

Análise de Seqüências de cpDNA e  
seu Papel na Reconstrução  
Filogenética do Gênero *Passiflora*  
(Passifloraceae)

Aline Pedroso Lorenz

Orientadora: Profa. Loreta Brandão de Freitas

Relatório apresentado à Comissão  
de Bacharelado do Departamento de  
Genética para obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas,  
ênfase Molecular, Celular e  
Funcional - UFRGS



Porto Alegre, 1999

## Introdução

As plantas do gênero *Passiflora* (Família Passifloraceae), são em sua maioria trepadeiras, apresentando estruturas especializadas como gavinhas, nectários extraflorais e flores características. São conhecidas popularmente como maracujás, nome tupi-guarani que significa fruta de chupar (Giavina-Bianchi et al., 1997).

A descoberta do gênero ocorreu durante a expansão européia no Novo Mundo. Nos séculos XVI e XVII foi a planta americana que causou maior admiração aos colonizadores espanhóis. A denominação *Passiflora* (flor da paixão) foi dada por seus primeiros conhecedores católicos que relacionaram suas estruturas florais com alguns instrumentos da paixão de Cristo (Cervi, 1997).

O Brasil é o principal centro de dispersão do gênero. E. P. Killip em 1938 reconheceu 350 espécies de *Passiflora* para a América, sendo 101 delas citadas para o Brasil. Algumas espécies possuem grande importância econômica, principalmente *P. edulis* e *P. alata*, sendo utilizadas na produção de sucos e outros itens alimentares, enquanto outras são utilizadas como plantas medicinais ou ornamentais, sendo bastante cultivadas pelos brasileiros.

Devido ao grande número de espécies e a complexidade de suas estruturas florais e vegetativas a taxonomia do grupo é bastante complicada. Os estudos taxonômicos clássicos utilizaram caracteres morfológicos para determinar a sistemática do grupo, embora restem vários aspectos a serem elucidados.

Atualmente os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos filogenéticos, principalmente após o advento da técnica de PCR (polymerase chain reaction). Depois do surgimento das técnicas de seqüenciamento de DNA, houve uma explosão de análises

baseadas em dados moleculares, pois estes fornecem uma enorme quantidade de dados filogeneticamente informativos. A escolha do tipo de marcador é de grande importância nestes estudos. As regiões não codificantes são mais usadas em estudos de níveis taxonômicos baixos, pois não são funcionais, estando livres para variar e fornecendo um maior número de caracteres informativos por unidade seqüenciada (Small et al., 1998). No estudo de taxa superiores, as seqüências a serem analisadas podem ser de regiões codificantes, que sofrem uma alta pressão seletiva, sendo portanto mais conservadas.

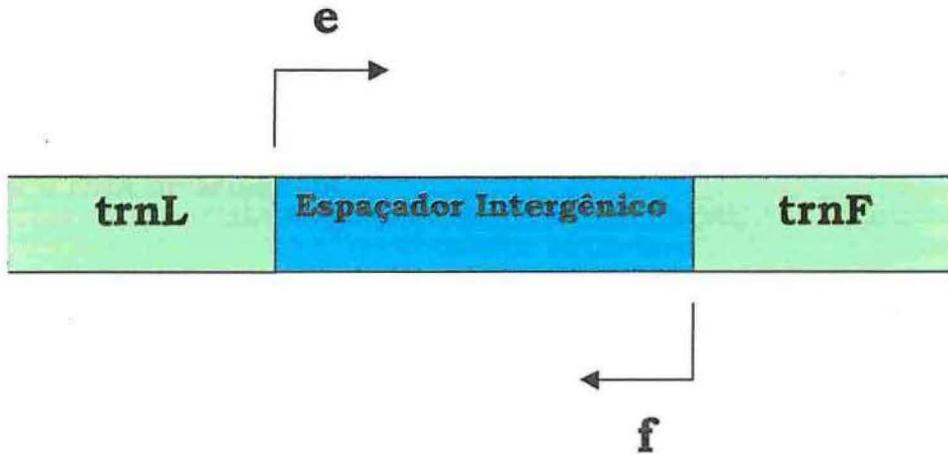
O estudo de diferentes marcadores moleculares fornece resultados mais reais sobre a filogenia do grupo estudado, já que filogenias baseadas em um único marcador molecular representam principalmente a evolução da seqüência e não necessariamente das espécies estudadas. Este argumento é especialmente relevante para o DNA de organelas que são herdadas matematicamente, qualquer hibridização poderia conduzir a uma evolução reticulada dentro de um taxon, distorcendo a filogenia. Para evitar-se isso, recomenda-se usar diferentes marcadores, sendo pelo menos um de DNA nuclear (Käss & Wink, 1997).

O espaçador intergênico de DNA cloroplasmático localizado entre os genes *trnL* e *trnF* (figura 1) é atualmente a região não codificante do cpDNA mais utilizada em estudos filogenéticos (Sang et al., 1997). O cpDNA apresenta sua organização estrutural, tamanho e seqüência bastante conservados evolutivamente (van Ham et al., 1994). Os genes nucleares apresentam taxas evolutivas cerca de três a seis vezes maiores que o cpDNA (Small et al., 1998), mas a utilização de regiões não codificantes do cpDNA torna possível a utilização deste para inferências em filogenias de táxons inferiores.

O estudo do DNA cloroplasmático tem sido vastamente utilizado para a construção de filogenias. Dentre as seqüências codificadoras mais utilizadas estão os genes *rbcL* (codifica a subunidade maior da proteína RUBISCO, Clegg, 1993), *ndhF* e *matK* (Gielly et al., 1996). Em alguns

trabalhos estes marcadores não forneceram variação suficiente para a resolução da filogenia do grupo estudado, sendo então comparados com seqüências não codificantes (como os espaçadores intergênicos *trnL* – *trnF* e *atpB* - *rbcL* , e o intron do gene *trnL*). No estudo comparativo da evolução do gene *rbcL* e do espaçador *atpB* – *rbcL* da tribo Rubiae (Rubiaceae), o resultado não foi o esperado. O gene *rbcL* apresentou uma maior variação que o espaçador, levantando a hipótese que este evolui mais lentamente porque apresenta em sua seqüência regiões filogeneticamente importantes que sofrem uma pressão seletiva maior que a esperada, devendo ter alguma função estrutural ou de regulação ainda desconhecida. Apesar disto a árvore filogenética baseada no espaçador foi mais congruente com a árvore baseada em dados morfológicos (Manen & Natali, 1995). No trabalho realizado com a família Acanthaceae, o intron do gene *trnL* foi comparado com o espaçador *trnL* – *trnF* e foi verificado que o espaçador, apesar de ser menor que o intron, apresentou um maior número de variações parcimoniosas e informativas. Este resultado já foi encontrado em estudos com outros grupos de plantas, sugerindo que o intron sofre uma maior pressão seletiva que o espaçador (Mac Dade & Moody, 1999). Em outro estudo, utilizando estes mesmos dois marcadores mas com tribos da família Asteraceae, foram obtidos resultados congruentes com as primeiras hipóteses filogenéticas, que foram baseadas em dados moleculares e morfológicos. Utilizando um número relativamente pequeno de pares de base, produziram filogenias com resolução comparável à das filogenias baseadas em regiões codificantes bem conhecidas como *rbcL* e *ndhF*, com a vantagem de serem mais fáceis de amplificar e seqüenciar (Bayer & Starr, 1998). Na comparação da seqüência do intron *trnL* – *trnF* de espécies da família Crassulaceae, foi detectada um única deleção de 70 pb no espaçador (além de várias outras de menor tamanho, mas informativas) o que indicou a monofilia do grupo estudado. Esta deleção ocorreu no interior do espaçador, permanecendo as bordas conservadas (Mes & Hart, 1994).

Figura 1: Representação esquemática da região do cpDNA onde se encontra o espaçador intergênico trnL – trnF.



## Objetivos

### → Objetivo Geral:

Contribuir para o conhecimento da filogenia de espécies brasileiras de *Passiflora* através do estudo de seqüências do cpDNA

### → Objetivos Específicos:

Caracterizar a seqüência do espaçador intergênico trnL-trnF em espécies brasileiras do gênero *Passiflora*;

Colaborar para a elucidação das questões pendentes na sistemática do grupo;

Contribuir para o conhecimento da biologia e genética de espécies brasileiras de *Passiflora*.

## Materiais e Métodos

O material analisado foi obtido de material herborizado de coleções particulares ou diretamente através de coletas na natureza. O DNA foi extraído de folhas jovens obtidas durante as coletas ou obtidas através da germinação das sementes em laboratório. Além de folhas também foi extraído DNA de sementes.

Tabela 1: Espécies do gênero *Passiflora* utilizadas na análise.

PASSIFLORA	<i>P. actinia</i>
	<i>P. alata</i>
	<i>P. caerulea</i>
	<i>P. elegans</i>
	<i>P. foetida</i>
	<i>P. galbana</i>
	<i>P. incarnata</i>
	<i>P. kermesina</i>
	<i>P. quadrangularis</i>
	<i>P. setacea</i>
DECALOBA	<i>P. tenuifila</i>
	<i>P. capsularis</i>
	<i>P. misera</i>
	<i>P. morifolia</i>
	<i>P. organensis</i>
	<i>P. rubra</i>
DYSOSMIOIDES	<i>P. suberosa</i>
	<i>P. haematostigma</i>
ASTROPHEA	<i>P. campanulata</i>
	<i>P. setulosa</i>

### → Extração de DNA:

A extração de DNA total das plantas crescidas em laboratório e de material fresco seguiu o método de Roy *et al* (1992) modificado, que consiste em:

1. macerar 0,5 gramas de tecido com nitrogênio líquido (para evitar a ação de enzimas que possam interferir na qualidade do material extraído), em geral, até a obtenção de um material em pó, transferindo-o para tubos de microcentrífuga 1,7 ml;
2. adicionar 1 ml de tampão de lise (10 mM de tris, 1,4 ml de NaCl, 20 mM de EDTA, 2% de 2-β-mercaptoetanol - BME, 2% de polivinil polipirrolidona - PVP) e emulsionar;
3. incubar o homogenado por 30 min a 65°C em banho-maria com agitação;
4. dividir o material em dois volumes iguais e emulsionar o homogenado lisado com igual volume de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) e centrifugar a 12000 rpm por 15min; recolher a fase aquosa em um tubo novo e agitar gentilmente até obter uma fase clara e homogênea;
5. adicionar igual volume de isopropanol gelado e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e estocar a 4°C por 12 a 24 horas;
6. retirar o DNA com auxílio de um bastão de vidro e lavá-lo com etanol 70% gelado;
7. ressuspender o DNA em água ultra-pura autoclavada por, 24 horas à temperatura ambiente, quantificar e congelar a amostra.

A extração de DNA do material herborizado seguiu o protocolo de extração de DNA com sílica (Taberlet & Fumagalli, 1996), que consiste de:

1. macerar 0,5 gramas de tecido com nitrogênio líquido (para evitar a ação de enzimas que possam interferir na qualidade do material extraído),

- em geral, até a obtenção de um material em pó, transferindo-o para tubos de microcentrífuga 1,7 ml;
2. adicionar 1 ml de tampão L6 (GuSCN 10M; Tris-HCl 0,1M pH 6,4; EDTA 20mM pH 8,0; triton X-100 1,3%) e agitar em vortex por 3 s;
  3. incubar a 60°C por uma hora com agitação constante;
  4. adicionar 50 µl de suspensão de sílica, agitar no vortex e incubar a temperatura ambiente por 10 min;
  5. centrifugar durante 1 min a 14000 rpm;
  6. lavar o *pellet* de sílica 2x com tampão L2 (GuSCN 10M; tris-HCl 0,1M pH 6,4) – adicionar 1 ml, vortex e centrifugar. Centrifugar durante 4 minutos;
  7. lavar com etanol 100% (adicionar 1 ml, vortex e centrifugar). Centrifugar durante 4 min;
  8. secar o *pellet* por 10 min a 56°C;
  9. ressuspender o *pellet* em 50 µl do tampão de eluição (TE), agitar no vortex;
  10. incubar por 5 min a 60°C;
  11. centrifugar por 2 min a 14000 rpm;
  12. transferir o sobrenadante para um novo tubo;
  13. repetir de 10 a 12;
  14. centrifugar rapidamente por 2 min para detectar a presença de partículas excedentes de sílica. Caso ocorra, transferir novamente o sobrenadante para outro tubo;
  15. estocar a 4°C (dias a semanas) ou -20°C (longo período).

### → PCR

Para a amplificação do marcador foram utilizados os primers universais “e” e “f” (Taberlet et al., 1991), que são baseados na seqüência

consenso dos genes de tRNA adjacentes (altamente conservados) que flanqueiam a região não codificadora (Quadro 1).

Quadro 1 : Seqüências dos primers para PCR e seqüenciamento.

<b>Primer e</b>	<b>Primer f</b>
5'GGTTCAAGTCCCTCTATCCC3'	5'TTTGAACTGGTGACACGAG3'

A amplificação por PCR do espaçador intergênico trnL – trnF seguiu o seguinte protocolo:

{	200 ng de DNA genômico
	tampão 1X
	0,2 mM dNTP
	1 mM de primer
	25 mM de MgCl <sub>2</sub>
	1,25 U de Taq polimerase GIBCO – BRL
água destilada estéril para um volume final de 25µl	

Condições de amplificação (35 ciclos idênticos):

{	94°C por 1 min para desnaturação;
	55°C por 1 min para anelamento;
	72°C por 1 min para alongamento.

Sendo feita uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min, e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de UV. Todos os produtos de PCR apresentaram banda única.

### → **Quantificação do DNA**

A quantificação dos produtos de PCR foi feita com o kit Low DNA Mass Ladder (GIBCO-BRL). Para isso foi utilizado 4  $\mu$ l da amostra (produto de PCR) + 1  $\mu$ l de BFB (com glicerol), e 4  $\mu$ l do marcador + 1  $\mu$ l de BFB (com glicerol). As amostras foram submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de UV. Para a quantificação do DNA dos produtos de PCR, as bandas das amostras foram comparadas com as do marcador de peso molecular e sua concentração e peso estimados.

### → **Purificação enzimática dos produtos de PCR**

A purificação enzimática foi feita através do Kit de pré-sequenciamento da Amersham (US 70995).

Protocolo:

1. Misturar 5  $\mu$ l do produto de PCR com 1  $\mu$ l de EXONUCLEASE e 1  $\mu$ l de FOSFATASE ALCALINA. Estas enzimas degradam os restos de primers e dNTPs, respectivamente, das reações de PCR;
2. colocar no termociclador: primeiro ocorre a degradação dos restos de dNTPs e primers a 37°C durante 15 min, e depois a degradação das enzimas do kit com um ciclo de 80°C por 15 min.

### → Reação de Seqüenciamento

Para cada reação foram adicionados os seguintes reagentes, em tubos separados:

REAGENTE	QUANTIDADE
Terminator Ready Reac. Mix	8µl
Template	
DNA simples fita	50 – 100 ng
DNA dupla fita	200 – 500 ng
DNA produto PCR	30 – 90 ng
Primer	3.2 pmol
H <sub>2</sub> O	q.s.

Volume total: 20µl

#### ⊛ Programa utilizado

96 °C por 20 segundos

60 °C por 4 minutos

4 °C (tempo indeterminado)

### → Purificação com Isopropanol/Etanol

Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados com uma mistura de isopropanol 100% e etanol. A seguir procede-se uma precipitação com isopropanol 75%.

### → **Seqüenciamento**

O seqüenciamento do DNA amplificado por PCR foi feito no seqüenciador automático ABI PRISM 310, seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer Applied Biosystems), que consiste na marcação com terminadores fluorescentes.

### → **Análise dos Dados**

O alinhamento das seqüências foi feito com o auxílio do programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) e a correção de eventuais erros pelo programa ProSeq. Para a análise filogenética das seqüências obtidas, o programa utilizado foi o MEBoot (pacote MEGA).

As seqüências alinhadas foram comparadas através do algoritmo de distância genética de Kimura-2 parâmetros. As distâncias genéticas obtidas foram agrupadas pelo método de Neighbor Joining (NJ) com “complete deletion” (CD) para construção da árvore filogenética.

## Resultados e Discussão

O espaçador intergênico de cpDNA trnL – trnF foi seqüenciado em vinte espécies de *Passiflora*., sendo que algumas delas tiveram mais de um indivíduo analisado.

O tamanho médio das seqüências obtidas do espaçador foi de 270 pb, sendo que este valor não pode ser melhor precisado porque não tivemos acesso a seqüência dos genes flanqueadores. O tamanho total das seqüências alinhadas foi de 296 pb, destes 182 representaram sítios filogeneticamente informativos. A árvore filogenética (figura 2) obtida apresenta dois ramos claramente distintos, representados por espécies dos subgêneros *Passiflora* (incluindo as espécies dos subgêneros *Astrophea* e *Dysosmioides*) e *Decaloba*. As análises realizadas confirmam a separação dos subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*, sugerindo que sejam grupos independentes e monofiléticos. Este resultado concorda com a sistemática tradicional do grupo baseada em características morfológicas. A inclusão dos subgêneros *Astrophea* e *Dysosmioides* em *Passiflora* discorda da taxonomia clássica do gênero, mas revisão de C. Feuillet e J. M. MacDougal (trabalho ainda não publicado) sugere a subdivisão do gênero *Passiflora* em cinco subgêneros concordando com os resultados obtidos para o cpDNA.

Nas espécies em que foram analisados mais de um indivíduo (*P. alata*, *P. elegans*, *P. caerulea* e *P. suberosa*), não foram observadas variações intraespecíficas significativas, sendo as diferenças encontradas representadas principalmente por mutações pontuais. Resultados semelhantes já foram encontrados em estudos realizados com este marcador em outros grupos de plantas (McDade & Moody, 1999), o que indica que este espaçador realmente sofre uma baixa pressão seletiva, apresentado vários sítios livres para variar.

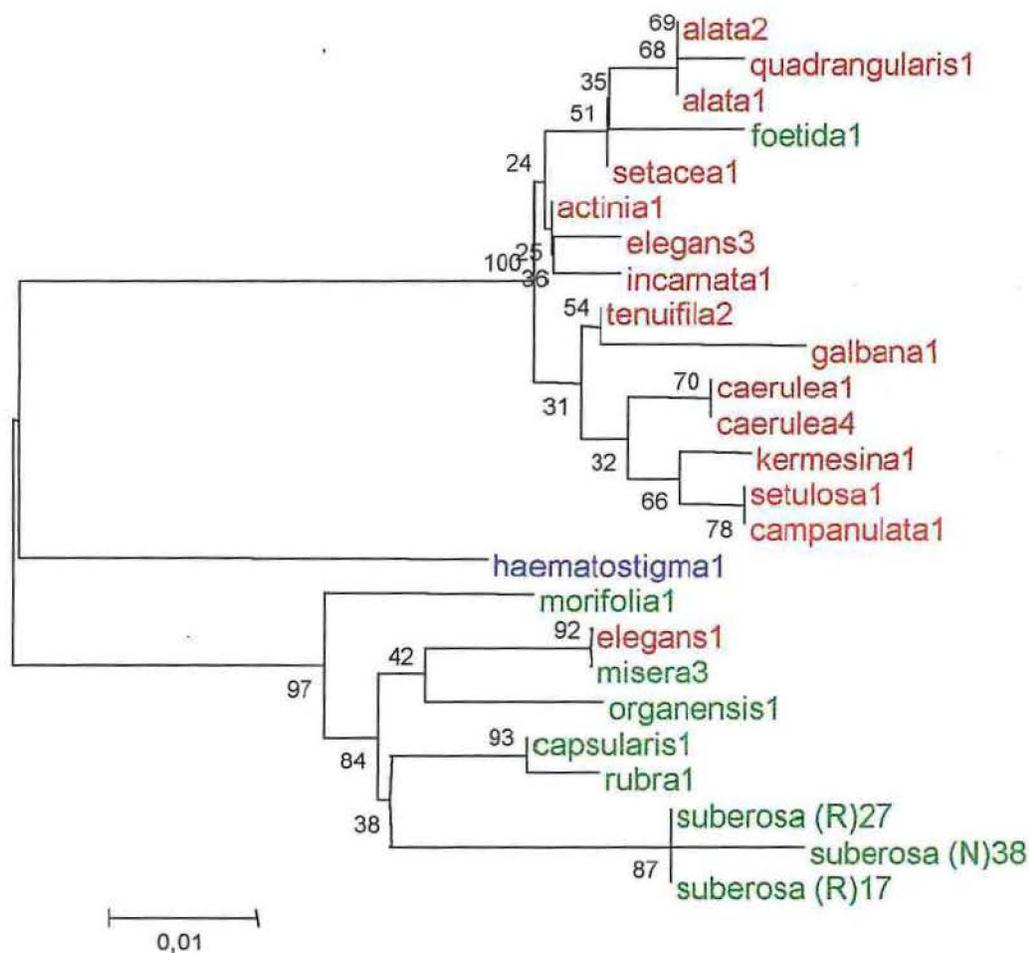


Figura 2: Filogenia obtida pelo método de Neighbor-Joining com distâncias de Kimura-2 parâmetros . - *Passiflora*, - *Decaloba*, - *Astrophea*, - *Dysosmioides*

Uma das características marcantes das seqüências obtidas, é a presença de repetições diretas e invertidas. Estas características já foram descritas para este marcador em estudos com outros grupos de plantas. van Ham et al., 1994, descreve como sendo característico destas seqüências a presença de repetições diretas (4-11 pb) e invertidas (7-11 pb) envolvidas em mutações de tamanho, o que também foi verificado em *Passiflora*.

Um exemplo de repetição direta ocorreu em todas as seqüências obtidas, variando apenas em uma mutação pontual, que ocorreu em *P. suberosa* (uma substituição do tipo transição), e em uma inserção simples (também do tipo transição) em *P. incarnata*.

*P. suberosa* foi a única espécie analisada a apresentar uma inserção de 15pb. Esta inserção parece ser uma duplicação direta de uma seqüência adjacente.

A ocorrência pequenas seqüências repetidas diretamente e inversamente pode indicar a presença de micro e minisatélites dentro do marcador, provavelmente resultantes de "slipped-strand mispairing" durante a replicação e reparo (van Ham et al., 1994). Tal fato já foi descrito para várias seqüências do cpDNA, mas a ocorrência dentro do espaçador trnL-trnF aqui apresentada em espécies de *Passiflora* é descrita pela primeira vez.

As variações encontradas nas seqüências foram na sua maioria mutações pequenas (de até 4 pb). Apesar do pequeno tamanho, estas foram filogeneticamente informativas. Tal característica do marcador também foi observada no estudo intragenérico feito com espécies da família Crassulaceae (Mes & Hart, 1994).

Nas mutações pontuais as transições foram mais freqüentemente observadas que as transversões entre as espécies analisadas.

Um indivíduo de *P. elegans* apresentou diferenças marcantes em sua seqüência quando comparado a outro de a mesma espécie ficando agrupado consistentemente com *P. misera* na árvore filogenética. Uma característica única das seqüências de *P. misera* e deste indivíduo de *P.*

*elegans* é a presença de um inserção de 4 pb. O indivíduo de *P. elegans* em questão foi uma plântula crescida em laboratório a partir de semente coletada de indivíduo que cresce na Região Central do Rio Grande do Sul, onde as espécies de *Passiflora* apresentam a característica de hibridizarem naturalmente (comunicação pessoal de C. Mondin). Uma hipótese para explicar tal fato é este indivíduo ter sido coletado de uma planta adulta com características morfológicas de *P. elegans*, a qual seria produto de um cruzamento onde o cpDNA foi herdado matematicamente de um indivíduo pertencente ao subgênero *Decaloba* (possivelmente *P. misera*).

*P. foetida* é uma espécie atualmente classificada como sendo pertencente ao subgênero *Decaloba*. Os resultados obtidos para este marcador refutam esta hipótese, agrupando esta espécie com as do subgênero *Passiflora*. Este resultado concorda com uma nova proposta de classificação do gênero feita por C. Feuillet e J. M. MacDougal (trabalho ainda não publicado), que inclui *P. foetida* no subgênero *Passiflora*. Estudos citogenéticos realizados por M. Guerra Fo. (comunicação pessoal) também reforçam esta proposta, pois o conjunto cromossômico de *P. foetida* apresenta características típicas das espécies do subgênero *Passiflora*.

As espécies do subgênero *Asthophea* (*P. setulosa* e *P. campanulata*) apresentaram seqüências bastante semelhantes entre si e ficaram consistentemente agrupadas, junto do grupo de espécies do subgênero *Passiflora*. A espécie do subgênero *Dysosmioides* ficou claramente separada das demais, mas incluída no grupo do subgênero *Passiflora*.

*P. elegans* é uma espécie endêmica do RS, que apresenta muitas características morfológicas comuns a *P. actinia*, principalmente no que se refere à morfologia floral. Ambas são plantas heliófitas, ocorrendo no interior e bordas de florestas e mais raramente em capoeiras e capoeirões.. *P. actinia* é uma espécie tipicamente brasileira e de Mata Atlântica, tem sua distribuição descrita para os estados de ES, RJ, SP, PR, SC, tendo o Rio Grande do Sul como limite sul de sua distribuição. No RS esta espécie

é mais facilmente encontrada na região Nordeste, abrangendo parte da Serra, bordas da Serra, e a região de Torres (Porta de Torres). *P. elegans* tem sua distribuição descrita para os estados RS e SC (onde apenas um exemplar foi coletado, suspeita-se que foi cultivado), Uruguai e Entrerios (Argentina) (Sacco, 1984). Todas estas informações aliadas a um constante agrupamento das duas espécies independente do tipo de análise utilizada, leva-nos a acreditar que a divergência destas tenha sido um evento recente. A hipótese é de que tenha havido um evento de especiação quando *P. actinia* se expandiu para o sul, originando *P. elegans*. Uma repetição direta de 5 pb foi encontrada somente nas seqüências destas espécies, evidenciando a proximidade filogenética das duas.

Em conclusão, as análises aqui apresentadas demonstram o grande potencial filogenético do marcador utilizado para reforçar e, até mesmo esclarecer, questões de classificação entre espécies do gênero *Passiflora*. Vários caracteres diagnósticos das espécies analisadas foram levantados e uma contribuição relevante à taxonomia do gênero foi estabelecida, uma vez que as sugestões de C. Feuillet e J. M. MacDougal (trabalho ainda não publicado) baseiam-se apenas em dados de revisão de nomenclatura e citações.

### Referências Bibliográficas

- BAYER, R. J. & STARR, J. R. 1998. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *trnL* intron and *trnL/trnF* intergenic spacer. **Ann. Miss. Bot. Gard.** **85**: 242-256.
- CERVI, A.C. 1997. *Passifloraceae* do Brasil. estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** **45**: 1-92.
- CLEGG, M.T. 1993. Chloroplast gene sequences and study of plant evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **90**: 363-367.
- GIAVINA-BIANCHI Jr, P. F.; CASTRO, F.M.M.; MACHADO, M. S. L. & DUARTE, J. S. 1997 Occupational respiratory allergic disease induced by *Pasiflora alata* and *Rhamnus purshiana*. **Ann. Allergy Asthma Immunol.** **79**: 449-459.
- GILLY, L.; YUAN, Y.-M.; KÜPFER, P. & TABERLET, P. 1996. Phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: chloroplast *trnL* (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequence. **Mol. Phyl. Evol.** **5(3)**: 460-466.
- KÄSS, E.; WINK, M. 1997. Phylogenetic Relationship in the Papilionoideae (Family Leguminosae) Based on Nucleotide Sequences of cpDNA (*rbcL*) and ncDNA (ITS 1 and 2). **Mol. Phyl. Evol.** **8** (1): 65-88.
- KILLIP, E.P. 1938. The american species of *Passifloraceae*. **Publ. Field Mus., Bot. ser.** **19**: 1-613.
- MANEN, J-F.; NATALI, A. 1995. Comparison of the Evolution of Ribulose-1, 5-Biphosphate Carboxylase (*rbcL*) and *atpB-rbcL* Noncoding Spacer Sequences in a Recent Plant Group, the Tribe Rubieae (Rubiaceae). **J. Mol. Evol.** **41**: 920-927.
- McDADE, L. & MOODY, M. L. 1999. Phylogenetic relationships among *Acantaceae*: evidence from noncoding *trnL-trnF* chloroplast DNA sequences. **Am. J. Bot.** **86(1)**: 70-80.
- MES, T. H. M. & HART, H. 1994. *Sedum surculosum* and *S. jaccardianum* (Crassulaceae) share a unique 70pb deletion in the chloroplast DNA *trnL* (UAA)-*trnF* (GAA) intergenic spacer. **Pl. Syst. Evol.** **193**: 213-221.
- ROY, A., FRASCARIA, N., MACKAY, J. & BOUSQUET, J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). In: *Betula alleghaniensis*. **Theor. App. Gen.** **85**: 173-180.

- SACCO, J. C. 1984. Flora Ilustrada do R.G.S. Passifloraceae. **Inst. Ciên. Nat. - UFRGS**. 26 p.
- SANG, T.; CRAWFORD, D.J.; STUESSY, T.F. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). **Am. J. Bot.** **84**(8): 1120-1136.
- SMALL, R. L., RYBURN, J. A., CRONN, R. C., SEELANAN, T. & WENDEL, J. F. 1998. The tortoise and hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. **Am. J. Bot.** **85** (9): 1301-1315.
- TABERLET, P. & FUMAGALLI, L. 1996. Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. **Mol. Ecol.** **5**: 301-305.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G. & BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Pl. Mol. Biol.** **17**: 1105-1109.
- THOMPSON, D. L.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Ac. Res.** **22**: 4673-4680.
- VAN HAM, R. C. H. J., HART, H. M. S. T. H. M. & SANDBRINK, J. M. 1994. Molecular evolution of noncoding regions of the chloroplast genome in the Crassulaceae and related species. **Curr. Genet.** **25**: 558-566.