se das limitações da análise filogenética por



máxima parcimônia como a atração dos ramos longos, por exemplo (Felsenstein 1978, Schlemmeister 2004, Phillippe et al. 2005, entre outros). Quanto aos métodos de distância, sabe-se das limitações relacionadas ao tamanho das seqüências e a perda de informação sobre os tipos de substituição (Lacey & Chang 2006, por exemplo). Para a análise bayesiana, Suzuki *et al.* (2002) demonstraram que os valores de probabilidade posterior são bastante liberais quando comparados com os de “bootstrap” de análises de máxima verossimilhança, concluindo que os últimos são mais indicados para acessar a confiabilidade dos relacionamentos filogenéticos. Por outro lado, a demanda computacional de análises de máxima verossimilhança é grande, e Alfaro *et al.* (2003) demonstraram que estimativas de probabilidade posterior através de MCMC são um bom preditor de confiabilidade de relacionamentos filogenéticos e que em alguns casos suportam topologias corretas com altos valores de suporte utilizando análises com menor número de caracteres do que os necessários em análises de máxima verossimilhança. Desta forma, optou-se neste trabalho por realizar análises filogenéticas através de quatro métodos: distância (“neighbor joining”), máxima parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana. Nem todas as árvores geradas nas diferentes análises serão apresentadas, embora seus valores de suporte sejam eventualmente citados.

De toda a forma, nossos resultados foram interpretados com cautela e sempre buscamos suporte para nossas conclusões taxonômicas em características morfológicas.

#### 4.3 Análises filogenéticas: subgênero *Astrophea*

As análises filogenéticas do subgênero *Astrophea* realizadas com as seqüências de ITS confirmaram a monofilia do grupo, apresentando valores de “bootstrap” (BS) referentes aos diferentes métodos de análises utilizados entre 93 e 100 e probabilidade posterior (PP) 1,00 (figuras 9 e 10). Esse resultado está de acordo com o obtido nas filogenias do gênero já publicadas (Muschner *et al.* 2003; Yockteng & Nadot 2004; Muschner 2005; Hansen *et al.* 2006). Nossas análises contaram com duas espécies da superseção *Pseudoastrophea*, seção *Pseudoastrophea*, *P. haematostigma* e *P. mansoi*. Em todas as árvores filogenéticas geradas por estas análises as duas espécies formaram um clado (BS  $\geq$  98 PP 1,00). As espécies pertencentes à superseção *Astrophea* não formaram um clado em nenhuma das árvores. Já as espécies *P. citrifolia* (da seção *Capreolata*, superseção *Astrophea*) e *P. candida* (seção *Pseudoastrophea*, superseção *Pseudoastrophea*) formaram um agrupamento em todas as árvores obtidas (BS > 80 PP 1,00). Os dois agrupamentos (*P. haematostigma* e *P. mansoi*, *P. citrifolia* e *P. candida*) formaram um grupo com valores de suporte entre 59 e 99 (BS) e 0,95 (PP). Em todas as

árvores geradas para este marcador, exceto na obtida por máxima parcimônia, *P. macrophylla* (superseção *Astrophea*, seção *Astrophea*) é o *taxon* irmão do referido grupo.

O subgênero *Astrophea* teve sua monofilia confirmada também na maioria das análises realizadas com os conjuntos de dados do marcador plastidial *rpoC1*. A análise somente com espécies de *Astrophea*, mais espécies do subgênero *Deidamioides* como grupo externo, contaram com um conjunto de espécies composto por *P. candida*, *P. citrifolia*, *P. macrophylla*, *P. kawensis* (superseção *Pseudoastrophea*, seção *Pseudoastrophea*) *P. amoena* (superseção *Pseudoastrophea*, seção *Botryastrophea*), *P. pittieri* (superseção *Astrophea*, seção *Capreolata*) e *P. lindeniana* (superseção *Astrophea*, seção *Astrophea*), diferente, portanto, do analisado para o marcador ITS. (figura 11). Nas análises realizadas com a seqüência total do marcador (íntron mais seqüências parciais dos exons) (figura 12) o subgênero mostrou-se monofilético (BS 58-71 PP 0,99). O agrupamento entre *P. candida* e *P. citrifolia* foi verificado em todas as árvores, embora com baixos valores de suporte em alguns casos. Nas análises com seqüências parciais do marcador (só o íntron, ou os dois éxons) (figuras 13 e 14) o subgênero só não teve a monofilia confirmada nas análises de MP para os exons e de MP e NJ para o íntron (árvores não mostradas). Atribuímos o resultado, que não se restringiu a este subgênero, ao pequeno tamanho das seqüências. Quando a seqüência total do marcador foi analisada somente para *Astrophea*, o subgênero mostrou-se monofilético (PP 1,00). Em nível infra-subgenérico, o único relacionamento filogenético constante foi o de *P. candida* e *P. citrifolia*, pertencentes a diferentes seções botânicas. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos para ITS. Não houve resolução interna suficiente para que inferências sobre o “status” taxonômico das seções botânicas nas análises realizadas com o marcador *rpoC1* pudessem ser feitas.

Por último, nas análises realizadas com as seqüências dos marcadores ITS e *rpoC1* concatenadas, o subgênero *Astrophea* também se mostrou monofilético (PP 1,00) (figura 15). A presença de *P. citrifolia* (seção *Capreolata*, superseção *Astrophea*), agrupada com *P. candida* e *P. amoena* (superseção *Pseudoastrophea*) fez com que ambas as superseções fossem consideradas polifiléticas. O agrupamento de *P. candida* e *P. citrifolia* também foi verificado nas análises de Muschner (2005), o que o reforça ainda mais, pois esta autora utilizou mais de 6000 pb e sete marcadores em suas análises. As espécies *P. lindeniana* e *P. macrophylla* (ambas da seção *Astrophea*, superseção *Astrophea*) estão na base do subgênero, como grupos irmãos de um agrupamento com baixo suporte estatístico (PP 0,59) formado pelas demais espécies. Neste grupo mais amplo localiza-se o agrupamento entre *P. haematostigma* e *P. mansoi* (ambas da seção

*Pseudoastrophea*, superseção *Pseudoastrophea*). Entretanto, uma vez que só obtivemos seqüências de ITS para estas espécies, o agrupamento deveu-se a um marcador apenas e precisa ser considerado com cautela. As outras duas espécies da seção *Astrophea* ficaram distanciadas nas árvores filogenéticas: *P. kawensis* ocupou uma posição basal dentro do agrupamento amplo e *P. candida* permaneceu junto a *P. citrifolia* e *P. amoena* (PP 0,98 e 0,57, respectivamente). *P. pittieri* apresentou-se como basal no mesmo agrupamento de baixo suporte estatístico, ao lado de *P. kawensis*, bastante distanciada de *P. citrifolia*, a outra espécie da seção *Capreolata* (superseção *Astrophea*) incluída nas análises.

A superseção *Astrophea* é composta por três seções segundo Feuillet e MacDougal 2003: *Astrophea*, *Capreolata* e *Leptopoda*, esta última com apenas duas espécies e não representada em nossas análises. *P. lindeniana* e *P. macrophylla* foram as representantes da seção *Astrophea* no presente estudo. As duas espécies posicionaram-se na base do subgênero, embora não agrupadas, nas árvores filogenéticas resultantes dos dados concatenados. Esta seção é caracterizada pelo hábito arbóreo ou escandente das plantas, além da ausência de gavinhas (Ulmer & MacDougal 2004), sugerindo que este hábito seja ancestral no grupo (Muschner 2005). A seção *Capreolata*, representada por *P. citrifolia* e *P. pittieri*, também teve suas espécies em agrupamentos distintos. Entretanto, a qualidade da descrição da espécie *P. citrifolia*, feita por Killip, é questionada por Ulmer e MacDougal (2004). Não foram encontradas na literatura informações morfológicas que justificassem o agrupamento de *P. candida*, *P. amoena* e *P. citrifolia*. Por exemplo, *P. amoena* apresenta pétalas vermelhas e corona de filamentos amarela, enquanto *P. citrifolia* e *P. candida* têm flores branco-esverdeadas (Ulmer & MacDougal 2004). As espécies têm, portanto, diferentes polinizadores.

A superseção *Pseudoastrophea* é composta pelas seções *Pseudoastrophea* e *Botryastrophea*. As espécies da seção *Botryastrophea* são trepadeiras com gavinhas e ocorrem na região da bacia Amazônica. Suas flores têm tons entre cor de laranja e vermelho, além de corona de filamentos reduzida, sendo presumivelmente polinizadas por beija-flores. *Botryastrophea* é composta por duas séries, *Botryastrophea* e *Carnae*, diferenciadas morfológicamente pela localização dos nectários extraflorais nas folhas (Ulmer e MacDougal 2004). *P. amoena* (série *Carnae*) foi a única representante da seção incluída em nossas análises. A espécie ocorre nas Guianas e no Suriname e tem como sinapomorfia a produção de flores em racemos a partir de galhos bastante curtos e lignificados, ou até mesmo no caule. Segundo Feuillet (2002), *P. amoena* é bastante próxima de *P. fuchsiiflora* Hemsl., espécie ainda não incluída em análises filogenéticas.

Não é possível excluir a hipótese de que o agrupamento de *P. amoena* com *P. candida* e *P. citrifolia* tenha sido um artefato, ocasionado por ser esta a única amostra da seção analisada. Por outro lado, a presença de *P. pittieri* (seção *Capreolata*, superseção *Astrophea*) no agrupamento reforçou a condição polifilética da superseção *Pseudoastrophea*.

As análises evidenciaram que as superseções *Pseudoastrophea* e *Astrophea* não são grupos naturais, bem como as seções analisadas. Como foram amostradas nove das 57 espécies deste subgênero (cerca de 20%), cabe registrar que não é possível descartar a hipótese de que alguns agrupamentos tenham se formado pela ausência de amostragem de espécies intermediárias. De qualquer maneira, faz-se necessária uma revisão taxonômica das superseções e seções do subgênero *Astrophea* (Ulmer & MacDougal 2004), além da inclusão de mais espécies deste subgênero em futuras análises filogenéticas.

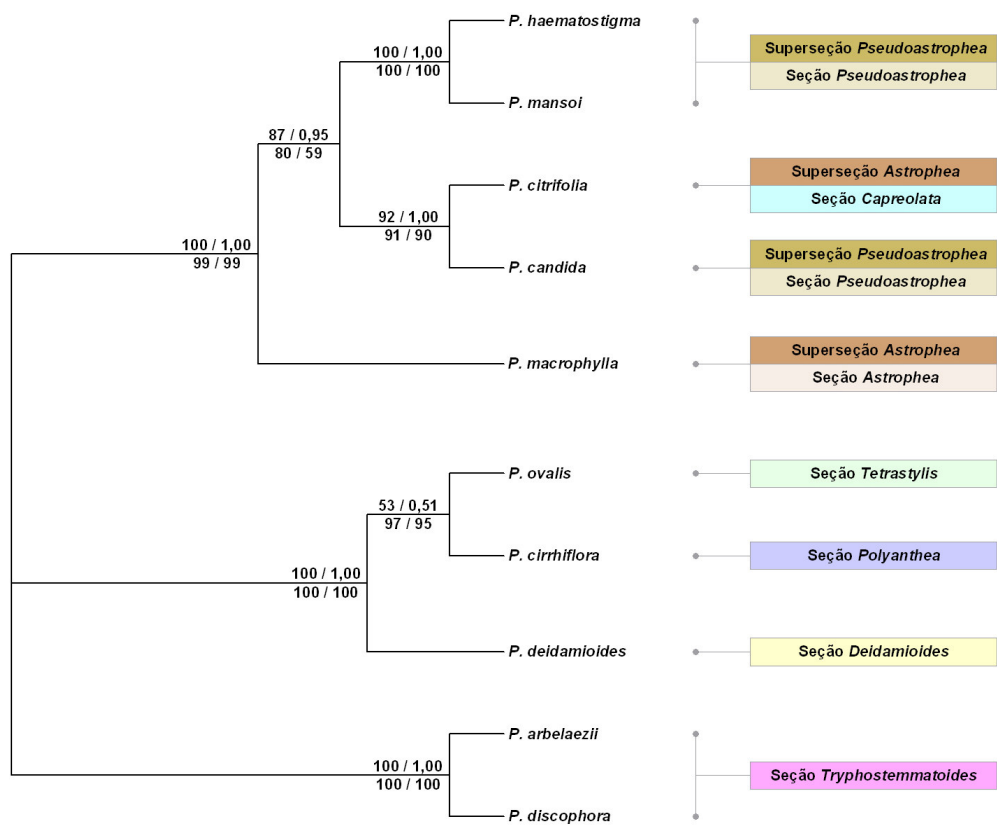


Figura 9. Árvore filogenética baseada nas seqüências do marcador ITS obtida através dos métodos de NJ, ML e inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de: “bootstrap” ML/probabilidade posterior. Os valores abaixo indicam “bootstrap” NJ e “bootstrap” NJ com indels codificados. *P. arbelaezii*, *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides*, *P. discophora* e *P. ovalis* pertecem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Astropheae*.

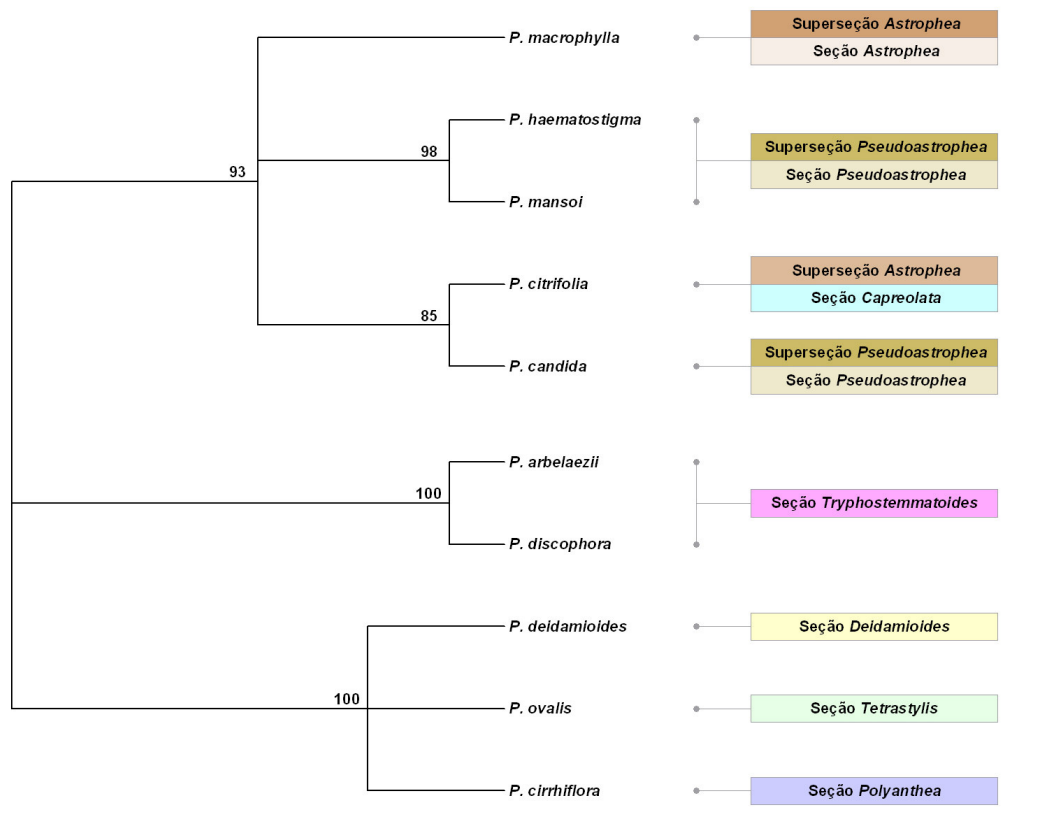


Figura 10. Árvore filogenética baseada nas seqüências do marcador ITS obtida através dos métodos de MP. Os números sobre os ramos indicam valores de “bootstrap”. *P. arbelaezii*, *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides*, *P. discophora* e *P. ovalis* pertecem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Astrophea*.

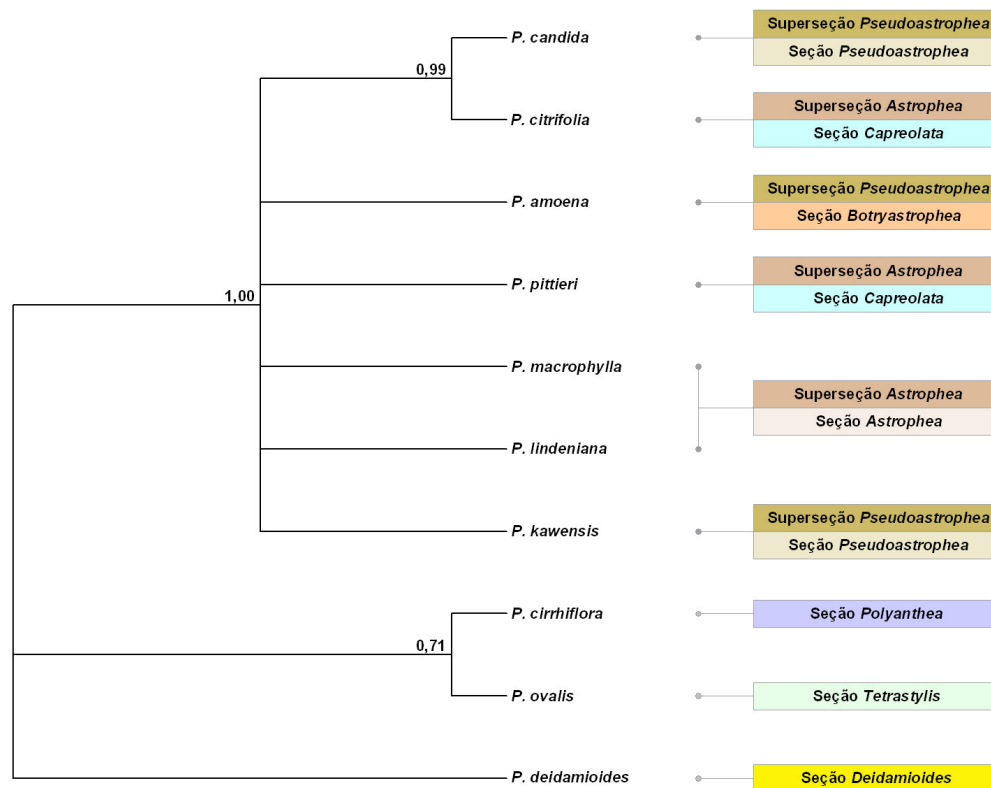


Figura 11. Árvore filogenética baseada nas seqüências do marcador *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior. *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides* e *P. ovalis* pertencem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Astrophea*.

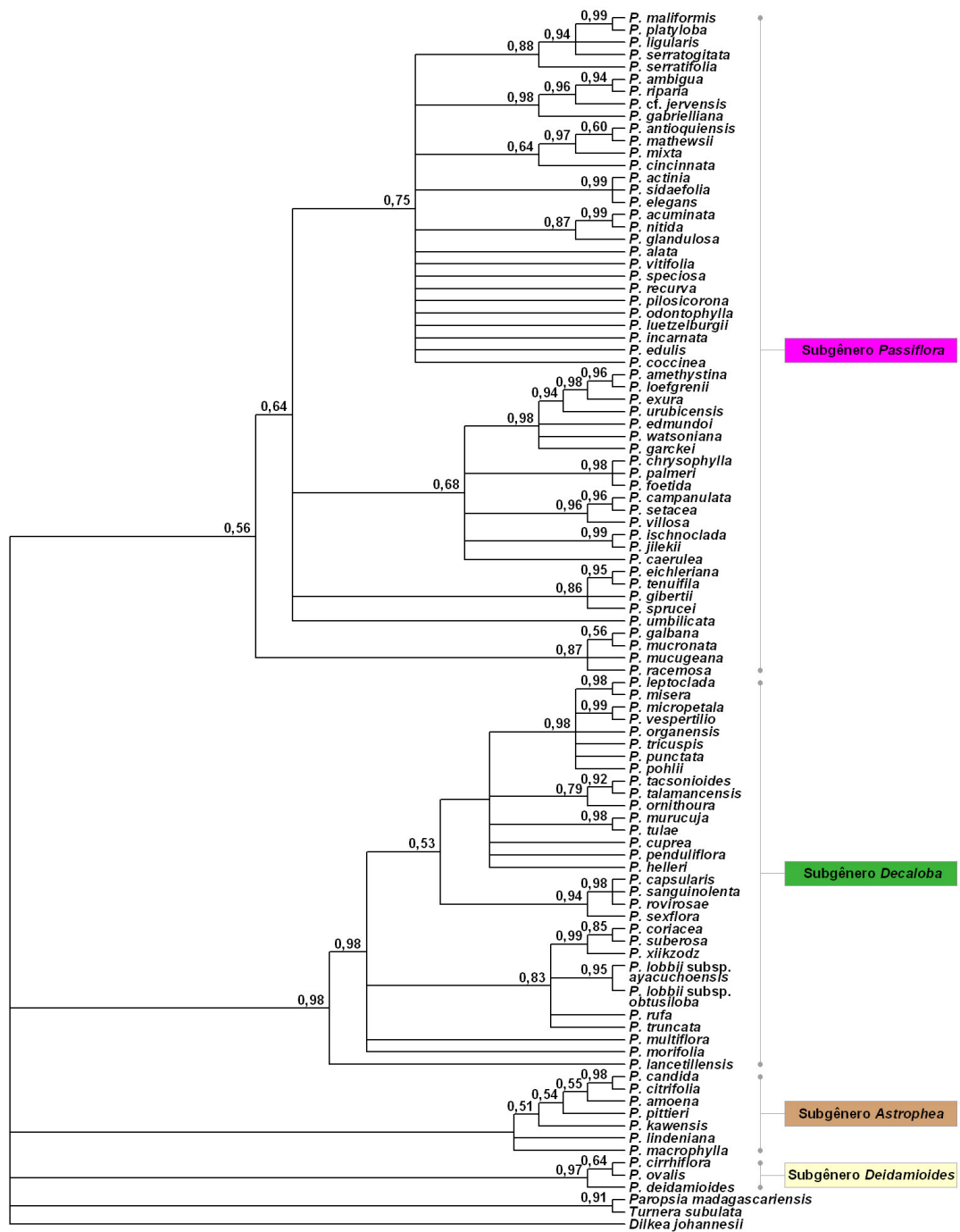


Figura 12. Árvore filogenética baseada nas seqüências do marcador *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior.



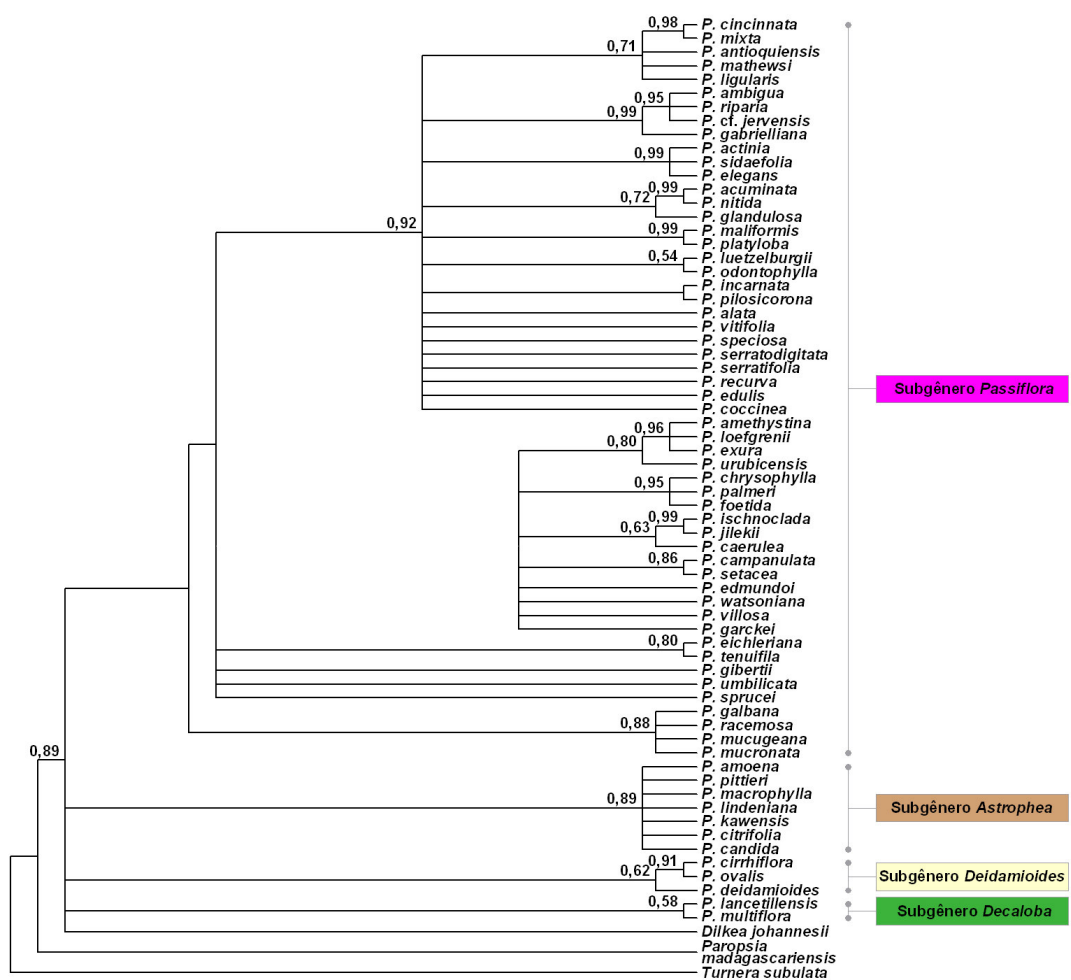


Figura 13. Árvore filogenética baseada nas seqüências do íntron do gene plastidial *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior.

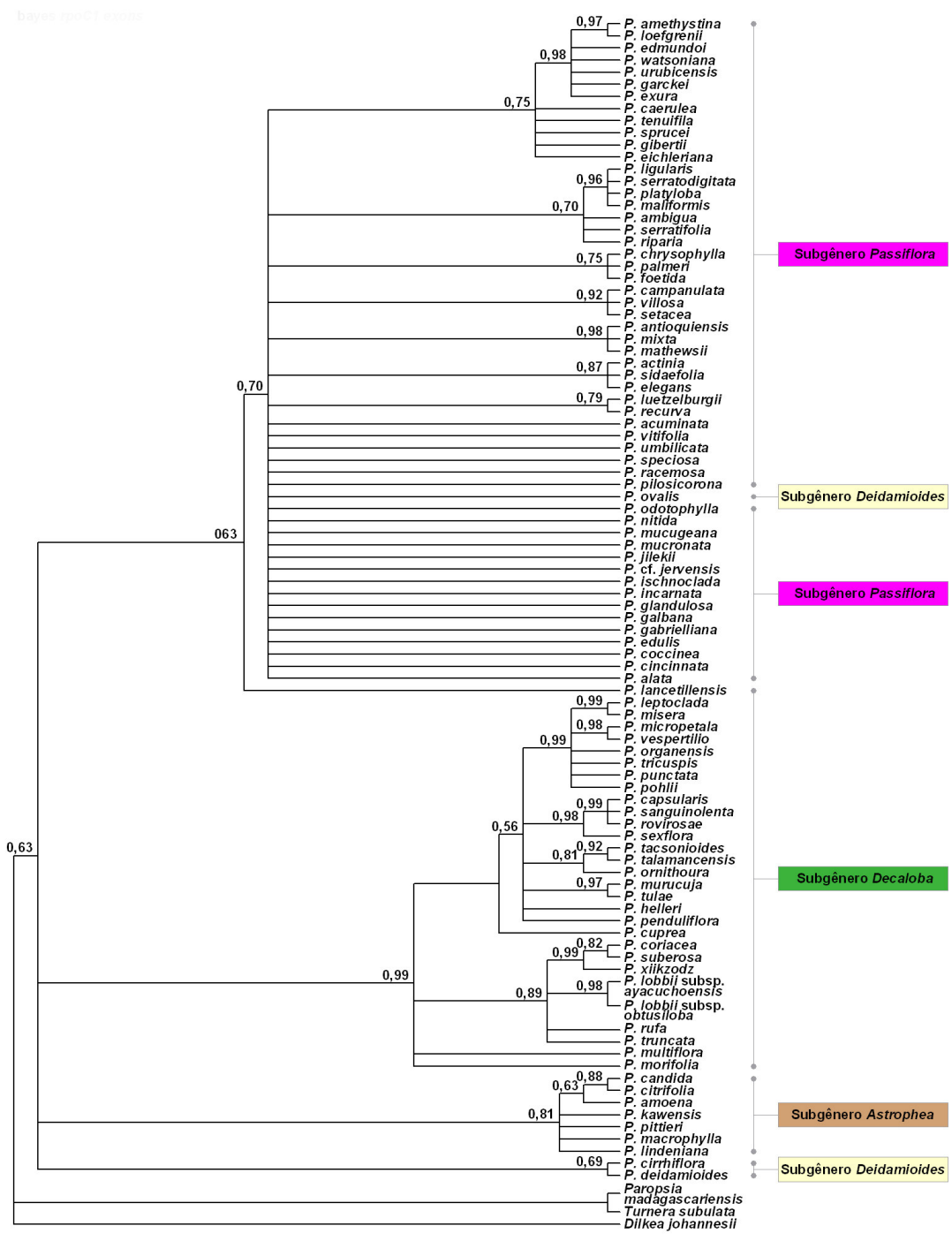


Figura 14. Árvore filogenética baseada nas seqüências parciais dos exons do gene plastidial *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior.

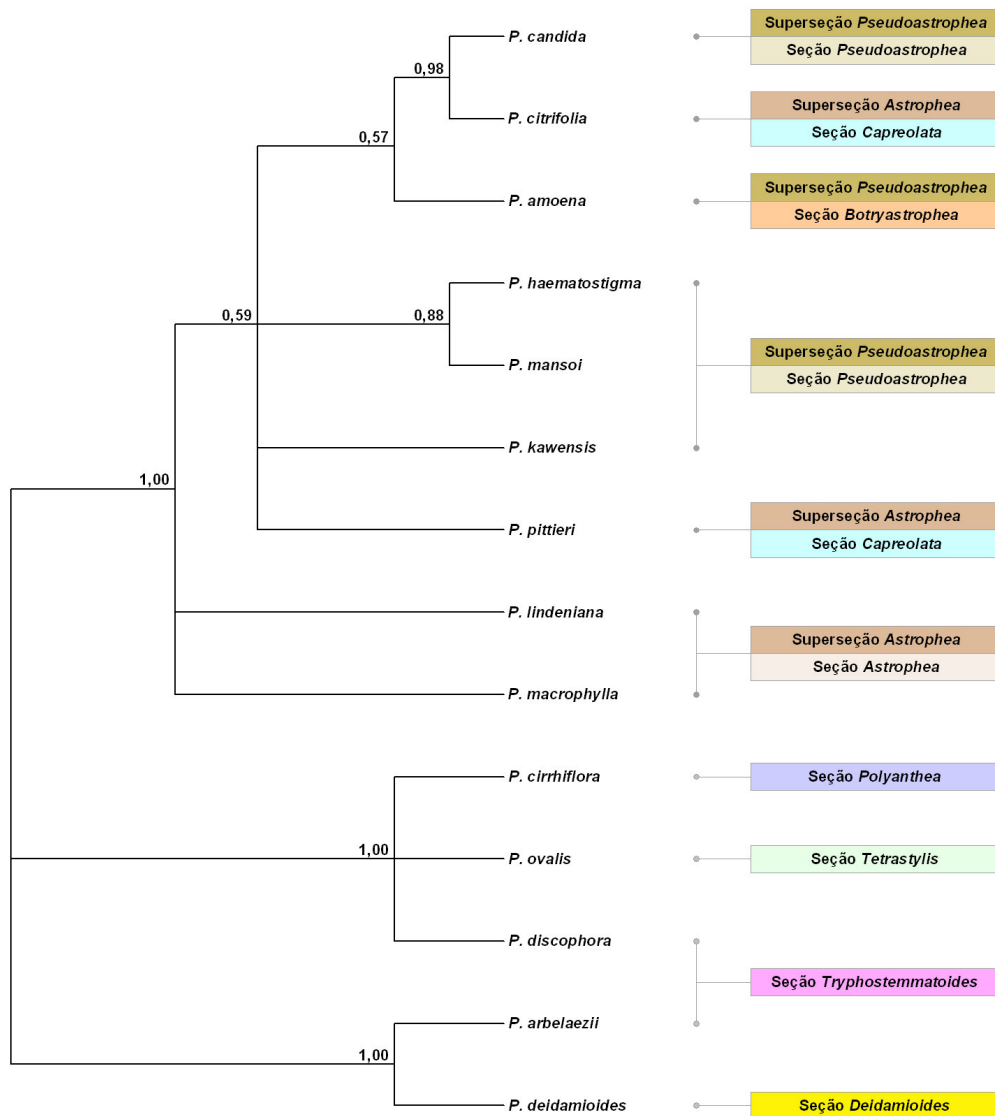


Figura 15. Árvore filogenética baseada nas seqüências dos marcadores ITS e *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior. *P. arbelaezii*, *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides*, *P. discophora* e *P. ovalis* pertencem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Astrophea*.

#### 4.4 Análises filogenéticas: subgênero *Decaloba*

O subgênero *Decaloba* mostrou-se monofilético em todas as análises filogenéticas realizadas com o marcador ITS, com altos valores de suporte (BS 100 PP 1,00) (figuras 16, 17 e 18). Na base do subgênero se localizaram as espécies *P. lancetillensis* e *P. membranacea*, representantes das superseções *Pterosperma* e *Hahnopathantus*, respectivamente. A seguir, as espécies da seção *Bryonioides*, *P. adenopoda*, *P. lobata* e *P. morifolia*, formaram um agrupamento com alto suporte estatístico (BS 100 PP 1,00). *P. rufa*, *P. truncata* e *P. auriculata*, da superseção *Auriculata*, compuseram grupo com suporte alto (BS 96 PP 1,00), assim como as duas subespécies de *P. lobbii*, da superseção *Multiflora*. Estas cinco espécies formaram um agrupamento também bastante robusto (PP 1,00). Na base de um agrupamento com suporte mediano (PP 0,71) esteve *P. multiflora*, outra espécie da superseção *Multiflora*. As espécies da superseção *Disemma*, passifloráceas do sudeste da Ásia, formaram um agrupamento monofilético (BS 89 PP 1,00), o que está de acordo com os resultados das análises filogenéticas realizadas por Krosnick e Freudenstein (2005), que utilizaram somente o método de máxima parcimônia. Dentro da superseção *Disemma*, formou-se um agrupamento com *P. aurantia*, *P. herbertiana* e *P. cinnabarina*, espécies que ocorrem na Austrália, e outro com *P. jugorum* como *taxon* irmão (PP 1,00) dos agrupamentos de *P. moluccana* var. *glaberrima*, *P. siamica*, *P. moluccana* var. *teysmanniana*, espécies que ocorrem na China, e *P. henryi* e *P. cupiformis*. Em um grande grupo, de baixo suporte estatístico (PP 0,51), localizaram-se as espécies da superseção *Cieca*, *P. coriacea*, *P. xiihzodz* e *P. suberosa*, reunidas entre si com alto suporte (BS 100 PP 1,00). Esse agrupamento foi identificado como grupo irmão das diversas espécies da superseção *Decaloba* do grande grupo. Dentro desta superseção destacaram-se dois agrupamentos também com elevado suporte. O primeiro incluiu somente espécies da seção *Decaloba*, enquanto o segundo compreendeu espécies das seções *Decaloba* e *Xerogona*.

Nas análises do subgênero *Decaloba* através das seqüências do marcador plastidial *rpoC1* (íntron e exons) o mesmo compôs, como esperado, um grupo monofilético (BS 72 PP 0,98) (figura 12). *P. lancetillensis* mostrou-se como espécie irmã das espécies restantes do subgênero. *P. morifolia*, única representante da superseção *Bryonioides* para este marcador e *P. multiflora*, da superseção *Multiflora*, estiveram na base do agrupamento das demais espécies. Entretanto, este resultado só foi verificado através de análise bayesiana. As espécies de *P. lobbii*, também da superseção *Multiflora*, compuseram agrupamento (PP 0,83) com *P. rufa* e *P. truncata*, da superseção *Auriculata*, e com as espécies da superseção *Cieca* (BS 100 PP 0,99). A superseção *Decaloba*

formou um clado (PP 0,53) com dois agrupamentos internos, um deles composto somente por espécies da seção *Decaloba* e o outro por espécies das seções *Xerogona* (*P. capsularis*, *P. rovirosae* e *P. sanguinolenta*) e *Decaloba* (*P. sexflora*).

Somente duas espécies amostradas para o subgênero *Decaloba* apresentaram o íntron plastidial *rpoC1*: *P. lancetillensis* e *P. multiflora*. Nas análises filogenéticas realizadas somente com a seqüência intrônica, exceto na análise de máxima parcimônia, que não teve resolução suficiente para separar os subgêneros, ambas as espécies compuseram um agrupamento de suporte baixo (PP 0,58) (figura 13). Quando somente as seqüências parciais dos exons do gene *rpoC1* foram analisadas, *P. lancetillensis* localizou-se na base do subgênero *Passiflora* (figura 14). Já *P. multiflora* e *P. morifolia* situaram-se na base do subgênero *Decaloba*. O agrupamento entre as espécies das superseções *Auriculata* e *Cieca*, mais *P. lobbii* da seção *Multiflora*, repetiu-se (PP 0,89). *P. cupraea* surgiu como *taxon* irmão das demais espécies da superseção *Decaloba*, embora com baixo suporte estatístico. O agrupamento composto por *P. capsularis*, *P. sanguinolenta*, *P. rovirosae* e *P. sexflora*, das seções *Decaloba* e *Xerogona*, repetiu-se. As demais espécies da seção *Decaloba* completaram este agrupamento.

As análises filogenéticas com as seqüências dos marcadores ITS e *rpoC1* concatenadas, que contaram com um menor número de espécies, também confirmaram a monofilia do subgênero (figura 20). *P. lancetillensis*, *P. membranacea*, *P. morifolia* e *P. multiflora* apareceram na base do subgênero. O agrupamento das subespécies de *P. lobbii* se repetiu, bem como de *P. rufa* e *P. truncata*, e das quatro juntas, unindo espécies das superseções *Auriculata* e *Multiflora*. As espécies da superseção *Cieca*, que têm flores apétalas, formaram novamente clado com alto valor de suporte (PP 1,00), assim como as espécies da superseção *Decaloba* (PP 0,99). Nesta, mais uma vez a maioria das espécies das seções *Decaloba* e *Xerogona* esteve reunida em um mesmo agrupamento interno (PP 0,99).

*P. lancetillensis*, única representante da seção *Pterosperma* incluída no presente trabalho, foi descrita recentemente, assim como a seção da qual faz parte (MacDougal & Hansen 2003). Além de *P. lancetillensis*, compõem esta seção as espécies *P. microstipula* L. Gilbert & J.M. MacDougal, *P. pedicellaris* J.M. MacDougal e *P. eueidipabulum* S. Knapp & Mallet. A seção *Pterosperma* é considerada rara e se caracteriza pelos múltiplos nectários no pecíolo, pelo pólen hexa-colpado, com opérculo secundário, e pela inflorescência cimosa com três brácteas no pedicelo (MacDougal & Hansen 2003). As análises filogenéticas de Muschner *et al.* (2003) e Muschner (2005) incluíram *P. lancetillensis* e *P. microstipula*. Em ambos os conjuntos de análises, estas

espécies formaram um agrupamento com alto suporte, na base do que hoje é reconhecido como subgênero *Decaloba*. Também no trabalho de Hansen *et al.* (2006), *P. microstipula* e *P. lancetillensis* foram incluídas no subgênero *Decaloba*. O fato de *P. lancetillensis* ter se posicionado na base do subgênero *Passiflora* na análise realizada com conjuntos de dados do marcador *rpoC1* parece ser um artefato técnico devido ao fato de que esta espécie foi a única representante amostrada de sua superseção e se localiza na base do subgênero *Decaloba* nas demais análises.

A superseção *Bryonioides* é composta por 20 espécies, das quais amostramos apenas três (~10%). Ela é caracterizada pela presença de tricomas em forma de gancho, além de estípulas conspicuas, o que não é comum no subgênero *Decaloba*, e suas espécies ocorrem no sul do México e norte da América Central (Ulmer & MacDougal 2004). Os resultados de nossas análises, bem como os de Krosnick e Freudenstein (2005) indicaram a monofilia do grupo, que também é bem sustentada por sua morfologia diferenciada dentro do subgênero.

A superseção *Disemma* teve sua monofilia confirmada nas análises do marcador ITS. No presente trabalho foram utilizadas as seqüências obtidas por Krosnick e Freudenstein (2005), uma vez que as espécies ocorrem somente no sudeste da Ásia. Os resultados aqui obtidos foram similares aos destes autores, embora aqui tenham sido utilizados outros métodos de análise filogenética que não só a máxima parcimônia. Dentre os agrupamentos internos desta superseção destacou-se o formado por *P. siamica* e *P. moluccana* var. *glaberrima*, espécies com desenvolvimento floral anômalo (Krosnick *et al.* 2006). O não agrupamento das duas variedades de *P. moluccana*, também observado por Krosnick e Freudenstein (2005), além de diferenças em seus desenvolvimentos florais, lança dúvidas sobre a atual classificação da espécie. Recomendamos a revisão taxonômica cuidadosa das variedades desta espécie, bem como de *P. siamica*.

Nas análises de Krosnick e Freudenstein (2005), *P. multiflora* foi apontada como *taxon* irmão da superseção *Disemma*. Esta conclusão pode ter sido influenciada pela sub-amostragem de espécies de outras superseções. Em nosso trabalho não foi possível identificar o grupo irmão desta seção, uma vez que a mesma se localiza em um grande agrupamento composto também pelas superseções *Cieca* e *Decaloba*, embora *P. multiflora* tenha ficado na base deste agrupamento nas análises a partir do marcador ITS.

A superseção *Cieca* foi identificada como monofilética nas análises realizadas neste trabalho, assim como por Muschner (2005) e Krosnick e Freudenstein (2005). A principal característica morfológica das espécies desta superseção é a ausência de

pétalas (Ulmer & MacDougal 2004), que se mostra uma sinapomorfia capaz de definir um agrupamento monofilético.

A monofilia da superseção *Decaloba*, a maior das superseções do subgênero *Decaloba*, verificada em nossas análises, também foi evidenciada nas árvores filogenéticas da tese de Muschner (2005), embora nestas *P. multiflora* se apresente como espécie irmã desta superseção. Já a monofilia de suas duas seções, *Xerogona* e *Decaloba*, é questionável, uma vez que *P. sexflora* e *P. lutea*, de *Decaloba*, apresentaram-se agrupadas com as demais espécies de *Xerogona*. Esta seção é pequena, apenas 13 espécies, e se caracteriza pelo fruto tipo cápsula e pela ausência de brácteas e de nectários na lâmina foliar. *P. sexflora* e *P. lutea* também não têm nectários na superfície de suas folhas, mas apresentam brácteas (eventuais em *P. lutea*) (Ulmer & MacDougal 2004). Por isso, recomendamos a inclusão destas duas espécies na seção *Xerogona*, para que as duas seções correspondam a agrupamentos naturais.

*P. micropetala* e *P. vespertilio* formaram um agrupamento em todas as análises filogenéticas nas quais foram incluídas. Ambas pertencem à seção *Decaloba* da superseção *Decaloba* e *P. micropetala* é às vezes confundida com *P. biflora*, por suas morfologias similares. Segundo Killip (1938), *P. micropetala* apresenta flores brancas, folhas semi-orbiculares e duas fileiras de filamentos na corona. O tipo desta espécie foi coletado no estado do Amazonas, Brasil. Há mais registros de ocorrência para *P. vespertilio*, que ocorre em terras de baixa altitude na Colômbia, no Equador, em Trinidad e Tobago, no Peru, na Bolívia e no Brasil. Suas flores também são brancas e o formato das folhas lembra um morcego de asas abertas. Os filamentos da corona são conados (unidos na base), formando uma membrana (Ulmer & MacDougal 2004). *P. micropetala* e *P. vespertilio* são as duas espécies do gênero *Passiflora* de nossa amostra que apresentaram a inserção de um códon na seqüência do éxon 2 do gene plastidial *rpoC1*. As análises filogenéticas para o marcador *rpoC1* realizadas sem as seqüências que continham esta inserção não mostraram diferenças marcantes quanto ao agrupamento das espécies de cada subgênero (figura 21). As alterações nas árvores dizem respeito ao posicionamento de *Dilkea johannesii*. Quando analisada em conjunto com *Paropsia madagascariensis* e *Turnera subulata* (que também apresentam a inserção no éxon 2), *D. johannesii* e *P. madagascariensis* localizaram-se, em algumas árvores, dentro do agrupamento das espécies de *Passiflora*. Acredita-se que este resultado seja incorreto, uma vez que em todas as demais análises filogenéticas de *Passiflora* em que foi utilizada como grupo externo esta espécie nunca teve sua inclusão no gênero *Passiflora* evidenciada (Muschner 2005, Hansen *et al.* 2006). Além disso, nas análises em que foi a

única espécie utilizada como grupo externo *D. johannesii* colocou-se como grupo irmão do subgênero *Passiflora*, conforme esperado. Atribuímos estas alterações no posicionamento dos grupos externos à saturação do marcador, que teria se refletido principalmente nas espécies mais divergentes do grupo analisado, aproximando-as erroneamente das demais devido às múltiplas substituições em um mesmo sítio.

Finalmente, faz-se necessário discutir a presença do íntron do gene plastidial *rpoC1* em apenas duas das espécies do subgênero *Decaloba* amostradas. Hansen *et al.* (2006) publicaram, durante o desenvolvimento deste trabalho, um extenso levantamento da presença ou ausência do íntron *rpoC1* nas espécies do gênero *Passiflora*, totalizando 136 espécies analisadas. A presença do íntron foi verificada em todas as espécies dos subgêneros *Astrophea*, *Deidamioides* e *Passiflora*, além de em sete espécies do subgênero *Decaloba*: *P. aurantia* G. Forester, *P. herbertiana* (superseção *Disemma*), *P. microstipula* L.E. Gilbert & J.M. MacDougal e *P. lancetillensis* (superseção *Pterosperma*), *P. membranacea*, *P. hahnii* (E. Fourn.) Mast. e *P. guatemalensis* S. Watson (da superseção *Hahniopathanthus*). Os autores rejeitaram a hipótese de uma única perda do íntron *rpoC1* no gênero *Passiflora* e propuseram pelo menos dois eventos de perda do mesmo. Os resultados aqui apresentados corroboram a hipótese de que houve mesmo mais de um evento de perda deste íntron, pois as espécies do subgênero que o possuem não são espécies irmãs, exceto nas análises que contaram somente com a seqüência intrônica. Assim, somente a presença ou ausência do íntron *rpoC1* não serve para o estabelecimento de relações evolutivas no gênero *Passiflora*, provavelmente nem no subgênero *Decaloba*, embora a aquisição e a perda de introns tenham tido sua utilidade filogenética comprovada em outros grupos de plantas, como o gênero de gimnospermas *Cycas* (Regina *et al.* 2005), e o próprio íntron *rpoC1* na subfamília Cactoideae (Cactaceae) (Wallace & Cota 1996). Por isso, faz-se importante o estudo caso a caso, como foi feito no presente estudo, da possibilidade ou não de uso deste tipo de caráter em análises filogenéticas



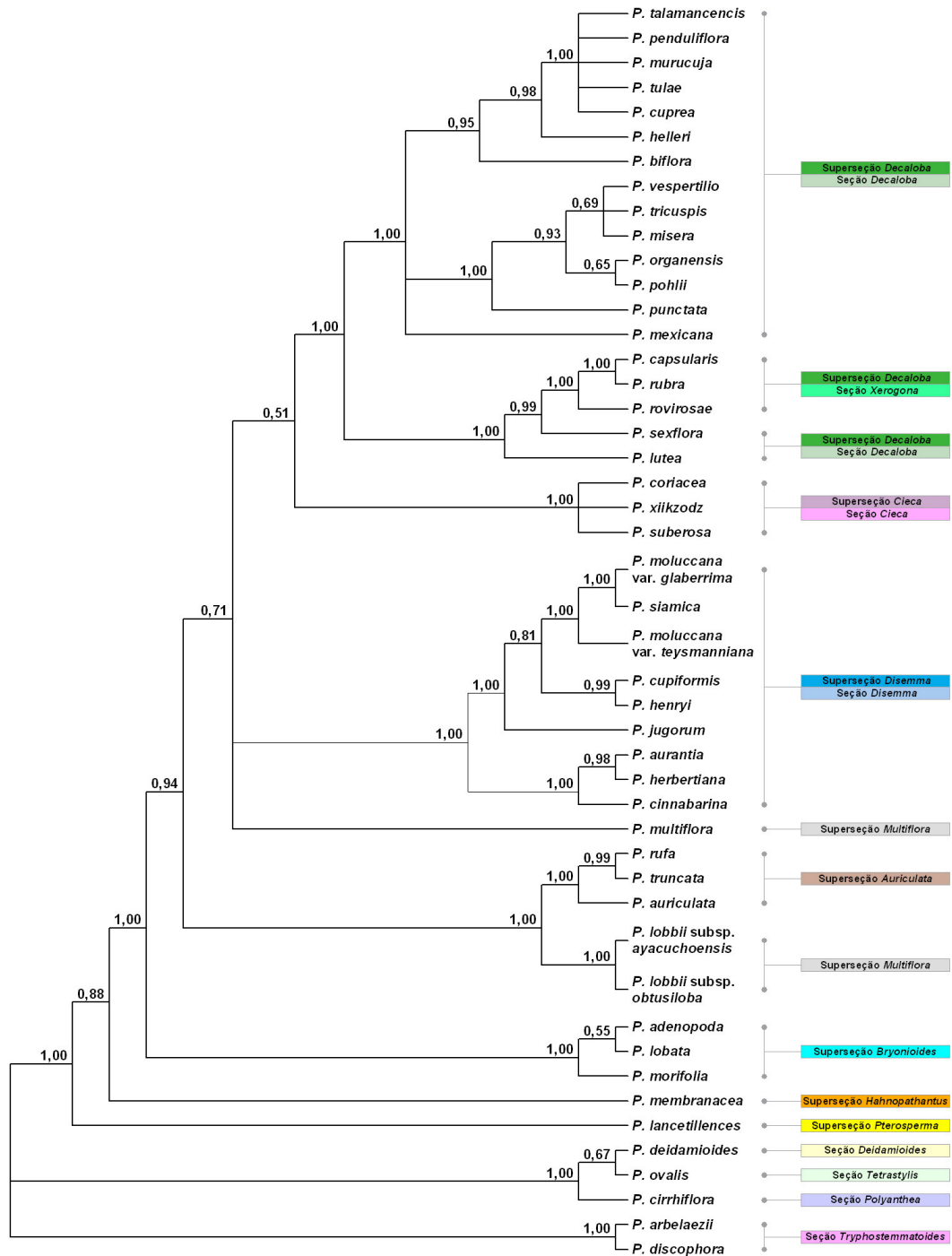


Figura 16. Árvore filogenética baseada na seqüência do marcador ITS obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior. *P. arbelaezii*, *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides*, *P. discophora* e *P. ovalis* pertencem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Decaloba*.

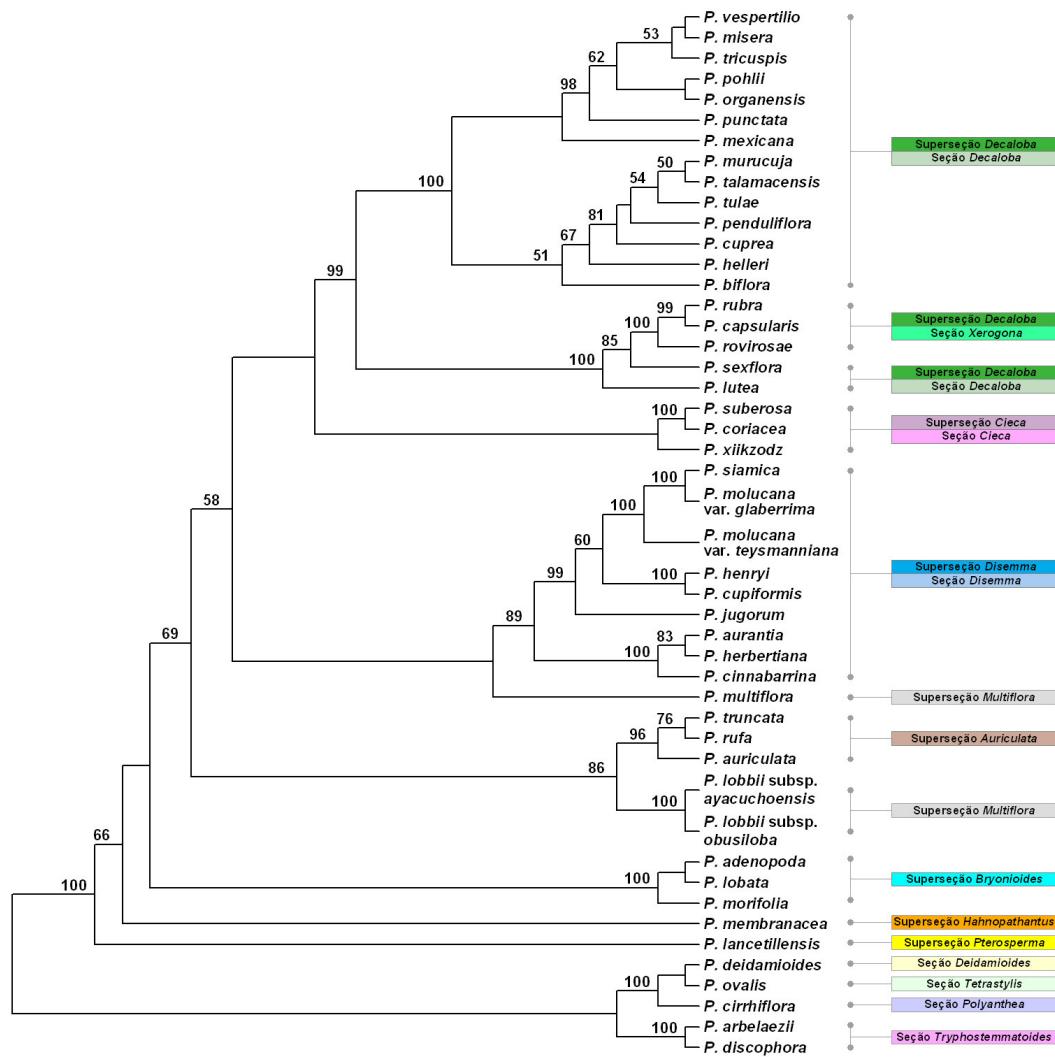


Figura 17. Árvore filogenética baseada na seqüência do marcador ITS obtida através de ML. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior. *P. arbelaezii*, *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides*, *P. discophora* e *P. ovalis* pertecem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Decaloba*.

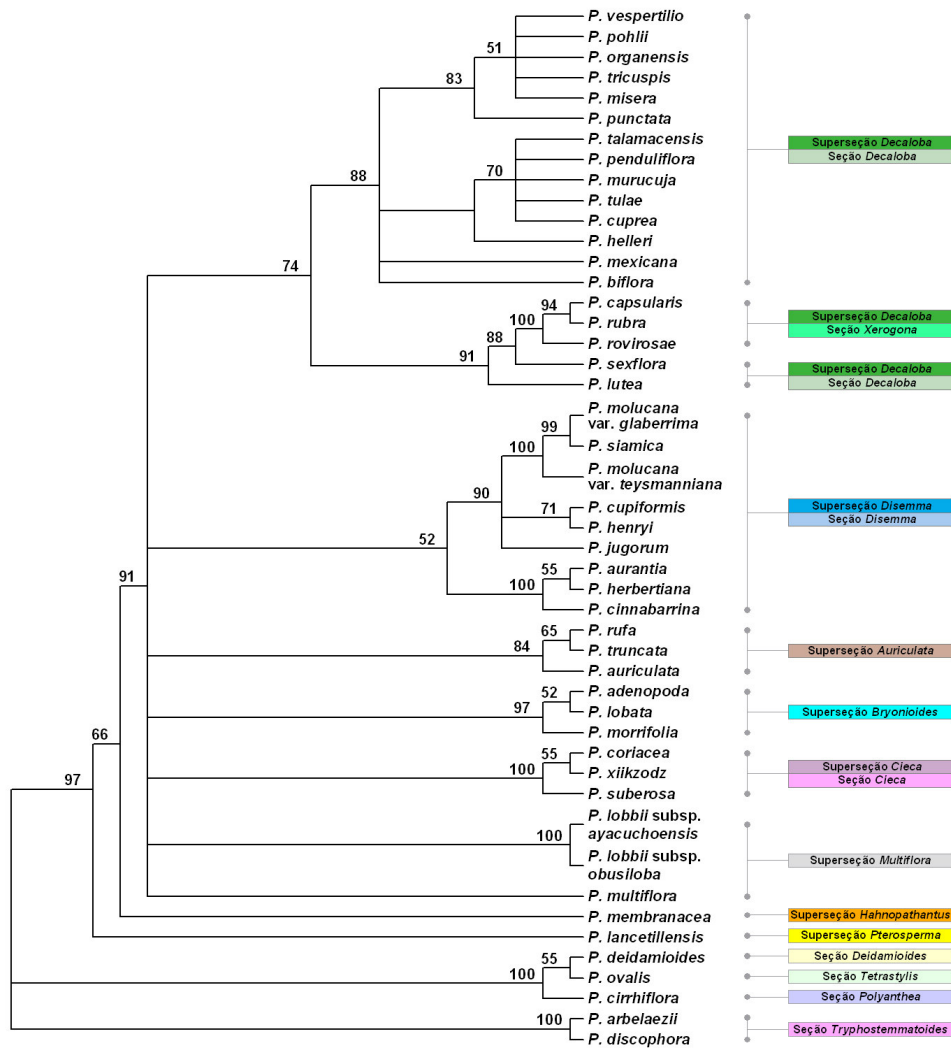


Figura 18. Árvore filogenética baseada na seqüência do marcador ITS obtida através de MP. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior. *P. arbelaezii*, *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides*, *P. discophora* e *P. ovalis* pertecem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Decaloba*.

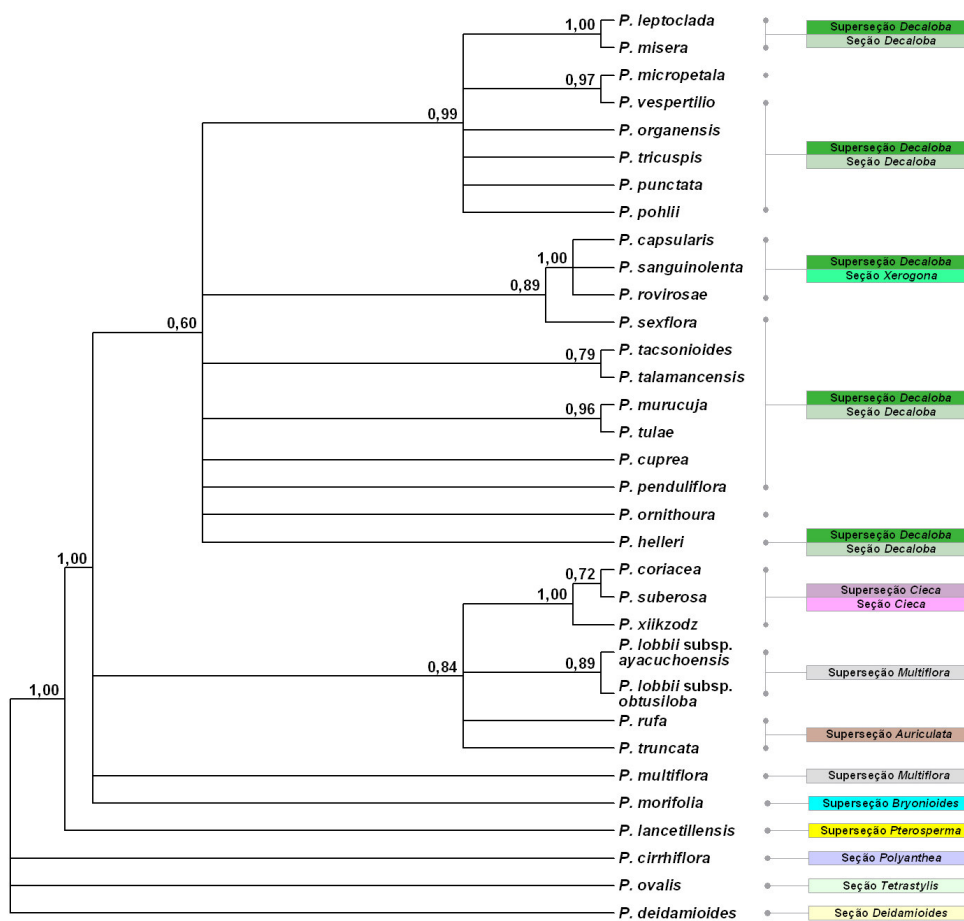


Figura 19. Árvore filogenética baseada na seqüência do marcador *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior. *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides* e *P. ovalis* pertecem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Decaloba*.

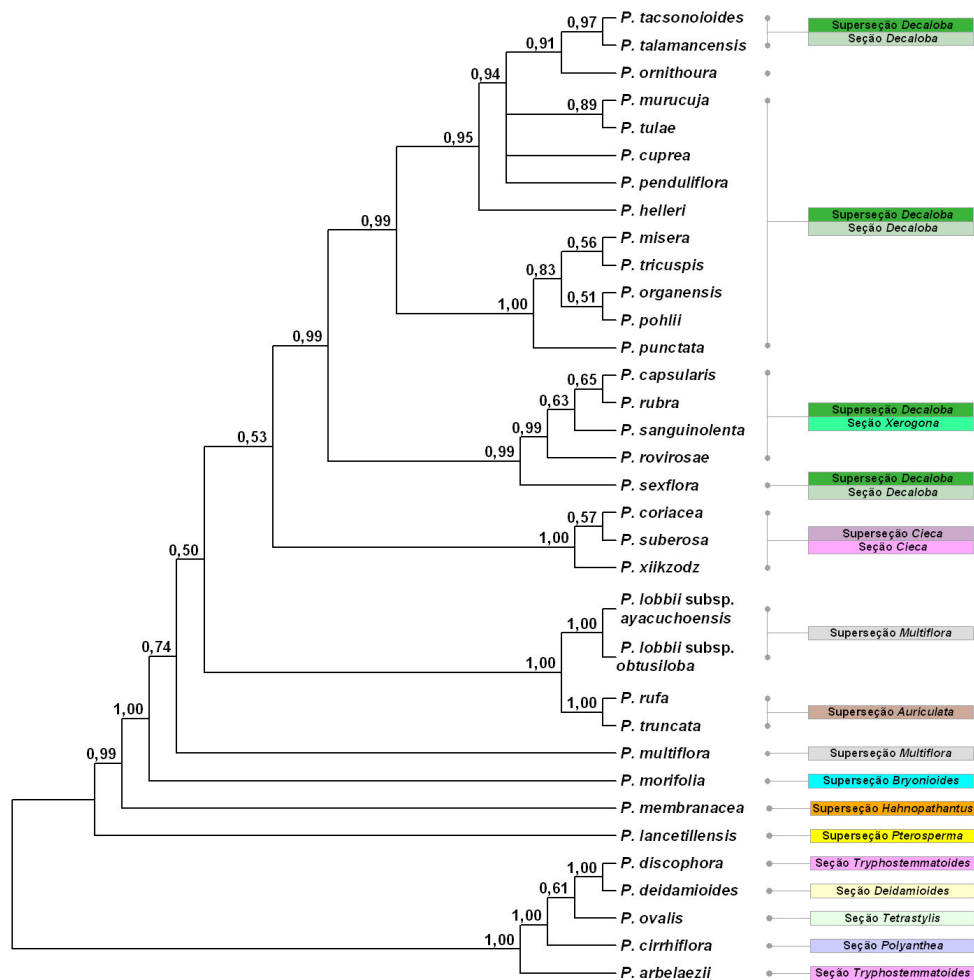


Figura 20. Árvore filogenética baseada nas seqüências dos marcadores ITS e *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior. *P. arbelaezii*, *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides*, *P. discophora* e *P. ovalis* pertecem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Decaloba*.

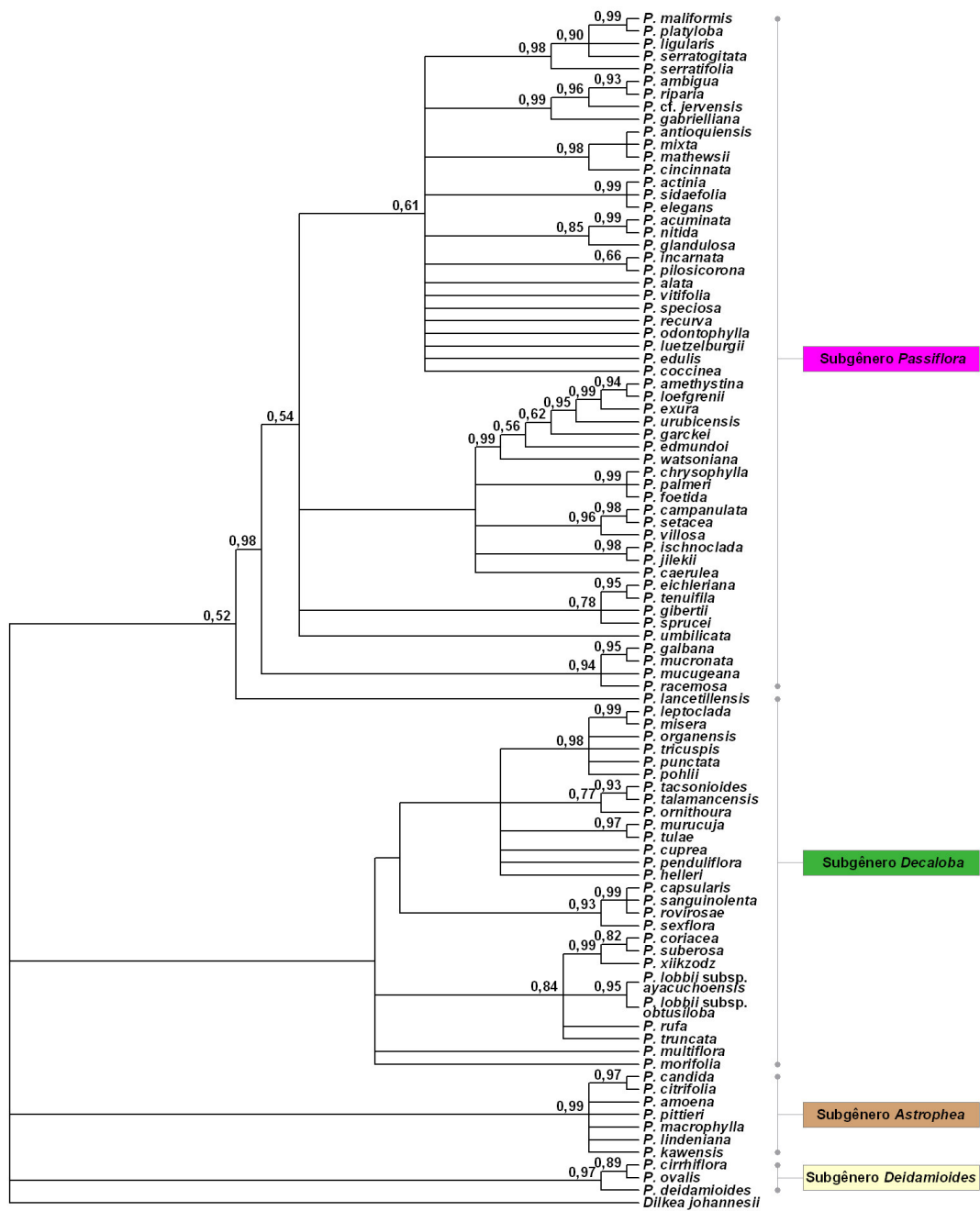


Figura 21. Árvore filogenética baseada nas seqüências do marcador *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior.

#### 4.5 Análises filogenéticas: subgênero *Passiflora*

O subgênero *Passiflora* mostrou-se monofilético nas árvores filogenéticas obtidas através de diversos métodos com as seqüências do marcador nuclear ITS (BS 100 PP 0,99) (figura 22). Em sua base, situou-se um agrupamento formado por *P. chrysophylla*, *P. foetida*, *P. palmeri* e *P. pilosicorona* (PP 0,95). Este agrupamento parece ser o grupo irmão do restante do subgênero. *P. glandulosa* localizou-se em uma posição basal no agrupamento seguinte, ou dentro do mesmo, assim como *P. cincinnata*. Ambas as espécies ficaram próximas de *P. reflexiflora* e *P. sprucei* (BS 84-91 PP 0,96), mais *P. quadrangularis* e *P. setulosa* e *P. hatsbachii* (BS 79-87 PP 1,00). *P. edulis* e *P. incarnata* também estiveram, eventualmente, presentes nesse agrupamento, ambas sempre associadas entre si (BS 83-94 PP 1,00). Na base do agrupamento seguinte se encontraram *P. gabrielliana*, associada a *P. cf. jervensis* nas análises de distância, e *P. odontophylla*. A seguir, *P. acuminata* e *P. nitida* (PP 1,00) ficaram associadas a *P. ambigua*, *P. racemosa*, *P. alata* e *P. laurifolia* (PP 0,91), além de *P. cf. jervensis* (PP 0,99), em grupo com baixa resolução interna. *P. mucugeana* e *P. recurva* formaram um agrupamento com suporte mediano (BS 52 PP 0,79), e se associaram a *P. odontophylla* nas análises de distância. Um agrupamento consistente (BS 96-99 PP 0,99) foi verificado entre *P. mathewsii*, *P. mixta* (associadas entre si BS 100 PP 1,00) e *P. urubicensis* (BS 84-85 PP 0,99), mais *P. mailiformis*, *P. serratodigitata* e *P. setacea* (BS 95-99 PP 1,00). *P. sidaefolia* e *P. campanulata* ocuparam diferentes posições, de acordo com o método de análise: ora estavam associadas entre si ora agrupadas a *P. elegans*, *P. actinia* e *P. eichleriana*. *P. ischnoclada* e *P. jilekii* também tiveram relações variadas, associadas a *P. mendoncaie* (PP 1,00) ou *P. campanulata*, dependendo do método. *P. villosa*, *P. serratifolia*, *P. speciosa*, *P. vitifolia* e *P. trisecta* localizaram-se na base de um agrupamento com o restante das espécies do subgênero (PP 1,00). *P. actinia*, *P. elegans* e *P. eichleriana* formaram um agrupamento de baixo suporte na árvore gerado por análise bayesiana. A seguir, *P. umbilicata* e *P. watsoniana* (BS 51-92 PP 0,95) também fizeram parte de um agrupamento com baixo suporte, que contou ainda com *P. galbana* e *P. mucronata*. Por último, *P. loefgrenii* e *P. amethystina* (BS 93-98 PP 1,00) agruparam com *P. garckeii* e *P. edmundoi*, além de *P. kermesina* e *P. miersii* (BS 88-89 PP 0,95), mais *P. caerulea* e *P. tenuifila*.

As análises filogenéticas com toda a seqüência do marcador plastidial *rpoC1* com espécies de todos os subgêneros confirmaram a monofilia do grupo, embora com baixo valor de suporte (PP 0,56) (figura 12). Um agrupamento composto por *P. galbana*, *P. mucronata*, *P. mucugeana* e *P. racemosa* (BS 50 PP 0,87) ficou na base do subgênero,

como grupo irmão das demais espécies, reunidas em outro agrupamento. *P. umbilicata* localizou-se na base deste agrupamento. A seguir, *P. eichleriana*, *P. tenuifila*, *P. gibertii* e *P. sprucei*, da superseção *Stipulata*, seção *Granadillastrum*, formaram um agrupamento de suporte mediano (PP 0,86). Na seqüência, outro agrupamento de suporte estatístico mediano (PP 0,68) compreendendo espécies de diversas superseções e seções, unindo espécies distanciadas nas análises através do marcador ITS, como *P. chrysophylla*, *P. palmeri* e *P. foetida* (PP 0,96) com *P. amethystina*, *P. loefgrenii* e *P. exura* (PP 0,94). As análises realizadas somente com as seqüências do íntron *rpoC1* ou dos exons novamente mostraram-se pouco informativas, com poucos agrupamentos com valor de suporte estatístico acima de 50 (figuras 13 e 14). Quando foram analisadas seqüências de *rpoC1* somente para o subgênero *Passiflora* o mesmo mostrou-se monofilético, com alto valor de suporte estatístico (figura 23). Diversos agrupamentos bastante robustos se formaram: *P. acumita* e *P. nitida* (PP 0,99), *P. actinia*, *P. sidaefolia* e *P. elegans* (PP 1,00), *P. antioquiensis*, *P. mixta* e *P. mathewsii* (PP 1,00), *P. ambigua*, *P. riparia*, *P. cf. jervensis* e *P. gabrielliana* (PP 0,99), *P. eichleriana* e *P. tenuifila* (PP 0,95), *P. maliformis* e *P. platyloba* (PP 1,00) mais *P. serratogitata* e *P. serratifolia*, *P. ischnoclada* e *P. jilekii* (PP 0,99), *P. campanulata* e *P. setacea* (PP 0,97), *P. chrysophylla*, *P. palmeri* e *P. foetida* (PP 1,00) e, por último, *P. amethystina*, *P. loefgrenii*, *P. exura*, *P. urubicensis*, *P. garckeii*, *P. edmuoi* e *P. watsoniana*, todas da superseção *Stipulata* (PP 0,99).

Na árvore gerada através das análises com os dados concatenados (figura 24), o subgênero *Passiflora* formou um clado com alto valor de suporte estatístico (PP 0,99). Já suas superseções e seções mostraram-se polifiléticas, como nas análises com os marcadores ITS e *rpoC1* em separado. O agrupamento entre *P. chrysophylla*, *P. foetida*, *P. palmeri* e *P. pilosicorona* localizou-se na base subgênero (PP 0,95). *P. cincinannata*, *P. quadrangularis*, *P. odontophylla*, *P. luetzelburgii*, *P. glandulosa* e *P. gabrielliana* apareceram na base do grupo das demais espécies, em uma politomia. Seguiram-se os agrupamentos entre *P. edulis* e *P. incarnata* (PP 0,97), *P. hastsbachii* e *P. setulosa*, *P. mucugeana* e *P. recurva*. (PP 0,76) e *P. reflexiflora* e *P. sprucei*, estas da superseção *Stipulata*, mas de seções diferentes. A seguir, um agrupamento moderadamente suportado (PP 0,72) foi composto por *P. alata*, *P. racemosa*, *P. laurifolia*, *P. acuminata* e *P. nitida* (PP 1,00) e *P. ambigua*, *P. riparia* e *P. cf. jervensis*. Outro agrupamento fracamente suportado (0,72) foi o composto por *P. mathewsii*, *P. mixta* (PP 0,96), *P. antioquiensis* e *P. urubicensis* mais *P. maliformis*, *P. platyloba*, *P. ligularis*, *P. serratodigitata* e *P. setacea*. A maioria destas espécies pertence à superseção *Laurifolia*, enquanto as restantes, às superseções *Tacsonia* e *Passiflora*. O maior agrupamento



contou com baixo valor de suporte estatístico (PP 0,56), tendo sido composto por espécies da superseção *Stipulata* em sua maioria. Espécies das superseções *Coccinea* e *Passiflora* também estiveram incluídas neste agrupamento, tendo ficado na base, sem resolução filogenética de seus relacionamentos próximos.

Grandes mudanças na classificação do subgênero *Passiflora* foram realizadas nos últimos anos, principalmente graças ao trabalho de revisão sistemática realizado por Feuillet e MacDougal (2003). Como já mencionado, os autores reduziram os subgêneros de *Passiflora* para quatro: *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*. No subgênero *Passiflora* foram incorporados os antigos subgêneros *Adenospela* (considerado inválido), *Calopathanthus*, *Distephana*, *Dysosmia*, *Dysosmioides* (também invalidado), *Granadilla*, *Granadillastrum*, *Manicata*, *Rathea*, *Tacsonia*, *Tacsonioides* e *Tacsoniopsis*. Os autores subdividiram o subgênero *Passiflora* em seis superseções.

A superseção *Passiflora* é composta por aquelas espécies que têm estípulas lineares a lanceoladas, folhas serradas, brácteas serradas livres e flores com uma corona vistosa (Ulmer & MacDougal 2004). As espécies desta superseção incluídas no presente trabalho encontraram-se distribuídas ao longo das filogenias, não constituindo em momento algum um grupo monofilético. Registramos somente o agrupamento de *P. edulis* e *P. incarnata*, com alto suporte estatístico. O relacionamento próximo entre estas espécies é descrito desde Killip (1938). As demais espécies, *P. recurva*, *P. lutezelburgii*, *P. setacea*, *P. serratifolia* e *P. racemosa* encontram-se distribuídas em diversos agrupamentos com espécies das superseções *Stipulata* e *Lauriofolia*, na maioria. Acreditamos que as características que circunscrevem esta superseção sejam amplamente distribuídas ao longo do gênero *Passiflora* e que, por isso, a validade da mesma deve ser revista.

A superseção *Stipulata* foi dividida em cinco seções cujas plantas têm estípulas oblongo-ovadas, brácteas livres, folhas inteiras ou trilobadas (exceto as da seção *Dysosmia*) e flores não pendentes, com corona grande e conspícua (exceto as espécies polinizadas por beija-flores das seções *Tacsonioides* e *Kermesinae*). A maior das seções é *Granadillastrum*. As demais são *Calopathanthus* (monoespecífica), *Tacsonioides*, *Kermesinae* e *Dysosmia*. Em nossas análises, a maioria das espécies da superseção *Stipulata* localizou-se no mesmo agrupamento, embora diversas espécies façam parte de outros, como *P. urubicensis*, *P. reflexiflora* e *P. sprucei*, *P. mucugeana* e *P. chrysophylla*. Dentro do agrupamento com a maioria das espécies de *Stipulata*, as seções *Granadillastrum*, *Tacsonioides* e *Kermesinae* também não representam grupos monofiléticos. Dentre as espécies desta superseção destacam-se os casos de *P.*

*ischnoclada* e *P. jilekii*, além de *P. amethystina* e *P. loefgrenii* mais *P. nitida* e *P. acuminata* que compuseram duplas de espécies em todas as árvores filogenéticas obtidas.

*P. ischnoclada* foi descrita por H. Harms em 1929, mas o único exemplar registrado de sua coleta original foi perdido em um incêndio no herbário do Museu de Berlin-Dahlem, na Alemanha, conforme relata Bernacci (2001). *P. ischnoclada* e *P. jilekii* foram consideradas morfológicamente bastante próximas, em função de suas brácteas coloridas e membranáceas, além de formato da folha similar, diferindo quanto à largura das estípulas (Bernacci 2001), já tendo sido consideradas como sinônimos de uma mesma entidade taxonômica (Cervi, 1997). Entretanto, novos exemplares de *P. ischnoclada* foram encontrados no estado de São Paulo e a espécie foi revalidada (Bernacci 2001; Cervi, 2006). Killip (1938) incluiu *P. ischnoclada* na série *Laurifoliae*, cujas características foram assim descritas por Cervi (1997): “folhas simples e inteiras com mais de 2,5 cm de largura; brácteas livres na base, maiores de 1 cm de comprimento, arredondadas no ápice e pecíolo com duas glândulas”. Em nossas análises, *P. ischnoclada* e *P. jilekii* mostraram-se sempre próximas, com altos valores de suporte, embora sua superseção, *Stipulata*, tenha se caracterizado polifilética, e diferenças tenham sido encontradas em suas seqüências, corroborando a hipótese de que se trata de duas espécies válidas.

*P. amethystina* e *P. loefgrenii* formaram um agrupamento com valores de suporte moderados a altos. *P. loefgrenii* foi descrita por Vitta (1997), como parte do subgênero *Passiflora*, série *Lobatae* (*sensu* Killip), de distribuição restrita à bacia do rio Ribeira, no estado de São Paulo, Brasil. A espécie diferencia-se de *P. amethystina* por apresentar pendúnculos longos e grandes flores roxas, enquanto *P. amethystina* tem flores azuladas. Vegetativamente as duas espécies são bastante similares a *P. eichleriana*, mas esta apresenta flores brancas (Vitta 1997). Conforme a classificação de Feuillet e MacDougal (2003) as três espécies estão incluídas na seção *Granadillastrum*, superseção *Stipulata* do subgênero *Passiflora*.

Outro caso bastante interessante é o de *P. actinia*, *P. elegans*, *P. sidaefolia* e *P. eichleriana*. *P. actinia* e *P. elegans* são espécies de distribuição parapátrica. *P. elegans* tem distribuição restrita ao estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e Mata Atlântica *sensu lato* da Argentina, enquanto *P. actinia* tem distribuição ampla, ocorrendo na Mata Atlântica *sensu strictu*, desde o Rio Grande do Sul até o Espírito Santo, Brasil. O trabalho de Lorenz-Lemke *et al.* (2005) demonstrou a existência de um híbrido interespecífico entre as mesmas na região limítrofe das duas distribuições, além de um gradiente norte-

sul de distribuição da variabilidade em *P. actinia*. *P. elegans* passou por um evento recente de gargalo de garrafa, seguido de expansão populacional. Neste estudo, *P. sidaefolia* foi utilizada como grupo externo. Esse agrupamento é suportado com alto valor estatístico em diversas de nossas análises, bem como em outras análises filogenéticas (Muschner *et al.* 2003, Muschner 2005). *P. eichleriana*, que esteve presente eventualmente (quando considerados todos os conjuntos de dados e análises realizadas) neste agrupamento ocorre no sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, além de no país vizinho Paraguai (Killip 1938). Nas análises de Muschner *et al.* (2003) e Muschner (2005), além de parte de nossos resultados, *P. eichleriana* formou agrupamento com *P. caerulea*. Ambas pertencem à seção *Granadillastrum* da superseção *Stipulata*. Novamente, atribuímos a variação de alguns relacionamentos filogenéticos encontrados nas árvores resultantes do presente estudo à baixa resolução filogenética obtida com os mesmos, principalmente no subgênero *Passiflora*.

A superseção *Laurifolia* é caracterizada por grandes flores pendentes, com uma corona longa de filamentos que circunda o ovário de maneira campanulada. Esse grupo é dividido em três séries, de acordo com Ulmer & MacDougal (2004). A série *Laurifoliae* tem estípulas lineares, ou linear-lanceoladas, brácteas livres e com glândulas, e folhas inteiras lanceoladas ou oblongo-ovadas. As brácteas conadas, ao menos na base, independente do tipo de folha, caracterizam a série *Tilifolia*. A série *Quadrangulares* compreende espécies com caules alados e quadrangulares, além de folhas não lobadas, brácteas livres e estípulas ovado-lanceoladas. A série *Marginatae*, monotípica, é caracterizada por folhas pequenas e flores com brácteas reduzidas e não esteve representada em nossa amostra. Verificou-se nas árvores filogenéticas a presença de um agrupamento composto majoritariamente por espécies desta superseção (*P. ambigua*, *P. riparia*, *P. acuminata*, *P. nitida*, *P. alata* e *P. laurifolia*), todas da série *Laurifoliae*, exceto *P. alata*, de *Quadrangulares*. A outra espécie desta série, *P. quadrangularis*, localizou-se na base do subgênero, com relacionamentos indefinidos, assim como *P. gabrielliana*. *P. maliformis* (da seção *Laurifoliae*) e *P. platyloba*, *P. ligularis* e *P. serratodigitata* (seção *Tilifolia*), da superseção *Laurifolia*, compuseram agrupamento consistente com espécies da superseção *Tacsonia*.

As espécies da superseção *Coccinea* têm estípulas linear-lanceoladas e flores vermelhas com corona curta, além de brácteas longas (Ulmer & MacDougal 2004). Os representantes desta superseção incluídos em nossas análises localizaram-se junto às espécies da superseção *Stipulata*. Duas das espécies, *P. coccinea* e *P. vitifolia*, agruparam-se com baixo suporte estatístico. O posicionamento desta superseção pode

ser fruto da aparente polifilia das superseções do subgênero *Passiflora*, como também da baixa resolução obtida para este subgênero através dos marcadores *rpoC1* e ITS.

Para a superseção *Tacsonia*, Feuillet e MacDougal (2003) seguiram a classificação publicada por Escobar (1988), mas transformaram as séries em seções. A seção *Colombiana* é a mais rica em espécies, com aquelas espécies com estípulas filiformes ou lanceoladas, brácteas tipicamente livres, com margem serrada ou fimbriada e folhas não lobadas ou trilobadas com lobos profundos. Com poucas exceções, são nativas da Colômbia e têm diversas séries reconhecidas. A segunda maior seção é *Elkea*, com plantas com brácteas grandes, inteiras e conadas, estípulas serradas a laceradas e folhas trilobadas. Suas espécies ocorrem no Equador e no Peru. As espécies da seção *Insignes* têm estípulas pinatissectas e corona filiforme, e ocorrem em sua maioria na Bolívia e no Peru. A seção *Tacsonia* compreende os representantes com flores na orientação horizontal. De resto, é similar à seção *Elkea*. Por isso, Ulmer e MacDougal (2004) sugerem a fusão das seções *Tacsonia* e *Elkea*. A seção *Manicata* é composta por quatro espécies de flores vermelhas e uma com flores brancas, com tubo floral curto e corona multisseriada. As seções menores são: *Boliviana*, *Fimbriatistipula*, *Parritana*, *Tacsoniopsis* e *Trifoliata*, todas definidas de acordo com a morfologia das brácteas e a coloração das folhas. *P. antioquiensis*, da série *Lepstomischae*, foi a única representante da seção *Colombiana* amostrada neste estudo. A espécie compôs um agrupamento com os demais membros da superseção *Tacsonia*, *P. mathewsii* e *P. mixta*. Estas são referidas por Ulmer e MacDougal (2004) como “espécies irmãs”, uma vez que diferem entre si pelo tamanho do tubo floral (menor em *P. mathewsii*) e pela simetria do androécio. *P. trisecta* foi a única representante da seção *Manicata*, e ocupou lugar na base do grande agrupamento de espécies da superseção *Stipulata*. Não se pode afirmar se este fato deveu-se à condição polifilética dos agrupamentos infra-subgenéricos de *Passiflora* ou a um artefato, através do qual a espécie agrupou com outras distantes por não ter um relativo disponível no alinhamento. O caso de *P. pilosicorona* parece ser o mesmo. Sendo a única representante da seção *Insignes*, ela esteve presente em diversas árvores filogenéticas na base do agrupamento de espécies da seção *Dysosmia*, superseção *Stipulata*.

Em resumo, as análises do presente trabalho evidenciaram que a classificação infra-subgenérica do subgênero *Passiflora* não corresponde a grupos naturais, monofiléticos. Embora a resolução dos relacionamentos infra-subgenéricos tenha sido visivelmente menor no subgênero *Passiflora* que nos demais, esta é uma conclusão segura. Esse fato acrescenta indícios à idéia de necessidade de revisão dos caracteres

de classificação infra-subgenérica de *Passiflora*, pois a mesma é centrada em caracteres morfológicos foliares, que são altamente variáveis e sujeitos a influências ambientais em *Passiflora* (Benson *et al.* 1976; MacDougal 1994; Barp *et al.* 2006)

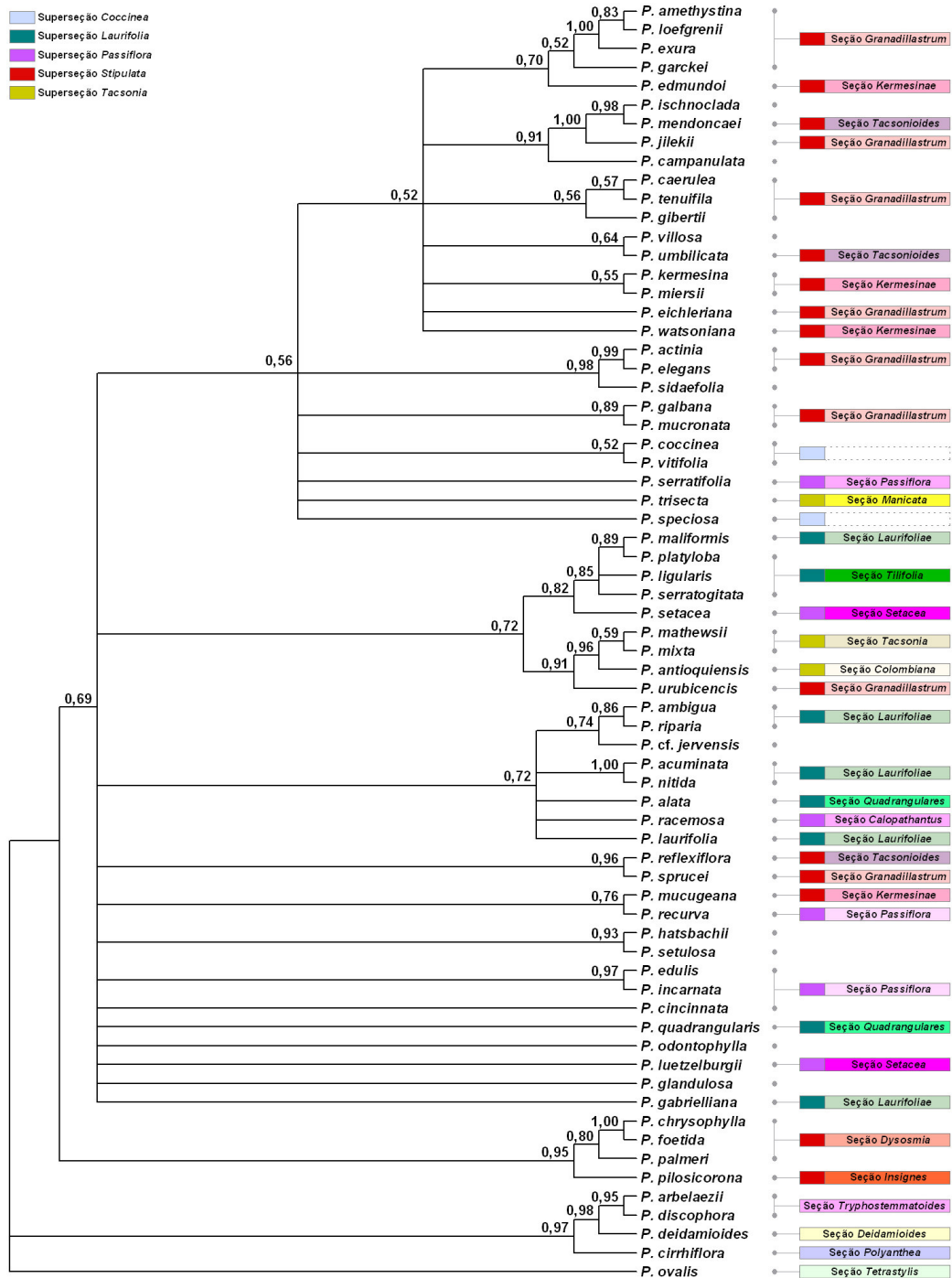


Figura 22. Árvore filogenética baseada nas seqüências do marcador ITS obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior. *P. arbelaezii*, *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides*, *P. discophora* e *P. ovalis* pertencem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Passiflora*.

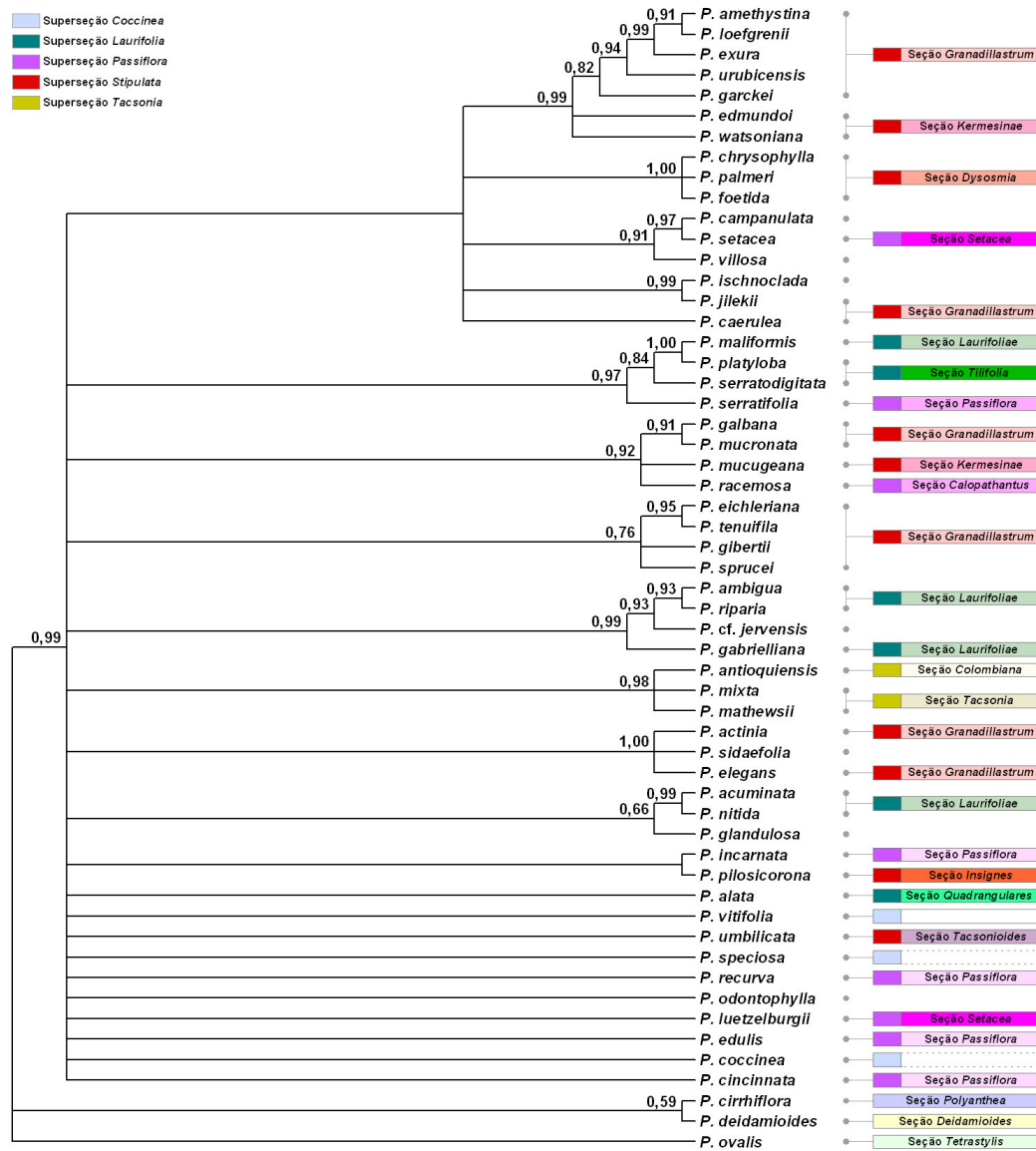


Figura 23. Árvore filogenética baseada nas seqüências do marcador *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de probabilidade posterior. *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides* e *P. ovalis* pertencem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Passiflora*.

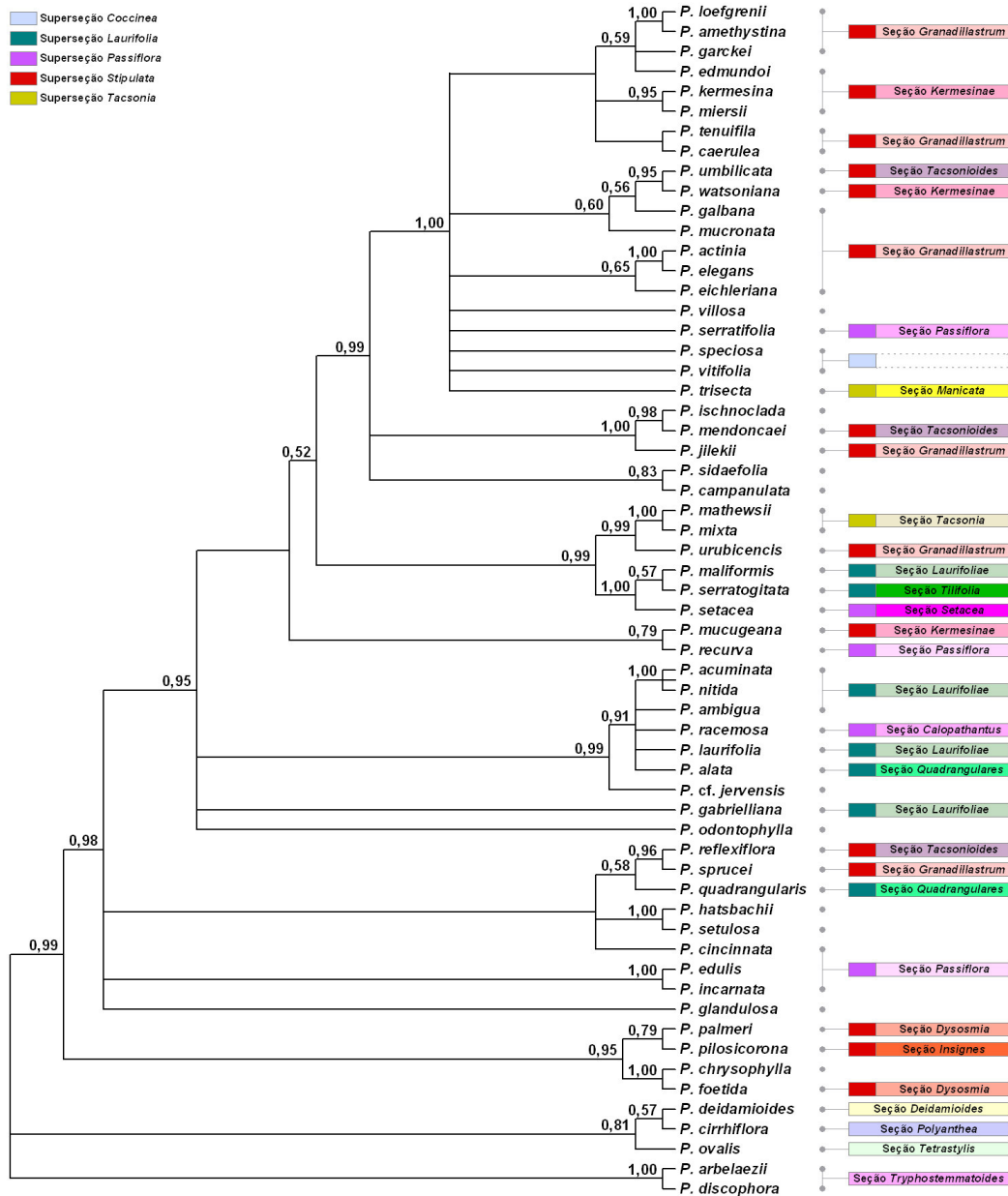


Figura 24. Árvore filogenética baseada nas seqüências dos marcadores ITS e *rpoC1* obtida através de inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores probabilidade posterior. *P. arbelaezii*, *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides*, *P. discophora* e *P. ovalis* pertecem ao subgênero *Deidamioides*. As demais espécies, ao subgênero *Passiflora*.



#### 4.6 Análises filogenéticas: subgênero *Deidamioides*

As espécies do subgênero *Deidamioides* foram utilizadas como grupo externo em nossas análises. As análises do marcador ITS e as com os dados concatenados contaram com cinco espécies: *P. deidamioides*, da seção *Deidamioides*, *P. ovalis*, da seção *Tetrastylis*, *P. cirrhiflora*, da seção *Polyanthea* e *P. arbelaezii* e *P. discophora*, da seção *Tryphostemmatoides*. Ainda compõe o subgênero a seção *Mayapathantus*, com um único representante, *P. obovata*, não incluído neste trabalho. Para enraizar as árvores do marcador *rpoC1* foram utilizadas *P. cirrhiflora*, *P. deidamioides* e *P. ovalis*, pois não obtivemos seqüências do mesmo para as demais espécies.

O agrupamento de *P. deidamioides*, *P. ovalis* e *P. cirrhiflora* foi constante nas árvores filogenéticas obtidas com o marcador ITS para os demais subgêneros, e apresentou altos valores de suporte (BS 100 PP 1,00) (figuras 9, 16 e 22). Nas árvores obtidas com o marcador *rpoC1* para todos os subgêneros, tanto com a seqüência total, como só com o íntron, *P. cirrhiflora* agrupou-se com *P. ovalis*, tendo *P. deidamioides* como grupo irmão (figuras 12 e 13). Nestas análises o subgênero mostrou-se monofilético. Através das seqüências parciais dos exons houve uma inversão: *P. deidamioides* formou agrupamento com *P. cirrhiflora*, excluindo *P. ovalis*, que posicionou-se junto ao subgênero *Passiflora* (figura 14). Quando o marcador foi analisado para cada subgênero isoladamente repetiu-se o agrupamento *P. cirrhiflora* e *P. ovalis*, mais *P. deidamioides*, exceto análise com o subgênero *Decaloba*, onde as espécies constituíram uma politomia (figuras 11, 19 e 23).

Nas análises com os marcadores concatenados por subgênero, os resultados foram bastante divergentes. O subgênero *Deidamioides* mostrou-se polifilético na análise com o subgênero *Astrophea* (figura 15) e monofilético na com o subgênero *Decaloba* (figura 20), mantendo-se os agrupamentos internos. Com as espécies de *Passiflora* o subgênero também se mostrou polifilético, em razão da não inclusão de *P. ovalis* no agrupamento das demais espécies do mesmo (figura 24).

As seções de *P. deidamioides* e de *P. cirrhiflora* são monoespecíficas, enquanto *P. ovalis* é acompanhada na seção *Tetrastylis* por *P. contracta* (espécie esta cujo “status” taxonômico é questionado – ver Vitta e Bernacci, 2004 e Cervi, 2006 para detalhes). A seção *Deidamioides* é caracterizada por folhas trifolioladas, flores nascidas nas gavinhas e corona multisseriada, de coloração branca. Já a seção *Polyanthea* apresenta folhas com cinco a nove lobos, flores também nascidas nas gavinhas e corona multisseriada de cor amarelo alaranjada, diferindo da anterior pela forma da folha, caráter não recomendado para taxonomia morfológica de *Passiflora* em função da alta variabilidade,

e pela coloração da corona de filamentos. As espécies da seção *Tetrastylis* têm inflorescência racemosa e flores zigomórficas, com quatro estigmas (Ulmer & MacDougal 2004), o que era considerado o caráter distintivo para a proposição de um novo gênero na família Passifloraceae (*Tetrastylis*).

*P. discophora* e *P. arbelaezii* formaram um agrupamento nas análises de ITS (BS 100 PP 1,00). As duas espécies pertencem à seção *Tryphostemmatoides*, composta por sete espécies no total. A seção é caracterizada pela presença de folhas e flores pequenas, que surgem aos pares nas gavinhas, exceto em *P. discophora*, que tem flores em pedúnculos que partem das gavinhas (Ulmer & MacDougal 2004)

Destaca-se em nossos resultados o fato de que, em algumas análises, o subgênero *Deidamioides* mostrou-se monofilético, com altos valores de suporte estatístico e, em outras, foi claramente polifilético, com os dois agrupamentos bem distintos já relatados. O agrupamento de *P. arbelaezii* e *P. discophora* reuniu espécies da mesma seção, cuja espécie tipo, *P. tryphostemmatoides*, foi considerada um subgênero a parte por Muschner (2005), o que reforça a idéia do subgênero polifilético e da existência de um quinto subgênero em *Passiflora*. Resultados similares aos de Muschner (2005) também foram obtidos por Krosnick e Freudenstein (2005). Nas análises de Yockteng e Nadot (2004), somente uma espécie do subgênero *Deidamioides* foi incluída; portanto, as autoras não fizeram inferências sobre a validade do mesmo.

Em função do exposto, a questão da monofilia ou não do subgênero *Deidamioides* permanece em aberto. Nossa recomendação para a resolução desta questão é a realização de novas análises filogenéticas, com as demais espécies do subgênero, através dos marcadores cloroplasmáticos utilizados por Muschner (2005), altamente informativos, e de ITS, que se revelou bastante informativo quando analisado separadamente para cada subgênero neste trabalho. Também serão de extrema valia os resultados da revisão taxonômica morfológica do grupo, que está sendo realizada por T.S. Nunes (Universidade Estadual de Feira de Santana) em sua tese de doutorado.

#### 4.7 Análises filogenéticas: introns do grupo II

As análises filogenéticas de distância foram realizadas com seqüências dos marcadores *nad1* e *rpoc1*. Em ambos os marcadores ocorreram diversos eventos e inserção e deleção. Assim, nossas análises foram realizadas com o intuito de avaliar a quantidade de informação filogenética obtida através deste tipo de caráter. As árvores obtidas são apresentadas nas figuras 25 e 26. Em ambas foi possível diferenciar os subgêneros de *Passiflora*, embora os grupos externos tenham se misturado aos mesmos, o que também foi verificado nas análises de Muschner (2005) para o íntron *nad1b-c*. Os

valores de “bootstrap” nas duas árvores também foram similares. Assim, concluímos que para estes dois marcadores a realização da codificação de indels para as análises não resultou em aumento da resolução das árvores filogenéticas.

Diversos autores comprovaram a eficiência da utilização de caracteres tipo indel em análises filogenéticas (Simmons & Ochoterena 2000; Simmons *et al.* 2001). É o caso, por exemplo, dos introns *nad1b-c* na família Orchidaceae (Freudenstein & Chase 2001) e *petD* (do gene que codifica a subunidade IV do citocromo b) em angiospermas basais (Löhne & Borsch 2005), onde as análises de dados combinando seqüências e indels tiveram acréscimo significativo na resolução e nos valores de suporte. Entretanto, a utilidade deste tipo de caráter, bem como o tipo de codificação ideal deve ser analisada caso a caso de acordo com o marcador e os *taxa* em questão. Assim, ressaltamos que nossas conclusões só se aplicam aos marcadores *rpoC1* e *nad1b-c*, no gênero *Passiflora*.

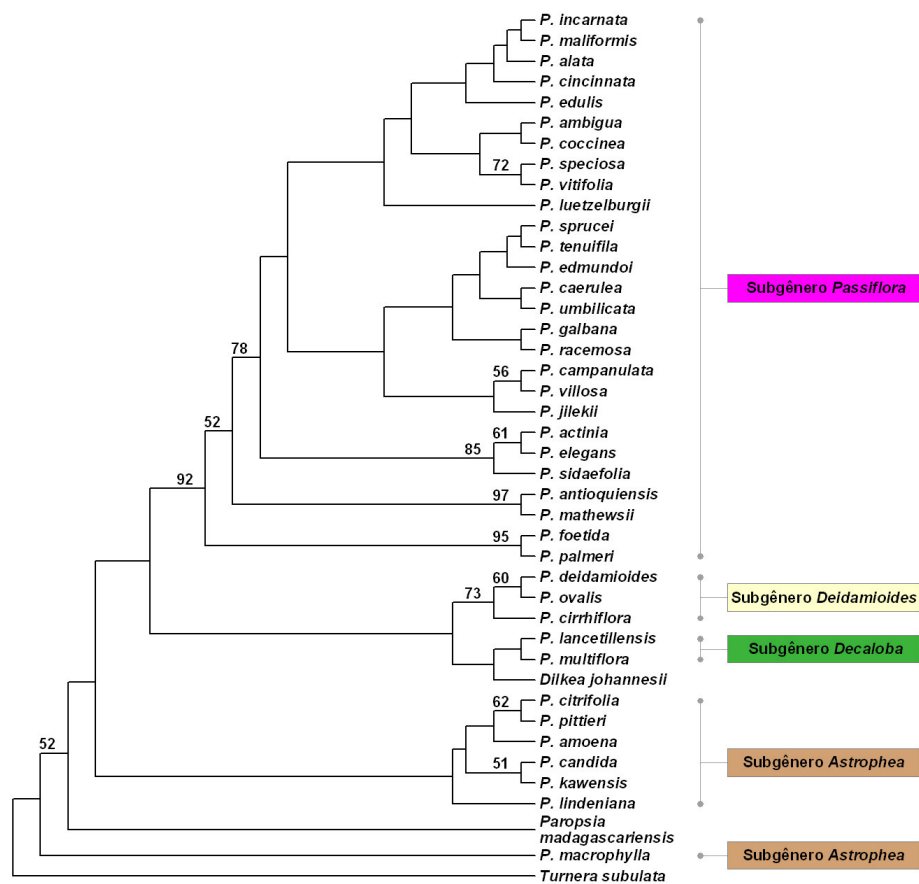


Figura 25. Árvore filogenética baseada nas seqüências dos introns *nad1b-c* e *rpoC1* obtida através de NJ, sem a codificação de indels. Os números sobre os ramos indicam valores de “bootstrap”.

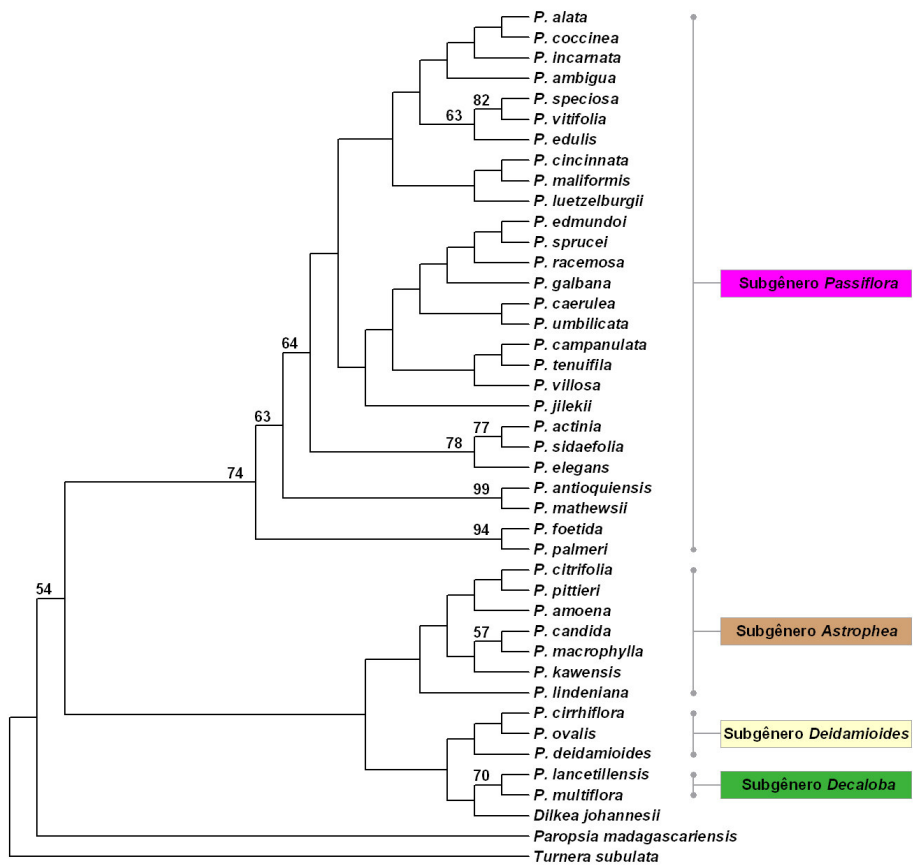


Figura 26. Árvore filogenética baseada nas seqüências dos introns *nad1b-c* e *rpoC1* obtida através de NJ, com a codificação de indels no programa GapCoder. Os números sobre os ramos indicam valores de “bootstrap”.

## 5. CONCLUSÕES

O marcador nuclear ITS mostrou-se bastante útil na análise filogenética do gênero *Passiflora*, bem como na resolução da classificação infra-subgenérica do mesmo. Verificou-se que a alta variabilidade das seqüências de ITS reside em sua maior parte entre os subgêneros. A abordagem de análise por subgêneros mostrou-se especialmente promissora, podendo vir a ser aplicada em outros *taxa*.

Também o marcador plastidial *rpoC1* foi bastante variável, principalmente na porção seqüenciada do éxon 2. Apesar de não ter sido possível a análise do íntron *rpl16*, sua variabilidade na seqüência de anelamento dos “primers” que dificultou a amplificação, bem como o impedimento do seqüenciamento, indicam a presença de alguma variabilidade no mesmo. Os íntrons *nad1b-c* e *rpoC1* foram pouco informativos, não se prestando, em conjunto, para a análise da classificação infra-subgenérica no gênero *Passiflora*. As análises com os eventos de inserção e deleção adicionaram pouca informação aos resultados.

Quanto às questões taxonômicas do gênero *Passiflora*, a monofilia dos subgêneros *Astropheia*, *Decaloba* e *Passiflora* foi mais uma vez confirmada. O “status” do subgênero *Deidamioides* como grupo natural permaneceu em aberto, assim como a existência do possível quinto subgênero *Tryphostemmatoides*. Análises com maior número de espécies se fazem necessárias para elucidar esta questão. A respeito da classificação infra-subgenérica das espécies de *Passiflora*, concluiu-se através deste trabalho que a maioria das superseções e seções é polifilética. Somente as definidas por caracteres conspícuos compõem grupos naturais. Portanto, os caracteres morfológicos que as delimitam devem ser revistos.

## 6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas de continuidade do presente trabalho têm-se:

- Construção de “primers” específicos para *Passiflora* que sejam capazes de amplificar e permitir o seqüenciamento do íntron plastidial *rpl16*.
- Incorporação de seqüências de ITS de mais espécies de *Passiflora*, em busca da redução do número de dados faltantes, o que possibilitará a inclusão da região 5,8S do nrDNA, que já demonstrou ser filogeneticamente informativa.
- Amplificação e clonagem do marcador ITS em espécies de *Passiflora* pertencentes a diversos subgêneros, para descartar a ocorrência de não homogeneização das cópias parálogas do marcador.
- Amplificação da seqüência restante do éxon 2 do gene plastidial *rpoC1* para possibilitar a investigação da ocorrência ou não de seleção diversificadora nesta região.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW & Leitch AR (2000) Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Am. J. Bot.* 87: 1578-1583.
- Alfaro ME, Zoller S & Lutzoni F (2003) Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of bayesian Markov Chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Mol. Biol. Evol.* 20(2): 255-266.
- Alvarez I & Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 417-434.
- APG I (1998) An ordinal classification for the families of flowering plants". *Ann. Miss. Bot. Gard.* 85: 531-553.
- APG II (2003) An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 399-436.
- Arias S, Terrazas T, Arreola-Nava HJ, Vázquez-Sánchez M & Cameron KM (2005) Phylogenetic relationships in *Peniocereus* (Cactaceae) inferred from plastid DNA sequence *J. Plant. Res.* 118: 317-28.
- Asmussen CB & Chase MW (2001) Coding and noncoding plastid DNA in palm systematics. *Am. J. Bot.* 88: 1103-1117.
- Baldwin BG (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 3-16.
- Baldwin BG (1993) Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. *Am. J. Bot.* 80: 222-238.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowki MF, Campbell CS & Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Barp EA, Soares GL, Gosmann G, Machado AM, Vecchi C & Moreira GR (2006) Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. *Braz. J. Biol.* 66: 853-62.
- Bellarosa R, Simeone MC, Papini A & Schirone B (2005) Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34: 355-370.
- Benson WW, Brown KS & Gilbert LE (1975) Coevolution of plant and herbivores: passion flower butterflies. *Evolution* 29: 659-680.
- Bernacci LC (2001) Notas sobre *Passiflora ischnoclada* Harms (Passifloraceae). *Acta Bot. Bras.* 15: 197-199.
- Borsch T, Hilu KW, Quandt D, Wilde V, Neinhuis C & Barthlott W (2003) Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *J. Evol. Biol.* 16: 558-576.
- Buckler ES IV, Ippolito A & Holtsford TP (1997) The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics* 145: 821-832.
- Campagna ML & Downie SR (1998) The intron in chloroplast gene *rp16* is missing from the flowering plant families Geraniaceae, Goodeniaceae and Plumbaginaceae. *Trans. Ill. State Acad. Sci.* 91: 1-11.



- Cervi AC (1997) Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. Fontqueria 45: 1-92.
- Cervi AC (2006) O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. Adumbrationes ad Summae Editionem 16: 1-5.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Qiu YL, Kron KA, Retting JH, Conti E, Palmer JD, Manhart JR, Sytsma KJ, Michael HJ, Kress WJ, Karol KG, Clark WD, Hedrén M, Gaut BS, Jansen RK, Kim KJ, Wimpee CF, Smith JF, Furnier GR, Strauss SH, Xiang QY, Plunkett GM, Soltis PS, Swensen SM, Williams SE, Gadek PA, Quinn CJ, Eguiarte LI, Golenberg E, Learn Jr. GH, Graham SW, Barrett SCH, Dayanandan S & Albert VA (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. Ann. Mo. Bot. Gard. 80: 528-580.
- Chase MW, Zmarzty S, Lledó MD, Wurdack KJ, Swensen SM & Fay MF (2002) When in doubt put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcl* DNA sequences. Kew Bull. 57: 141-181.
- Chaw SM, Long H, Wang BS, Zharkikh A & Li WH (1993) The phylogenetic position of Taxaceae based on 18S rRNA sequences. J. Mol. Evol. 37:624-630.
- Clausen V, Frydenvang K, Koopmann R, Jorgensen LB, Abbiw DK, Ekpe P & Jaroszewski JW (2002) Plant analysis by butterflies: occurrence of cyclopentenylglycines in Passifloraceae, Flacourtiaceae, and Turneraceae and discovery of the novel nonproteinogenic amino acid 2-(3'-cyclopentenyl)glycine in *Rinorea*. J. Nat. Prod 65: 542-547.
- Cronquist A (1981) An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press, 1261pp.
- Davis CC, Webb CO, Wurdack KJ, Jaramilo CA & Donoghue MJ (2005) Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-cretaceous origin of modern tropical rain forests. Am. Nat. 165: E36-E65.
- De Melo NF & Guerra F<sup>o</sup>. MS (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. Ann. Bot. 92: 309-316.
- De Melo NF, Cervi AC & Guerra F<sup>o</sup>. MS (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). Plant Syst. Evol. 226: 69-84.
- Delsuc F, Brinkmann H & Philippe H (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. Nat. Rev. Genet. 6: 361-375.
- Devos N, Raspé O, Oh S-H, Tyteca D & Jacquemart A-L (2006) The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: insights from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data. Mol. Phylogenet. Evol. 38: 767-778.
- Downie SR, Katz-Downie DS & Cho KJ (1996a) Phylogenetic analysis of Apiaceae subfamily Apioideae using nucleotide sequences from the chloroplast *rpoC1* intron. Mol. Phylogenet. Evol. 6:1-18.
- Downie SR, Llanas E & Katz-Downie DS (1996b) Multiple independent losses of the *rpoC1* intron in angiosperm chloroplast DNAs. Syst. Bot. 21: 135-151.
- Downie SR, Katz-Downie DS, Rogers EJ, Zujewski HL & Small E (1998) Multiple independent losses of the plastid *rpoC1* intron in *Medicago* (Fabaceae) as inferred from phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Can. J. Bot. 76: 791-803.
- Downie SR, Katz-Downie DS & Watson MF (2000) A phylogeny of the flowering plant

- family Apiaceae based on chloroplast DNA *rpl16* and *rpoC1* intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae. *Am. J. Bot.* 87: 273-292.
- Duff RJ & Nickrent DL (1999) Phylogenetic relationships of land plants using mitochondrial small-subunit rDNA sequences. *Am. J. Bot.* 86: 372-386.
- Dunn IS & Blattner FR (1986) Sharons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Res.* 15: 2677-2698.
- Dutra CG, Zamberlan PM, Lorenz-Lemke A, Nunes TS, Queiroz L, Cervi AC, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas, L (2006) Estrutura populacional em *Passiflora ovalis* Vell: ex Roemer (Passifloraceae) determinada através do estudo de marcadores plastidiais. In: CD de Resumos do LVII Congresso Nacional de Botânica.
- Ellison NW, Liston A, Steiner JJ, Williams WM & Taylor NL (2006) Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium* – Leguminosae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39: 688-705.
- Escobar LK (1988) Passifloraceae. In: Pinto P and Lozano G (eds). *Flora de Colombia*. Univ. Nac. de Colombia, Bogotá. 10: 1-138.
- Escobar LK (1989) A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 76: 877-885.
- Felsenstein J (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27: 401-410.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Ferreira HB (2003) Organização gênica de eucariotos. In Zaha A, Ferreira HB and Passaglia LMP (eds) *Biologia Molecular Básica*. 3rd edition. Mercado Aberto, Porto Alegre, pp 92-126.
- Feuillet C (2002) A new series and three new species of *Passiflora* subgenus *Astrophea* from the Guianas. *Brittonia* 54: 18-29
- Feuillet C & MacDougal JM (2003) A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora* 13: 34-38.
- Fior S, Karis PO, Casazza G, Minuto L & Sala F (2006) Molecular phylogeny of the Caryophyllaceae (Caryophyllales) inferred from chloroplast *matK* and nuclear rDNA ITS sequences. *Am. J. Bot.* 93: 399-411.
- Freudenstein JV & Chase MW (2001) Analysis of mitochondrial *nad1b-c* intron sequences in Orchidaceae: utility and coding of length-change characters. *Syst. Bot.* 26: 645-657.
- Fuertes Aguilar J, Rosselló JA & Nieto Feliner G (1999) Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). *Mol. Ecol.* 8: 1341-1346.
- Gielly L & Taberlet P (1994) The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Mol. Biol. Evol.* 11: 769-777.
- Goel S, Raina SN & Ogihara Y (2002) Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the *Phaseolus-Vigna* Complex. *Mol. Phyl. Evol.* 22:1-19.
- Goertzen LR, Cannone JJ, Gutell RR & Jansen RK (2003) ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 216-234.

- Goldblatt P, Savolainen V, Porteous O, Sostaric I, Powell M, Reeves G, Manning JC, Barraclough TG & Chase MW (2002) Radiation in the Cape flora and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25: 341-360.
- González AMT & Morton CM (2005) Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 36-44.
- Goremykin VV, Hirsch-Ernst KI, Wolfi S & Hellwing FH (2003) Analysis of the *Amborella trichopoda* chloroplast genome sequence suggests that *Amborella* is not a basal angiosperm. *Mol. Biol. Evol.* 20: 1499-1505.
- Goremykin VV, Hirsch-Ernst KI, Wolfi S & Hellwing FH (2004) The chloroplast genome of *Nymphaea alba* whole genome analyses and the problem of identifying the most basal angiosperm. *Mol. Biol. Evol.* 21: 1445-1454.
- Graur D & Li W-H (2000) Fundamentals of molecular evolution. 2nd edition Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 481pp.
- Grundt HH, Popp M, Brochman C & Oxelman B (2004) Polyploid origins in a circumpolar complex in *Draba* (Brassicaceae) inferred from cloned nuclear DNA sequences and fingerprints. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 695-710.
- Guindon S & Gascuel O (2003) PhyML – A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.
- Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi AC & Jansen RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Syst Bot* 31:138-150.
- Harpke D & Peterson A (2006) Non-concerted ITS evolution in *Mammillaria* (Cactaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 41: 579-593.
- Hidalgo O, Garcia-Jacas N, Garnatje T & Susanna A (2006) Phylogeny of *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae) and related genera inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data: taxonomic and biogeographic implication. *Ann. Bot.* 97:705-714.
- Hiesel R, Haseler AV & Brennicke A (1994) Plant mitochondrial nucleic acid sequences as a tool for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 634-638.
- Hosokawa K, Shibata T, Nakamura I & Hishida A (2004) Discrimination among species of *Papaver* based on the plastid *rpl16* gene and the *rpl16-rpl14* spacer sequence. *Forensic Sci.Int.* 139: 195-199.
- Hott S B, Culham A & Crane PR (1995) The utility of *atpB* gene sequences in resolving phylogenetic relationships: comparison with *rbcL* and 18S ribosomal DNA sequences in the Lardizabalaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82: 194-207.
- Huang J, Giannasi DE & Price RA (2005) Phylogenetic relationships in *Ephedra* (Ephedraceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol* 35: 48-59.
- Hudson GS, Holton TA, Whitfield PR & Bottomley W (1988) Spinach chloroplast *rpoBC* genes encode three subunits of the chloroplast RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 200: 639-654.
- Johnson LA & Soltis DE (1994) *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Syst. Bot.* 19: 143-156.
- Judd WS & Olmstead RG (2004) A survey of tricolpate (eudicot) phylogenetic

- relationships. *Am. J. Bot.* 91: 1627-1644.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA & Stevens PF (1999) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, XVI + 464pp.
- Kajita T, Kamiya K, Nakamura K, Tachida H, Wikneswari R, Tsumura Y, Yoshimaru H & Yamazaki T (1998) Molecular phylogeny of Dipetrocarpaceae in Southeast Asia based on nucleotide sequences of *matK*, *trnL* intron, and *trnL-trnF* intergenic spacer region in chloroplast DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10: 202-209.
- Katayama H & Ogiwara Y (1996) Phylogenetic affinities of the grasses to other monocots as revealed by molecular analysis of chloroplast DNA. *Curr. Genet.* 29: 572-581.
- Kelchner SA (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 87: 482-498.
- Kelchner SA (2002) Group II introns as phylogenetic tools: structure, function and evolutionary constraints. *Am. J. Bot.* 89: 1651-1669.
- Kelchner SA & Clarrck LG (1997) Molecular evolution and phylogenetic utility of the chloroplast *rpl16* introns in *Chusquea* and the Bambusoideae (Poaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 8: 385-397.
- Kelchner SA & Thomas MA (2007) Model use in phylogenetics: nine key questions. *Trends Ecol. Evol.* 22: 87-94.
- Killip EP (1938) *The American Species of Passifloraceae*. Field Museum of Natural History, Botanical Series 19: 1-613.
- Kim K & Jansen RK (1995) *ndhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 10379-10383.
- Koehler-Santos P, Lorenz-Lemke A, Muschner VC, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. *Biol. J. Linn. Soc.* 88: 611-630.
- Krosnick SE & Freudenstein JV (2005) Monophyly and floral character homology of Old World *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: Supersection *Disemma*). *Syst. Bot.* 30: 139-152.
- Krosnick SE, Harris EM & Freudenstein JV (2006) Patterns of anomalous floral development in the Asian *Passiflora* (Subgenus *Decaloba*: supersection *Disemma*). *Am. J. Bot.* 93: 620-636.
- Kumar S, Tamura K & Nei M (2004) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief. Bioinformatics* 5: 150-163. <http://www.megasoftware.net>
- Kyndt T, VanDroogenbroeck B, Romeijn-Peeters E, Romero-Motochi JP, Scheldeman X, Goethebeur P, VanDamme P & Gheysen G (2005) Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 442-459.
- Lacey MR & Chang JT (2006) A signal-to-noise analysis of phylogeny estimation by neighbor-joining: insufficiency of polynomial length sequences. *Math. Biosci.* 199: 188-215.
- Lehman K & Schmidt U (2003) Group II introns: structure and catalytic versatility of large natural ribozymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38: 249-303.
- Lewin B (2001) *Genes VII*. Porto Alegre, Artmed Editora, XVIII + 955 pp.

- Liao D (1999) Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 24-30.
- Löhne C & Borsch T (2005) Molecular evolution and phylogenetic utility of the *petD* group II intron: a case study in basal angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* 22: 317-332.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM & Freitas LB (2005) Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nr DNA) variation. *Ann. Botany* 95: 799–806.
- MacDougal JM (1994) Revision on *Passiflora*, subgenus *Decaloba*, section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). *Systematic Botany Monographs* 41: 1-146.
- MacDougal JM & Hansen AK (2003) A new section of *Passiflora*, subgenus *Decaloba* (Passifloraceae), from Central America, with two new species. *Novon* 13: 459-466.
- Mäder G (2005) Caracterização populacional de onze espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) através do marcador molecular ITS. Dissertação de Bacharelado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 67pp.
- Manen JF & Natali A (1995) Comparison of the evolution of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (*rbcl*) and *atpB-rbcL* noncoding spacer sequences in a recent plant group, the tribe Rubieae (Rubiaceae). *J. Mol. Evol.* 41: 920-927.
- Martin PG & Dowd JM (1991) A comparison of 18S ribosomal RNA and rubisco large subunit sequences for studying angiosperm phylogeny. *J. Mol. Evol.* 33: 274-282.
- Mayol M & Rosseló JA (2001) Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*? *Mol. Phylogenet. Evol.* 19: 167-176.
- Meerow AW, Fay MF, Charles LG, Qin-Bao L, Faridah QZ & Chase MW (1999) Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid sequence data. *Am. J. Bot.* 86: 1325-1345.
- Michel F, Umesono K & Ozeki H (1989) Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns – a review. *Gene* 82: 5-30.
- Mondin CA (2001) *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira citação para o Rio Grande do Sul. *Pesquisas Botânica*, 51: 147-150.
- Moore MJ & Jansen RK (2006) Molecular evidence for the age, origin, and evolutionary history of the American desert plant genus *Tiquilia* (Boraginaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39: 668-687.
- Muschner VC (2005) Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae). Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 162pp.
- Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM & Freitas LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *Am. J. Bot.* 90: 1229-1238.
- Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Vecchia M, Bonatto, SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Differential organellar inheritance in *Passiflora*'s (Passifloraceae) subgenera. *Genetica* 128: 449-453.
- Muse SV (2000) Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. *Plant Mol. Biol.* 42: 25-43.
- Nei M & Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford. 333pp.

- Nicholas KB & Nicholas Jr HB (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Programa distribuído pelo autor. Evolutionary Biology Center, Uppsala University. <http://www.abc.se/~nylander/>
- Ogden TH & MS Rosenberg (2006) Multiple sequence alignment accuracy and phylogenetic inference. *Syst. Biol.* 55: 314-328.
- Ortega GG & Schmidt PC (1995) Obtención de comprimidos conteniendo extractos atomizados de flor de la pasión (*Passiflora incarnata* L.) *Acta Farmacêutica Bonaerense* 14: 173-180.
- Philippe H, Delsuc F, Brinkmann H & Lartillot N (2005) Phylogenomics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 36: 541-562.
- Philippe H, Zhou Y, Brinkmann H, Rodrigue N & Delsuc F (2005) Heterotachy and long-branch attraction in phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* 5:50
- Posada D & Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of the AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* 53: 793-808
- Posada D & Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Qiu YL, Lee J, Bernasconi-Quadroni F, Soltis DE, Soltis PS, Zanis M, Zimmer EA, Chen Z, Savolainen V & Chase MW (1999) The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404-407.
- Qiu YL, Lee J, Bernasconi-Quadroni F, Soltis DE, Soltis PS, Zanis M, Zimmer EA, Chen Z, Savolainen V & Chase MW (2000) Phylogeny of basal angiosperms: analyses of five genes from three genomes. *Int. J. Plant Sci.* 161: S3–S27.
- Qiu YL, Lee J, Whitlock BA, Bernasconi-Quadroni F & Dombrowska O (2001) Was the ANITA rooting of the angiosperm phylogeny affected by long-branch attraction? *Amborella*, Nymphaeales, Illiciales, Trimeniaceae and *Austrobileya*. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1745-1753.
- Razafimandimbison SG, Kellog EA & Bremer B (2004) Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: a case study from Naucleaeae (Rubiaceae). *Syst. Biol.* 53:177-192.
- Regina TMR, Picardi E, Lopez L, Pesole G & Quagliarielo C (2005) A novel additional group II intron distinguishes the mitochondrial *rps3* gene in Gymnosperms. *J. Mol. Evol.* 60: 196-206.
- Renner SS (1999) Circumscription and phylogeny of the Laurales: evidence from molecular and morphological data. *Am. J. Bot.* 86: 1301-1315.
- Richardson JE, Pennington RT, Pennington TD & Hollingsworth PM (2001) Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. *Science* 293: 2242-2245.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Ronsted N, Law S, Thornton H, Fay MF & Chase MW (2005) Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae; Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 35: 509-527.
- Roure B, Rodriguez-Ezpeleta N & Philippe H (2007) SCAFoS: a tool for Selection,

- Concatenation and Fusion of Sequences for phylogenomics. *BMC Evol. Biol.* 7:
- Roy A, Frascaria N, MacKay J & Bousquet J (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 173-180.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 9: 945-967.
- Samigullin TK, Martin WF, Troitsky AV & Antonov AS (1999) Molecular data from the chloroplast *rpoC1* gene suggest a deep and distinct dichotomy of contemporary spermatophytes into two monophyla: gymnosperms (including Gnetales) and angiosperms. *J. Mol. Evol.* 49: 310-315.
- Sang T (2002) Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37: 121-147.
- Savard L, Muchaud M & Bousquet J (1993) Genetic diversity and phylogenetic relationships between birches and alder using ITS, 18S rRNA and *rbcL* gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2: 112-118.
- Savolainen V & Chase M (2003) A decade of progress in plant molecular phylogenetics. *Trends Ecol. Evol.* 19: 717-724.
- Schulmeister S (2004) Inconsistency of maximum parsimony revisited. *Syst. Biol.* 53(4): 521-528.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer, SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE & Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92: 142-166.
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H & Sugiura M (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5: 2043-2049.
- Simmons MP & Freudenstein JV (2003) The effects of increasing genetic distance on alignment of, and tree construction from, rDNA internal transcribed spacer sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 444-451.
- Simmons MP & Ochoterena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 49: 369-381.
- Simmons MP, Ochoterena H & Carr TG (2001) Incorporation, relative homoplasy, and effect of gap characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 50: 454-462.
- Soltis DE, Albert VA, Savolainen V, Hilu K, Qiu YL, Chase MW, Farris JS, Stefanovic S, Rice DW, Palmer JD & Soltis OS (2004) Genome-scale data, angiosperm relationships and "ending incongruence": a cautionary tale in phylogenetics. *Trends Plant Sci* 9: 477-483.
- Soltis DE, Soltis PS, Clegg MT & Durbin M (1990) *rbcL* sequence divergence and phylogenetic relationships in Saxifragaceae sensu lato. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4640-4644.
- Soltis DE, Soltis PS, Endress PK & Chase MW (2005) *Phylogeny and Evolution of Angiosperms*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, 370pp.
- Suh Y, Heo K & Park CW (2000) Phylogenetic relationships of maples (*Acer* L; Aceraceae) implied by nuclear ribosomal ITS sequences. *J. Plant Res.* 113: 193-202.
- Suh Y, Thien LB, Reeve HE & Zimmer EA (1993) Molecular evolution and phylogenetic

implication of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Am. J. Bot.* 80: 1042-1055.

Suzuki Y, Glzko GV & Nei M (2002) Overcredibility of molecular phylogenies obtained by bayesian phylogenetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(25): 16138-16143.

Swofford DL (1998) PAUP\* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and others methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, 554 pp.

Takhtajan A (1991) Evolutionary trends in flowering plants. New York, Columbia University Press, 241pp.

Tanaka M, Wakasugi T, Sugita M, Shinozaki K & Sugiura M (1986) Genes for the eight ribosomal proteins are clustered on the chloroplast genome of tobacco (*Nicotiana tabacum*): similarity to the S10 and *spc* operons of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 6030-6034.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.

Ulmer T & MacDougal JM (2004) *Passiflora* – Passionflowers of the World. Timber Press, Portland-Cambridge, 430pp.

van den Berg C, Goldman DH, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Cameron KM & Chase MW (2005) An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 92: 613-624.

Vitta FA (1997) *Passiflora loefgrenii* (Passifloraceae), a new species in subgenus *Passiflora* from the Brazilian Atlantic rainforest. *Novon* 7: 218-212.

Vitta FA & Bernacci LC (2004) A new species of *Passiflora* in section *Tetrastylis* (Passifloraceae) and two overlooked species of *Passiflora* from Brazil. *Britonia* 56(1): 89-95.

Wallace RS & Cota JH (1996) An intron loss in the chloroplast gene *rpoC1* supports a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae. *Curr. Genet.* 29: 275-281.

Wanke S, Jaramillo MA, Borsch T, Samain MS, Quandt D & Neinhuis C (2007) Evolution of Piperales – *matK* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Mol. Phylogent. Evol.* 42: 477-497.

White TJ, Burns T, Lee S & Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J and White TJ (eds) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, California, pp 315-322.

Wolfe KH, Li WH & Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 9054-9058.

Xia X & Xie Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92: 371-373.

Yockteng R & Nadot S (2004) Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthase nuclear gene expressed in chloroplast (*ncpGS*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 379-396.

Young ND & Healy J (2003) GapCoder automates the use of indel characters in



phylogenetic analysis. BMC Bioinformatics 4: 6

Zhang W (2000) Phylogeny of the grass family (Poaceae) from *rpl16* intron sequence data. Mol. Phylogenet. Evol. 15: 135-146.