

SIMONE GUALBERTO SANTOS

**Análise da hipótese da vicariância entre *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth.
e *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae)
com base em DNA cloroplastídico**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de Doctor *Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

SIMONE GUALBERTO SANTOS

**Análise da hipótese da vicariância entre *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth.
e *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae)
com base em DNA cloroplastídico**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 17 de abril de 2008

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(Co-orientador)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-orientador)

Prof. João Augusto Alves
Meira Neto

Prof. Lyderson Facio Viccini

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu vitória nas lutas enfrentadas e possibilitou alcançar mais este importante objetivo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Botânica vinculado ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos meus queridos pais Aderbal e Lourdes, pelo amor, oração e dedicação, torcendo sempre pela minha vitória.

Ao meu grande amor e esposo Marcelo que me acompanhou durante essa jornada, me dando atenção, paz, tranquilidade, amor e carinho.

A minha família que vibrou e sofreu junto comigo durante todas as etapas do meu trabalho.

Ao meu orientador, professor e amigo Everaldo Gonçalves de Barros, pela confiança e amizade, pelo apoio e incentivo durante todas as etapas dessa minha formação e dos meus trabalhos.

Ao professor Ronan Xavier Corrêa pelo incentivo, auxílio, apoio e amizade e compreensão em todos os momentos da minha trajetória acadêmica.

Aos meus professores conselheiros Wagner Campos Otoni e Luiz Orlando de Oliveira, pelos aconselhamentos durante a formulação do projeto.

Ao meu amigo Fabrício Juchum, pelas análises estatísticas e pelos aconselhamentos

A minha amiga Mariana, pela cumplicidade, paciência, amor, amizade dedicação extrema a este trabalho.

Aos meus anjos do campo Brazilino e Lima, que me acompanharam nas expedições de coleta do material botânico.

Aos amigos que conquistei em Viçosa, por serem meus companheiros-irmãos nesta trajetória.

Aos primos Arthur Dantas Silva e Claudio Olívio Vilela de Lima, pela contribuição na etapa final da escrita.

Ao Gilmar Valente pelo auxílio nas coletas de *D. miscolobium* em Minas Gerais.

Aos professores, pelos aconselhamentos prestados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Genética e Biologia Molecular e aos funcionários da UESC pela colaboração e agradável convivência.

Ao amigo e técnico do laboratório da UESC Robson, por todo o apoio no seqüenciamento das minhas amostras.

Aos herbários, em nome dos seus curadores, André M. Amorim (CEPEC – Centro de Pesquisas do Cacau, CEPLAC, Ilhéus, BA) e Luiz Alberto M. Silva (UESC- Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA), que forneceram informações dos bancos de dados.

Aos funcionários da UFV, em especial Ângelo pelo seu atendimento sempre carinhoso e atencioso mesmo distante.

A todos os professores que ministraram as disciplinas do curso, pelos ensinamentos. Em especial ao Alexandre (*in memoriam*), por ter plantado em minha vida a semente da sabedoria e da simplicidade.

Ao André Carvalho (*in memoriam*) por seu essencial trabalho de sistemática do gênero *Dalbergia* no Brasil.

A todos os amigos e colegas do curso que certamente contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

BIOGRAFIA

SIMONE GUALBERTO SANTOS, filha de Aderbal Souza Santos e Lourdes Gualberto Santos, nasceu em São Paulo - SP, em 10 de dezembro de 1975.

Em 1994, iniciou o curso superior em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), concluindo em 2000. Na UESC desenvolveu atividades de Iniciação Científica no projeto “Formação do Horto e Recomposição da Mata da UESC”.

Em 2002 recebeu da UESC o título de especialista em Genética e Biologia Molecular, onde desenvolveu um trabalho na área de diversidade genética de plantas.

Em fevereiro de 2004, concluiu o curso de Mestrado em Botânica, com área de concentração em Botânica Estrutural/ Biotecnologia, na UFV.

Em março de 2004, iniciou o curso de Doutorado em Botânica, com área de concentração em Botânica Estrutural/ Biotecnologia, na UFV, defendendo tese em abril de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Família Leguminosae	3
2.2. Aspectos gerais do gênero <i>Dalbergia</i>	4
2.3. Vicariância	5
2.4. Filogenia Molecular.....	6
2.4.1. Genomas nuclear, mitocondrial e cloroplastídico.....	9
2.4.2. Ferramentas de análise de dados moleculares.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material vegetal.....	14
3.2 Extração de DNA.....	15
3.3 Amplificação de DNA.....	16
3.4 Purificação dos produtos de PCR.....	17
3.5 Seqüenciamento dos produtos de PCR.....	17
3.6. Análises filogenéticas.....	18
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMO

SANTOS, Simone Gualberto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2008. **Análise da hipótese da vicariância entre *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth. e *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae) com base em DNA cloroplastídico.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-orientadores: Ronan Xavier Corrêa, Luiz Orlando de Oliveira e Wagner Campos Otoni

O gênero *Dalbergia* L. f. (Fabaceae: Papilionoideae), possui cerca de 100 espécies de distribuição pantropical. No Brasil, há 40 espécies de *Dalbergia* distribuídas em áreas representativas dos diferentes ecossistemas brasileiros. *D. nigra* e *D. miscolobium* são espécies consideradas vicariantes, que ocorrem na Mata Atlântica e no Cerrado, respectivamente. Estas espécies figuram como objetos de estudo sobre vicariância em trabalhos anteriores de fitossociologia e quimiosistemática, porém, estes estudos necessitam de outras abordagens, visto ser a teoria de vicariância ainda polêmica entre pesquisadores. Neste trabalho, objetivou-se analisar as seqüências do íntron trnL em *D. nigra* e *D. miscolobium*, visando investigar a validade dessa região genômica para distinguir essas espécies e discutir possível vicariância entre elas. Amostras de DNA de plantas das espécies de *Dalbergia* foram extraídas e amplificadas com *primers* específicos trnL-c e trnL-d (cpDNA). As seqüências de DNA alinhadas produziram uma matriz com 530 caracteres. Excluindo os autopomórficos e os invariáveis, foram obtidos 75 sítios variáveis dos quais 37 foram informativos para análise de parcimônia. De modo geral, as análises de máxima parcimônia e *neighbor-joining* foram consistentes, resultando em árvores de topologias semelhantes entre si, com a separação dos taxa em clados. As relações filogenéticas entre as espécies estudadas, com base nos dados moleculares, corroboram aquelas baseadas em dados de morfologia encontrados na literatura, contudo não confirmam a hipótese de vicariância entre *D. nigra* e *D. miscolobium*.

ABSTRACT

SANTOS, Simone Gualberto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2008. **Analysis of vicariance hypothesis between *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth. and *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae) based on chloroplast DNA sequences.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-advisers: Ronan Xavier Corrêa, Luiz Orlando de Oliveira and Wagner Campos Otoni

The genus *Dalbergia* L. f. (Fabaceae: Papilionoideae) includes approximately 100 pantropical species. In Brazil there are 40 *Dalbergia* species distributed in different Brazilian ecosystems. *D. nigra* and *D. miscolobium* which occur in the Mata Atlântica and Cerrado regions, respectively, are considered to be vicariant. Vicariance between these two species has been investigated by phytosociological and chymosystematic studies, however, new approaches need to be used for these studies as this hypothesis has not been confirmed and is not fully accepted by the scientific community. In this work the chloroplast trnL intron sequences of *D. nigra* and *D. miscolobium* have been analyzed as a tool to distinguish these two species and possibly aid the discussion of vicariance between them. Leaf DNA samples were extracted, amplified and sequenced with specific primers for the trnL-c and trnL-d regions of the trnL gene present in the chloroplast DNA. The sequences obtained were aligned generating a matrix with 530 characters. Seventy-five variable sites were obtained, 37 of them were informative for the parsimony analysis. As a whole the maximum parsimony and the neighbor-joining analyses were consistent, giving rise to trees with similar topologies, separating the different taxa into clades. The phylogenetic relationships between the species studied based on molecular data support those based on morphological data presented in the literature, however, they do not confirm the hypothesis of vicariance between *D. nigra* and *D. miscolobium*.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Dalbergia* L. f. (Fabaceae: Papilionoideae), possui cerca de 100 espécies de distribuição pantropical, sendo considerado o segundo maior da tribo Dalbergieae Bronn ex. D.C. No Brasil, ocorrem 40 espécies de *Dalbergia* distribuídas em áreas representativas dos diferentes ecossistemas brasileiros. É possível encontrar as espécies de *Dalbergia* nos mais variados tipos de vegetação, como: Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Campo Rupestre (Carvalho, 1997). *Dalbergia nigra* (jacarandá-da-bahia, típico da Mata Atlântica) e *Dalbergia miscolobium* (jacarandá-do-cerrado) foram espécies consideradas vicariantes, isto é, afins em substituição umas às outras em territórios vizinhos nos nichos ecológicos (Rizzini, 1963). Essa hipótese foi corroborada pela técnica de cromatografia em sílica, que permitiu avaliar a presença de substâncias típicas de *Dalbergia* de diferentes continentes entre essas duas espécies (Gottlieb, 1964).

Segundo Carvalho (1997), *D. miscolobium* apresenta folhas alternas e compostas por cinco a 10 pares de folíolos rígidos, ovalados, de cor verde-azulada, com até três centímetros de comprimento. As inflorescências são ramificadas e estão no ápice dos ramos ou na axila das folhas, contendo até 60 flores. As flores têm cerca de dois mm de comprimento e cor roxo-escura. Os frutos são escuros, secos (tipo legume samaróide), alongados com até oito cm de comprimento, foliáceos, contendo uma ou duas sementes castanhas, achatadas e reniformes. *D. nigra* caracteriza-se pelos folíolos oblongos com ápice obtuso, às vezes retuso, ovário glabro, exceto na margem ventral, onde é ciliado e sâmaras glabras castanho-escuras. Distingue-se das demais espécies de *Dalbergia* por apresentar frutos com duas sementes. Assim, pode-se salientar que essas duas espécies apresentam diferenças marcantes em formato de folhas, pilosidade de algumas estruturas e cor da flor.

As duas espécies objeto deste estudo apresentam elevado valor econômico. Além disso, *D. nigra* encontra-se em risco de extinção (Varty, 1998). A destruição acelerada das florestas tropicais e o intenso processo de exploração extrativista têm inserido muitas espécies de interesse econômico e conservacionista no grupo de espécies ameaçadas de extinção (Carvalho, 1992; Silva & Mendonça, 1998).

Poucos indivíduos dessa espécie são encontrados, ainda que de forma isolada, nos maciços e nos fragmentos de floresta que restam, devido ao intenso desmatamento indiscriminado da Mata Atlântica no sul da Bahia (Almeida, 2001).

A madeira do jacarandá-do-cerrado é de boa qualidade, assim como do jacarandá-da-Bahia, porém é pouco utilizada por causa da tortuosidade de seu tronco. Também conhecida por sua importância econômica, sua madeira é usada em construções de casas e cercas, na fabricação de instrumentos e na produção de carvão. Os frutos secos são usados para compor arranjos artesanais de flores secas. Possui grande potencial para a ornamentação devido à presença de algumas características, como a folhagem verde-azulada. A casca libera um corante utilizado para tingir o algodão empregado em tecelagem (Almeida, 1998).

Seqüências de DNA cloroplastídico têm sido largamente utilizadas em estudos de sistemática molecular de Leguminosae em diferentes níveis taxonômicos (Chase et al., 1993; Doyle et al., 2000; Brouat et al., 2001; Pennington et al., 2001; Doyle & Luckow et al. 2003; Herendeen et al., 2003; Luckow et al., 2003; Wojciechowski, 2003; Simpson et al., 2003; McMahon & Hufford, 2004; Wojciechowski et al., 2004; Luckow et al., 2005; Haston et al., 2005). Esta região do genoma do cloroplasto tem sido utilizada com sucesso em estudos interespecíficos, intragenéricos e em reconstruções filogenéticas (Gielly et al., 1996; Bruneau et al., 2000; Bruneau et al., 2001; Lee & Wen, 2004). Neste trabalho, objetivou-se analisar as seqüências do íntron trnL em *D. nigra* e *D. miscolobium*, visando investigar a validade dessa região genômica para distinguir essas espécies e discutir a possível vicariância entre elas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Leguminosae

A família Leguminosae Juss. ou Fabaceae Lindl. (*sensu* APG II) é a terceira maior família de angiospermas, compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (Lewis et al., 2005), com menos espécies apenas que Orchidaceae e Asteraceae (Doyle & Luckow, 2003). Cronquist (1981, 1988), em seu esquema de classificação, considerou as leguminosas como três famílias independentes. Com base em dados moleculares e não-moleculares, Leguminosae é dividida nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Faboideae) (Judd et al., 1999; Lewis & Schrire, 2003; APG II, 2003; Soltis et al., 2005). A subfamília Faboideae é a maior com 476 gêneros e aproximadamente 14.000 espécies (Lewis et al., 2003); em Mimosoideae, encontram-se 77 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies (Doyle & Luckow, 2003); Caesalpinioideae é formada por 170 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies (Doyle, 1995; Doyle et al., 2000; Bruneau et al., 2001), sendo extremamente diversa em morfologia (Tucker, 2003), compartilhando algumas das características de Mimosoideae e Faboideae.

As leguminosas estão distribuídas através do mundo, em diferentes habitats, latitudes e altitudes, nos mais diferenciados ecossistemas. Enquanto que Faboideae, considerada a subfamília com o maior número de caracteres derivados é cosmopolita, as outras duas subfamílias ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Heywood, 1979; Polhill & Raven, 1981).

A riqueza dos leguminosas não pode ser resumida somente à sua importância ecológica ou ao grande número e distribuição de suas espécies. Economicamente, seu potencial é bastante acentuado incluindo variedades alimentícias, medicinais, madeireiras, ornamentais, produtoras de fibras e óleos, além de contribuir com a agricultura fixando nitrogênio aos solos. Por isso, Fabaceae é a segunda maior família botânica em importância econômica, sendo menos importante apenas que Poaceae (Wojciechowski et al., 2004).

Uma característica marcante desta família é a simbiose em suas raízes com rizóbios, que permite a fixação de nitrogênio atmosférico (Sprent, 2001).

2.2. Aspectos Gerais do gênero *Dalbergia*

O gênero *Dalbergia* foi proposto pelo filho de Linnaeus em 1781, em memória de Carl Gustav Dahlberg, um soldado sueco no Suriname e coletor para Linnaeus. É considerado o segundo maior gênero da tribo Dalbergieae Bronn ex. D.C. e pertence à família Fabaceae, sub-família Papilionoideae. Foi descrito para acomodar duas espécies: *D. lanceolaria*, originária de Ceilão, e *D. monetaria*, originária do Suriname (Carvalho, 1989).

Existem cerca de 100 espécies no gênero *Dalbergia*, sendo que no Brasil observa-se a ocorrência de 40 delas. O gênero é dividido em cinco seções (*Pseudoecastaphyllum*, *Triptolemea*, *Ecastaphyllum*, *Selenolobium* e *Dalbergia*), que podem ser definidas por meio das características da inflorescência e do fruto. *D. ecastaphyllum* pertence à seção *Ecastaphyllum*; *D. decipulares* pertence a seção *Triptolemea*; e *D. glaucescens*, *D. nigra* (Vell.) Allem. ex Benth e *D. miscolobium* pertencem a seção *Dalbergia* com a inflorescência do tipo panícula e o fruto oblongo, samaroide, membranáceo com venação reticulata (Carvalho, 1997).

O gênero *Dalbergia* surgiu na África, de onde dispersou, tanto para o leste, como para o oeste. As diferentes condições climáticas e ecossistemas da Ásia e América do Sul influenciaram os diferentes modos de evolução do gênero (Almeida, 2001). É possível encontrar espécies de *Dalbergia* nos mais variados tipos de vegetação, como: Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Campo Rupestre (Carvalho, 1997). *D. nigra* é arbórea, de grande porte, endêmica do litoral sul da Bahia, sendo um componente típico da Mata Atlântica. É uma planta decídua, de caráter pioneiro, característica da floresta pluvial da encosta atlântica, sendo encontrada nas encostas bem drenadas, tanto no interior da mata primária densa, como em formações secundárias (Lorenzi, 1992). *D. miscolobium* é característica da vegetação de Cerrado e ocorre do Estado do Piauí ao Estado do Paraná. Ela é encontrada sob a forma de arbustos ou pequenas árvores de campos limpos que podem alcançar 12 m de altura, quando as condições de solo e

disponibilidade de água permitem a formação de um tipo de floresta seca, chamada cerradão (Carvalho, 1997).

Espécies de *Dalbergia* são importantes árvores tropicais de madeira de lei, que apresentam modo de dispersão de sementes principalmente pelo vento (Rout et al., 2003). As valiosas madeiras dos jacarandás são conhecidas desde o Brasil colonial e a importância econômica dessas plantas é citada na literatura já no início daquele período. Entre estas espécies, o jacarandá-da-Bahia é a que possui madeira com maior valor econômico. Esta apresenta cor escura, de fragrância acentuada e bastante resistente e que apesar de seu peso e densidade, é facilmente trabalhada e resiste ao apodrecimento mesmo nas quentes e úmidas condições tropicais (Carvalho, 1990). Além disso, é amplamente utilizada, não só pelo desenho decorativo de seu laminado, mas também pela multiplicidade de suas aplicações, tais como: na confecção de mobílias torneadas de luxo, no preparo de acabamentos internos em construção civil, em molduras de portas e rodapés, em caixas de rádios e televisões, em peças entalhadas, em cabos de talheres e no artesanato em geral (Almeida, 2001).

D. miscolobium (jacarandá-do-cerrado) é uma madeira de boa qualidade, assim como o jacarandá-da-Bahia, porém é pouco utilizada devido à tortuosidade de seu tronco. Também conhecida por sua importância econômica, sua madeira é usada em construções de casas e cercas, fabricação de instrumentos e carvão. Os frutos secos são usados para compor arranjos artesanais de flores secas. Possui grande potencial para a ornamentação devido à presença de algumas características, como a folhagem verde-azulada. A casca libera um corante utilizado para tingir o algodão empregado em tecelagem (Almeida, 1998).

2.3. Vicariância

No estudo da distribuição dos seres vivos verifica-se, frequentemente, que alguns taxa muito similares entre si, originários de um mesmo ancestral, ocupam áreas contínuas e ecologicamente distintas, como, por exemplo, o Cerrado e a Mata Atlântica (Rizzini, 1971; Amorim, 2002). Este conceito ecológico de vicariância é o mais usual e os taxa envolvidos levam o nome de vicariantes (o que substitui; do latim *vicarius*, substituto), ou pares vicariantes, quando se quer fazer referências dois-a-dois (Pereira, 1990).

Entretanto, há sérias dificuldades que tornam problemática a inferência do tipo de processo que tenha gerado o padrão de distribuição de espécies tidas como vicariantes. A escassez de dados fósseis faz com que estudos históricos sobre vicariância sejam feitos com base em informações contemporâneas. Talvez este seja o principal motivo pelo qual a vicariância ainda seja um tema muito polêmico entre os pesquisadores da área.

Rizzini (1963) apresentou uma lista de 35 espécies vicariantes lenhosas de Mata e Cerrado e sugeriu que as espécies da Mata evoluíram *in loco* para as de Cerrado. A existência de tantos pares vicariantes sugere uma coexistência antiga entre os dois tipos contrastantes de formação, Cerrado e Mata (Labouriau, 1966). Estas idéias são também compartilhadas por Gottlieb. (1964) que verificaram, por meio de análise da composição química, a estreita relação entre diversos pares vicariantes, como por exemplo, *D. nigra* e *D. miscolobium*.

2.4. Filogenia Molecular

A noção acerca da evolução de que todos os seres vivos partilham um ancestral comum e que a estrutura dos organismos de hoje traz gravada em si parte de sua história evolutiva, tem estimulado o estudo das relações de parentesco entre os organismos. Desta forma, quando propomos a existência de conexões entre as espécies, ou seja, a existência de uma filogenia, passamos de um modelo estático para um modelo onde tanto as espécies quanto suas características são conectadas historicamente (Amorim, 2002). Assim, poderíamos definir filogenia como uma suposta reconstrução da história evolutiva de um grupo, indicando os vários níveis nas relações de ancestralidade das espécies com suas espécies descendentes (Miyaki et al., 2001; Amorim, 2002).

A análise filogenética fornece um referencial evolutivo que permite uma maior eficiência no uso do conhecimento sobre as espécies e seus habitats, facilitando o gerenciamento do conhecimento biológico (Miyaki et al., 2001). Quando todo o conhecimento biológico sobre a vida é organizado ao redor de uma classificação filogenética, o armazenamento dessas informações torna-se mais eficiente e, conseqüentemente, facilita a recuperação dessas informações

pelos cientistas e pela própria sociedade interessada (Amorim, 2002). Enfim, por meio da análise filogenética, podem-se compreender os processos evolutivos como a especiação, extinção, adaptação e, dessa forma, inferir a história da evolução.

Estudos recentes confirmam dados anteriores a respeito da filogenia de Leguminosae, indicando seu monofiletismo, sendo esta família pertencente à ordem Fabales juntamente com Polygalaceae, Surianaceae e Quillajaceae (Doyle et al., 2000; APG II, 2003; Doyle & Luckow, 2003; Wojciechowski et al., 2004; Soltis et al., 2005). Análises filogenéticas baseadas em dados morfológicos e moleculares indicam que Faboideae e Mimosoideae são monofiléticas (Doyle, 1995; Doyle et al., 2000; Kajita et al., 2001; Lavin et al., 2001; Wojciechowski, 2003).

A tribo Dalbergiadeae, com exceção de *Andira*, *Hymenolobium*, *Vatairea* e *Vataireopsis*, pertence a um grupo monofilético pantropical de leguminosas da subfamília Papilionoidea, designado dalbergiídeos. Esse grupo ainda inclui todos os gêneros previamente referidos para as tribos Aeschynomene e Adesmieae e a subtribo Bryinae da Desmodieae. Esse grupo foi detectado a partir de análises filogenéticas de seqüências de DNA de cloroplasto e do RNA ribossomal 5,8 S. Todos os dalbergiídeos são membros de um dos seguintes subclados: *Adesmia*, *Dalbergia* e *Pterocarpus*. O clado dalbergiídeo e seus três subclados são crípticos, no sentido de que eles são geneticamente distintos, mas pobremente distinguidos por dados não-moleculares. Caracteres taxonômicos tradicionalmente importantes como hábitos arbóreos, estames livres e vagens leguminosas, não fornecem suporte para o estabelecimento dos clados, que são mais apropriadamente identificados por análises moleculares (Lavin et al., 2001).

Análises moleculares de leguminosas revelam o grupo Papilionoideae como monofilético e sugerem que ele divergiu de outras leguminosas entre 40 a 50 milhões de anos atrás. Essas mesmas análises dão suporte à existência de quatro grupos maiores de papilionóides, que contêm importantes espécies domesticadas e/ou espécies modelo, mas as relações filogenéticas entre alguns desses grupos não estão bem esclarecidas. O clado aeschynomenóide/dalbergiídeo é um grupo diverso que inclui o amendoim e outros gêneros

herbáceos, mas também plantas lenhosas como o jacarandá-da-Bahia (Doyle & Luckow, 2003).

Diversas abordagens para inferir as relações filogenéticas foram sendo desenvolvidas ao longo do século XX, resultando em controvérsias a respeito de tais relações, dos métodos e tipos de dados utilizados para inseri-las (Amorim, 1997, 2002). Tradicionalmente, a identificação de espécies tem sido feita com base em características morfológicas, como morfologia floral, cor da flor, e características agrônômicas. Porém, dados genéticos têm se mostrado bastante úteis na identificação e classificação de espécies. Atualmente as análises de macromoléculas, em especial do DNA, vêm sendo amplamente utilizadas para este fim, caracterizando uma linha de pesquisa denominada sistemática molecular. Além disso, os dados relativos à análise do DNA são gerados de forma rápida e em grande quantidade devido aos avanços tecnológicos na área de biologia molecular (Judd et al., 1999; Matioli & Passos-Bueno, 2001).

Muitos estudos sobre sistemática e evolução têm revelado a forte tendência do uso de análises de seqüências de genes para a reconstrução de árvores filogenéticas. Em plantas com flores, genes de cloroplastos têm sido muito utilizados para este fim (Doyle & Luckow, 2003).

Os dados moleculares associados às novas ferramentas de análise têm contribuído acentuadamente nas mais diversas pesquisas, envolvendo estudos sobre irradiações adaptativas (Givnish, 2001), história da diferenciação geográfica entre espécies (Schaal & Olsen, 2001), fluxo gênico e variabilidade genética entre populações (Cain et al., 2000), impactos da hibridação e poliploidia sobre a especiação, adaptação, expressão gênica e evolução cromossômica (Rieserberg et al., 1996). Essas informações moleculares têm sido extensivamente utilizadas tanto para esclarecer quanto confirmar ou questionar relações filogenéticas já propostas.

Adicionalmente, podemos inferir que a constante busca por filogenias precisas supera o ideal puramente descritivo. Assim, a origem das adaptações morfológicas pode ser inserida em um contexto filogenético na reconstrução segura das mudanças moleculares que originaram novas estruturas Clegg et al. (1994), ou ainda, dos genes de desenvolvimento, usados como marcadores

filogenéticos para elucidar a diversidade morfológica de algumas estruturas (Beckert & Theiben, 2003; Kaufmann et al., 2005).

2.4.1. Genomas mitocondrial e cloroplastídico

A célula vegetal possui genomas de origem nuclear, mitocondrial (DNAm_t) e cloroplastídico (DNAcp), cada um com características que definem sua utilidade para resolver questões evolutivas em diferentes níveis (Stebbins, 1950; Walbot & Cullis, 1985; Nahum, 2001). O DNAm_t e o DNAcp diferem grandemente em relação ao genoma nuclear, no tamanho e número de genes e, principalmente, nas taxas e nos padrões de evolução (Nahum, 2001). Os genes mitocondriais e cloroplastídicos são herdados de uma maneira não-Mendeliana em todos os organismos estudados, e a herança dos genomas citoplasmáticos é freqüentemente materna, mas existem numerosas exceções que resultam em diferentes graus de herança paterna ou biparental do DNAcp e DNAm_t (Birky, 1995, 2001),

A maior parte das informações genéticas das células vegetais está localizada no núcleo. Contudo, o estudo do genoma nuclear em angiospermas, traz algumas dificuldades por causa do grande tamanho e complexidade do genoma, com extensas regiões não-codificantes. Os genomas de plantas com flores estão entre os maiores entre os organismos vivos (Bennett et al., 2000). O grande tamanho desses genomas, em parte, deve-se à origem poliplóide de muitas espécies vegetais. Adicionalmente, alguns autores têm proposto que cerca de 30-80% de todas as espécies de plantas podem ter sido originadas por eventos de hibridação (Grant, 1971; Stace, 1987; Whitham et al., 1999), o que torna mais complexo o estudo evolutivo de alguns grupos.

O genoma do cloroplasto corresponde a uma molécula de DNA circular, podendo variar de 120 a 220 kb (Nahum, 2001; Borém & Vieira, 2005). O DNA cloroplastídico (cpDNA) geralmente apresenta duas regiões simples, uma grande (LSC, *large single copy*) e uma pequena (SSC, *small single copy*), com aproximadamente 134-160 kb e 80-87 kb, respectivamente. Além disso, são encontradas regiões repetidas invertidas (IR, *inverted repeats*), formadas por dois segmentos idênticos em sentidos opostos, separando a SSC da LSC (Doyle, 1995; Nahum, 2001). As regiões IR podem apresentar um tamanho

variável, de 12 a 25 kb cada, porém algumas linhagens, nas leguminosas, perderam estas regiões (Doyle, 1995; Palmer & Delwiche, 1998).

O cpDNA vem sendo bastante empregado em estudos de filogenia por causa de sua estabilidade estrutural, seu padrão de herança e sua elevada taxa de mutação. Nos últimos anos, ocorreu grande aumento no número de publicações sobre filogenia molecular, nos diferentes níveis taxonômicos, construídas a partir do cpDNA ou em associação com o mesmo (Chase et al., 1993; Doyle et al., 2000; Bruneau et al., 2001; Brouat et al., 2001; Doyle & Luckow, 2003; Herendeen et al., 2003; Luckow et al., 2003; Simpson et al., 2003; Wojciechowski, 2003; McMahon & Hufford, 2004; Wojciechowski et al., 2004; Haston et al., 2005; Salamin et al., 2005).

Dentre as regiões plastidiais não codificadoras melhor estudadas no grupo das angiospermas, nas análises filogenéticas, encontram-se o espaçador intergênico *trnL-trnF* e o íntron *trnL* (Mes et al., 2000; Holt et al., 2004; Lledó et al., 2005) (Figura 1). Essas regiões têm sido amplamente utilizadas nas análises filogenéticas nos mais variados níveis taxonômicos (Mes et al., 2000; Bruneau et al., 2001; Muschner et al., 2003; Lee & Wen, 2004; Haston et al., 2005).

Entretanto, o uso de regiões não-codificadoras é muito discutido por alguns autores. Segundo Golenberg et al. (1993), algumas seqüências não-codificadoras contêm mais *indels* (inserções ou deleções) do que substituições, não devendo ser tratados como caracteres informativos. Kelchner (2000), por outro lado, considera que apesar de os *indels* dificultarem o alinhamento das seqüências e a determinação das homologias, esses trechos contêm informações filogenéticas importantes e que devem ser incluídas nas análises.

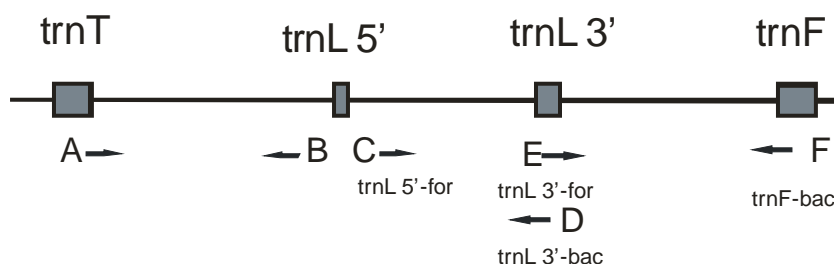


Figura 1. Representação da região cloroplastídica *trnL* e *trnL-F* (Taberlet et al., 1991). Os quadrados representam regiões codificadoras.

A mitocôndria em células vegetais, semelhantemente ao cloroplasto, apresenta seu material genético na forma de DNA circular. Contudo, a amplitude de tamanho do genoma mitocondrial em diferentes espécies é bastante grande, podendo variar de 6 a 2000 kb (Judd et al., 1999; Nahum, 2001). Pode-se destacar que o genoma mitocondrial (DNAMt) apresenta um alto dinamismo em algumas espécies com variações no tamanho, porém, seu material genético é muito conservado (Eguiarte et al., 2003). Adicionalmente, Muse (2000) verificou que as taxas de substituição são acentuadamente baixas em genes mitocondriais das plantas. Segundo Palmer & Herbon (1988), a pouca utilização do DNAMt nas análises filogenéticas de plantas pode estar relacionada ao alto grau de recombinação intra-molecular encontrado na maioria das espécies estudadas, dificultando o estudo de grandes regiões de seu genoma.

Segundo Palmer (1992), o DNAMt de plantas tem sido pouco aplicado em estudos filogenéticos por causa das características da estrutura e baixa taxa de mutação desse genoma. Entretanto, nos últimos anos tem crescido o interesse na inclusão do genoma mitocondrial nos estudos filogenéticos. Alguns trabalhos abrangendo regiões intrônicas e espaçadoras têm mostrado o potencial dessas seqüências para uso na sistemática molecular (Freudenstein & Chase, 2001; Duminil et al., 2002; Dombrovska & Qiu, 2004). Uma das primeiras regiões investigadas para uso no estudo de filogenia foi o gene que codifica a NADH desidrogenase, principalmente os fragmentos correspondentes às subunidades I (Wissinger et al., 1991) e II (Demesure et al., 1995). Chen & Sun (1998), em seus estudos baseados no DNAMt, encontraram variações compatíveis à de algumas regiões cloroplastídicas e nucleares. Destaca-se ainda que outras regiões desse genoma podem conter informações filogenéticas muito úteis, principalmente aquelas relacionadas com os eventos de inserção e deleção (Freudenstein & Chase, 2001).

2.4.2. Ferramentas de análise de dados moleculares

Assim como a natureza dos dados moleculares é bastante diversa daquela das características morfológicas, os métodos de análise filogenética utilizando seqüências também tiveram de ser adaptados a partir dos métodos tradicionais, e novas abordagens foram criadas. Na análise de dados moleculares para a inferência filogenética têm sido mais comumente utilizadas quatro abordagens: métodos baseados em análise de distância, máxima parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana (Felsenstein, 1988; Swofford et al., 1996; Huelsenbeck et al., 2001). Na reconstrução por esses métodos estão associadas a estimativa da topologia e a estimativa do valor do comprimento de cada ramo, a fim de gerar uma árvore que represente uma inferência estatística da árvore verdadeira (Nei & Kumar, 2000).

O método de agrupamento de vizinhos ou *neighbor-joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) é uma simplificação do método de evolução mínima (Nei & Kumar, 2000), o qual se baseia no cálculo das distâncias evolutivas (Graur & Li, 2000) para todos os pares de indivíduos e reconstrução de uma árvore que leva em consideração as relações entre todas as distâncias (Russo, 2001; Schneider, 2001). No caso de NJ, a metodologia não busca examinar todas as possíveis topologias, mas aquelas que produzem uma árvore refletindo a organização seqüencial de vizinhos e minimizem seu comprimento total (Schneider, 2001). Trata-se de um método rápido, apropriado para grandes conjuntos de dados, permitindo linhagens com diferentes tamanhos de ramos e substituições múltiplas, no entanto, ele mostra apenas uma topologia possível (Nei & Kumar, 2000). O método NJ requer uma menor capacidade computacional podendo levar a conclusões similares àquelas obtidas por métodos que requerem maior tempo de cálculo, como Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança (Nei et al., 1998).

A Máxima Parcimônia (MP) (Henning, 1966; Eck & Dayhoff, 1967) é um método muito simples, baseado na mudança do estado dos caracteres (Graur & Li, 2000). Fundamenta-se na hipótese de que a via menos complicada é a mais provável, minimizando o número de etapas evolucionárias necessárias para explicar um determinado evento. Segundo Schneider (2001), o método é baseado na premissa de que a árvore mais provável explicaria todas as

variações encontradas requerendo o menor número de mudanças. Ainda sobre a MP, Miyaki et al. (2001) descrevem que este método baseia-se em um modelo evolutivo no qual uma mudança é mais provável do que duas, tratando as substituições independentemente. Essa metodologia procura todas as topologias de árvores possíveis, em busca da árvore mínima ótima. Apesar de fazer análises de diferentes topologias, MP é um método que requer grande tempo de comparação, o tamanho dos ramos não é informativo e utiliza-se apenas sítios informativos (Nei & Kumar, 2000).

Ao contrário da MP, o método de Máxima Verossimilhança (MV) (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967; Felsenstein, 1981) baseia-se em testar hipóteses ou modelos evolutivos, considerando todos os sítios indistintamente, observando qual topologia obtida é a mais adequada ao modelo utilizado (Pereira et al., 2001; Nei & Kumar, 2000; Schneider, 2001). Essa metodologia apresenta menor variância em comparação com outros métodos, tendendo a ser robusta ao assumir o modelo evolutivo, sendo caracterizada ainda por uma boa base estatística. Contudo, devido ao seu grande consumo de memória computacional, trata-se de um método moroso quando utilizado na análise com grandes bancos de dados (Nei & Kumar, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Amostras de folhas de 35 plantas de diferentes espécies de *Dalbergia* L.F. foram coletadas nas regiões de Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, nos Estados da Bahia e de Minas Gerais (Tabela 1 e Figura 2). As espécies *D. nigra* e *D. miscolobium* foram escolhidas com base na hipótese de vicariância entre elas (Rizzini, 1963) e, principalmente, porque *D. nigra* encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção da flora da Mata Atlântica (IBAMA, 1992; Varty, 1998). Essas localidades foram escolhidas porque figuram nos herbários do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC) e da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) como locais de ocorrência dessas espécies. Os materiais testemunhas dessas espécies encontram-se depositados nos Herbários da UESC (HUESC) e da UFV (VIC), sob os seguintes números: HUESC 11042 (*D. nigra*); HUESC 11713 (*D. miscolobium*); HUESC 11043 (*D. decipulares*); HUESC 11391 (*D. ecastaphyllum*); VIC 4441 (*D. glaucescens*).

Tabela 1. Indivíduos de *Dalbergia* utilizados neste trabalho.

Planta	Espécie	Local de coleta	Vegetação
1 a 5	<i>D. nigra</i>	Viçosa (MG)	Mata Atlântica
6 a 11	<i>D. nigra</i>	Ilhéus (BA)	Mata Atlântica
12 a 16	<i>D. miscolobium</i>	Paraopeba (MG)	Cerrado
17 a 22	<i>D. miscolobium</i>	Caetité (BA)	Cerrado
23 a 28	<i>D. decipulares</i>	Jacobina (BA)	Caatinga
29 a 34	<i>D. ecastaphyllum</i>	Ilhéus (BA)	Restinga
35	<i>D. glaucescens</i>	Abaíra (BA)	Caatinga

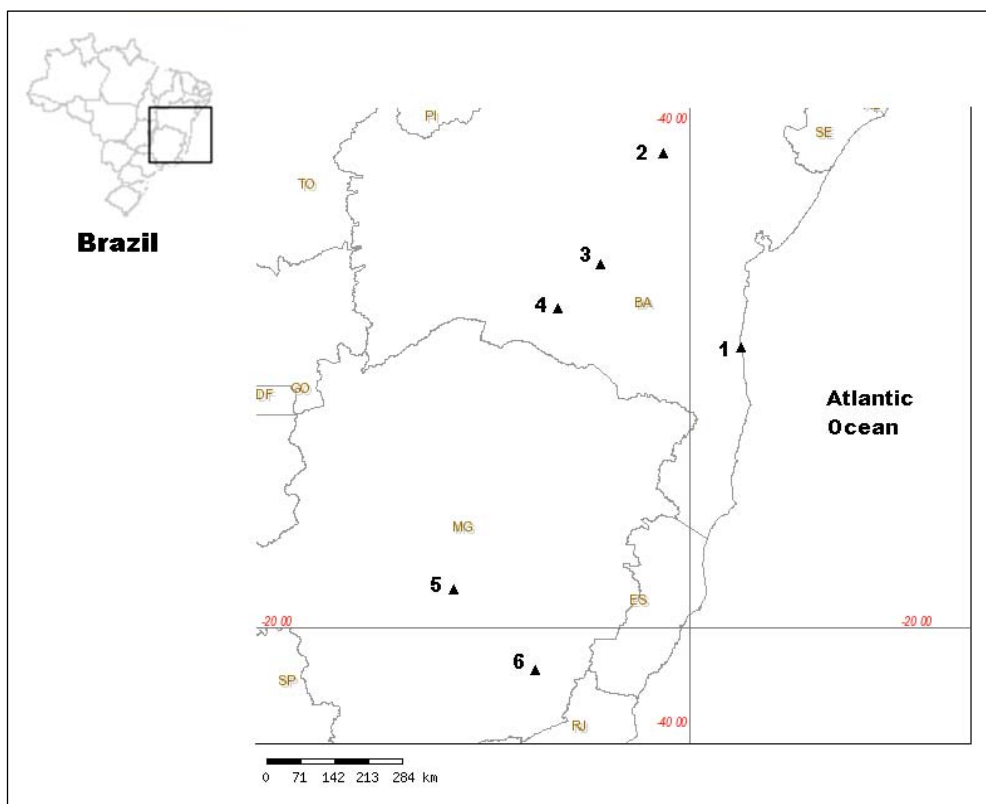


Figura 2. Áreas de coleta de espécies de *Dalbergia* nos estados da Bahia e Minas Gerais. Números representam: **1**, Ilhéus; **2**, Jacobina; **3**, Abaíra; **4**, Caetité; **5**, Paraopeba; **6**, Viçosa.

As amostras de folhas foram acondicionadas em sílica-gel entre o período de coleta e extração de DNA. Foram incluídas, nas análises, seqüências obtidas no Genbank referentes às espécies *Andira inermis* e *Macherium* sp., utilizadas na polarização das árvores. A espécie *Andira inermis* foi selecionada como grupo externo e *Macherium* sp. como grupo irmão com base na literatura (Lavin et al., 2001).

3.2. Extração do DNA

O DNA genômico total foi extraído do tecido foliar, das amostras de folhas acondicionadas em sílica-gel, pelo método do CTAB de acordo com a metodologia descrita por Doyle & Doyle (1990), modificada por Grattapaglia & Sederoff (1994), Corrêa et al. (1999) e Almeida et al. (2001).

As folhas foram pulverizadas em tubos do tipo Eppendorf (2 mL) na presença de nitrogênio líquido e com auxílio de uma “chave estrela” adaptada para esse fim. Posteriormente à pulverização, foram adicionados 700 µL de tampão de extração CTAB 2% às amostras, as quais foram agitadas no vórtex e incubadas em banho-maria a 65 °C por 30 a 40 minutos, sendo vertidas suavemente a cada 10 minutos.

A purificação dos ácidos nucleicos iniciou-se com a eliminação das proteínas, adicionando-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) em cada amostra, sendo por 5 minutos agitadas suavemente por inversões. Em seguida foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 g, sendo a fase superior, contendo o DNA, transferida para um novo tubo.

Posteriormente, foi feita a precipitação dos ácidos nucleicos pela adição de isopropanol gelado (4°C) ao novo tubo na proporção de 1:1 (sobrenadante:isopropanol), o qual, após suave agitação foi incubado por 30 min a -20 °C. Em seguida, os materiais foram centrifugados a 14.000g por 10 min a 4 °C, formando-se ao final um precipitado esbranquiçado. A fase aquosa foi descartada e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%, sendo seco à temperatura ambiente. Por fim, o precipitado foi ressuspenso em 70 µL de TE-RNAase (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 / EDTA 1 mM + RNAase A 10 µg/mL) e incubado em banho-maria por 30 min a 37 °C.

Após a extração, a avaliação da qualidade e a estimativa da concentração do DNA foram realizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Após quantificação, o DNA obtido foi diluído para a concentração de 10 ng/µL, sendo, então, armazenado a -20 °C.

3.3. Amplificação do DNA

Amostras de DNA de cada uma das cinco espécies (Tabela 1) foram amplificadas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* da *PerkinElmer*. Os *primers* trnL (Tabela 2) e o programa de amplificação dos fragmentos foram aqueles recomendados por Taberlet et al. (1991) e Gielly & Taberlet (1994), alterando-se a temperatura de “anelamento” para 52,3°C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 2- Seqüências dos *primers* utilizados no estudo das espécies de *Dalbergia*

Primer	Seqüência	Sentido
<i>trnL-c</i>	5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3'	<i>Forward</i>
<i>trnL-d</i>	5' GGGGATAGAGGGACTTGAAC 3'	<i>Reverse</i>

3.4. Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada pela adição das enzimas exonuclease (EXO1) e fosfatase alcalina (SAP – *Shrimp Alkaline phosphatase*). A primeira degrada o excesso de *primer* fita simples e a segunda, os nucleotídeos não incorporados. Para purificação de produtos de PCR em 12 µL de mistura de reação, de foram utilizados 0,66 µL de exonuclease, 0,66 µL de fosfatase alcalina e 0,68 µL de H₂O ultrapura autoclavada. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 37 °C e 15 min a 80 °C, essa última etapa visa à inativação das enzimas.

3.5. Seqüenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados utilizando o kit de seqüenciamento “DYEnamic™ ET Terminator Sequencing Premix” (MegaBace™) (Amersham Pharmacia Biotech. Inc). Para os seis indivíduos analisados de cada espécie foram feitas seis repetições de cada amostra, sendo três oriundas do *primer forward* e três do *reverse*. Nas reações, cada *primer* (sentido R e F) foi colocado separadamente. As reações seguiram as recomendações do fabricante com as seguintes modificações: 1,5 µL de DNA purificado, 0,5 µL de *primer*, 1 µL de H₂O ultrapura autoclavada e 2 µL de Mix (integrante do kit).

No termociclador, a reação passou por 40 ciclos de amplificação, apresentando três etapas, a primeira a uma temperatura de 95 °C por 10 s, a segunda a 53 °C ou 52,3 °C (dependendo do *primer*) por 15 s e a terceira a 60 °C por 100 s. As temperaturas utilizadas para os *primers* nessa reação são as

mesmas da reação de amplificação. Posteriormente, os produtos provenientes dessa amplificação foram sequenciados no seqüenciador MegaBace DNA Analysis System 1000 (Amersham & Life Science).

3.6. Análises filogenéticas

As seqüências foram alinhadas com auxílio do programa ClustalW, implementado no programa BioEdit (Hall, 1999), seguido de ajustes manuais quando necessários. Ressalta-se que a seqüência final de cada indivíduo foi resultado da análise de seis seqüências, sendo três oriundas do *primer forward* e três do *reverse*.

De posse da matriz, construiu-se uma árvore utilizando o agrupamento de vizinhos (NJ – *neighbor-joining*) (Saitou & Nei, 1987), baseado no modelo de Jukes & Cantor (1969), no programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versão 1.02 (Kumar et al., 1993). Adicionalmente, procedeu-se à análise filogenética, feita pelo método da máxima parcimônia implementado no programa MEGA (Hall, 1999).

4. RESULTADOS

Foram obtidos produtos de amplificação e seqüências do íntron *trnL* para todos os indivíduos de *Dalbergia* analisados. A partir do alinhamento múltiplo das seqüências provenientes dessa região, foi produzida uma matriz com 530 caracteres. Os comprimentos dos fragmentos seqüenciados entre as espécies de *Dalbergia* estudadas variaram de 506 a 513 pb.

O conteúdo A-T teve pequena variação entre as espécies estudadas tendo encontrado 65,8% em *D. decipularis*, 66,7% em *D. ecastaphyllum*, 67,3% em *D. glaucescens*, 66,6% em *D. miscolobium* (Bahia) e 66,4% em *D. miscolobium* (Minas Gerais), 66,7% em *D. nigra*. Os diferentes tratamentos para os *indels* nas análises demonstraram que eles não influenciaram na topologia dos dendrogramas nem nos resultados do estudo.

Após a exclusão dos caracteres invariáveis, foram obtidos 75 sítios variáveis dos quais 37 foram informativos para a análise de parcimônia. O índice de divergência entre as seqüências oriundas das espécies de *Dalbergia* variou de 1,2% a 6,9%. Entretanto, entre *D. nigra* e *D. miscolobium*, espécies consideradas vicariantes, esse índice de divergência foi de 3%, sendo igual ou superior ao de outras espécies bem definidas dentre as *Dalbergia* analisadas neste trabalho. As análises indicam a existência de variações intra e inter-populacionais em *D. miscolobium*, no entanto, há a necessidade de um estudo mais específico para uma inferência mais segura a esse respeito.

As análises filogenéticas utilizando os métodos de *neighbor-joining* e máxima parcimônia produziram resultados similares entre si (Figuras 3 e 4). A divergência genética estimada por *neighbor-joining* reproduz claramente a distância genética entre *D. nigra* e *D. miscolobium* (Figura 3). O cladograma, consenso estrito (Figura 4), construído com base na máxima parcimônia, apresenta uma topologia com clados bem definidos, agrupando os indivíduos de mesma espécie. Os clados que representam *D. nigra* e *D. miscolobium* estão separados, indicando que essas espécies não são vicariantes. Adicionalmente, novas hipóteses podem ser inferidas, como a relação entre *D. nigra* e *D. ecastaphyllum*, as quais formaram um clado bem suportado caracterizando uma estreita relação entre estas duas espécies. Um clado

exclusivo de *D. miscolobium* foi obtido, indicando a separação dos indivíduos oriundos dos estados da Bahia e de Minas Gerais.

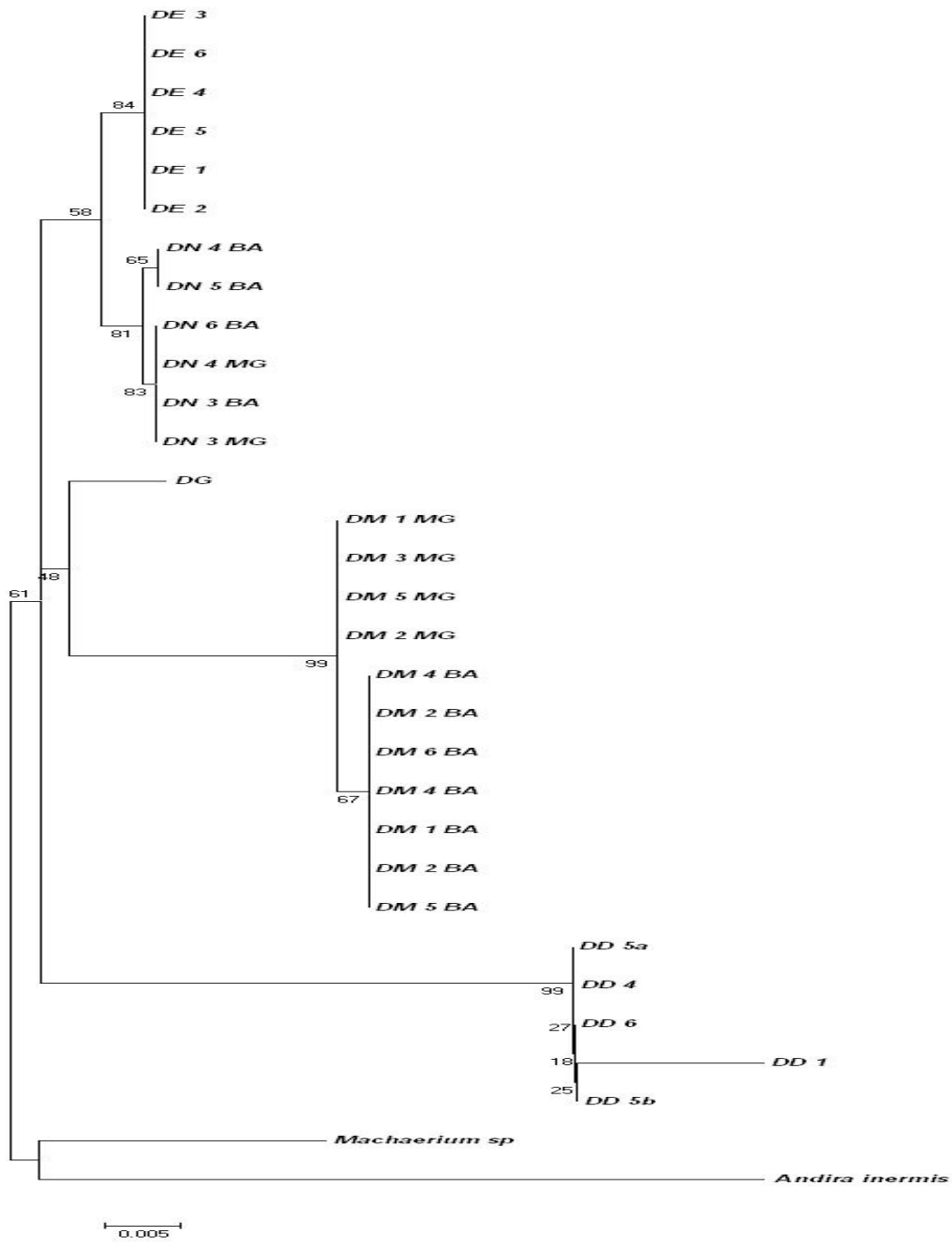


Figura 3. Árvore representativa da dissimilaridade genética entre indivíduos de *Dalbergia*, obtida pelo método de agrupamento de vizinhos. Os números ao longo dos ramos representam os valores de *bootstrap* calculados em 10,000 replicações. (*Dalbergia decipulares* (DD); *Dalbergia nigra* Bahia e Minas Gerais (DN BA e DN MG); *Dalbergia miscolobium* Bahia e Minas Gerais (DM BA e DM MG); *Dalbergia ecastaphyllum* (DE); *Dalbergia glaucescens* (DG)).

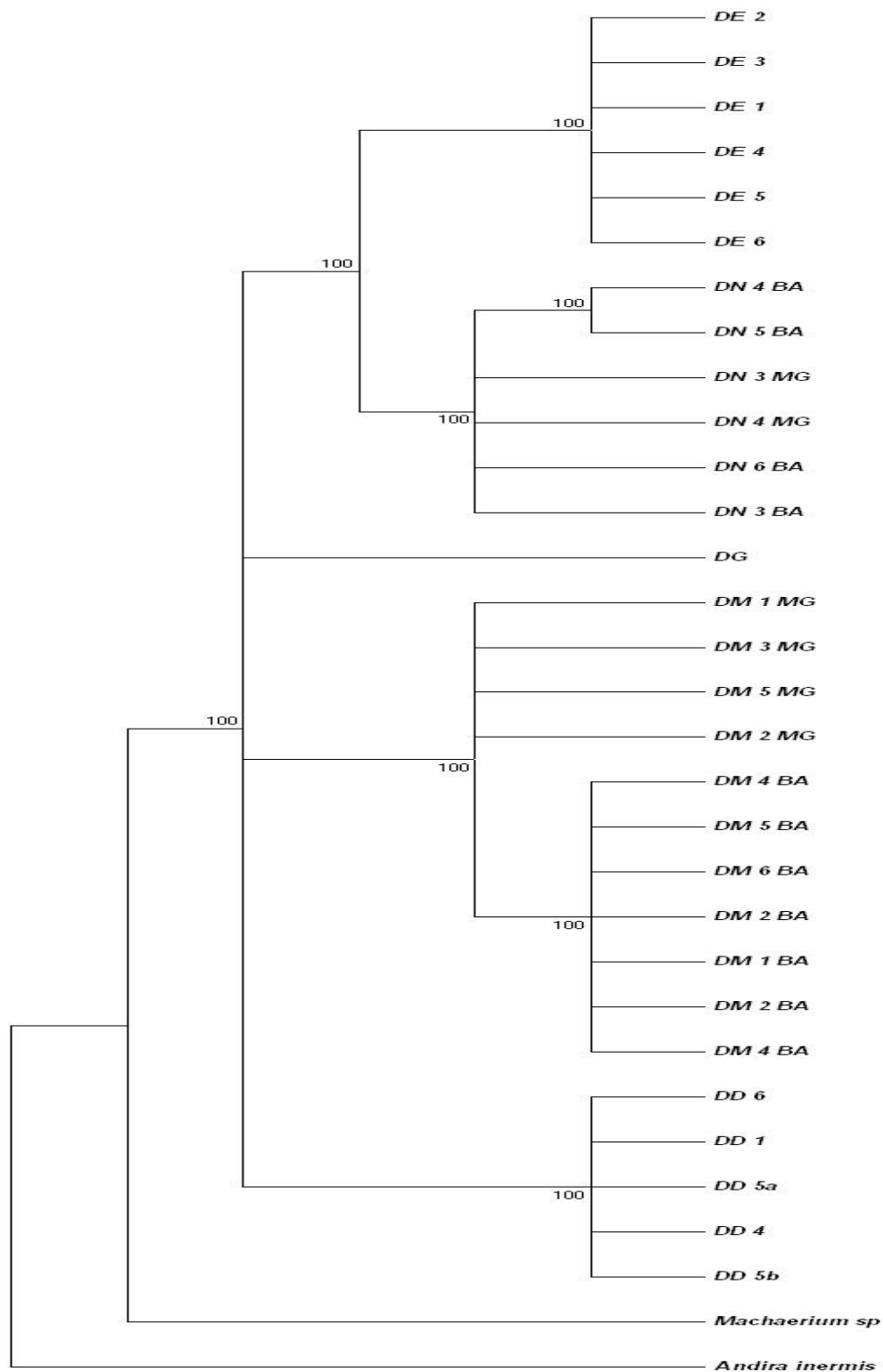


Figura 4. Árvore de consenso estrito das 399 árvores mais parcimoniosas das seqüências do íntron *trnL* para as espécies de *Dalbergia*, incluindo os indels. Os números ao longo dos ramos representam os valores de *bootstrap* calculados em 10,000 replicações (CI = 0,91; RI = 0,96). *Dalbergia decipulares* (DD); *Dalbergia nigra* Bahia e Minas Gerais (DN BA e DN MG); *Dalbergia miscolobium* Bahia e Minas Gerais (DM BA e DM MG); *Dalbergia ecastaphyllum* (DE); *Dalbergia glaucescens* (DG).

5. DISCUSSÃO

Os comprimentos dos fragmentos de DNA obtidos com os *primers* selecionados para a região do íntron *trnL*, para as espécies de *Dalbergia* apresentaram similaridade aos observados em outras Leguminosae (Taberlet et al., 1991). A riqueza do conteúdo A-T observado nas sequências analisadas neste trabalho é reflexo da região do cloroplasto selecionada, uma vez que seqüências não-codificantes tendem a ser mais ricas em A-T. Os dados obtidos foram similares a estudos anteriores que abordaram regiões de íntron, onde o conteúdo A-T foi superior ao G-C (Palmer, 1991; Small et al., 1998). A presença de *indels* nos dados oriundos do *trnL* em *Dalbergia* também era esperada pois, segundo Golenberg et al. (1993); Gielly & Taberlet (1994) e Small et al. (1998) seqüências não-codificantes geralmente acumulam *indels* e substituições nucleotídicas em taxas mais elevadas que regiões codificantes.

Rizzini (1963) estudou 45 pares de espécies vicariantes na flora do cerrado, incluindo *D. nigra* e *D. miscolobium*. Segundo esse autor, tal vicariância indicaria que a flora arbórea do Cerrado evoluiu *in loco* a partir de outras floras silvestres, porém, mais úmidas. Apesar da hipótese de vicariância entre essas duas espécies ter sido corroborada por Gottlieb (1964), persistem lacunas acerca da sistemática dessas espécies. Carvalho (1997) redefiniu o gênero *Dalbergia* em cinco seções que podem ser sistematizadas por meio das características da inflorescência e do fruto. A seção *Dalbergia* (*D. nigra*, *D. miscolobium*, *D. foliolosa*, *D. glaucescens* e *D. acuta*) é caracterizada por sua inflorescência do tipo panícula, fruto oblongo e nervura reticulada. Apesar da clara relação taxonômica entre *D. nigra* e *D. miscolobium*, sendo posicionadas em uma mesma seção, Carvalho (1997) não tratou estas duas espécies como vicariantes. Assim, pode-se inferir que as informações fornecidas pelos trabalhos de quimiotaxonomia e morfologia nem sempre são satisfatórias para a reconstrução das relações filogenéticas uma vez que persistem discordâncias na sistemática das espécies.

Os processos e o tempo evolutivo necessários para o surgimento de novas espécies não são facilmente definidos. No entanto, a aplicação de técnicas moleculares tem ajudado na identificação das taxas de especiação e no modo

pelo qual os fatores ecológicos, geográficos, e temporais influenciaram nessas taxas de especiação no tempo (Wojciechowsk et al., 2004).

Uma possível explicação para a existência de espécies de difícil distinção morfológica, como *D. nigra* e *D. miscolobium*, poderia incluir processos de radiação recente. Essas espécies ocorrem na Bahia, região que sofreu grande influência na formação de sua flora pelos ciclos de glaciação do quaternário, período em que as Leguminosae já eram proeminentes na flora da Bahia (Lima et al. 2002).

Segundo a hipótese do "modelo glacial cíclico", instabilidades recentes no clima conduziram a expansões e retrações das florestas tropicais e especiação alopátrica por diferenciação das populações em refúgios separados. Ainda, os mesmos autores, no estudo das relações filogenéticas entre espécies de *Inga*, sugeriram que houve recente diversificação do gênero associada aos ciclos glaciais quaternários.

Na presente análise, baseada na sequência da região do íntron *trnL*, foi encontrada acentuada divergência genética entre *D. nigra* e *D. miscolobium*. Distâncias similares ou inferiores foram observadas entre as outras espécies bem definidas de *Dalbergia* inclusas no estudo. Assim, essa divergência em níveis moleculares sugere a presença de táxons distintos (Figura 3).

Corroborando e proporcionando uma maior confiabilidade, a filogenia baseada no íntron *trnL* acerca das relações entre *D. nigra* e *D. miscolobium* foi consistente com as evidências morfológicas descritas por Carvalho (1997). Nesse sentido, o cladograma de consenso estrito (Figura 4) ratifica que tratam-se de espécies distintas, uma vez que foram agrupados os indivíduos de mesma espécie em clados, assim como, os clados foram formados com alto suporte para as respectivas espécies. Em nenhuma das análises realizadas nesse estudo foi verificado algum posicionamento dos indivíduos inclusos na análise que indicasse vicariância.

A inclusão dos *indels* em análises de parcimônia, em outros estudos, caracterizou essa região como uma ferramenta interessante e eficiente, contribuindo na melhor resolução dos cladogramas (Lee & Wen, 2004) no estudo do gênero *Panax*, bem como Haston et al. (2005) no estudo do grupo *Peltophorum* - Caesalpinioideae. No entanto, no presente estudo, a inclusão dos *indels* na análise de parcimônia não alterou os resultados, nem ofereceu uma

melhor resolução, indicando, serem desnecessárias mudanças na atribuição de peso dessas regiões.

Adicionalmente, os táxons restantes incluídos na presente análise possibilitaram testar as relações entre espécies de pelo menos três das cinco seções de *Dalbergia*. Uma discussão mais detalhada das seções pode ser encontrada em Carvalho (1997). Não obstante, é interessante notar a hipótese alternativa da relação entre *D. nigra* e *D. ecastaphyllum*, uma vez que em trabalhos baseados em morfologia essas espécies pertencem a distintas seções (Carvalho, 1997). Anteriormente havia sido proposta a existência de um padrão evolutivo em *Dalbergia* como base em morfologia comparativa (Carvalho, 1989). Contudo, um clado bem fundamentado, com base nas seqüências do íntron *trnL*, incluiu essas duas espécies (Figura 4). Talvez, essa informação obtida no presente estudo seja reflexo do baixo número de táxons envolvidos na análise. No entanto, isso indica a necessidade de mais estudos a cerca do gênero *Dalbergia*, e talvez, uma revisão das seções existentes.

Os resultados do presente trabalho, indicaram a existência de acentuadas variações genéticas nas populações de *D. miscolobium* da Bahia e de Minas Gerais. Essas variações encontradas entre as populações podem estar ligadas a fragmentação do bioma o que provoca a diminuição do número de indivíduos de uma população, favorecendo à perda de variação genética. A população remanescente passa a ter um tamanho menor que o mínimo adequado para que ela possa ter sua continuidade normal e evolução. Nessa pequena população pode ocorrer, em curto prazo, deriva genética, o que significa que as freqüências de seus genes irão diferir daquelas da população original, inclusive chegando à perda de alelos. A longo prazo, pode ainda haver um aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e cruzamentos entre indivíduos aparentados (Kageyama,1998). Esses dados podem estar indicando a formação de subespécies ou espécies dentro de *D. miscolobium*, sugerindo um estudo mais detalhado a cerca da evolução desse grupo.

No presente estudo, utilizando ferramentas moleculares, foi possível confirmar as observações feitas por Carvalho (1997), com base em caracteres morfológicos. Ambos os estudos negam a hipótese de vicariância entre *D. nigra* e *D. miscolobium*. Nossos dados confirmam a utilidade do íntron *trnL* no estudo inter-específico de *Dalbergia*. Estudos moleculares com outra região genômica

estão em desenvolvimento em nosso laboratório. Caso os resultados dessas análises reafirmem os resultados aqui obtidos, teremos demonstrado de modo mais contundente que *D. nigra* e *D. miscolobium* são espécies distintas e não vicariantes.

6. CONCLUSÃO

- A região do íntron *trnL* de cloroplasto pode ser utilizada para auxiliar nas soluções ligadas às questões filogenéticas espécies vegetais próximas como *D. nigra* e *D. miscolobium*.
- A análise da sequência da região *trnL* nega a hipótese inicial que as espécies *D. nigra* e *D. miscolobium* são vicariantes, indicando o tratamento destas como espécies distintas.
- Os dendrogramas obtidos com base na análise das seqüências da região *trnL* apresentam topologias consistentes.
- Estudos adicionais envolvendo outras regiões do genoma devem ser conduzidos para confirmar os resultados aqui obtidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C.A.S.; BONVICINO, C.R.; LACHTERMACHER, M.; MOREIRA, M.A.M.; OLÍCIO, R.; SEUÁNEZ, H.N. Técnicas de avaliação da diversidade genética. In: GARAY, I.; DIAS, B. (eds). **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis: Vozes, p. 268-294. 2001.
- ALMEIDA, M.P. **Avaliação da diversidade genética de acessos *ex situ* de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* Vell. Allemão ex Benth.) por meio de marcadores RAPD como subsídio para sua conservação**. 2001. 56 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2001.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: **EMBRAPA – CPAC**. 1998.
- AMORIM, D.S. **Elementos Básicos de Sistemática e Filogenia**. 2a ed., Ribeirão Preto: Holos e SBE, 276 p. 1997.
- AMORIM, D.S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto: Holos, 156 p. 2002.
- BECKERT, A.; THEIBEN, G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 29, p. 464-489, 2003.
- BENNETT, M.D., BHANDOL, P.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses - 807 new estimates. **Annals of Botany**. v. 86, p. 859-909, 2000.
- BIRKY, C.W. Uniparental inheritance of mitochondria and chloroplast genes: mechanisms and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 92, p. 11331-11338, 1995.
- BIRKY, C.W. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplast: laws, mechanisms, and models. **Annual Review of Genetics**. v. 35, p. 125-148, 2001.
- BORÉM, A. e VIEIRA, M. L. C. **Glossário de Biotecnologia**. Ed. Folha de Viçosa, p.183. 2005.
- BROUAT, C.; GIELLY, L.; MCKEY, D. Phylogenetic relationships in the genus *Leonardoxa* (Leguminosae: Caesalpinioideae) inferred from chloroplast *trnL* intron and *trnF* intergenic spacer sequences. **American Journal of Botany**. v. 88, p. 143-149, 2001.
- BRUNEAU, A.; BRETELER F.J.; WIERINGA, J.J.; GERVAIS, G. Y. F.; FOREST, F. Phylogenetic relationship in tribes Macrolobieae and Detarieae

- as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. In: Herendeen PS, Bruneau A (eds) **Advances in Legume Systematics 9**. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 121-149, 2000.
- BRUNEAU, A.; FOREST, F.; HERENDEEN, P.S.; KLITGAARD, B.B.; LEWIS, G.P. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. **Systematic Botany**. v. 26, p. 487–514, 2001.
- CAIN, M.L.; MILLIGAN, G.; STRAND, A.E. Long-distance seed dispersal in plant populations. **American Journal of Botany**. v. 87, p. 1217-1218, 2000.
- CARVALHO, A. M. de. **Systematics studies of the genus *Dalbergia* L. f. in Brazil**. 1989. Tese (Ph.D.). Reading (UK): University of Reading, 1989.
- CARVALHO, A. M. de. Os Jacarandás da Bahia. **Agrotropica**. v.2, n.1, p.1-10, 1990.
- CARVALHO, A. M. de. The genus *Dalbergia* L. f. in Bahia, Brazil. **Herbarium, CEPEC Cocoa Research Center**. CP 7, p.6 – 17, 1992.
- CARVALHO, A. M. de. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. **Brittonia**. v. 49, n. 1, p. 87-109, 1997.
- CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics**. v. 19, p. 233-257, 1967.
- CHASE, M.W.; SOLTIS, D.E.; OLMSTEAD, R.G.; MORGAN, D.; MISHLER, B.D.; DUVALL, M.R.; PRICE, R.A.; HILLS, H.G.; QIU, Y.-L.; KRON, K.A.; RETTIG, J.H.; CONTI, E.; PALMER, J.D.; MANHART, J.R.; SYTSMA, K.J.; MICHAELS, H.J.; KRESS, W.J.; KAROL, K.G.; CLARK, W.D.; HEDREN, M.; GAUT, B.S.; JANSEN, R.K.; KIM, K.-J.; WIMPEE, C.F.; SMITH, J.F.; FURNIER, G.R.; STRAUSS, S.H.; XIANG, Q.-Y.; PLUNKETT, G.M.; SOLTIS, P.S.; SWENSEN, S.M.; WILLIAMS, S.E.; GADEK, P.A.; QUINN, C.J.; EGUIARTE, L.E.; LES, D.H.; GOLENBERG, E.; LEARNGRAHAM, G.H.J.; BARRETT, S.W.; DAYANANDAN, S.C.H.; ALBERT, V.A.S. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 80, p. 528-580, 1993.
- CHEN, H.; SUN, M. Consensus multiplex PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) for rapid detection of plant mitochondrial DNA polymorphism. **Molecular Ecology**. v.7, p.1553-1556, 1998.
- CORRÊA, R. X.; ABDELNOOR, R. V.; FALEIRO, F. G.; CRUZ, C. D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**. v. 58, n.1, 15-23. 1999.

- DEMASURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R.J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**. v. 4, p. 129-131, 1995.
- DOMBROVSKA, O.; QIU, Y.-L. Distribution of introns in the mitochondrial gene *nad1* in land plants: phylogenetic and molecular evolutionary implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 32, p. 246-263, 2004.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v. 12, n. 1, p.13-15, 1990.
- DOYLE, J.J. DNA data and Legume Phylogeny: A progress report. In: CRISP, M.; DOYLE, J.J. (eds). **Advances in Legume Systematics 7**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 11-30, 1995.
- DOYLE, J.J.; CHAPPILL, J.A.; BAILEY, D.C.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 9**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 1-20. 2000.
- DOYLE, J.J.; LUCKOW, M.S. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**. v. 131, p. 900-910, 2003.
- DUMINIL, J.; PERNONGE, M.H.; PETIT, R.J. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plants mitochondrial DNA. **Molecular Ecology Notes**. v. 2, p. 428-430, 2002.
- ECK, R.V.; DAYHOFF, M.O. **Atlas of protein sequence and structures**. Silver Springs: National Biomedical Research Foundation, 1967.
- EGUIARTE, L.E.; CASTILLO, A.; SOUZA, V. Evolución molecular y genómica en angiospermas. **Interciencia**. v. 28, n. 3, p. 141-147, 2003.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**. v. 17, p. 368-376, 1981.
- FELSENSTEIN, J. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. **Annual Reviews Genetics**. v. 22, p. 521-565, 1988.
- FREUDENSTEIN, J.V.; CHASE, M.W. Analysis of mitochondrial *nad1c-c* intron sequences in Orchidaceae: utility and coding of length-changes characters. **Systematic Botany**. v. 26, p. 643-657, 2001.
- GIELLY, L.; TABERLET, P. The Use of Chloroplast DNA to Resolve Plant Phylogenies: Noncoding versus *rbcL* Sequences. **Molecular Biology and Evolution**. v. 11, n. 5, p. 769-777, 1994.

- GIELLY, L.; YUAN, Y-M; KUPFER, P.; TABERLET, P. Phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: chloroplast *trnL* (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.5, n.3, p.460-466, 1996.
- GIVNISH, T.J. The rise and fall of plant species: a population biologist's perspective. **American Journal of Botany**. v. 88, p. 1928-1934, 2001.
- GOLENBERG, E.M., CLEGG, M.T.; DURBIN, M.L.; DOEBLEY, J.; MA, D.P. Evolution of a noncoding região of the chloroplast genome. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 2, p. 52-64, 1993.
- GOTTLIEB, O. R. The occurrence of (S)-dalbergione in *Dalbergia violacea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 36, p.31-32, 1964.
- GRANT, V. **Plant speciation**. New York: Columbia University Press. 435 p. 1971.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**. v.137, p. 1121-1137, 1994.
- GRAUR, D.; LI, W.H. **Fundamentals of Molecular Evolution**. 2a ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 481 p. 2000.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**. v. 41, p. 95-98, 1999.
- HASTON, M.E., LEWIS, G.P. & HAWKINS, J.A. A phylogenetic reappraisal of the *Peltophorum* group (Caesalpinieae: Leguminosae) based on the chloroplast *trnL-F*, *rbcl* and *rps16* sequence data. **American Journal of Botany**. v. 92, n. 8, p. 1359-1371, 2005.
- HENNING, W. **Phylogenetic systematics**. Urbana: University of Illinois Press, 263 p. 1966.
- HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A.; LEWIS, G.P. Phylogenetic relationships in caesalpinoid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data. In: KLITGAARD, B.B.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 37-62. 2003.
- HERENDEEN, P.S.; LEWIS, G.P.; BRUNEAU, A. Floral morphology in caesalpinoid legumes: testing the monophyly of the 'Umtiza clade'. **International Journal of Plant Sciences**. v. 164, p. 393-407, 2003.
- HOLT, S.D.S.; HOROVA, L.; BURES, P. Indel patterns of the plastid DNA *trnL-trnF* region within the genus *Poa* (Poaceae). **Journal of Plant Research**. v.117, p. 393-407, 2004.

- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J.P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**. v. 294, p. 2310-2314, 2001.
- IBAMA. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçada de extinção. Disponível em <http://www2.ibama.gov.br/flora/extinção.htm> acessado em 18/06/08.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant Systematics a Phylogenetic Approach**. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 464 p. 1999.
- JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N. (ed). **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, p. 21-132. 1969.
- KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F. B. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**. v.12, n.32, p.65-70, 1998.
- KAUFMANN, K.; MELZER, R.; THEIBEN, G. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. **Gene**. v. 347, p. 183-198, 2005.
- KELCHNER, S.A. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 87, p. 482-498, 2000.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. **MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.02**. Pennsylvania: Institute for Molecular Evolutionary Genetics, Penn State University, University Park., 1993.
- LAVIN, M.; PENNINGTON, R. T; KLITGARD, B. B.; SPRENT, J.I.; LIMA, H.C. de; GASSON, P.E. The dalbergioid legumes (Fabaceae): Delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**. v. 88, n. 3, p. 503-533, 2001.
- LEE, C.; WEN, J. Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC-trnD intergenic region and the utility of trnC-trnD in interspecific studies of plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 31, p. 894-903, 2004.
- LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D. Leguminosae or Fabaceae? In: KLITGAARD, B.B.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 1-3. 2003.
- LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 577 p. 2005.

- LIMA, H.C.; LEWIS, G.P.; BUENO, E. Pau-brasil: uma biografia. In: BUENO, E. et al. (eds). **Pau-Brasil**. São Paulo: Axis Mundi, 39-76 p. 2002.
- LLEDÓ, M.D.; CRESPO, M.B.; FAY, M.F.; CHASE, M.W. Molecular phylogenetics of *Limonium* (Plumbaginaceae): Biogeographical and systematic implications. **American Journal of Botany**. v. 92, p. 1189-1198, 2005.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Lorenzi, Harri (Ed.). Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 368p. 1992.
- LUCKOW, L.; MILLER, J.T.; MURPHY, D.J.; LIVSHULTZ, T. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In: KLITGAARD, B.B.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 197-220. 2003.
- LUCKOW, M.; FORTUNATO, R.H.; SEDE, S.; LIVSHULTZ, T. The phylogenetic affinities of two mysterious monotypic mimosoids from Southern South America. **Systematic Botany**. v.30, n.3, p.585-602, 2005.
- MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 153-161. 2001.
- MCPMAHON, M.; HUFFORD, L. Phylogeny of *Amorpheae* (FABACEAE: PAPILIONOIDEAE). **American Journal of Botany**. v. 91, n. 8, p. 1219-1230, 2004.
- MES, T.H.; KUPERUS, P.; KIRSCHNER, J.; STEPANEK, J.; OOSTERVELD, P.; STORCHOVA, H.; den NIJS, J.C. Hairpins involving both inverted and direct repeats are associated with homoplasious indels in non-coding chloroplast DNA of *Taraxacum* (Lactuceae: Asteraceae). **Genoma**. v. 43, p. 634-641, 2000.
- MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A. de M.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 97-107, 2001.
- MUSCHNER, V.C.; LORENZ, A.P.; CERVI, A.C.; BONATTO, S.L.; SOUZA-CHIES, T.T.; SALZANO, F.M.; FREITAS, L.B. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**. v. 90, p. 1229-1238, 2003.
- MUSE, S.V. Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. **Plant Molecular Biology**. v. 42, p. 25-43, 2000.
- NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 82-96. 2001.

- NEI, M.; KUMAR, S.; TAKAHASHI, K. The optimization principle in phylogenetic analysis tend to give incorrect topologies when the number of nucleotides or aminoacids is small. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 95, p. 12390-12397, 1998.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, 333 p. 2000.
- PALMER, J.D. Plastid chromosomes: structure and evolution. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. v. 7A, p. 5-53, 1991.
- PALMER, J.D. Mitochondrial DNA in plant systematics applications and limitations. In: SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; DOYLE, J.J. (eds). **Molecular systematics of plants**. New York: Chapman and Hall, p. 36-49. 1992.
- PALMER, J.D.; DELWICHE, C.F. The origin and evolution of plastids and their genome. In: SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; DOYLE, J.J. (eds). **Molecular systematics of plants II**. DNA sequencing. Boston: Kluwer, EEUU, p. 375-408. 1998.
- PALMER, J.D.; HERBON, L.A. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. **Journal of Molecular Evolution**. v. 27, p. 87-97, 1988.
- PENNINGTON, R.T.; LAVIN, M.; IRELAND, H.; KLITGAARD, B.; PRESTON, J.; HU, J-M. Phylogenetic relationships of basal papilionoid legumes based upon sequences of the chloroplast *trnL* intron. **Systematic Botany**. v.26, n.3, p.537-556, 2001.
- PEREIRA, B. A. da S. **Estudo morfo-anatômico da madeira, casca e folha de duas variedades vicariantes de *Sclerobium paniculatum* Vogel (Leguminosae, Caesalpinioideae) de Mata e Cerrado**. Viçosa, MG: UFV, Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade Federal de Viçosa. 192p. 1990.
- PEREIRA, S.L.; MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A. de M. Reconstrução filogenética. Método probabilístico. In: MATIOLI, S.R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p.117-129. 2001.
- RIZZINI, C. T. **A flora do cerrado**. In: Simpósio sobre o Cerrado. Editora da Universidade de São Paulo, p. 125-177, 1963.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. Manual de Dendrologia Brasileira. E. Blucher, São Paulo, 294 p. 1971.
- ROUT, G. R.; BHATACHARYA, D.; NANDA, R.M.; NAYAK, S.; DAS, P. Evaluation of genetic relationships in *Dalbergia* species using RAPD markers. **Biodiversity and Conservation**. v. 12, n. 2, p. 197-206, 2003.

- RUSSO, C.A.M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S.R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p. 130-136. 2001.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 184-204, 1987.
- SALAMIN, N.; HODKINSON, T.R.; SAVOLAINEN, V. Towards building the tree of life: a simulation study for all angiosperm genera. **Systematic Biology**. v. 54, p. 183-196, 2005.
- SCHAAL, B.A.; OLSEN, K.M. Gene genealogies and population variation in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 97, p. 7024-7029, 2001.
- SCHNEIDER, H. **Métodos de Análise Filogenética um guia prático**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.
- SILVA, L. F. da; MENDONÇA, J.R. Mata Atlântica do Sudeste da Bahia: Interação Ambiental e Deterioração do Ecossistema. **Especiaria**. Ano I, no. 2, jul/dez, p.153-176. 1998.
- SIMPSON, B.B.; LARKIN, L.L.; WEEKS, A. Progress towards resolving the relationships of the *Caesalpinia* group (Caesalpinieae: Caesalpinioideae: Leguminosae). In: KLITGAARD, B.B.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 123-148. 2003.
- SMALL, R.L.; RYUBURN, J.A.; CRONN, R.C.; SEELAND, T.; WENDEL, J.F. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. **American Journal of Botany**. v. 85, n. 9, p. 1301-1315, 1998.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; ENDRESS, P.K; CHASE, M.W. **Phylogeny and Evolution of Angiosperms**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts U.S.A, 370 p. 2005.
- SPRENT, J.I. **Nodulation in legumes**. London: Royal Botanical Gardens, Kew, 146 p. 2001.
- STACE, C.A. Hybridization and the plant species. In: Urbanska, K.M., (ed). **Differentiation patterns in higher plants**. New York: Academic Press, p 115-127. 1987.
- STEBBINS, G.L. **Variation and evolution in plants**. New York: Columbia University Press, 1950.

- SWOFFORD, D. L., OLSEN, G. J., WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. In: HILLIS, D. M., MORITZ, C. & MABLE, B. K. (eds.). **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 407-514, 1996.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**. v. 17, p. 1105-1109, 1991.
- TUCKER, S.C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**. v. 131, p. 911-926, 2003.
- VARTY, N. 1998. *Dalbergia nigra*. In: IUCN 2007. 2007 **IUCN Red List of Threatened Species**. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 December 2007.
- WALBOT, V.; CULLIS, C.A. Rapid genomic change in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 36, p. 367-396, 1985.
- WHITHAM, T.G.; MARTINSEN, G.D.; FLOATE, K.D.; DUNGEY, H.S.; POTTS, B.M.; KEIM, P. Plant hybrid zones affect biodiversity: tools for a genetic-based understanding of community structure. **Ecology**. v. 80, n. 2, p. 416-428, 1999.
- WISSINGER, B., SCHUSTER, W.; BRENNICKE, A. Trans splicing in *Oenothera* mitochondria: nad1 mRNAs are edited in exon and trans-splicing group II intron sequences. **Cell**. v. 65, p. 473-482, 1991.
- WOJCIECHOWSKI, M.F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In: KLITGAARD, B.B.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 5-35. 2003.
- WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M.J. A Phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid Matk gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**. v. 91, n.11, p. 1846-1862, 2004.