

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

**Isolamento de marcadores microssatélites para *Petunia integrifolia*
subesp. *depauperata* (Solanaceae) e *Passiflora ovalis* (Passifloraceae)**

Raquel Athayde Kriedt

Porto Alegre, novembro de 2009.

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

**Isolamento de marcadores microssatélites para *Petunia integrifolia*
subesp. *depauperata* (Solanaceae) e *Passiflora ovalis* (Passifloraceae)**

Raquel Athayde Kriedt

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Loreta Brandão de Freitas

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

Porto Alegre, novembro de 2009.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

A parte experimental deste estudo foi realizada nas instalações do Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS.

Este projeto foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);
- Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Loreta, pela acessibilidade, confiança, pelo exemplo de dedicação, e por mostrar como o amor pelo trabalho faz com que tudo fique mais leve.

Aos colegas de laboratório pelas contribuições diárias em todos os aspectos – intelectual, de alegria, de descontração, de fofoca! Adoro passar o tempo com vocês!

Aos amigos que tornaram esses belos cinco anos em algo ainda mais prazeroso. Amo vocês!

Aos meus pais pelo amor, compreensão, por cada momento de dedicação, e por segurar a minha mão quando meus pés já parecem não ter apoio... Amo muito, muito vocês!

Ao Leandro por cada momento que passamos juntos (mesmo quando todas as responsabilidades universitárias nos impedem), por me fazer companhia, me dar segurança, amor, e planos! Te amo!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela formação da qual me orgulho.

Às Instituições Financiadoras deste trabalho.

RESUMO

Marcadores microsatélites são regiões do DNA compostas de pequenos motivos de um a seis nucleotídeos repetidos *in tandem*. Esses marcadores co-dominantes são altamente polimórficos e amplamente utilizados em diversos tipos de estudos devido a sua eficiência em determinar diferenças entre grupos, entre eles, estudos de genética de populações e conservação. Também, esses marcadores são apropriados na investigação de questões relacionadas aos processos históricos ocorridos em ambientes naturais através da análise dos padrões filogeográficos das espécies que neles habitam. Entender esses processos é de extrema relevância para a conservação de ambientes que se encontram sob constante pressão antrópica, como a Planície Costeira e a Mata Atlântica. Com intuito de contribuir para o entendimento desses processos, as espécies *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* e *Passiflora ovalis* foram selecionadas por se distribuírem ao longo da Planície Costeira e da Mata Atlântica, respectivamente, estando ameaçadas pela fragmentação de seus ambientes. O objetivo geral desse projeto foi a obtenção de um conjunto de marcadores microsatélites para estas espécies, visando sua aplicação em estudos evolutivos. Assim, o DNA total foi extraído e digerido, seguido da ligação de adaptadores para amplificação por PCR com “primers” específicos. Os fragmentos contendo microsatélites foram selecionados e clonados em vetor “TOPO TA cloning”, inserido em células competentes. Foram selecionadas 384 colônias transformadas de *P. integrifolia* subsp. *depauperata* e 312 de *P. ovalis*. Os clones de ambas as bibliotecas foram amplificados e sequenciados com os “primers” do vetor, resultando em um total de 481 sequências, das quais 411 foram únicas. Como resultado, aproximadamente 90% das sequências únicas continha repetições, 50 delas com tamanho adequado de repetição e região flanqueadora disponível para desenho de “primers”. Treze conjuntos de “primers” foram desenhados e sintetizados para *P. integrifolia* subsp. *depauperata* e 12 para *P. ovalis*. Esses resultados são condizentes com os demais encontrados para outras espécies de ambas as famílias botânicas, obtidos através do mesmo método selecionado para a obtenção dos conjuntos de “primers” neste trabalho. O desenvolvimento desses marcadores auxiliará no melhor entendimento da dinâmica populacional destas espécies e no estabelecimento de estratégias que priorizem a conservação de grupos que melhor representam a história evolutiva das espécies, identificando populações com maior variabilidade genética.

ABSTRACT

Microsatellites markers are repetitive DNA regions composed of small motifs of one to six nucleotides *in tandem*. These highly polymorphic co-dominant molecular markers are widely used in various studies, such as population and conservation genetics studies, for they are very efficient in determining differences among groups. As well, these markers are appropriate for investigating questions related to historical processes that took place in natural environments by analyzing the phylogeographical patterns of its inhabitant species. To understand these historical processes is very relevant for the conservation of environments that are under anthropic pressure, such as the Coastal Plain in Rio Grande do Sul and Santa Catarina, and the Atlantic Forest. To reconstruct this history, two species were chosen: *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata* and *Passiflora ovalis*, selected for its distribution along the Coastal Plain and Atlantic Forest, respectively. Based on these questions, the aim of this study was to obtain a set of microsatellite markers for these species using an enrichment technique. To do so, the total DNA was extract and digested with the restriction enzymes *RsaI* and *HaeIII* to obtain fragments, followed by the ligation of oligo adapters to assure that every fragment has a common and known end for PCR amplification. The DNA fragments were then hybridized to biotinylated oligo probes and were selectively retained by magnetic beads linked to streptavidin. These selected fragments were amplified and linked to pCR 2.1-TOPO plasmid vector using TOPO TA cloning kit (Invitrogen). The potentially inserted plasmids were introduced into chemically competent *Escherichia coli*. Over 384 positive clones were selected for *P. integrifolia* subsp. *depauperata*, and 312 for *P. ovalis*. The clones were amplified and sequenced, resulting in 481 sequences, of which 411 were non-redundant. Approximately 90% of these unique sequences presented repeats, 50 of them adequate for primer design. Thirteen primers sets were designed for *P. integrifolia* subsp. *depauperata* and twelve for *P. ovalis*. These results are in accordance with others found for species of both botanical families, developed with the same methodology. The development of these markers will help to understand the population dynamics of these two species and to establish strategies that prioritize the conservation of groups that best represent the history of these species, identifying populations with higher genetic variability.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. O gênero <i>Petunia</i> Juss.	8
1.2. <i>Petunia integrifolia</i> (Hook.) Schinz e Thell. subesp. <i>depauperata</i> (R.E.Fr.) Stehmann	9
1.3. Planície Costeira.....	12
1.4. O gênero <i>Passiflora</i> L.	13
1.5. <i>Passiflora ovalis</i> Vell. Ex Roemer	14
1.6. Mata Atlântica	16
1.7. Marcadores microssatélites	17
1.7.1. Isolamento de marcadores microssatélites	21
1.7.1.1. Métodos disponíveis para o isolamento de marcadores microssatélites	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Coletas	25
3.2. Extração de DNA	26
3.3. Construção da Biblioteca Genômica Enriquecida	26
3.3.1. Digestão do DNA genômico.....	27
3.3.2. Ligação de adaptadores	27
3.3.3. Seleção e amplificação de fragmentos contendo microssatélites	27
3.3.4. Inserção do DNA enriquecido em microssatélites em um vetor de clonagem ..	29
3.3.5. Transformação e amplificação dos clones	29
3.3.6. Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados	30
3.3.7. Estoque dos clones em glicerol	31
3.3.8. Análise das sequências de DNA	32
3.3.9. Desenho de “primers” para PCR	32
3.3.10. Amplificação dos “primers”	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Clones e unidades de repetições	34
4.2. Iniciadores e amplificações	34
5. DISCUSSÃO.....	39
5.1. Sucesso no isolamento de microssatélites	39
5.2. Dificuldades no isolamento de microssatélites	41
5.3. Repetições mais frequentes	42
5.4. Frequência de microssatélites e tamanho do genoma	43
5.5. Considerações e perspectivas	45
6. REFERÊNCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1: <i>Petunia integrifolia</i> subesp. <i>depauperata</i>	11
Figura 2: <i>Passiflora ovalis</i>	15
Quadro 1: Condições para realização do sequenciamento	31
Figura 3: Amplificação de marcadores	35
Tabela 1: Número de sequências, frequência de repetições, e motivos mais frequentes em <i>P. integrifolia</i> subesp. <i>depauperata</i> e <i>P. ovalis</i>	35
Tabela 2: Loci de <i>Petunia</i> (PID) e <i>Passiflora</i> (PO) e suas repetições, características e "status" dos iniciadores.	36
Tabela 3: Conjuntos de "primers" e suas características.	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Petunia* Juss.

Petunia Juss. (Solanaceae) é um gênero subtropical, endêmico da América do Sul, que apresenta 14 espécies (Stehmann e colaboradores, 2009), sendo a maioria delas encontradas no Sul e Sudeste do Brasil. Conhecidas popularmente pelas petúnias-de-jardim, híbrido artificial obtido no início do século XIX a partir do cruzamento entre as espécies *P. integrifolia* (Hook) Schinz e Tell e *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns e Poggenb, este grupo de espécies tem uma longa história de cruzamentos artificiais. A obtenção desses híbridos demonstra a falta de barreiras genéticas entre as espécies do gênero (Watanabe e colaboradores, 1996).

Na natureza, as espécies de *Petunia* são, em geral, herbáceas ou subarborescentes não lenhosas, anuais ou perenes, com caule ereto, ascendente, decumbente, ou procumbente. As diferentes espécies podem apresentar folhas sésseis ou pecioladas, elípticas, ovadas ou obovadas, e, raramente, lineares. Apresentam inflorescência simpodial com crescimento monocasial associado com brácteas opostas. São flores zigomorfas ou actinomorfas, de pré-floração imbricada com cálice esverdeado, fendido até próximo à base, com lobos lineares ou espatulados. A corola pode apresentar diferentes colorações: branco, vermelho, alaranjado, rosa e púrpura, sendo a última mais comum. Pode apresentar-se como infundibuliforme, campanulada ou hipocrateriforme, com cinco estames adnatos que apresentam anteras que variam da coloração amarelada até o azul ou violeta. Os estames, geralmente inclusos, arranjam-se em três níveis diferentes: um curto, dois em altura média, e dois longos. O ovário é glabro, envolto por um nectário lobado, e com um estigma filiforme (Stehmann e colaboradores, 2009).

As espécies do gênero apresentam diferentes síndromes florais, tendo melitofilia como a mais comum, estando presente em 11 espécies do gênero. Além das espécies melitófilas, existem aquelas polinizadas por aves e outras por mariposas (Stehmann e colaboradores, 2009). Em geral, espécies polinizadas por abelhas são auto incompatíveis (Tsukamoto e colaboradores, 1998), e as espécies melitófilas de *Petunia* não fogem a este padrão, dependendo da polinização realizada por abelhas especializadas para a sua reprodução (Wittmann e colaboradores, 1989; Silva, 1994). Algumas linhagens de *Petunia axillaris* (Tsukamoto e colaboradores, 2003), *Petunia exserta* Stehmann (Tsukamoto e colaboradores, 1998) e *Petunia secreta* Stehmann e Semir (Stehmann, 1999) são

autocompatíveis. Todas as espécies apresentam frutos capsulares, secos quando maduros, com sementes pequenas e numerosas, sem um sistema de dispersão a longas distâncias, ocasionando a proximidade das sementes à planta mãe (Stehmann, 1999).

As espécies de *Petunia* se reproduzem sexuadamente e florescem, em geral, em um mesmo período, sendo ausente o isolamento sazonal entre elas. Os mecanismos de isolamento no gênero são predominantemente ecológicos, como a segregação floral e o habitat, e geográficos (Stehmann, 1999).

1.2. *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz e Thell. subesp. *depauperata* (R.E.Fr.) Stehmann

A espécie *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz e Thell. apresenta uma das maiores distribuições do gênero, estando presente na Argentina, Paraguai, Uruguai e região sul do Brasil, associada a diferentes tipos de substrato, incluindo áreas cultivadas e beira de estrada. Pode ser reconhecida por seu hábito decumbente, suas folhas elípticas ou obovadas (podem ser encontradas folhas lineares em populações costeiras), corola infundibuliforme de cor púrpura, e pólen azulado (Stehmann e colaboradores, 2009).

A delimitação taxonômica de *taxa* relacionados à *P. integrifolia* é bastante complexa. Esses *taxa* correspondem ao grupo que Wijsman (1982) denominou de “complexo *integrifolia*” (*P. integrifolia*, *P. inflata* R.E.Fr. e *P. occidentalis* R. E. Fr.), às espécies *P. interior* T. Ando e Hashim., *P. riograndensis* T. Ando e Hashim., *P. littoralis* L.B. Sm. e Downs, e *P. bajeensis* T. Ando e Hashim., e à subespécie *P. integrifolia* subesp. *depauperata* (Stehmann e colaboradores, 2009).

Historicamente, indivíduos encontrados ao longo da costa dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina têm sido identificados com diferentes nomenclaturas. Exemplares com o pedúnculo floral maior que 15 milímetros foram descritos em 1846 como *P. dichotoma* Sendtner, e aqueles que possuíam o pedúnculo floral menor que 15 milímetros foram descritos em 1911 como *P. violacea* subesp. *depauperata* Fries (Stehmann, 1999). Já as populações da ilha de Florianópolis (Santa Catarina) foram reconhecidas por Smith e Downs (1966) como uma espécie distinta, sendo chamadas de *Petunia littoralis*.

Wijsman (1982) reconheceu *P. integrifolia* como sendo uma espécie única, formada por três subespécies geográficas, sendo elas *P. integrifolia* subsp. *integrifolia*, associada à

região do Pampa, *P. integrifolia* subsp. *occidentalis*, isolada na região norte da Argentina e sul da Bolívia, e *P. integrifolia* subsp. *inflata* no Paraguai, nordeste da Argentina e oeste da região sul do Brasil. Posteriormente, outros três *taxa* relacionados à *P. integrifolia* foram elevados à categoria de espécie segundo Ando e Hashimoto (1996) que denominaram as populações que apresentavam anteras com tecas diferenciadas e ramificações tricotômicas de *Petunia interior*. Em 1998, estes mesmos autores baseados nas diferenças de tamanho da flor, tamanho dos estames e formato do tubo da corola descreveram *Petunia riograndensis* e *Petunia bajeensis* no planalto sul-riograndense.

Em uma revisão taxonômica do gênero, Stehmann (1999) argumentou que a espécie *P. integrifolia* encontram-se naturalmente estruturada em populações parcialmente isoladas, e que este isolamento seria o responsável por diferenças florais e vegetativas nas populações, ocasionando um gradiente morfológico, o que induz à proposição de *taxa* pontuais. Este autor defende que todas as espécies e subespécies descritas anteriormente deveriam ser sinonimizadas em *Petunia integrifolia*, podendo ser aceitos alguns *taxa* infra-específicos.

Longo (2005), analisando seis morfologias distintas consideradas como *P. integrifolia* por Stehmann (1999), através de dados moleculares, verificou a existência de três linhagens evolutivas na espécie. Uma linhagem correspondente a indivíduos amostrados na porção norte do estado do Rio Grande do Sul, denominada pela autora como clado interior; outra, composta por indivíduos amostrados na região sudoeste e centro-sul do Estado, tendo o Lago Guaíba como seu limite leste, denominada de clado continental; e outra, correspondente a indivíduos distribuídos a leste do Lago Guaíba e ao longo da Planície Costeira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, juntamente com aqueles presentes na Ilha de Santa Catarina, denominada de clado costeiro. A partir de seus resultados, Longo (2005) observou que o clado interior é o mais divergente dos três e o único que pode ser relacionado a uma entidade taxonômica distinta, correspondendo à espécie *Petunia interior* descrita por Ando e Hashimoto (1996). Kriedt e colaboradores (2007) em um estudo posterior analisando maior número de indivíduos com marcadores moleculares plastidiais, verificou que a espécie *P. bajeensis*, que possui diferenças morfológicas significativas, constitui uma linhagem única e independente, assim como *P. inflata*, a qual se diferencia dos demais *taxa* do grupo *integrifolia* por um maior número de

características moleculares, sugerindo uma separação anterior desta linhagem em relação às demais.

Baseado em análises morfológicas e moleculares, Stehmann e Bohs (2007) aceitaram duas subespécies: *Petunia integrifolia* subesp. *integrifolia* (Fries) Stehmann e Semir, distribuída na região pampeana da Argentina e Uruguai, e região centro-sul do Rio Grande do Sul, e *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata* (R. E. Fr.) Stehmann, ocupando os depósitos de sedimentos ao longo da costa do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, datados do quaternário.

Os indivíduos de *P. integrifolia* subesp. *depauperata* (Figura 1) são caracterizados pelo hábito procumbente e presença de folhas estreitas e flores de coloração purpúrea. Essas flores são pequenas quando comparadas a outras do grupo *integrifolia*. Assim como as demais espécies do grupo, as flores deste *taxon* apresentam características distintivas de melitofilia (Stehmann e colaboradores, 2009). Habitando solos arenosos, essa linhagem distribui-se desde a Ilha de Santa Catarina (Florianópolis, SC) até a Barra do Chuí (RS), abrangendo toda a Planície Costeira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Ramos (2008) analisou o padrão filogeográfico para *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata* através de marcadores moleculares plastidiais (*trnS-trnG* e *trnH-psbA*). Esse estudo resultou em 16 haplótipos em uma “network” estruturada em três grupos geográficos (Centro, Norte e Sul) apoiados pela detecção de barreiras históricas entre esles, sugerindo que a colonização da Planície Costeira tenha ocorrido por eventos subsequentes de ocupação, influenciados pelas oscilações marinhas ocorridas durante o Pleistoceno e o Holoceno. Este cenário de instabilidade resultou no padrão genético observado atualmente para esta linhagem.



Figura 1: *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata*.

1.3. Planície Costeira

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul é uma das planícies mais extensas da Terra, com cerca de 33 mil km² de área plana (Weschenfelder, 2005), e 620 km de extensão desde o Município de Torres, ao norte, até a desembocadura do Arroio Chuí, ao sul (Tomazelli e Villwock, 1996). A atual praia oceânica da Planície Costeira é extensa e contínua lateralmente, localizada em uma região costeira aberta e dominada pela ação das ondas. As feições morfológicas da praia se caracterizam pela homogeneidade e continuidade lateral, contrastando com a marcante modificação antrópica, causada ao campo de dunas frontais e à planície arenosa adjacente (Weschenfelder, 2005).

A Planície Costeira foi originada devido a diversos eventos de transgressões e regressões marinhas que se estenderam por aproximadamente 400 mil anos, abrangendo parte do Pleistoceno e Holoceno (Weschenfelder, 2005). Esses eventos deram origem a quatro sistemas deposicionais do tipo laguna-barreira, paralelos à linha de costa. Cada sistema se caracteriza por uma barreira arenosa seguida por depósitos lagunares costeiros extensos em direção ao continente (Lima e Buchmann, 2005; Tomazelli e Villwock, 2005). A formação desses sistemas é relacionada aos estágios glaciais e interglaciais ocorridos no Pleistoceno e Holoceno, resultantes da alternância cíclica entre períodos frios e quentes (Villwock e Tomazelli, 1995). Essas oscilações periódicas alteraram a disponibilidade de habitats, produzindo grande impacto na distribuição e na história evolutiva de grupos de organismos (Knowles, 2001).

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul se caracteriza pelo clima subtropical úmido, sem estação seca e com verão quente (Hasenack e Ferraro, 1989). Apresenta vegetação hidrófila e halófila em ambientes instáveis, tornando as comunidades vegetais altamente mutáveis (Werneck e Lorscheister, 2001). A vegetação é composta de um mosaico de comunidades florísticas estruturalmente distintas, mais dependentes do solo que do clima (Dorneles e Waechter, 2004).

A paisagem da Planície Costeira vem sofrendo modificações devido à constante pressão antrópica, estando sujeita a impactos devido à introdução de plantas exóticas, ao desenvolvimento agrícola e pastoril, a contaminação por agrotóxicos e forte urbanização. Essas atividades causam a destruição das dunas costeiras (Oliveira e colaboradores, 2005a) e, devido à forte tendência de expansão da urbanização e migração desta para áreas menos desenvolvidas, é importante caracterizar zonas prioritárias para a preservação nessa região.

1.4. O gênero *Passiflora* L.

O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) abrange 525 espécies distribuídas em regiões tropicais das Américas, Ásia e Austrália. Conhecidas como “flor-da-paixão”, várias espécies do gênero possuem frutos comestíveis, como o maracujá (*P. edulis*), enquanto outras são cultivadas como ornamentais por suas flores vistosas (Judd e colaboradores, 1999; Ulmer e McDougal, 2004).

Passiflora apresenta uma complexa taxonomia, a qual inclui quatro subgêneros, sendo estes *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora*, e muitas seções e séries (Feuillet e MacDougal, 2003). Essa complexidade taxonômica ocorre devido à grande diversidade de estruturas florais e vegetativas encontrada nos representantes do gênero, podendo as plantas se apresentar como lianas herbáceas ou lenhosas, assim como ervas, arbustos perenes ou arbóreas (Ulmer e McDougal, 2004).

Como características comuns, as plantas pertencentes ao gênero *Passiflora* apresentam nectários extraflorais e gavinhas, embora alguns exemplares arbóreos não possuam esta estrutura. Porém, é a presença de características marcantes na flor, como um disco nectarífero na base do hipanto, uma corona de filamentos distribuídos em uma a seis fileiras, cinco estames, e órgãos reprodutivos unidos em um androginóforo que reúnem estas espécies em um mesmo gênero (Ulmer e McDougal, 2004). A corona de filamentos é uma das estruturas florais mais variáveis, apresentando diferentes cores, odores, formas e disposição dos filamentos (Endress, 1994). As folhas também apresentam grande variabilidade, possivelmente a maior entre as angiospermas (MacDougal, 1994). São sempre alternas, e podem apresentar-se desde lâminas inteiras até folhas de nove lobos (Ulmer e McDougal, 2004).

O gênero apresenta espécies autocompatíveis e autoincompatíveis, de maneira que as espécies de fecundação cruzada obrigatória necessitam de agentes polinizadores (Ulmer e McDougal, 2004). A grande diversidade de estruturas florais pode ser resultado de seleção natural envolvendo seus agentes polinizadores como fatores seletivos (Koschnitzke, 1993), pois as flores de *Passiflora* atraem uma ampla gama de polinizadores: desde abelhas, vespas, borboletas e mariposas, até beija-flores e morcegos (Koschnitzke, 1993; MacDougal, 1994; Varassin e Silva, 1999). Os frutos são em maioria carnosos e a dispersão das sementes em *Passiflora* é realizada por aves, morcegos e

pequenos mamíferos como roedores e marsupiais, que são atraídos pelo agradável cheiro e pela coloração dos frutos (Semir e Brown 1975; Koehler-Santos e colaboradores, 2006).

1.5. *Passiflora ovalis* Vell. Ex Roemer

A espécie *Passiflora ovalis* (Figura 2) Vell. Ex Roemer pertence ao subgênero *Deidamioides*, o qual é composto por apenas 13 espécies relativamente basais (Ulmer e McDougal, 2004). Em 11 destas, as flores se originam diretamente das gavinhas, uma característica rara e considerada ancestral para o gênero. 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.

Passiflora ovalis é restrita a áreas de Mata Atlântica, próximas ao litoral, e se estende desde o Estado de São Paulo até o Estado de Pernambuco. Foi descrita em 1846, fazendo alusão ao formato de suas folhas: inteiras, não lobadas, de elípticas a oblongas. Apresenta inflorescência racemosa com flores de, em média, 5,5 cm de diâmetro, com sua coloração podendo apresentar-se em um gradiente de branca a esverdeada. As sépalas apresentam coloração verde por fora e branca por dentro, sendo lanceoladas a oblongas e as pétalas são brancas e lanceoladas. A corona de filamentos se apresenta em duas séries de 0,5 a 1 cm, e de coloração branca. Cada inflorescência pode conter até 20 flores que se abrem em um mesmo período, exalando um forte odor de alho (Ulmer e MacDougal, 2004).

Em *Natürlichen Pflanzenfamilien* (Harms, 1897) foi criada a seção *Tetrastylis*, na qual a espécie foi nomeada de *Tetrastylis ovalis*, sendo separada das demais espécies de *Passiflora* devido à presença de quatro estigmas e estiletos em vez de três como é condição comum nos representantes do gênero, assim como a presença de um androginóforo inclinado em vez da estrutura ereta. No entanto, Feuillet e MacDougal (2003) voltaram a incluir esta espécie no gênero *Passiflora*, corroborados por Muschner e colaboradores (2003) em estudos com dados moleculares. De acordo com Ulmer e MacDougal (2004), a delimitação do gênero *Passiflora* baseada em três estigmas é inapropriada, pois outras espécies no gênero apresentam flores com quatro estigmas e também apresentam uma característica marcante do gênero: o androginóforo.

Vitta e Bernacci (2004) sugeriram que populações localizadas em diferentes regiões deveriam ser reconhecidas como espécies diferentes, pois apresentam diferenças na estrutura de suas flores. As populações do norte da distribuição (Espírito Santo, Bahia e Pernambuco) foram consideradas por estes autores como *Passiflora contracta*, apresentando inflorescências racemiformes (7 a 12 cm de comprimento), sem pedúnculo floral, e um pedicelo único articulado (de 1,3 a 2,7 cm de comprimento), dando uma aparência sésstil à flor. As populações do sul (São Paulo e Rio de Janeiro) seriam *Passiflora ovalis* apresentando inflorescências paniculiformes (30 a 90 cm de comprimento), pedúnculos alongados (6 a 15 mm de comprimento) com dois a três pedicelos articulados de 4 a 5,5 cm de comprimento. Porém, em 2006, Cervi sinonimizou *P. ovalis* e *P. contracta* sob o epíteto específico de *P. ovalis*, uma vez que, para este autor, as características florais que distinguem as duas espécies variam muito nas populações naturais e que podem sofrer influências do ambiente.

Cerca de 2% das espécies de *Passiflora* são polinizadas por morcegos, e este é o caso de *Passiflora ovalis*, que recebe a visita de morcegos da família Phyllostomidae, *Glossophaga soricina* e *Rhinophylla pumilio*. Sua coloração branca, flores zigomórfas, concentração de açúcar no néctar e a grande quantidade de pólen em grandes anteras, definem sua síndrome de quiropterofilia. Outras características como antese noturna e a posição inclinada das anteras são indicativos desta síndrome (Buzato e Franco, 1992).

Dutra (2008) estudou o padrão filogeográfico dessa espécie através de marcadores moleculares plastidial (*trnS-trnG*) e nuclear (ITS) para indivíduos distribuídos nos Estados da Bahia e Espírito Santo. Esse estudo resultou na detecção de duas possíveis barreiras ao fluxo gênico dentre indivíduos dessa espécie, a partir da presença de dois grandes rios que cortam a sua distribuição.



Figura 2: *Passiflora ovalis*.

1.6. Mata Atlântica

A origem da Mata Atlântica está relacionada com o soerguimento da Cordilheira dos Andes, quando a placa de Nazca, a oeste da América do Sul, deslocou-se para o leste colidindo com a placa sul-americana. Essa colisão resultou no levantamento da placa sul-americana (Kious e Tilling, 1996), e soerguimento desta na porção leste do continente. Esse soerguimento gerou fraturas e elevações no terreno, seguidas de afundamento de blocos de rochas, criando ladeiras íngremes que caracterizam a Serra do Mar (Almeida, 1976). A erosão resultante de chuvas e ventos acarretou em acúmulo de sedimentos ao longo da costa leste, originando a planície litorânea, a qual, nos últimos 1,8 milhões de anos, foi sendo alterada devido aos eventos de regressões e transgressões marinhas. Essa região de planície compõe um dos principais habitats da Mata Atlântica (Tonhasca, 2005).

O bioma Mata Atlântica está entre os biomas mais ricos em biodiversidade, estando entre os cinco maiores “hotspots” do mundo em termos de endemismo (Myers e colaboradores, 2000). Ele é composto por diferentes formações fitoecológicas, como a Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica *sensu stricto*), a Floresta Estacional Semi-Decidual, a Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária), a Floresta Estacional Decidual, manguezais, restingas e campos de altitude. Devido à grande utilização de seus recursos e ao desmatamento para cultivo agrícola e pastoril, a fragmentação da floresta aumenta desenfreadamente, trazendo consigo os efeitos prejudiciais à biodiversidade (Tonhasca, 2005).

Historicamente, o desmatamento da Mata Atlântica teve início juntamente com a colonização européia no Brasil (Morellato e Haddad, 2000). Originalmente, esse bioma ocupava 15% do território nacional, percorrendo o litoral brasileiro de ponta a ponta. A floresta se estendia do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, e ocupava uma área de 1,3 milhões de quilômetros quadrados (Rizzini, 1988). Hoje, estima-se que restem apenas 8% de remanescentes de mata (Morellato e Haddad, 2000).

O desmatamento resulta em diversas alterações físicas, sendo a fragmentação do habitat uma das principais. A destruição e fragmentação de habitats provoca a redução e o isolamento de populações, podendo até mesmo levar espécies à extinção (Tonhasca, 2005).

1.7. Marcadores microssatélites

Microssatélites, também chamados “simple sequence repeats” (SSR), ou “short tandem repeats” (STR), constituem-se de 1- 6 nucleotídeos, chamados de motivo, repetidos *in tandem* e estão presentes em regiões codificadoras e não codificadoras dos genomas eucarióticos e procarióticos (Field e Wills, 1996; Tóth e colaboradores, 2000). Esses motivos devem estar repetidos ao menos seis vezes e podem apresentar-se de maneira pura, sem nenhuma base estranha ao motivo, sendo considerados perfeitos (ex.: CACACACACACA); podem apresentar bases estranhas ao motivo em meio à sequência do *locus*, sendo considerados imperfeitos (ex. CACACACTCACA); podem também apresentar uma pequena sequência em meio ao motivo, sendo chamados de interrompidos (ex.: CACACATGGTCACA); e podem conter motivos diferentes em um mesmo *locus*, sendo chamados de compostos (ex.: CACACAGTGTGT) (Zane e colaboradores 2002). Cada *locus* de microssatélite varia tipicamente entre cinco e 40 repetições, podendo haver *locus* com repetições ainda mais longas. Os motivos mais comumente utilizados em estudos de genética molecular são os di, tri e tetranucleotídicos, sendo os motivos dinucleotídicos os mais comuns para a maioria das espécies (Li e colaboradores, 2002).

Esses marcadores são co-dominantes, caracterizados pelo alto grau de polimorfismos (Schlötterer e Tautz, 1992) e pelas altas taxas de mutação que apresentam, entre 10^{-2} e 10^{-6} nucleotídeos por *locus* por geração (Sia e colaboradores, 2000), sendo estas mais altas que no restante do genoma no qual se inserem (Jarne e Lagoda, 1996). Essas altas taxas de mutação fazem desses marcadores uma ótima ferramenta na análise de paternidade e parentesco (Wright e Bentzen, 1994; Schlötterer, 2000), filogenias (Chistiakov e colaboradores, 2006), na determinação de fluxo gênico atual (Goldstein e Schlötterer, 1999), na estimativa do tamanho populacional, e na investigação de ocorrência de eventos recentes, do tipo gargalo de garrafa, nas populações (Selkoe e Toonen, 2006). Também, marcadores microssatélites são reconhecidos pela eficácia no mapeamento genômico em diversos organismos (Schuler e colaboradores, 1996; Knapik e colaboradores, 1998). Suas aplicações estendem-se em áreas desde estudos forenses (Jarne e Lagoda, 1996), até estudos de genética de populações, genética da conservação, e conservação e manejo de recursos biológicos (Chistiakov e colaboradores, 2006).

Originalmente, microssatélites foram empregados como uma ferramenta exclusiva para estudos em humanos, mas, recentemente, a análise desses marcadores se tornou muito

eficaz nos estudos com animais e plantas. Heywood e Iriondo (2003) verificaram a relevância do uso de microssatélites na identificação de unidades de conservação e na investigação dos processos genéticos ocorridos nas espécies, como os padrões de fluxo gênico, a geração de “vizinhanças genéticas”, e a incidência de deriva genética nas populações.

Devido à alta variabilidade desses marcadores, juntamente com a possibilidade de se obter marcadores mendelianos multi-alélicos, eles se tornam muito úteis na detecção da diversidade genética que, sendo reconhecida como componente fundamental da biodiversidade, desempenha um importante papel na conservação de espécies ameaçadas, e na manutenção de suas populações ao longo do tempo, pois espécies que apresentam baixa variabilidade genética sofrem redução na adaptação a mudanças ambientais em seu processo evolutivo (Frankham, 1995); e na inferência de eventos demográficos recentes, incluindo a detecção de impactos gerados pelas comunidades humanas nas populações naturais (Pearse e Crandall, 2004). Sua herança codominante possibilita sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos através da detecção de padrões filogeográficos, como a estrutura genética de populações isoladas e fragmentadas, possibilitando a análise de sistemas reprodutivos de plantas e animais, e suas conseqüências (Collevatti e colaboradores, 2001; Morand-Prieur e colaboradores, 2002). Atualmente, esses marcadores são amplamente empregados em análises de estrutura populacional de populações biológicas em geral, como plantas selvagens (Zucchi e colaboradores, 2002) e cultivadas (Pinto e colaboradores, 2003), ajudando na criação de estratégias para conservação de germoplasma (Hoshino e colaboradores, 2002).

A criação de um *locus* de microssatélite no genoma se dá a partir de um número mínimo de repetições (proto-microssatélite) que passa a ser estendido devido um erro da DNA polimerase (Messier e colaboradores, 1996; Rose e Falush, 1998). Porém, Zhu e colaboradores (2000) verificaram que a origem de microssatélites a partir de sequências aleatórias é possível.

Um *locus* homozigoto de microssatélite tem o mesmo número de repetições em ambos os cromossomos homólogos, enquanto um *locus* heterozigoto tem um número diferente de repetições em cada alelo. Porém, em um mesmo *locus*, uma população como um todo, normalmente, contém diversos alelos, cada um com um número diferente de repetições, o que torna esses marcadores muito eficientes na discriminação entre diferentes

indivíduos, e é este alto poder de discriminação que justifica seu uso em estudos de genética de populações e análises forenses (Oliveira e colaboradores, 2006).

Os microssatélites se distribuem de maneira irregular dentro do genoma. Existe uma diferença na frequência desses marcadores em regiões codificadoras e não codificadoras (Arcot e colaboradores, 1995; Wilder e Hollocher, 2001), sendo os motivos tri e hexanucleotídicos os mais comuns em regiões codificadoras, pois não alteram a fase de leitura dos códons (Tóth e colaboradores, 2000), e é possível haver função para a presença dessas repetições nessas regiões (Valle, 1993). A frequência desses marcadores também varia entre os diferentes *taxa*, não só no número absoluto, mas também no tipo de repetições que apresentam. Em plantas, Morgante e colaboradores (2002) verificaram que a frequência estimada do número total de microssatélites varia substancialmente entre alguns *taxa* cultivados como milho, soja, trigo e arroz, sendo mais frequentes em espécies que possuem genomas de menor tamanho, contradizendo estudos que afirmam que microssatélites são elementos derivados de sequências repetitivas do genoma, e que sua densidade estaria relacionada com um aumento do tamanho do genoma (Schlötterer e Harr, 2000).

Esses marcadores podem apresentar um efeito neutro ou funcional no genoma (Oliveira e colaboradores, 2006), podendo estar associados com a regulação e o funcionamento de alguns genes (Kashi e Soller, 1999), com a presença de patologias (Ashley e Warren, 1995; Cummings e Zoghbi, 2000; Wells e Ashizawa, 2006), ou agindo como “hot spots” para recombinação (Trecó e Arnheim, 1986; Wahls e colaboradores, 1990; Bailey e colaboradores, 1998).

Existem mecanismos que explicam as altas taxas de mutação desses marcadores, como a inclusão de erros durante a recombinação, a permuta desigual e a ocorrência de “deslizes” (“slippage”) da polimerase durante a replicação ou reparo do DNA (Strand e colaboradores, 1993). Porém, estudos revelam que a inclusão de erros durante a recombinação seria o mecanismo de menor predominância na geração de variabilidade em microssatélites (Levinson e Gutman, 1987).

A ocorrência da permuta desigual pode acarretar em uma perda ou ganho de um grande número de repetições. Quando as regiões repetitivas dos microssatélites estão presentes, pode ocorrer a formação de uma alça durante o emparelhamento dos cromossomos homólogos (complexo sinaptonêmico) significando que apenas partes do

cromossomo, geralmente de tamanhos desiguais, serão permutadas, fazendo com que um cromossomo receba um fragmento maior (mais repetições), e o outro menor (Oliveira e colaboradores, 2006). Já durante a replicação ou reparo do DNA, a DNA-polimerase pode deslizar causando uma dissociação temporária das fitas. As fitas se reassociam rapidamente, mas não necessariamente no sítio correto, gerando um erro de pareamento, mas com continuação da extensão de uma nova fita e um aumento, ou diminuição, no número de repetições do alelo (Goldsteind e Schlötterer, 1999).

Os deslizos da polimerase parecem não acarretar grandes diferenças no número de repetições (Schlötterer e Tautz, 1992), mas podem desestabilizar os microssatélites devido à ineficiência do reparo quanto às alças de DNA - alças podem resultar em uma “armadilha” para a polimerase, fazendo com que ela replique a mesma sequência diversas vezes sem que isso seja detectado como erro, visto que a sequência está realmente correta em termos de qualidade, porém não em quantidade. Essa desestabilização também pode ocorrer devido a alterações na estrutura da DNA polimerase, ou ainda em seus co-fatores, resultando em um aumento dos escorregões (Sia e colaboradores, 2000).

Existem modelos mutacionais teóricos para determinar corretamente os parâmetros populacionais genéticos obtidos de dados de microssatélites. Os modelos mutacionais são utilizados para obter o número esperado de alelos em uma população, a partir da heterozigosidade observada, e também em análises de variação genética. São quatro os modelos mutacionais utilizados para microssatélites:

- ⇒ Modelo de alelos infinitos (IA – “infinite alleles model”): proposto por Wright (1931), este modelo assume que cada mutação cria aleatoriamente um novo alelo. Este modelo considera um alelo de dez repetições podendo ser tão relacionado geneticamente com um alelo de 15 repetições, como com um alelo de 16 repetições, ou seja, a proximidade no número de repetições não indica uma maior relação filogenética entre os alelos.
- ⇒ Modelo de mutação de um passo (SM – “stepwise mutation model”): proposto por Slatkin (1995), este modelo assume que, ao mutar, um *locus* de microssatélite ganha ou perde uma unidade de repetição. Este modelo considera que dois alelos que diferem por apenas um motivo são mais proximamente relacionados do que alelos que diferem por várias unidades de repetição. Este modelo é preferencialmente utilizado na estimativa do

relacionamento entre indivíduos, e na estruturação populacional, havendo exceção quando há homoplasias.

- ⇒ Modelo de mutação “duas fases”: (TP – “two phase model”): proposto por Di Rienzo e colaboradores (1994), este modelo é uma extensão do modelo SM, aprimorado para uso em estudos em microssatélites. Este modelo assume que grande parte das mutações em microssatélites se constitui de adição ou subtração de uma unidade de repetição, mas que, em menor frequência, a alteração de muitas unidades de repetição pode ocorrer.
- ⇒ Modelo de alelos K (KA – “K-alleles model”): proposto por Crow e Kimura (1970), este modelo assume que, se há k alelos possíveis em um *locus*, então a probabilidade de um alelo mutar para outra forma é $\mu/k-1$, em que μ é a taxa de mutação.

Em geral, a região do DNA que flanqueia um *locus* de microssatélite é bastante conservada entre indivíduos de uma mesma espécie e, em alguns casos, até mesmo entre espécies relacionadas. Essa característica permite que, uma vez um microssatélite esteja isolado do genoma, “primers” sejam desenhados para guiar a amplificação deste *locus* por PCR. Um par específico de “primers” para PCR é o produto real do isolamento de marcadores microssatélites (Selkoe e Toonen, 2006).

A possibilidade de utilizar um “primer” desenhado para uma espécie em outra ocorre devido à natureza homóloga do DNA da região flanqueadora ao *locus* isolado. Porém, quanto maior for a distância genética entre as espécies, menor é o sucesso de amplificação (Primmer e Merilä, 2002). Da mesma forma, o grau de polimorfismo de um *locus* não é transferível, ou seja, se para uma determinada espécie um *locus* se mostra bastante polimórfico, o mesmo pode não ocorrer quando este é amplificado em outra espécie (Oliveira e colaboradores, 2006). Métails e colaboradores (2002) observaram a amplificação heteróloga de vários *loci* entre diferentes cultivares, subespécies e espécies relacionadas.

1.7.1. Isolamento de marcadores microssatélites

A tarefa de isolar marcadores microssatélites requer considerável esforço e tempo despendido devido ao fato de consistir, tradicionalmente, de um “screening” ou busca de determinadas sequencias em uma biblioteca genômica (Rassmann e colaboradores, 1991).

Visto que a frequência de microssatélites varia entre os genomas de diferentes *taxa*, tanto em termos absolutos de número de *loci*, quanto no tipo de repetições que apresentam (Hancock, 1999), essa estratégia de isolamento, chamada estratégia tradicional, é eficaz apenas em *taxa* com alta frequência de microssatélites (Zane e colaboradores, 2002), sendo menos eficientes quando se está lidando com *taxa* que apresentam baixa frequência de microssatélites em seus genomas, como ocorre em plantas (Zhivotovsky e Feldman, 1995). Para esses *taxa* existem protocolos de isolamento que visam superar as limitações através de pequenas modificações na estratégia tradicional (Zane e colaboradores, 2002).

1.7.1.1. Métodos disponíveis para o isolamento de marcadores microssatélites

Os métodos tradicionais de isolamento de microssatélites são menos eficientes quando utilizados em *taxa* com baixa frequência de microssatélites como aves e plantas, ou quando é necessário um grande número de *loci*, como em casos de estudos de distância genética entre populações (Zhivotovsky e Feldman, 1995; Cooper e colaboradores, 1999) ou construções de mapas genéticos (Liu, 1997). Os métodos tradicionais se baseiam na busca desses marcadores em sequências aleatórias do genoma obtidas através da fragmentação do genoma a partir da digestão deste por enzimas de restrição, ou quebra de moléculas de DNA por sonicação. Os fragmentos são selecionados de acordo com seu tamanho de maneira a obter fragmentos pequenos (300-700pb) que são ligados em um vetor plasmidial de maneira direta ou após ligação a adaptadores específicos. Os plasmídeos são inseridos no genoma de bactérias gerando milhares de clones recombinantes que podem ser selecionados quanto à presença de microssatélites por hibridização com sondas (Southern Hybridization) contendo repetições nucleotídicas, através do uso de uma membrana de náilon. Esses clones são repicados e selecionados novamente. Os clones resultantes são sequenciados e selecionados quanto à presença de microssatélites (Rassmann e colaboradores, 1991). Uma vez encontrado o microssatélite, “primers” são desenhados e a otimização da reação de amplificação do *loci* pode ser iniciada (Zane e colaboradores, 2002).

Uma maneira de evitar a construção de uma biblioteca se dá a partir da utilização de outra técnica existente: a PIMA (“PCR Isolation of Microstellite Arrays”), proposta por Lunt e colaboradores (1999). Esta técnica leva em consideração a abundância de regiões repetitivas encontradas nos fragmentos amplificados por RAPD (“Random Amplification

of Polymorphic DNA”) e se utiliza de diversos “primers” de RAPD para obter fragmentos do genoma amplificados randomicamente, os quais são posteriormente hibridizados com sondas contendo repetições nucleotídicas. Os fragmentos selecionados são então sequenciados para a busca por microssatélites (Cifarelli e colaboradores, 1995). Uma vez encontrados, os microssatélites tem seus “primers” desenhados e sua otimização iniciada (Zane e colaboradores, 2002). Modificações desta técnica podem ser encontradas em Ender e colaboradores (1996). Além desta, existe o método conhecido como FIASCO (“Fast Isolation by AFLP of Sequences COntaining repeats”) desenvolvido por Zane e colaboradores (2002). Baseada em AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”), esta técnica consiste de uma digestão com enzima de restrição simultânea à ligação dos adaptadores aos fragmentos digeridos para posterior reação de AFLP, seguida pela amplificação desses fragmentos. Após a PCR, ocorre uma hibridização do DNA com sondas biotinizadas que são posteriormente selecionadas por esferas magnéticas contendo estreptavidina, recuperadas por campo magnético. O DNA é liberado da ligação sondas-esferas por desnaturação seguida de lavagens. Os fragmentos selecionados são amplificados e clonados, possibilitando um posterior “screening” por PCR e sequenciamento dos clones.

Existem dois protocolos para produção de bibliotecas genômicas altamente enriquecidas em tipos específicos de repetições nucleotídicas que se utilizam de reações de extensão de “primers”. Ambos os métodos se baseiam na construção de uma biblioteca genômica primária na qual se insere um vetor fago contendo fragmentos de DNA genômico para obtenção de uma biblioteca de DNA fita simples. Esse DNA fita simples é usado como molde para uma reação de extensão de “primers” na qual os “primers” contem repetições oligonucleotídicas específicas, com ou sem a presença de biotina, que se anelam em uma região que contenha sua seqüência complementar, gerando um produto de DNA fita dupla apenas de vetores contendo a repetição desejada. Esse DNA fita dupla é então selecionado ou através da ligação dos “primers” biotinizados a esferas magnéticas contendo estreptavidina, a qual apresenta alta afinidade com biotina, clonado e sequenciado para busca dos fragmentos contendo microssatélites (Paetkau, 1999), ou através de hibridização com sondas compostas de repetições nucleotídicas contendo microssatélites. Os clones selecionados são sequenciados e “primers” são desenhados para os microssatélites encontrados e dá-se início a otimização dos marcadores (Ostrander e colaboradores, 1992).

Outra classe de métodos de isolamento se baseia em hibridização seletiva, sendo a estratégia predominante atualmente, pois permite a seleção dos fragmentos antes de ser efetuada a clonagem (Glenn e Schable, 2005). Essa estratégia foi inicialmente introduzida por Armour e colaboradores (1994), Kandpal e colaboradores (1994), e Kijas e colaboradores (1994) e tem como primeiro passo, idêntico ao método tradicional, digerir o DNA genômico para produzir pequenos fragmentos que serão ligados a uma sequência conhecida (vetor ou adaptador). Como a estratégia de enriquecimento é dependente da habilidade de recuperação dos fragmentos contendo possíveis microssatélites após a hibridização com sondas, esses fragmentos ligados a um vetor ou adaptador são submetidos a uma reação de PCR. Após esse passo, o DNA é desnaturado para separação da dupla-fita e hibridização das sondas, que podem ser sondas simples ou biotiliadas. Sendo simples, essas sondas são hibridizadas em membrana de náilon. Sendo biotinizadas, essas devem ser capturadas por esferas magnéticas cobertas por estreptavidina. Após a hibridização são efetuados diversos passos de lavagem para remover o DNA não contendo as sondas específicas, e o DNA selecionado é eluído e amplificado por PCR. Finalmente o DNA enriquecido é clonado e sequenciado, possibilitando a busca por fragmentos contendo microssatélites e o posterior desenho dos “primers” (Zane e colaboradores, 2002).

Segundo Zane e colaboradores (2002), métodos tradicionais tem uma baixa eficiência e são mais dispendiosos. Os métodos que empregam o enriquecimento são mais utilizados por serem mais rápidos e eficientes. Porém, a construção de uma biblioteca genômica para isolamento de microssatélites é apenas o primeiro passo no processo de obtenção de “primers” para estes marcadores, de forma que essa tarefa pode representar uma grande quantidade de trabalho.

O sucesso do isolamento de marcadores microssatélites envolve várias etapas desde a construção da biblioteca até a amplificação bem sucedida de “primers” que resultem em *loci* polimórficos. Cada etapa apresenta um potencial de perda de *loci*, sendo o número final de *loci* que resultará em amplificação de populações polimórficas apenas uma fração do número de clones originalmente sequenciados da biblioteca (Squirrell e colaboradores, 2003).

A obtenção de marcadores nucleares altamente polimórficos, tanto para *Passiflora ovalis* como para *Petunia integrifolia* subesp. *depauperati*, é de extrema valia, pois auxilia

na detecção da variabilidade genética, e possibilita o refinamento da análise dos padrões filogeográficos dessas espécies, uma vez que esses foram acessados com marcadores de menor nível de polimorfismo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi a obtenção de um conjunto de marcadores microssatélites para as espécies *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata* e *Passiflora ovalis* visando sua aplicação em estudos evolutivos envolvendo estas espécies.

2.2. Objetivos específicos

Este trabalho apresenta como objetivos específicos: (i) a identificação de regiões de microssatélites em *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata* e *Passiflora ovalis* através da análise de uma biblioteca genômica enriquecida construída para cada espécie; (ii) a caracterização dos clones resultantes da construção das bibliotecas; (iii) o desenho de “primers” específicos para a amplificação das regiões de microssatélites através de PCR; e (iv) o estabelecimento das melhores condições de amplificação para cada conjunto de “primers”, e (v) comparar a metodologia empregada com diferentes protocolos para obtenção de marcadores do tipo microssatélites descritos na literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coletas

A biblioteca genômica enriquecida foi construída a partir do DNA extraído de folhas jovens de dois indivíduos, um de *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata* e outro de *Passiflora ovalis*, coletados da natureza. Para a amplificação dos conjuntos de primers foram utilizados 50 indivíduos coletados de duas populações naturais de *P. integrifolia* subesp. *depauperata* situadas no município de Taim, no Rio Grande do Sul, e Garopaba, em Santa Catarina, coletados e georreferenciados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Evolução Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e 43 indivíduos de *P. ovalis* das localidades de Conde, na Bahia, e Ubatuba, São Paulo, coletados e georreferenciados em colaboração com Teonildes Sacramento Nunes e Luciano Paganucci de Queiroz, pesquisadores da Universidade Estadual de Feira de Santana. O material

coletado foi acondicionado em sílica gel até o momento da pulverização das folhas, e para cada população de *P. integrifolia* subesp. *depauperata* e *P. ovalis* foi confeccionada uma exsicata e depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio grande do Sul, ou no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana, respectivamente.

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme a metodologia descrita por Roy e colaboradores (1992), na qual 20 mg do tecido foliar desidratado em sílica gel pulverizado com nitrogênio líquido foi embebido em 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) e incubado a 65°C por dez minutos. Em seguida foi feita uma emulsão com 600 µl de fenol e clorofórmio na proporção 1:1 e posterior centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi recolhida e transferida para um novo tubo no qual o DNA foi precipitado com isopropanol em mesmo volume da fase recolhida, e um décimo do volume de acetato de sódio. Após armazenamento das amostras a -4°C por 24 horas, essas são centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos para geração de um precipitado, e o sobrenadante resultante é descartado. O precipitado é duplamente lavado com 200 µl de etanol 70°GL que foi descartado após centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, e secado em temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período de secagem o precipitado foi eluído em 200 µl de água ultra pura estéril, com posterior tratamento com 2 µl de RNase a 10 mg/ml. Os produtos de extração foram testados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado GelRed™ e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Para a quantificação, os produtos foram quantificados no fluorômetro “Qubit™” com o kit “Quant-iT™ dsDNA HS Assay” (Invitrogen). Para a construção da biblioteca genômica foram necessários 15 µg de DNA, diluídos entre 150 e 250 ng/µl.

3.3. Construção da Biblioteca Genômica Enriquecida

A construção da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites de ambas as espécies foi realizada segundo o protocolo obtido junto ao Molecular Ecology Laboratory com o Professor Luciano B. Beheregaray, atualmente na Flinders University, Adelaide,

SA, Austrália, modificado do protocolo de Saltonstall (2003), originalmente baseado em Fisher e Bachmann (1998).

3.3.1. Digestão do DNA genômico

Para que o material genético tenha fragmentos de tamanho adequado para a inserção em um vetor de clonagem, o DNA genômico das espécies foi digerido com enzimas de restrição de corte freqüente, ocorrendo da seguinte maneira: em um tubo de 0,5 ml foram adicionados 17 µl de água ultra pura estéril, 5 µl de DNA em concentração aproximada de 250 ng/µl, 4 µl de tampão 1x One-Phor-All *PLUS* (GE Healthcare), 2 µl (20 unidades) de enzima *Hae*III (Roche Diagnostics) e 2 µl (20 unidades) de *Rsa*I (Roche Diagnostics), totalizando 30 µl. Essa reação de clivagem foi então incubada a 37°C por uma hora e 30 minutos, e em seguida a 75°C por 5 minutos. Após esse período foram utilizados 5 µl da reação adicionada a 2 µl de azul de bromofenol (glicerol 20%) para que esta pudesse ser verificada em eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% corado com GelRedTM (Biotium) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

3.3.2. Ligação de adaptadores

Para garantir que todos os fragmentos digeridos tivessem uma terminação comum e conhecida, estes foram ligados a adaptadores por suas extremidades. Os fragmentos foram então ligados a dois adaptadores pela adição de 25 µl do resultado da digestão com 6 µl (aproximadamente 240 pmol) do adaptador “oligo A” e 6 µl do adaptador “oligo B” (Sigma Genosys) a 40 mM, 6 µl de dATP (Promega) a 10 µM e 2,1 unidades de T4 ligase, de forma a totalizar 45,1 µl. Essa mistura foi incubada a 37°C por 16 horas (“overnight”). Foram confeccionadas duas reações de ligação para cada espécie devido à utilização de diferentes tipos de sondas para seleção de microssatélites de diferentes motivos.

3.3.3. Seleção e amplificação de fragmentos contendo microssatélites

Os fragmentos de DNA ligados aos adaptadores têm de passar por uma hibridização com sondas biotiniladas de repetições di, tri, ou tetranucleotídicas para que essas sejam capturadas por esferas magnéticas ligadas a estreptavidina, que apresenta grande afinidade com biotina, de forma a selecionar os fragmentos de DNA contendo as repetições di, tri, ou tetranucleotídicas. Para tanto, duas soluções diferentes foram necessárias: uma para as

sondas dinucleotídicas, outra para as sondas tetranucleotídicas (não foram utilizadas sondas trinucleotídicas). Na solução para as sondas dinucleotídicas foram utilizados 45 µl do DNA ligado aos adaptadores e 30 µl de SSC 20x (0,9 M NaCl, 0,1 M citrato de sódio, pH 7.0), sendo adicionados 25 µl de água ultra pura estéril para um volume total de 100 µl. Na solução para as sondas tetranucleotídicas foram utilizados 40 µl do DNA ligado e 60 µl de SSC 20x. Ambas as soluções foram incubadas a 95°C por 10 minutos, sendo imediatamente acondicionadas em gelo por 2 minutos. Subsequentemente, 3,5 µl (aproximadamente 140 pmol) de cada sonda biotinizada a 40 µM foram adicionados à devida solução: (dCA)₁₀ e (dGA)₁₀ na solução para as sondas dinucleotídicas, e (dAGAT)₁₀, (dAACT)₁₀ e (dACAT)₁₀ na solução para as sondas tetranucleotídicas. As sondas dinucleotídicas foram hibridizadas ao DNA através da incubação a 65°C, enquanto as tetranucleotídicas foram incubadas a 37°C, ambas por 10 minutos. O DNA hibridizado foi então seletivamente retido utilizando 600 µl de esferas magnéticas Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA selecionados foram eluídos em 25 µl de água ultra pura estéril e amplificado por PCR em uma reação de volume total de 50 µl contendo 5 µl do DNA eluído, 10 µl de tampão GoTaq Colourless Reaction Buffer (Promega) 5x, 10 µl (aproximadamente 200 µM) de dNTP (Promega) a 1 mM, 1 µl (aproximadamente 40 pmol) de “oligo A” (Sigma-Aldrich) a 40 µM, 3 µl (aproximadamente 1.5 mM) de cloreto de magnésio a 25 mM, 1 µl (5 unidades) de GoTaq Flexi DNA polimerase (Promega), e 20 µl de água ultra pura estéril. Essa reação foi submetida a uma temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por um minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os passos para seleção de fragmentos de DNA contendo microssatélites, desde a hibridização às sondas até a retenção dos fragmentos selecionados, foram repetidos tanto para seleção de fragmentos contendo repetições dinucleotídicas como para tetranucleotídicas. Ao final, o produto de PCR da primeira seleção de fragmentos foi utilizado na nova seleção em vez do DNA digerido ligado aos adaptadores, gerando um novo produto de DNA eluído.

3.3.4. Inserção do DNA enriquecido em microsatélites em um vetor de clonagem

O novo produto de DNA eluído foi submetido a uma nova reação de PCR. A única diferença desta reação para a anterior está na duração da extensão final, sendo esta de 15 minutos em vez de 5 minutos. Para verificar o produto da PCR, 5 µl da reação foram adicionados a 2 µl de azul de bromofenol (glicerol 20%) e submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. O produto da PCR foi então purificado utilizando o kit UltraClean 15 DNA Purification Kit (Mo Bio Laboratories) de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA purificados foram então ligados em um vetor pCR 2.1-TOPO utilizando o kit TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante, o que envolve a adição de 4 µl dos fragmentos de DNA selecionados a uma solução salina e ao vetor, e incubação da reação a temperatura ambiente por 30 minutos.

3.3.5. Transformação e amplificação dos clones

A transformação dos possíveis insertos contendo vetor pCR 2.1-TOPO foi efetuada utilizando células TOP10 (*Escherichia coli*) quimicamente competentes seguindo as instruções do fabricante do kit de clonagem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Foram necessárias quatro transformações, uma para cada solução contendo fragmentos selecionados de DNA: dinucleotídios e tetranucleotídios para *Petunia*, e dinucleotídios e tetranucleotídios para *Passiflora*. A transformação se deu através da incubação das reações no gelo por 30 minutos, seguida de incubação a 42°C por 30 minutos, e nova incubação em gelo, agora por 2 minutos. Após este procedimento, foram adicionados às células 250 µl de meio S.O.C. (Invitrogen). As células transformadas foram agitadas a 37°C por uma hora, e ao final deste período cada reação de transformação foi distribuída em três placas de Petri contendo meio sólido (LB ágar, sendo LB a redução de *lysogeny broth*) (1.0% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 1,5% agar, 50 µg/ml ampicilina, e 40 µl X-gal (40 mg/µL)). Essas placas foram então incubadas a 37°C “overnight”. Os clones positivos foram repicados em LB líquido, agitado a 37°C “overnight” e amplificados por PCR em uma reação contendo 0,4 µl (aproximadamente 16 pmol) de “primer” M13F (-20) e M13R-pUC (-40) (Sigma-Aldrich), 0,5 µl (2,5 unidades) de GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega), 8 µl (200 µM) de dNTP (Promega) a 1 mM, 4 µl (2,5 mM) de MgCl₂ (Promega) a 25 mM, 8 µl (2,5 mM) de tampão 1x GoTaq Colourless Reaction Buffer

(Promega), e 1 µl do clone em meio líquido. As condições para a PCR incluem desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 3 minutos, com uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Após o término na reação de PCR, 5 µl da reação foram adicionados a 2 µl de azul de bromofenol (glicerol 20%) para que esta pudesse ser verificada por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

3.3.6. Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando polietilenoglicol (PEG) 20% segundo o protocolo de Dunn e Blatner (1987). O protocolo resume-se aos seguintes passos:

- ⇒ Adição de igual volume de PEG 20% (p/v) ao produto de PCR e homogeneização;
- ⇒ Incubação a 37°C por 30 minutos;
- ⇒ Centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos;
- ⇒ Descarte cuidadoso do sobrenadante;
- ⇒ Adição de 125 µl de EtOH 80% gelado. Incubação por um minuto e centrifugação por dois minutos;
- ⇒ Descarte do sobrenadante;
- ⇒ Repetição dos 6º e 7º passos com etanol absoluto;
- ⇒ Evaporação do EtOH residual a 70°C por dez minutos;
- ⇒ Ressuspensão do produto de PCR em 15 µl de H₂O ultra-pura estéril e incubação à temperatura ambiente por 12 horas.

O sequenciamento do DNA foi realizado em sequenciador automático MegaBACE™ 1000 (GE HealthCare), seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o *DYEnamic™ ET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente, de acordo com as especificações do fabricante. As condições para a reação de sequenciamento são apresentadas no quadro abaixo:

Quadro 1: Condições para a reação de sequenciamento.

<u>O sequenciamento do DNA foi realizado</u>		<u>Condições de amplificação</u>
<i>DYEnamic™ET terminator sequencing premix</i>	4 µl	35 ciclos { 95 °C por 20 s 50 °C por 15 s 60 °C por 1 min
Produto de PCR purificado	40 ng	
“Primer”	5 µM	
Água estéril	Até 10 µl	

As reações foram purificadas diretamente nas placas destinadas ao sequenciador, de acordo com o seguinte protocolo:

- ⇒ Adição de 1 µl de acetato de amônio 7,5 M pH e 30 µl de etanol absoluto (temperatura ambiente) em cada produto de reação de sequenciamento;
- ⇒ Fechamento da placa com adesivo apropriado e mistura por 30 inversões;
- ⇒ Centrifugação da placa por 45 minutos, 1780 RCF e 20°C;
- ⇒ Descarte do sobrenadante, por inversão brusca da placa;
- ⇒ “Spin” a 500 RCF com a placa invertida e apoiada em papel toalha;
- ⇒ Adição de 100 µl de etanol 70% (temperatura ambiente) ao “pellet”;
- ⇒ “Spin” a 1780 RCF e descarte do sobrenadante, por inversão brusca da placa;
- ⇒ “Spin” a 750 RCF com a placa invertida e apoiada em papel toalha;
- ⇒ Adição de 10 µl de *Loading Solution* e fechamento da placa com adesivo apropriado;
- ⇒ Ressuspensão em *vortex* por 5 minutos;
- ⇒ “Spin” a 1780 RCF e encaminhamento ao sequenciador.

3.3.7. Estoque dos clones em glicerol

Os clones foram estocados em glicerol após serem repicados em meio líquido. Para tal, 1 µl de cada colônia em meio líquido foi adicionado em 100 µl de LB líquido tratado com 50 µg/ml de ampicilina e incubado sob agitação a 37°C “overnight”. Após o crescimento das colônias, foram adicionados 100 µl de glicerol 50% e essas estocadas a -80°C.

3.3.8. Análise das sequências de DNA

As sequências geradas foram visualizadas no programa Chromas 2.33 (*Technelysium*, Helensvale, Austrália, disponível no *site* www.technelysium.com.au), e as sequências dos “primers” e do vetor devidamente excluídas de forma manual. As sequências foram analisadas a procura de repetições contendo entre dois e seis pares de base, repetidos no mínimo uma vez. Foram consideradas microssatélites as repetições maiores que 12 pares de base, sendo identificadas visualmente e com ajuda do software IMEx: Imperfect Microsatellite Extractor (Mudunuri e Nagarajaram, 2007) para identificação de microssatélites, sendo que os parâmetros adotados para considerar a sequência um microssatélite passível de síntese de iniciadores foram:

- ⇒ A sequência deve conter um motivo de 1- 6 nucleotídeos repetidos no mínimo seis vezes *in tandem*, quando tri ou tetranucleotídico, e mais que seis vezes quando dinucleotídico.
- ⇒ A repetição não pode apresentar qualquer tipo de imperfeição entre os motivos.

3.3.9. Desenho de “primers” para PCR

As sequências dos insertos contendo microssatélites foram submetidas ao programa Primer 3 (disponível no *site* <http://primer3.sourceforge.net/webif.php>), para que “primers” específicos para a amplificação dos mesmos fossem gerados. Os parâmetros utilizados para o desenho dos pares de “primers” foram os seguintes:

Tamanho de “primer” entre 18 e 24 pares de bases – esse tamanho permite que o “primer” seja longo o suficiente para apresentar uma especificidade adequada, e curto o bastante para que anele com facilidade ao molde quando é alcançada a temperatura de anelamento específica.

Conteúdo de G-C entre 35 e 80% - o conteúdo de Gs e Cs nos “primers” como porcentagem do total das bases deve se manter entre 40 e 60%.

T_m entre 57°C e 63°C – por definição, T_m (“melting temperature”) é a temperatura na qual metade da fita dupla de DNA se encontra dissociada e metade se encontra na forma íntegra, indicando a estabilidade do duplex. “Primers” com T_m acima de 65°C possuem a tendência de gerar anelamento secundário.

Diferença máxima de 3°C entre a T_m dos “primers” de um conjunto – ambos primer do conjunto devem apresentar T_m próximas para maximizar o rendimento do produto de

PCR. Uma diferença maior que 5°C entre as T_m pode resultar na não amplificação do produto.

Baixa complementaridade entre os “primers” – a complementaridade entre o conjunto de “primers” é calculada de forma que as bases complementares tenham um peso de 1.00. A complementaridade máxima aceitável é de 8.00, ou seja, oito bases complementares, sendo de até 3.00 a complementaridade ideal.

Baixa complementaridade da porção 3’ terminal do “primer” – a complementaridade da porção terminal do “primer” em relação a si próprio, e em relação ao outro “primer” do conjunto. Este parâmetro é medido de forma a testar a possibilidade de formação de dímeros de “primers” durante a reação de PCR. A complementaridade máxima aceitável é de 3.00, ou seja, três bases complementares, sendo a complementaridade ideal igual a 0.00.

Todos os “primers” diretos tiveram adicionados à sua porção 5’ uma sequência chamada cauda M13 (5’-CACGACGTTGTAAAACGAC-3’), na qual um “primer” universal M13 marcado com fluorescência é anelado durante a reação de PCR, possibilitando a posterior leitura do fragmento no sequenciador automático MegaBACE™ 1000 (GE HealthCare).

3.3.10. Amplificação dos “primers”

Os marcadores microssatélites resultantes desse trabalho foram testados para polimorfismos em 50 indivíduos de *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata* e 40 indivíduos de *Passiflora ovalis* provenientes de duas populações naturais de cada espécie. Para tanto, foram feitas reações de PCR de volume final 15 µl, adicionando em um tubo para PCR 1,5 µl de tampão 10x (Invitrogen), resultando em uma concentração final de 1x, 1,5 µl de dNTP (0,2 mM) a 2 mM (Invitrogen), 0,3 µl de “primer” direto (0,04 µM) a 2 µM, 1,5 µl de “primer” reverso (0,2 µM) a 2 µM, 1,5 µl de fluorescência FAM, ou NED, ou HEX (0,2 µM) a 2 mM, 0,6 µl de MgCl₂ (2 µM) a 50 mM (Invitrogen), 0,1 µl de Taq *Platinum* DNA polymerase (0,5 unidades) contendo 5 u/µl (Invitrogen), 7 µl de água ultra pura estéril, e 1 µl de DNA em concentração mínima de 10 ng/µl. A reação ocorreu em termociclador automático Applied Biosystem em condições de amplificação estabelecidas para cada conjunto de “primers”. As condições gerais incluem desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento

na temperatura específica de cada “primer” por 45 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram verificados através de eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, corado com GelRed™ (Biotium) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Foram utilizados 2 µl do volume total de cada reação, com a adição de 2 µl de azul de bromofenol (glicerol 20%) para cada verificação.

4. RESULTADOS

4.1. Clones e unidades de repetições

Foram obtidos 696 clones totais, sendo 384 clones referentes à biblioteca de *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata*, e 312 à de *Passiflora ovalis*. Destes, um total de 578 clones foram amplificados com sucesso, sendo 345 clones referentes à *Petunia* e 233 à *Passiflora*. Do total dos clones amplificados, 481 foram sequenciados com sucesso, sendo 318 de *Petunia* e 163 de *Passiflora*. O índice de clones repetidos chegou a 14,5% do total de clones sequenciados, resultando em 411 sequências únicas.

Do total de 411, 375 clones apresentaram algum tipo de repetição (repetidos de 2 a 20 vezes), somando 396 unidades de repetição identificadas. O número de unidades de repetição apresentadas para *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata* e *Passiflora ovalis*, e a natureza destas, está apresentada na Tabela 1. Cinquenta sequências apresentaram microssatélites (≥ 12 pb): 33 perfeitos, 14 imperfeitos, um interrompido e dois compostos, sendo um destes imperfeito. Ao todo, 16 microssatélites não apresentaram condições necessárias para o desenho de ao menos um dos “primers” (indisponível), 34 microssatélites apresentaram iniciadores disponíveis, sendo que 25 adequados aos parâmetros adotados para a síntese de “primers”, citados anteriormente. Os microssatélites encontrados em ambas as espécies estão apresentados na Tabela 2 (a;b), juntamente com o “status” de seus iniciadores.

4.2. Iniciadores e ampliações

O desenho dos “primers” para cada *loci* foi efetuado segundo os padrões descritos anteriormente. Em *Petunia*, 100% dos *loci* foram amplificados com sucesso (Figura 3a), sendo que 7,7% destes apresentam um padrão de bandas ininterpretável (múltiplas bandas). Em *Passiflora*, 58,3% dos *loci* amplificaram com sucesso, sendo que 33,3% destes

apresentam múltiplas bandas, como representado na Figura 3b. Os iniciadores, suas especificações, e a informação de quais desses amplificam, se encontram listados na Tabela 3, sendo PID a denominação dos conjuntos descritos para *P. integrifolia* subesp. *depauperata*, e PO a denominação para os conjuntos de *P. ovalis*.

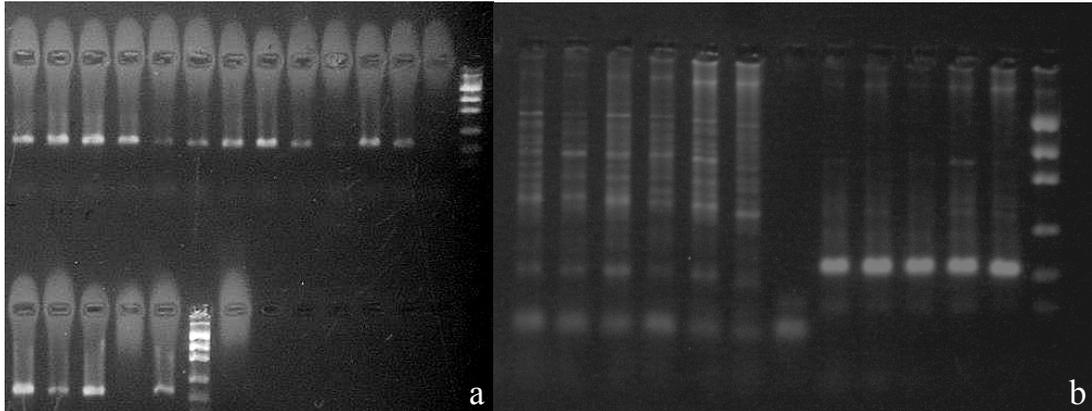


Figura3: Amplificação de marcadores. Locus PID3C4 para *P. integrifolia* subesp. *depauperata* (a); locus PO7C12 para *Passiflora ovalis* (b).

Tabela 1: Número de sequências, frequência de repetições, e motivos mais frequentes em *P. integrifolia* subesp. *depauperata* e *P. ovalis*.

Espécie	<i>Petunia integrifolia</i> subesp. <i>depauperata</i>	<i>Passiflora ovalis</i>
Número de sequências únicas	273	138
Número de sequências contendo repetições	250	125
Número de sequências contendo microssatélites	28	23
Frequência de unidades de repetição dinucleotídicas	52,80%	68%
Frequência de unidades de repetição trinucleotídicas	33,40%	25%
Frequência de unidades de repetição tetranucleotídicas	11%	5,84%
Frequência de unidades de repetição pentanucleotídicas	2,20%	0,58%
Frequência de unidades de repetição hexanucleotídicas	0,30%	0,58%
Motivos mais frequentes	CA/GT, GA/CT, GAA/CTT, GAAA/CTTT	CA/GT, GA/CT, GAA/CTT, GAAA/CTTT

Tabela 2: Loci de *Petunia* (PID) e *Passiflora* (PO) e suas repetições, características, características e “status” dos iniciadores.

Clone	Repetição	Classificação	"Status" do iniciador	Clone	Repetição	Classificação	Iniciador
PID1D3	(AC) ₇	imperfeito	disponível	PO5E11	(AC) ₇ (AG) ₆	composto	sintetizado
PID1D6	(TGG) ₆	perfeito	sintetizado	PO5G8	(TG) ₆	perfeito	disponível
PID1F1	(CT) ₇	perfeito	sintetizado	PO5G10	(GA) ₁₅	perfeito	indisponível
PID1F3	(CT) ₈	imperfeito	indisponível	PO5H1	(GA) ₁₄	perfeito	sintetizado
PID1G6	(TG) ₇	perfeito	sintetizado	PO6A12	(GT) ₆	perfeito	indisponível
PID1H7	(GT) ₇	imperfeito	indisponível	PO6D1	(AC) ₁₁	perfeito	sintetizado
PID2A9	(GT) ₁₇	imperfeito	indisponível	PO6D4	(GT) ₉	perfeito	sintetizado
PID2B7	(CA) ₇	imperfeito	indisponível	PO6D6	(GT) ₈	perfeito	sintetizado
PID2C4	(GT) ₆	imperfeito	indisponível	PO6D7	(GT) ₇	perfeito	disponível
PID2C7	(CA) ₇	imperfeito	indisponível	PO6D12	(TC) ₉	perfeito	indisponível
PID2E3	(CT) ₈	imperfeito	indisponível	PO6E6	(CT) ₉	perfeito	sintetizado
PID2F2	(TC) ₁₂	perfeito	sintetizado	PO6E8	(GT) ₁₀	perfeito	sintetizado
PID2F9	(CT) ₇ (CCCTCCCGTC)(CT) ₁₂	interrompido	indisponível	PO6E12	(CT) ₁₁	imperfeito	indisponível
PID2G11	(AG) ₇	imperfeito	disponível	PO6F5	(GT) ₆	perfeito	disponível
PID3A1	(CA) ₈	imperfeito	disponível	PO6F7	(CT) ₈	perfeito	sintetizado
PID3A7	(AG) ₈	imperfeito	disponível	PO6G2	(CT) ₁₀ (CA) ₁₁	composto, imperfeito	indisponível
PID3B12	(GT) ₉	perfeito	sintetizado	PO6G11	(AG) ₁₁	perfeito	sintetizado
PID3C4	(CT) ₁₂	perfeito	sintetizado	PO6H1	(GA) ₈	perfeito	indisponível
PID3D4	(AG) ₇	imperfeito	disponível	PO7C12	(AC) ₇	perfeito	sintetizado
PID3E8	(AC) ₆	perfeito	disponível	PO7F10	(AG) ₁₆	perfeito	indisponível
PID3G3	(TAGA) ₇	perfeito	sintetizado	PO7H11	(CTT) ₁₃	perfeito	sintetizado
PID3G5	(TTC) ₉	perfeito	sintetizado	POSYD	(GAA) ₂₀	perfeito	sintetizado
PID3G7	(CA) ₁₀	perfeito	sintetizado				
PID3H7	(GAA) ₆	perfeito	sintetizado				
PID4B3	(GAA) ₈	perfeito	indisponível				
PID4C6	(GAA) ₁₃	perfeito	sintetizado				
PID4D4	(CTAT) ₈	perfeito	sintetizado				
PID4G8	(CA) ₈	perfeito	sintetizado				
Total	28	--	--	Total	22	--	--

Tabela 3: Conjuntos de “primers” e suas características.

Locus	Amplificação	"Primer" (pb)	Conteúdo de GC (%)	Tm (°C)	Complementaridade	Complementaridade 3'
PID1D6	ok	F: 25	F: 40,00	F: 57,94	F: 6,00	F: 3,00
		R: 21	R: 49,86	R: 58,16	R: 4,00	R: 2,00
PID1F1	ok	F: 22	F: 40,91	F: 59,07	F: 4,00	F: 0,00
		R: 25	R: 44,00	R: 59,56	R: 4,00	R: 3,00
PID1G6	ok	F: 22	F: 50,00	F: 58,68	F: 3,00	F: 0,00
		R: 20	R: 50,00	R: 58,47	R: 6,00	R: 3,00
PID2F2	ok	F: 20	F: 45,00	F: 60,03	F: 5,00	F: 0,00
		R: 21	R: 42,86	R: 58,64	R: 3,00	R: 1,00
PID3B12	bandas múltiplas	F: 21	F: 47,62	F: 60,94	F: 4,00	F: 2,00
		R: 21	R: 47,62	R: 59,27	R: 4,00	R: 0,00
PID3C4	ok	F: 21	F: 47,62	F: 60,06	F: 5,00	F: 0,00
		R: 20	R: 50,00	R: 59,33	R: 3,00	R: 0,00
PID3G3	ok	F: 24	F: 29,17	F: 57,42	F: 5,00	F: 3,00
		R: 25	R: 36,00	R: 58,59	R: 6,00	R: 2,00
PID3G5	ok	F: 20	F: 55,00	F: 61,37	F: 4,00	F: 2,00
		R: 20	R: 55,00	R: 59,55	R: 4,00	R: 1,00
PID3G7	ok	F: 21	F: 47,62	F: 59,44	F: 5,00	F: 2,00
		R: 24	R: 37,50	R: 58,18	R: 5,00	R: 0,00
PID3H7	ok	F: 23	F: 39,13	F: 60,89	F: 6,00	F: 3,00
		R: 22	R: 40,91	R: 57,61	R: 4,00	R: 2,00
PID4C6	ok	F: 22	F: 40,91	F: 59,99	F: 4,00	F: 2,00
		R: 19	R: 57,89	R: 60,57	R: 4,00	R: 0,00
PID4D4	ok	F: 18	F: 55,56	F: 60,36	F: 4,00	F: 0,00
		R: 27	R: 25,93	R: 57,16	R: 7,00	R: 3,00
PID4G8	ok	F: 22	F: 45,45	F: 59,52	F: 7,00	F: 2,00
		R: 24	R: 37,50	R: 58,82	R: 4,00	R: 2,00

Tabela 3: Conjuntos de “primers” e suas características (continuação).

<i>Locus</i>	Amplificação	"Primer" (pb)	Conteúdo de GC (%)	Tm (°C)	Complementaridade	Complementaridade 3'
PO5E11	bandas duplas	F: 21 R: 23	F: 47,62 R: 47,83	F: 59,58 R: 59,37	F: 3,00 R: 5,00	F: 0,00 R: 0,00
PO5H1	sem produto	F: 26 R: 24	F: 34,62 R: 45,83	F: 57,57 R: 60,37	F: 6,00 R: 4,00	F: 2,00 R: 0,00
PO6D1	sem produto	F: 20 R: 20	F: 50,00 R: 55,00	F: 59,43 R: 59,62	F: 4,00 R: 3,00	F: 0,00 R: 1,00
PO6D4	bandas múltiplas	F: 20 R: 20	F: 55,00 R: 55,00	F: 61,11 R: 62,33	F: 3,00 R: 6,00	F: 1,00 R: 2,00
PO6D6	sem produto	F: 22 R: 20	F: 27,27 R: 45,00	F: 55,08 R: 60,52	F: 4,00 R: 5,00	F: 3,00 R: 1,00
PO6E6	bandas duplas	F: 21 R: 22	F: 42,86 R: 45,45	F: 57,42 R: 58,46	F: 3,00 R: 6,00	F: 1,00 R: 2,00
PO6E8	ok	F: 22 R: 20	F: 31,82 R: 45,00	F: 58,66 R: 58,83	F: 6,00 R: 5,00	F: 2,00 R: 2,00
PO6F7	sem produto	F: 21 R: 20	F: 38,10 R: 50,00	F: 59,40 R: 58,64	F: 4,00 R: 5,00	F: 2,00 R: 0,00
PO6G11	ok	F: 20 R: 20	F: 50,00 R: 45,00	F: 57,77 R: 59,51	F: 3,00 R: 5,00	F: 1,00 R: 3,00
PO7C12	bandas múltiplas	F: 22 R: 20	F: 45,45 R: 60,00	F: 60,01 R: 60,40	F: 3,00 R: 5,00	F: 3,00 R: 0,00
PO7H11	ok	F: 20 R: 24	F: 45,00 R: 41,67	F: 59,02 R: 58,20	F: 4,00 R: 6,00	F: 0,00 R: 0,00
POSYD1	sem produto	F: 23 R: 20	F: 39,13 R: 50,00	F: 58,39 R: 58,40	F: 3,00 R: 6,00	F: 2,00 R: 1,00

5. DISCUSSÃO

5.1. Sucesso no isolamento de microsatélites

O método mais comum de se obter sequências flanqueadoras de microsatélites é a partir da construção de uma biblioteca genômica enriquecida em *loci* de microsatélites e a chave para a análise dos *loci* são exatamente as sequências que flanqueiam esses microsatélites (Whang e colaboradores, 2008). O protocolo envolvendo esferas magnéticas e biotina proposto por Kijas e colaboradores (1994) está fundamentado nas bases da teoria da combinação covalente entre a estreptavidina das esferas magnéticas e a biotina das sondas de microsatélites, e apresenta potencial para separar centenas de *loci* em pouco tempo. É um método muito eficiente e simples, que pode aumentar a quantidade de clones contendo microsatélites em até 50% (Kandpal e colaboradores, 1994; Li e Zheng, 2004).

Neste estudo, 384 clones de *Petunia* deram origem a 345 produtos de PCR, dos quais 273 (79,1%) geraram sequências limpas e únicas, e, destas, 250 (91,6%) apresentaram algum tipo de repetição. Das sequências únicas geradas da biblioteca enriquecida para *Petunia*, os microsatélites representaram 10,2% (28 sequências), e aqueles para os quais os iniciadores foram sintetizados (microsatélites perfeitos), foram 13 (4,8% do total). Para *Passiflora* os números não se mostraram muito diferentes: 233 produtos de PCR amplificados com sucesso, oriundos de 312 clones, geraram 138 sequências únicas, correspondendo a 59,2% dos produtos obtidos. As repetições estiveram presentes em 90,6% dessas (125 sequências), gerando 23 microsatélites que correspondem a 16,7% do total de sequências não-redundantes, dos quais 12 (8,7%) tiveram “primers” sintetizados.

Embora baixos quando comparados a valores obtidos para algumas plantas como os apresentados por Draheim e colaboradores (2009), em que 43% dos clones sequenciados apresentaram microsatélites que geraram 14 “primers” (22,2% do total de clones), e por Assoumane e colaboradores (2009), em que exatos 50% dos clones apresentaram microsatélites, gerando 11 “primers” funcionais, os valores aqui apresentados se assemelham àqueles relatados para outras espécies das famílias Solanaceae e Passifloraceae, a partir do mesmo método de obtenção. Em Solanaceae, por exemplo, Kwon e colaboradores (2009) apresentaram um sucesso de 87% na obtenção de sequências únicas geradas a partir de uma biblioteca enriquecida em microsatélites para *Lycium*

chinense Mill. Dessas sequências, 52% apresentaram repetições (estes autores consideraram microssatélites todas as repetições dinucleotídicas que, quando únicas no fragmento, apresentavam-se maiores ou iguais a 8pb, e quando acompanhadas de outro motivo no fragmento, maiores que 4pb – microssatélite complexo) e 27,8% resultaram em “primers”. Dos primers sintetizados, 4,9% amplificaram com sucesso. Se os autores houvessem utilizado os mesmo parâmetros para consideração de microssatélite adotados no presente trabalho, o número de “primers” funcionais apresentados não seria maior que oito, totalizando 1,85% de clones resultando em *loci* funcionais. Em *Przewalskia tangutica* Maxim, Wan e colaboradores (2008) reportaram que 14,5% dos clones sequenciados apresentaram microssatélites (estes autores consideram microssatélite as repetições dinucleotídicas maiores ou iguais a 10pb), que resultaram em 12 iniciadores, correspondendo a 6% do total de clones sequenciados. Para *Atropa baetica* Willk., Suárez-Santiago e colaboradores (2008) obtiveram 15% de clones sequenciados contendo microssatélites, resultando em 9,8% de clones com microssatélites apresentando regiões flanqueadoras adequadas para desenho de iniciadores. Para a família Passifloraceae, 15,1% dos clones sequenciados para *Passiflora alata* Curtis apresentaram microssatélites, sendo desenhados “primers” para 13,2% do total de clones sequenciados (Pádua e colaboradores, 2005). Para *Passiflora edulis* Sims., Oliveira e colaboradores. (2005b) obteve 95 sequências contendo microssatélites a partir de 822 clones sequenciados, correspondendo a 11,54%. Estes dados são condizentes com os dados apresentados neste trabalho para *Passiflora ovalis*.

Quando contrastamos os valores obtidos neste trabalho para *Petunia* com valores obtidos para outras espécies de Solanaceae, através de métodos alternativos, temos que, para tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Areshchenkova (2000) obteve 48 iniciadores para *loci* de microssatélite a partir de 100.000 clones de uma biblioteca genômica posteriormente hibridizados a sondas contendo repetições. Destes, apenas 25 *loci* apresentaram sucesso na amplificação. Este número corresponde a 0,025% do total de clones iniciais. Para berinjela (*Solanum melongena* L.), Nunome e colaboradores (2003) obtiveram 23 “primers” resultando em produtos de amplificação, a partir de 72.000 clones gerados também através de uma biblioteca genômica posteriormente hibridizada com sondas contendo repetições, resultando em uma frequência de 0,03% de *loci* de microssatélites a partir da amostra inicial de clones. Nagy e colaboradores (2007), através

da construção de uma biblioteca genômica para *Capsicum annum* L. submetida à hibridização com sondas contendo repetições marcadas com isótopo radioativo, obtiveram 46 microssatélites em 55.296 clones, resultando em uma frequência de 0,08%. Esses resultados corroboram a idéia de que, embora não se aproximando da marca de 50% de clones contendo microssatélites, descritos por Li e Zheng (2004), o método de enriquecimento em *Petunia integrifolia* subesp. *depauperata* gerou resultados que condizem com aqueles descritos para outras espécies de Solanaceae, através da utilização do mesmo método, e aparenta vantagem em relação à obtenção de *loci* de microssatélites a partir de métodos de hibridização pós construção de uma biblioteca genômica, comparado a outras espécies de Solanaceae.

Zhang e colaboradores (2008) reportaram a utilização do método FIASCO para obtenção de “primers” para *Trifolium repens* L. (Fabaceae), obtendo 33,9% de sequências contendo repetições (estes autores consideraram como sucesso os motivos que se apresentavam repetidos mais de uma vez), 25% de sequências contendo microssatélites maiores ou iguais a 18pb, 15,4% de “primers” sintetizados, sendo destes apenas 22,1% para microssatélites perfeitos – 3,4% do total de sequências únicas obtidas pelos autores. Este valor está abaixo do índice de microssatélites encontrados neste trabalho para *Petunia*, e beira à metade da frequência daqueles sintetizados para *Passiflora*, considerando a quantidade de sequências e “primers” obtidos.

5.2. Dificuldades no isolamento de microssatélites

O desenvolvimento de uma biblioteca para isolamento de microssatélites é apenas o primeiro passo no processo de obtenção de “primers” funcionais para *loci* de microssatélites (Zane e colaboradores, 2002). O sucesso no isolamento de marcadores microssatélites envolve diversos passos desde a obtenção da biblioteca até o desenvolvimento de “primers” funcionais, e em cada passo existe a possibilidade de perda de *loci*, de forma que o número de microssatélites obtidos no final do processo representa apenas uma fração dos clones sequenciados (Squirrell e colaboradores, 2003).

Em uma de suas publicações, Squirrell e colaboradores (2003) caracterizaram a possível perda dos *loci*. Os autores relataram uma provável perda de 36% de *loci* na obtenção de microssatélites únicos a partir do total de clones sequenciados, pois é inevitável que alguns deles não possuam microssatélites. Quando se trata do isolamento de

microssatélites em plantas, aproximadamente um terço das sequências é perdido devido à falta de microssatélites. Neste trabalho, essa provável perda foi de 91,2% em *Petunia* e 85,9% em *Passiflora*. Os autores relataram também uma perda de 46% no processo de obtenção de “primers” a partir das sequências únicas contendo microssatélites, pois um certo número de clones podem apresentar não só a mesma sequência, mas sequências complementares. Ainda, nem todas as sequências flanquadoras dos microssatélites se apresentam adequadas para o desenho de iniciadores. Neste trabalho a perda foi de 64% e 65,2% para *Petunia* e *Passiflora*, respectivamente. Quanto à perda de *loci* devido à falta de produto ou presença de múltiplas bandas, os autores calcularam uma perda de 49% da obtenção de *loci* funcionais devido a não amplificação ou produtos com padrão de bandas ininterpretável. Em *Petunia*, essa perda foi de apenas 7,7%, enquanto em *Passiflora* chegou a 75%. Devido a testes em andamento, com DNA de indivíduos coletados da espécie *Passiflora ovalis*, é possível que a grande falta de produto apresentada para os *loci* desenvolvidos para esta espécie seja resultado da baixa quantidade e/ou qualidade do DNA extraído das amostras, devido à presença de inibidores da amplificação, pois ao submeter os DNAs a tratamentos específicos de purificação, o número de *loci* amplificados dobrou, embora a amplificação e interpretação ainda necessite de ajustes.

A grande diferença na porcentagem de perda entre as etapas apresentadas por Squirrell e colaboradores (2003) e o presente estudo, pode estar relacionada com o fato de que não existe um consenso sobre o que considerar um microssatélite nas publicações, de forma que os valores aqui encontrados podem estar superestimados. Por exemplo, no presente trabalho foram considerados microssatélites as sequências repetidas *in tandem* maiores ou iguais a 12pb. Já em *Lycium chinense*, foram considerados microssatélites as repetições maiores ou iguais a 8pb. Essa heterogeneidade é bastante frequente, de forma que algumas publicações apresentam microssatélites com o número de repetição mais ou menos restrigente.

5.3. Repetições mais frequentes

Seguindo os resultados reportado por Tóth e colaboradores (2000) em seu estudo comparativo entre os diferentes genomas e sua frequência de microssatélites, as repetições mais frequentes em ambas as bibliotecas aqui estudadas foram, respectivamente, di e trinucleotídicas. As unidades de repetição mais abundantes encontradas neste trabalho não

diferiram entre as duas espécies, sendo CA/GT e GA/CT as repetições dinucleotídicas mais frequentes, GAA/CTT a repetição trinucleotídica mais abundante, e GAAA/CTTT a tetranucleotídica mais frequente. Em sua maior parte, este resultado está de acordo com dados anteriormente publicados com base no genoma de *Arabidopsis*. Cardle e colaboradores (2000) mostraram que, nesse genoma, se observa uma maior frequência de repetições AT/TA e GA/CT como repetições dinucleotídicas, e GAA/CTT como trinucleotídicas. A abundância das repetições tetranucleotídicas não foi mencionada. Os mesmo autores, analisando outras espécies de plantas vasculares, também demonstraram a ocorrência das repetições AT/TA, GA/CT, e GAA/CTT como as repetições mais frequentes nos genomas analisados. Comparando os dados apresentados para espécies pertencentes à Solanaceae, *Lycium chinense* apresentou as repetições CA/GT, GA/CT e TA/AT como as mais frequentes (Kwon e colaboradores, 2009); *Atropa baetica* apresentou CT/GA e GT/CA como repetições dinucleotídicas mais frequentes, e GAA/CTT como repetição trinucleotídica mais frequente (Suárez-Santiago e colaboradores, 2008); *Przewalskia tangutica* apresentou GA/CT e CA/GT como as repetições mais comuns (Wan e colaboradores, 2008); *Capsicum annuum* apresentou AC/TG e AG/CT como repetições mais frequentes (Nagy e colaboradores (2007); e Nunome e colaboradores (2003) encontraram CA/GT e AT/TA como repetições mais frequentes em berinjela. Em relação a repetições dinucleotídicas, apenas *Lycium chinense* e berinjela apresentaram AT/TA entre as repetições mais frequentes, *Atropa baetica*, *Przewalskia tangutica*, e *Capsicum annuum* apresentaram com maior frequência as mesmas repetições encontradas aqui para *P. integrifolia* subesp. *depauperata*. Considerando as repetições trinucleotídicas, *Atropa baetica* também apresenta GAA/CTT como mais abundante. Alguns autores apresentam a relação de microssatélites mononucleotídicos. Neste trabalho, a opção foi deixá-los de lado devido às dificuldades que a presença destes acarreta no sucesso da reação de PCR, e, possivelmente, na análise de variabilidade dos marcadores devido a probabilidade destas repetições representarem homoplasias, uma vez que um dos objetivos do desenvolvimento de bibliotecas de microssatélites para estas duas espécies é sua utilização em estudos populacionais e filogeográficos.

5.4. Frequência de microssatélites e tamanho do genoma

De acordo com Lagercrantz e colaboradores (1993), plantas apresentam cinco vezes menos microssatélites em seus genomas quando comparados a mamíferos. Entre os vertebrados, peixes apresentam maior frequência de microssatélites comparados aos demais, sendo aves a classe de vertebrados com menor quantidade de microssatélites em relação ao número de bases analisadas, tendo suas frequências similares às aquelas encontradas em plantas (Neff e Gross, 2001). Quando comparado o número de microssatélites obtidos pelo método de construção de biblioteca enriquecida para peixes e para as plantas anteriormente citadas, observa-se que o esforço de sequenciamento para obtenção do mesmo número, ou menor, de “primers” sintetizados, é maior em plantas. Em *Hexagrammos decagrammus* Pallas, peixe de recifes temperados, 82% dos clones sequenciados resultaram no desenho de “primers” para *loci* apresentando até 35 repetições (Freinwald e colaboradores, 2009). Para *Plectropomus leopardus* Lacepède, Ding e colaboradores (2009) obtiveram 100% de sucesso no isolamento de microssatélites a partir de uma biblioteca genômica enriquecida. Iniciadores foram desenhados para todos os clones e 72% destes se apresentaram polimórficos. Para *Maccullochella peelii peelii* Mitchell, espécie de água doce, Rourke e colaboradores (2007) obtiveram 143 “primers” desenhados a partir de 288 sequências, resultando em 49,6% de sucesso. Porém, para tucunaré, Carvalho e colaboradores (2008), utilizando-se do mesmo método e sondas apresentadas neste trabalho, sequenciou 120 clones transformados que resultaram em 20 microssatélites, perfeitos e imperfeitos, (16,6%) com sequência flanqueadora adequada para desenho de “primers”. Destes, dez falharam ao amplificar produto, resultando em dez *loci* funcionais. Outros estudos também apresentam frequência reduzida de microssatélites funcionais obtidos de genoma de peixes (Tong e colaboradores, 2006; Amado e colaboradores, 2008).

Hancock (1995) afirmou que a quantidade de microssatélites em um dado genoma estava correlacionada ao tamanho deste genoma. Esse fato poderia estar relacionado com a possibilidade de microssatélites estarem envolvidos no empacotamento do DNA (Gaillard e Strauss, 1994). Porém, foi demonstrado que microssatélites podem possuir propriedades específicas de ligação a proteínas, desempenhando importante papel na atividade transcricional (Kashi e Soller, 1999). Nesse caso, não haveria correlação entre tamanho do genoma e a frequência de microssatélites, pois a quantidade de DNA codificador, em geral, independe do tamanho do genoma. Na realidade, poderia haver relação entre a frequência

de microssatélites e a quantidade de DNA separando os *loci* adjacentes (Neff e Gross, 2001). Neff e Gross (2001) ainda relatam que muitos peixes apresentam genoma menor que de algumas aves, e ainda apresentam maior número de microssatélites que as últimas. De fato, em média, os peixes apresentam genoma de aproximadamente 1,8Gb (Gregory, 2005), enquanto algumas plantas, mais especificamente da família Solanaceae, apresentam genoma de, em média, 3Gb (Moscone e colaboradores, 2003).

Morgante e colaboradores (2002) demonstraram que a frequência de microssatélites em plantas é inversamente relacionada ao tamanho do genoma e à proporção de DNA repetitivo, mas que se mantém constante nas porções transcritas do genoma. Esses resultados indicam que a maior parte dos microssatélites existentes em plantas está em regiões mais antigas que a recente expansão do genoma, contrariando a idéia de origem de microssatélites a partir de DNA repetitivo, e inferindo uma possível razão para a baixa frequência de microssatélites em plantas.

5.5. Considerações e perspectivas

Devido à vasta amplitude de utilização desses marcadores, o desenvolvimento de microssatélites para as mais diversas espécies sofre, desde a última década, crescimento acentuado. Técnicas cada vez mais eficientes colaboram na obtenção desses marcadores, mas não dispensam uma grande carga de trabalho (Squirrell e colaboradores, 2003), sendo necessário o sequenciamento de mais de 800 clones para obtenção de pouco mais de dez *loci* polimórficos em algumas espécies (Amado e colaboradores, 2008). Porém, devido à necessidade de se utilizar um marcador altamente polimórficos como microssatélites para a realização de estudos sobre a estrutura genética das populações, cruzamentos geneticamente assistidos, mapeamento genético entre outros (Whang e colaboradores, 2008), vale a pena o trabalho empregado na tentativa de obtenção de *loci* polimórficos de microssatélites.

A obtenção desses marcadores para *P. integrifolia* subesp. *depauperata* e *Passiflora ovalis*, ainda é inédita e ansiosamente aguardada, pois, entre outras questões interessantes, ambas espécies apresentam complexidades taxonômicas, as quais devem ser analisadas. A obtenção de marcadores de herança biparental e alto grau de variabilidade, como os microssatélites, que permitem avaliar mais detalhadamente a influência da polinização e dispersão de sementes, pode auxiliar na determinação da dinâmica evolutiva e da história

dos *taxa*. Para tanto, está se trabalhando na validação dos “primers” sintetizados a partir dos resultados obtidos com este estudo, para caracterização genética das populações naturais dessas espécies que sofrem ameaças devido à fragmentação do seu habitat. O melhor entendimento da dinâmica populacional destas espécies poderá ajudar no estabelecimento de estratégias que priorizem a conservação de grupos que melhor representem a história evolutiva das espécies, identificando populações com maior variabilidade genética (Vasquez e Gittleman, 1998).

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.F.M. The system of continental rifts bordering the Santos Basin, Brazil. *An Academia Brasileira Ciências* v.48, p.15-26, 1976.
- AMADO, M.V., *e colaboradores* IP Isolation and characterization of microsatellite markers for the ornamental discus fish *Symphysodon discus* and cross-amplification in other Heroini cichlid species. *Molecular Ecology Resources* v.8, p.1451-1453, 2008.
- ANDO, T., HASHIMOTO, G. A new Brazilian species of *Petunia* (Solanaceae) from interior Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* v.48, p.217-223, 1996.
- ANDO, T., HASHIMOTO, G. Two new species of *Petunia* (Solanaceae) from southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Brittonia* v.50, p.483-492, 1998.
- ARCOT, S.S., *e colaboradores* Alu repeats: A source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics* v.29, p.136-144, 1995.
- ARESHCHENKOVA, T. **Isolation, characterization and mapping of microsatellites from the tomato genome and their application in molecular analysis of centromeric regions.** Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Alemanha. Tese de Doutorado, 2000.
- ARMOUR, J.A., *e colaboradores* Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* v.3, p.599-565, 1994.
- ASHLEY, C.T., WARREN, S.T. Trinucleotide Repeat Expansion and Human Disease. *Annual Review of Genetics* v.29, p.703-728, 1995.
- ASSOUMANE, A.A., *e colaboradores* Isolation and characterization of microsatellite markers for *Acacia senegal* (L.) Willd., a multipurpose arid and semi-arid tree. *Molecular Ecology Resources* v.9, p.1380-1383, 2009.
- BAILEY, A.D., PAVELITZ, T., WEINER, A.M. The microsatellite sequence (CT)_n x (GA)_n promotes stable chromosomal integration of large tandem arrays of functional human U2 small nuclear RNA genes. *Molecular Cell Biology* v.18, p.2226-2271, 1998.
- BUZATO, S., FRANCO, A.L. *Tetrastylis ovalis*: a second case of bat-pollinated passionflower (Passifloraceae). *Plant Systematics Evolution* v.181, p.261-267, 1992.
- CARDLE, L., *e colaboradores* Computational and Experimental characterization of Physically Clustered Simple Sequence Repeats in Plants. *Genetics* v.56, p.847-854, 2000.
- CARVALHO, D.C., *e colaboradores* Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (*Cichla piquiti*). *Molecular Ecology Resources* v.9, p.239-241, 2008.
- CERVI, A.C. O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summæ Editionem* v.16, p.1-5, 2006.

- CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B., VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture** v.255, p.1-29, 2006.
- CIFARELLI, R.A., GALLITELLI, M., CELLINI, F. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. **Nucleic Acids Research** v.23, p.3802-3803, 1995.
- COLLEVATI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D., HAY, J.D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity** v.86, p.60-67, 2001.
- COOPER, G., *e colaboradores* An empirical exploration of the genetic distance for 213 human microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics** v.65, p.1125-1133, 1999.
- CROWN, J., KIMURA, M. (1970) **An Introduction to Population Genetics Theory**. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 591p, 1970.
- CUMMINGS, C.J., ZOGHBY, H.Y. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. **Human Molecular Genetics** v.9, p.909-916, 2000.
- DI RIENZO A., *et al* Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** v.91, p.3166-3170, 1994.
- DING, S., *e colaboradores* Characterization of eight polymorphic microsatellite loci for leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus* Lacepède). **Molecular Ecology Resources** v.9, p.1484-1487, 2009.
- DORNELES, L.P.P., WAECHTER, J.L. Estrutura do componente arbóreo da floresta arenosa de restinga do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul. **Hoehnea** v.31, p.61-71, 2004.
- DRAHEIM, H., CUI, M., DICK, C.W. Characterization of 14 microsatellite DNA markers for the tropical forest tree *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. (Myristicaceae). **Molecular Ecology Resources** v.9, p.1386-1389, 2009.
- DUNN, I.S., BLATTNER, F.R. Sharo's 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Research** v.15, p.2677-2698, 1987.
- DUTRA, C.G. **Filogeografia de *Passiflora ovalis***. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Trabalho de Conclusão de Curso, 2008.
- ENDER, A., *e colaboradores* RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. **Molecular Ecology** v.5, p.437-441, 1996.

- ENDRES, P.K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, Cambridge, 511p, 1994.
- FEUILLET, C., MacDOUGAL, J.M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora** v.13, p.34-38, 2003.
- FIELD, D., WILLS, C. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceedings of Biological Science** v.263, p.209-215, 1996.
- FISCHER, D., BACHMAN, K. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). **Biotechniques** v.24, p.796-802, 1998.
- FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics** v.29, p.305-327, 1995.
- FREINWALD, J., e colaboradores Stewart NL, Yates DC e Bernardi G (2009) Isolation and characterization of nine polymorphic microsatellite loci of kelp greenling, *Hexagrammos decagrammus*, a temperate reef fish. **Molecular Ecology Resources** v.9, p.563-565, 2009.
- GAILLARD, C., STRAUSS, F. Association of poly(CA)-poly(TG) DNA fragments into four-stranded complexes bound by HMG1 and 2. **Science** v.264, p.433-436, 1994.
- GLENN, T.C., SCHABLE, N.A. Isolating microsatellite DNA loci. In: **Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data**, Part B (eds Zimmer, E.A. e Roalson, E.). Academic Press, San Diego, USA, p.202-222, 2005.
- GOLDSTEIN, D. B., SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, New York, USA, 343p, 1999.
- GREGORY, T.R. Animal Genome Size Database. Disponível em <<http://www.genomesize.com>>, acesso às 14 horas e 37 minutos de 06 de novembro de 2009.
- HANCOCK, J.M. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. **Journal of Molecular Evolution** v.41, p.1038-1047, 1995.
- HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: **Microsatellites.Evolution and Applications** (eds Goldstein DB, Schl.tterer C), p. 1-9. Oxford University Press, New York, USA, 1999.
- HARMS, H. Passifloraceae. In: **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**, A. Engler e K. Prantl, editors. Nachträge 2-4 (I). W. Engelmann, Leipzig. p 253-256, 1897
- HASENACK, H., FERRARO, L.W. Considerações sobre o clima da região de Tramandaí, RS. **Pesquisas** v.22, p.53-70, 1989.
- HEYWOOD, V.H., IRIONDO, J. M. Plant conservation: Old problems, new perspectives. **Biological Conservation** v.113, p.321-335, 2003.

- HOSHINO, A.A., *e colaboradores* Aplicação de Marcadores Moleculares do Tipo Microsatélite na Caracterização e Conservação de Recursos Genéticos Vegetais Mantidos em Bancos de Germoplasma. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** v.29, p.146-150, 2002.
- JARNE, P., LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution** v.11, p.424-429, 1996.
- JUDD, W.S., *e colaboradores* **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, XVI 464p, 1999.
- KANDPAL, R.P, KANDPAL, G., WEISSMAN, S.M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** v.91, p.88-92, 1994.
- KASHI, Y., SOLLER, M. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: **Microsatellites: Evolution and Applications** (eds Goldstein DB e Schlötterer C). Oxford University Press, Oxford, UK, p.10-23, 1999.
- KIJAS, J.M., *e colaboradores* Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **Biotechniques** v.16, p.656-662, 1994.
- KIOUS, W.J., TILLING, R.I. The dynamic earth: the story of plate tectonics. **United States Geological Services**, U S Government Printing Office, Washington, DC, USA 77p, 1996.
- KNAPIK, E.W., *et al.* A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). **Nature Genetics** v.18, p.338-343, 1998.
- KNOWLES, L.L. Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. **Molecular Ecology** v.10, p.691-701, 2001.
- KOEHLER-SANTOS, P., *et al.* Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society** v. 88, p.611-630, 2006.
- KOSCHNITZKE, C. **Morfologia e biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Dissertação de Mestrado, 1993.
- KRIEDT, R.A., *et al.* Questões taxonômicas no gênero *Petunia* Juss: uma abordagem filogeográfica do complexo integrifolia. In: **CD-ROM do 53º Congresso Brasileiro de Genética**, Águas de Lindóia, 2007.
- KWON, S., *et al.* Isolation and characterization of 21 microsatellite loci in *Lycium chinense* and cross-amplification in *Lycium barbarum*. **Conservation Genetics** v.10, p.1557-1560, 2009.

- LAGERCRANTZ, U., ELLENGREN, H., ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research** v.21, p. 1111-1115, 1993.
- LEVINSON, G., GUTMAN, G.A. Slippedstrand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution** v.4, p.203-221, 1987.
- LI, M.F., ZHENG, X.Q. Research progress of methods of SSR primers development. **Hereditas** (Beijing) v.26, p.769-776, 2004.
- LI, Y.C., *et al.* Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology** v.11, p.2453-2465, 2002.
- LIMA, L.G., BUCHMANN, F.S.C. Novo afloramento fossilífero (Pleistoceno/Holoceno) no sul da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. In: X ABEQUA Associação Brasileira de Estudos do Quaternário, Guarapari. **Boletim de resumos** v.1, 2005.
- LIU, B.H. **Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis**. CRC Press, Boca Raton, FA, 611p, 1997.
- LONGO, D. **Delimitação taxonômica do complexo *Petunia integrifolia*: uma abordagem molecular**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Dissertação de Mestrado, 2005.
- LUNT, D.H., HUTCHINSON, W.F., CARVALHO, G.R. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PIMA). **Molecular Ecology** v.8, p.893-894, 1999.
- MacDOUGAL, J.M. Revision on *Passiflora*, subgenus *Decaloba*, section *Pseudodyosmia* (Passifloraceae). **Systematic Botany Monographs** v.41, p.1-146, 1994.
- MESSIER, W., LI, S.H., STEWART, C.B. The birth of microsatellites. **Nature** v.381, p.483, 1996.
- MÉTAIS, I., *et al.* Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics** v.104, p.346- 1352, 2002.
- MORAND-PRIEUR, M.E., *et al.* Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. **Molecular Ecology** v.11, p.613-617, 2002.
- MORELLATO, P., HADDAD, C. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica** v.32, p.786-792, 2000.
- MORGANTE, M., HANAFEY, M. POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics** v.30, p.194-200, 2002.

- MOSCONE, E.A., *et al.* Analysis of Nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by Flow Cytometry and Feulgen Densitometry. **Annals of Botany** v.9, p.21-29, 2003.
- MUDUNURI, S.B., NAGAJARAM, H.A. IMEx: Imperfect Microsatellite Extractor. **Bioinformatics** v.23, p.1181-1187, 2007.
- MUSCHNER, V.C., *et al.* A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae) **American Journal of Botany** v.90, p.1229-1238, 2003.
- MYERS, N., *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** v.403, p.853-858, 2000.
- NAGY, I., *et al.* Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Genome** v.50, p.668-688, 2007.
- NEFF, B.D., GROSS, M.R. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. **Evolution** v.55, p.1717-1733, 2001.
- NUNOME, T., *e colaboradores* Identification and characterization of microsatellite in eggplant. **Plant Breeding** v.122, p.256-263, 2003.
- OLIVEIRA, P.E., *et al.* Paleovegetação e Paleoclimas do Quaternário do Brasil. In: Souza, C.R.G., Suguio, K., Oliveira, M.A.S., Oliveira, P.E. (eds) **Quaternário do Brasil** Holos Editora, Ribeirão Preto, p. 52-74, 2005a.
- OLIVEIRA, E.J., *et al.* Development and characterization of microsatellite markers of the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes** v.5, p.331-333, 2005b.
- OLIVEIRA, E.J., *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics Molecular Biology** v.29, p.294-307, 2006.
- OSTRANDER, E.A., *e colaboradores* Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** v.89, p.3419-3423, 1992.
- PÁDUA, J.G., *e colaboradores* Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). **Molecular Ecology Notes** v.5, p.863-865, 2005.
- PAETKAU, D. Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. **Biotechniques** v.26, p.690-697, 1999.
- PEARSE, D.E., CRANDALL, K.A. Beyond Fst: Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics** v.5, p.585-602, 2004.
- PINTO, L.R., *e colaboradores* Genetic diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. **Euphytica** v.134, p.277-286, 2003.

- PRIMMER, C.R., MERILÄ, J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. **Conservation Genetics** v.3, p.445-449, 2000.
- RAMOS, A.M.C. **História Evolutiva de *Petunia integrifolia* subsp. *depauperata***. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Trabalho de Conclusão de Curso, 2008.
- RASSMANN, K., SCHLÖTTERER, C., TAUTZ, D. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Electrophoresis** v.12, p.113-118, 1991.
- RIZZINI, C.T. **Ecosistemas brasileiros**. Index, Rio de Janeiro, 200p.
- ROSE, O., FALUSH, D. A threshold size for microsatellite expansion. **Molecular Biology and Evolution** v.15, p.613-615, 1998.
- ROURKE, M., *e colaboradores* Isolation and characterization of 102 new microsatellite loci in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Percichthyidae), and assessment of cross-amplification in 13 Australian native and six introduced freshwater species. **Molecular Ecology Notes** v.7, p.1258-1264, 2007.
- ROY, A., *e colaboradores* Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. **Theoretical and Applied Genetics** v.85, p.173-180, 1992.
- SALTONSTALL, K. Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. **Molecular Ecology** v.12, p.1689-1702, 2003.
- SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma** v.109, p.365-371, 2000.
- SCHLÖTTERER, C., HARR, B. *Drosophila virilis* has long and highly polymorphic microsatellites. **Molecular Biology and Evolution** v.17, p.1641-1646, 2000.
- SCHLÖTTERER, C., TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research** v.20, p.211-215, 1992.
- SCHULER, G.D., *e colaboradores* A gene map of the human genome. **Science** v.274, p.540-546, 1996.
- SELKOE, K.A., TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters** v.9, p.615-629, 2006.
- SEMR, J., BROWN, K.S. Jr. (1975) Maracujá: A flor da paixão. **Revista Universitária de Geografia**, fevereiro, p.41-47, 1975.
- SAI, E.A., *e colaboradores* Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** v.97, p.250-255, 2000.

- SILVA, O.S. **Importância de *Callonychium petuniae* CURE e WITTMANN, 1990 (Insecta, Hymenoptera, Andrenidae) e outras abelhas no sucesso reprodutivo de *Petunia integrifolia* (HOOKER) SCHINZ et. THELLUNG (Solanaceae).** Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Dissertação de Mestrado, 1994.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics** v.139, p.457-462, 1995.
- SMITH, L.B., DOWNS, R. Solanáceas. In: Reitz, P. R. (ed) **Flora Ilustrada Catarinense.** Biblioteca Superior de Cultura, Itajaí. 321pp. 1966.
- SQUIRRELL, J., *e colaboradores* How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? **Molecular Ecology** v.12, p.1339-1348, 2003.
- STEHMANN, J.R. **Estudos taxonômicos da tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave e *Lexarza* e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann e Semir.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Tese de Doutorado, 1999.
- STEHMANN, J.R., BOHS, L. Nuevas Combinaciones en Solanaceae. In: Zuloaga FO, Morrone O e Belgrano MJ (eds.) Novedades taxonómicas y nomenclaturales para la flora vascular del cono sur de sudamérica. **Darwiniana**, v. 45, p.240-241, 2007.
- STEHMANN, J.R., *e colaboradores* The genus *Petunia*. In: Gerats, T. e Strommer, J.(org) ***Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics.*** Springer, New York. p.1-28, 2009.
- STRAND, M., *e colaboradores* Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature** v.365, p.274-276, 1993.
- SUÁREZ-SANTIAGO, V.N., *e colaboradores* **Molecular Ecology Resources** v.9, p.830-832, 2008.
- TOMAZELLI, L.J., VILLWOCK, J.A. Quaternary geological evolution of Rio Grande do Sul Coastal Plain, Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v.68, p.373-382, 1996.
- TOMAZELLI, L.J., VILLWOCK, J.A. Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: O Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul. **Gravel** v.3, p.109-115, 2005.
- TONG, G., *et al.* Isolation of microsatellite DNA and analysis on genetic diversity of endangered fish, *Hucho taimen* (Pallas). **Molecular Ecology Resources** v.6, p.1099-1101, 2006.
- TONHASCA, J. A. **Ecologia e história natural da Mata Atlântica.** Rio de Janeiro, Interciência, 197p, 2005.
- TÓTH, G., GÁSPARI, Z., JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research** v.10, p.967-981, 2000.

- TRECO, D., ARNHEIM, N. The evolutionarily conserved repetitive sequence d(TG.AC)_n promotes reciprocal exchange and generates unusual recombinant tetrads during yeast meiosis. **Molecular Cell Biology** v.6, p.3934-3947, 1986.
- TSUKAMOTO, T., *et al.* Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). **Acta Phytotaxonomy and Geobotany** v.49, p.115-133, 1998.
- TSUKAMOTO, T., *et al.* Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. **Plant Physiology** v.131, p.1903-1912, 2003.
- ULMER, T., MacDOUGAL, J.M. **Passiflora: Passionflowers of the World**. Portland, Oregon, 430p, 2004.
- VALLE, G. TA-repeat microsatellites are closely associated with ARS consensus sequences in yeast chromosome III. **Yeast** v.9, p.753-759, 1993.
- VARASSIN, G., SILVA, A.G. A melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em vegetação de restinga. **Rodriguésia** v.50, p.5-17, 1999.
- VÁZQUEZ, D.P., GITTLEMAN, J.L. Biodiversity conservation: Does phylogeny matter? **Current Biology** v.8, p.R379-R381, 1998.
- VILLWOCK, J.A., TOMAZELLI, L.J. Geologia costeira do Rio Grande do Sul. **Notas Técnicas** v.8, p.1-45, 1995.
- VITTA, F.A., BERNACCI, L.C. A new species of *Passiflora* in section *Tetrastylis* (Passifloraceae) and two overlooked species of *Passiflora* from Brazil. **Brittonia** v.56, p.89-95, 2004.
- WAHLS, W., WALLACE, L.J., MOORE, D. The Z-DNA motif d(TG)₃₀ promotes reception of information during gene conversion events while stimulating homologous recombination in human cells in culture. **Molecular Cell Biology** v.10, p.785-793, 1990.
- WAN, D., *et al.* Isolation of polymorphic microsatellite from *Przrwalskia tangutica* (Solanaceae). **Conservation Genetics** v.9, p.995-997, 2008.
- WATANABE, H., *et al.* Cross compatibility of *Petunia* cultivars and *P. axillaris* with native taxa of *Petunia* in relation to their chromosome number. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science** v.65, p.625-634, 1996.
- WELLS, R.D., ASHIZAWA, T. **Genetic Instabilities and Neurological Diseases**. Academic Press, San Diego. 2a ed. 766p, 2006.
- WERNECK, P.B., LORSCHAITTER, M.L. Paleoambientes dos últimos milênios na zona da mata do Faxinal, Torres, Rio Grande do Sul, Brasil, através de um estudo de sucessão vegetal. **Boletim de Resumos, Mudanças Globais e o Quaternário, VIII Congresso da ABEQUA**, Imbé-RS: p.405-406, 2001.

- WESCHENFELDER, J. **Processos sedimentares e variação do nível do mar na região costeira do Rio Grande do Sul**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Tese de Doutorado, 2005.
- WHANG, H., *et al.* Construction Fractional Genomic Libraries and Screening Microsatellites DNA of *Esox reieherti* Dybowski. **Zoological Research** v.29, p.245-252, 2008.
- WIJSMAN, H.J.W. On the inter-relationships of certain species of *Petunia* I. Taxonomic notes on the parental species of *Petunia hybrida*. **Acta Botanica Neerlandica** v.31, p.447-490, 1982.
- WILDER, J., HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molecular Biology and Evolution** v.18, p.384-392, 2001.
- WITTMANN, D., *et al.* Coevolved reproductive strategies in the oligolectic bee *Callonychium petuniae* and three purple flowered *Petunia* species in Southern Brazil. **Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung** v.28, p.157-165, 1989.
- WRIGHT, J.M., BENTZEN, P. Microsatellites: Genetic markers of the future. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** v.4, p.384-388, 1994.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics** v.16, p.97-159, 1931.
- ZANE, L., BARGELLONE, L., PATARNELLO, L. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology** v.11, p.1-16, 2002.
- ZHANG, Y., *et al.* Genome-side identification of microsatellite in white clover (*Trifolium repens* L.) using FIASCO and phpSSRMiner. **Plant Methods** v.4, p.19-26, 2008.
- ZHIVOTOVSKY, L.A., FELDMAN, M.W. Microsatellite variability and genetic distances. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** v.92, p.11549-11552, 1995.
- ZHU, Y., STRASSMANN, J.E., QUELLER, D.C. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. **Genetics Research** v.76, p.227-236, 2000.
- ZUCCHI, M.I., *et al.* Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes** v.2, p.512-514, 2002.