



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS DE PATOS - PB

**ESTUDO *IN SÍLICO* DA EVOLUÇÃO MOLECULAR DA SUBFAMÍLIA
MIMOSOIDEAE (FABACEAE) POR MEIO DE MARCADORES 18S e *rbcL***

TÁSSIA LAICYA VIEIRA DE SOUZA

PATOS – PB,

2011

TÁSSIA LAICYA VIEIRA DE SOUZA

**ESTUDO *IN SÍLICO* DA EVOLUÇÃO MOLECULAR DA SUBFAMÍLIA
MIMOSOIDEAE (FABACEAE) POR MEIO DE MARCADORES 18S E *rbcL***

Trabalho de conclusão de curso
Apresentado a Unidade Acadêmica de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Campina Grande, como
requisito para o título de graduada em
Licenciatura em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO ALVES SOARES

PATOS – PB,
2011



Biblioteca Setorial do CDSA. Agosto de 2022.

Sumé - PB

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

S729e

2011

Souza, Tássia LaicyaVieira de

Estudo *in Silico* da evolução Molecular da Subfamília
Mimosoideae (Fabaceae) por meio de marcadores 18S e *rbcL*. /
Tássia LaicyaVieira de Souza. - Patos - PB: UFCG/UACB, 2011.
42f.

Inclui Bibliografia.

Orientador (a): Carlos Eduardo Alves Soares.

(Graduação em Licenciatura em Ciências Biológica). Centro de
Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina
Grande.

1 - Filogenia – Monografia. 2 – Fabaceas. 3 – Marcadores
moleculares. 4- Genética vegetal. I – Título.

CDU: 575.86

TÁSSIA LAICYA VIEIRA DE SOUZA

**ESTUDO *IN SÍLICO* DA EVOLUÇÃO MOLECULAR DA SUBFAMÍLIA
MIMOSOIDEAE (FABACEAE) POR MEIO DE MARCADORES 18S E *rbcL***

Aprovado em: ____ / ____ / 2011

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Eduardo Soares – Orientador

Universidade Federal de Campina Grande

Prof.^a. Dr.^a. Márcia Almeida de Melo

Universidade Federal de Campina Grande

Prof. MSc. Jair Moises de Sousa

Universidade Federal de Campina Grande

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Valdemar Tude e a Ana Rita. E as minhas irmãs Tudeana e Tacyana.

Agradecimentos

Ao meu adorável Deus, que me deu e continua me dando o dom da vida, como também todas as oportunidades de lutar por ela e torná-la a cada dia melhor, me dando força e determinação para vencer todos os obstáculos. Senhor te amo.

Ao meu professor e orientador Carlos Eduardo Alves Soares que inicialmente me aceitou como sua orientanda, que nesse tempo confiou em mim e me ajudou a ir além das minhas limitações, me ajudando a crescer e amadurecer diante dos meus conhecimentos científicos. Agradeço também pelo estágio na Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN; Natal-RN.

Aos professores João Paulo e João Filipe que me acolheram no Laboratório de Glicobiologia, Departamento de Bioquímica da UFRN, e em especial a João Paulo que me deu a oportunidade de desenvolver inicialmente o meu projeto de monografia em seu laboratório junto com o seu aluno Taffarel Torres. Agradeço também a Erika, Ivanice, Gabi, João Paulo e Ricardo, obrigada por terem me acolhido tão bem no laboratório.

A todos os docentes da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, especialmente a professora Graça Marinho que foi como uma mãe para todos os alunos, ajudando-nos e incentivando-nos. E também ao professor Fernando Zanella por todo o apoio.

Agradeço também a disponibilidade da banca – Márcia Mello, Carlos Eduardo e Jair Moises.

A minha querida mãe Ana Rita, uma pessoa singular, que sempre me ensinou que é necessário batalhar, mas que também me deu todas as oportunidades cabíveis a ela. Mainha obrigada por acreditar em mim e por sempre me ajudar a escolher o melhor. Ao meu querido pai Valdemar Tude, obrigada, pois de você herdei a paciência e honestidade, características que são essências para se viver melhor nesse mundo. Orgulho-me de ser filha de vocês. Amo vocês.

A minha irmã Tudeana que na maioria das vezes também é uma mãe, uma pessoa altamente bondosa e inteligente, agradeço a você por todo o seu apoio em todos os sentidos. Obrigada minha querida irmã aqui cheguei graças a você também. Tenho que agradecer também ao meu cunhado Fábio Kioshy pelos bons momentos de descontração e pelos extras. Valeu Ki. Amo vocês.

A minha irmã Tacyana por sua alegria de viver e por ter me dado um sobrinho tão lindo, Fábio Filho, por intermédio do qual eu tenho momentos tão especiais de boas risadas. Amo vocês.

Ao meu namorado Jefferson, inicialmente obrigada por sua sinceridade ela me ajuda a crescer. Obrigada também por sua compreensão quando precisei ficar ausente nesse tempo de vida acadêmica e especialmente agora no final de curso. É muito bom está com você e ter você para dividir meus dias bons e ruins. Te amo.

Cicinho, Marta, Jeddson e Vitória, sei que torcem por minhas conquistas e que também são responsáveis por cada uma que alcanço. Amo vocês.

As minhas tias: Norma, Neuma, Neusa, Adriana e Elza, obrigada pela confiança e amor. Em especial a tia Dida por ter me alfabetizado e a tia Norma obrigada por ter emprestado para mim o seu notebook, o que seria da minha monografia sem ele?! Amo vocês.

Obrigada Albenes por ser essa pessoa que também me ajudou a chegar até aqui. Obrigada por todo o seu apoio e crença em mim. Amo você.

A todos os meus primos (Jéssyka, Ayssa, Anderson, Laiane, Ana Clara, Carol, Lucas e Haninha). Em especial a Kekinha, pelos inúmeros favores prestados a mim. Amo vocês.

As minhas amigas: Izabella, Joyce, Andrea, Débora, Rafinha e Rita de Cássia, vocês que tornam meus dias bem melhores e que me dão suporte quando preciso, isso acontece sempre. Amo vocês.

A minha amiga de Curso Manoella. Manu valeu por todo o seu apoio e incentivo. Obrigada por sua bondade, sinceridade e disponibilidade. Tenho sorte de ter você como amiga. Amo você.

Nega Cammila obrigada pelos os bons momentos de conversas e obrigada por confiar em mim.

Danniely obrigada pelo auxílio na elaboração do meu trabalho e também pela companhia no estágio em Natal-RN.

Agradeço também aos demais colegas de turma pelos bons momentos e por tudo que superamos juntos.

Muito obrigada!

“A ciência incha,
mas o amor edifica.
Se alguém pensa que sabe
alguma coisa, de fato
ainda não sabe tanto quanto
deveria saber”

Paulo (I Coríntios, 8:1-2)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.....	14
1.INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Fabaceae: Aspectos botânicos e filogenéticos.....	16
2.2 Subfamília Mimosoideae.....	17
2.3 Sistemática Filogenética.....	19
2.4 Os Algoritmos para reconstrução filogenética.....	20
2.5 Os marcadores moleculares 18S e <i>rbcL</i>	21
2.6 O NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information).....	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	23
CAPÍTULO II.....	26
1.INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Obtenção dos acessos de Mimosoideae.....	29

3.2 Alinhamentos múltiplos das sequências obtidas.....	29
3.3 Determinação do modelo de substituição de nucleotídeos e cálculo das matrizes de distância.....	29
3.4 Inferência Filogenética.....	29
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Região 18S.....	30
4.1.1 Obtenção dos acessos de Mimosoideae.....	30
4.1.2 Alinhamentos múltiplos dos acessos obtidos.....	30
4.1.3 Modelo de Substituição para os acessos de Mimosoideae.....	31
4.1.4 Análise dos cladogramas.....	33
4.1.4.1 Método NJ (Neighbor-Joining).....	33
4.1.4.2 Método Máxima Parcimônia (MP).....	34
4.2 Região do gene <i>rbcL</i>	35
4.2.1 Obtenção dos acessos de Mimosoideae.....	35
4.2.2 Alinhamentos múltiplos dos acessos obtidos.....	36
4.2.3. Modelo de Substituição para os acessos de Mimosoideae.....	36
4.2.4 Análise dos cladogramas.....	38
4.2.4.1 Método NJ.....	38
4.2.4.2 Método da MP.....	40
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagens de representantes dos gêneros das tribos: Acacieae, Mimoseae, Ingeae e Mimosygateae, respectivamente. A- Arbusto da espécie de *Acacia cyanophylla*, B- Flor e Fruto do Gênero *Acacia*, C- Árvore da espécie de *Acacia tortilis*, D- Arbusto da espécie de *Mimosa tenuiflora*, E- Flor e fruto da espécie *Mimosa pudica*; F- Flor do Gênero *Parkia*; G- Árvore da espécie *Inga feuillei*; H- *Albizia julibrissin*; I- Flor e Fruto da espécie *Albizia julibrissin*; J- Fruto do gênero *Mimozyanthus*. Fonte: <http://www.plantsystematics.org> Acesso em 05 de junho de 2011.....18
- Figura 2** - Árvore construída através programa MEGA utilizando o método NJ representando as sequências de 18S de Mimosoideae.....33
- Figura 3** - Árvore construída através programa MEGA utilizando o método MP representando as sequências de 18S de Mimosoideae.....34
- Figura 4** - Árvore construída através programa MEGA utilizando o método NJ representando as sequências de *rbcL* de Mimosoideae.....39
- Figura 5** - Árvore construída através programa MEGA utilizando o método MP representando as sequências de *rbcL* de Mimosoideae.....40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Subfamília Mimosoideae com os representantes de suas tribos e gêneros.....17
- Tabela 2** – Sequências de Mimosoideae do tipo 18S (parcial) obtidas no banco de dados de sequências biológicas do NCBI (GenBank).....30
- Tabela 3** – Resultado do alinhamento múltiplo de sequências 18S com seus respectivos números de: sítios conservados, variáveis e sítios Informativos a MP.....31
- Tabela 4** – Resultado da implementação do MODELTEST para o alinhamento das sequências da região 18S de Mimosoideae obtidas no GenBank.....32
- Tabela 5**– Sequências de Mimosoideae do tipo *rbcL* (parcial) obtidos no banco de dados de sequências biológicas do NCBI (GenBank).....35
- Tabela 6** - Resultado do alinhamento múltiplo de sequências *rbcL* com seus respectivos números de: sítios conservados, variáveis e sítios Informativos a MP.....36
- Tabela 7** – Resultado da implementação do MODELTEST para o alinhamento das sequências da região *rbcL* de Mimosoideae obtidas no GenBank.....37

**ESTUDO *IN SÍLICO* DA EVOLUÇÃO MOLECULAR DA SUBFAMÍLIA
MIMOSOIDEAE (FABACEAE) POR MEIO DE MARCADORES 18S E *rbcL***

SOUZA, T.L.V¹, SOARES, C.E.A.¹

¹Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura), Rodovia Patos/Teixeira, Bairro Jatobá, CEP. 58704-330, Patos, Paraíba, Brasil (tassialaicya@gmail.com, ceduardoas@yahoo.com.br).

RESUMO

Sequências parciais da região do DNA ribossômico (rDNA) 18S (total 7) e do gene *rbcL* (total 19) de diferentes representantes da subfamília Mimosoideae (Fabaceae) foram obtidos do GenBank e empregadas neste trabalho com o objetivo de auxiliar no esclarecimento filogenético dentro desta subfamília. Alinhamentos múltiplos das sequências foram produzidos com o programa ClustalX. Para construção de árvores filogenéticas o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), foi utilizado com os métodos de Neighbor-Joining (NJ) com 500 replicações e Máxima Parcimônia (MP) com 100 replicações. A árvore construída através do método NJ para o marcador 18S, apresentou uma melhor resolução filogenética agrupando as espécies dentro das suas respectivas tribos, de acordo com a classificação da ferramenta Taxonomy do NCBI. No entanto ocorreu irresoluções a nível de tribo para as topologias dadas pelos métodos NJ e MP com o marcador *rbcL*, em que as tribos Mimoseae e Acacieae não se mostraram monofiléticas. O gênero *Albizia* se mostrou parafilético em todas as topologias dadas pelos métodos NJ e MP baseada tanto em sequências de 18S como em sequências de *rbcL*. A história evolutiva das tribos de Mimosoideae baseada em sequências do gene *rbcL* não está de acordo com as topologias disponível no Taxonomy do NCBI.

Palavras-chave: Filogenia, Mimosoideae, rRNA, Rubisco.

**IN SÍLICO STUDY OF THE MOLECULAR EVOLUTION IN MIMOSOIDEAE
(FABACEAE) SUBFAMILY BASED ON 18S AND *rbcL* MARKERS**

SOUZA, T.L.V¹, SOARES, C.E.A.¹

¹ Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura), Rodovia Patos/Teixeira, Bairro Jatobá, CEP. 58704-330, Patos, Paraíba, Brasil (tassialaicya@gmail.com, ceduardoas@yahoo.com.br).

ABSTRACT

Partial sequences of the region of ribosomal DNA (rDNA) 18S (total 7) and the *rbcL* gene (total 19) of different species of the Mimosoideae subfamily were obtained from GenBank. The goal of this work was to help in the phylogenetic inference inside this subfamily. Multiple alignments of all sequences were produced with the ClustalX program. For construction of phylogenetic trees the MEGA package (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) was used. The methods of Neighbor-Joining (NJ) with 500 replications and Maximum Parsimony (MP) with 100 replications were performed. The phylogenetic tree constructed by NJ and MP methods using 18S gene showed a better resolution phylogenetic grouping species within their respective tribes, according to the classification of the NCBI Taxonomy tool. However, at the level of tribe for the topologies given by NJ and MP methods with marker *rbcL*, unresolved clades were observed. The tribes Mimoseae and Acacieae were polyphyletic. The genus *Albizia* was paraphyletic in all topologies constructed by MP and NJ methods. In this case, both topologies based on 18S and *rbcL* sequences do not supported the monophyletic hypothesis. In conclusion, the evolutionary history of the Mimosoideae tribes hypothesized with *rbcL* gene sequences do not agree with the topologies available in the NCBI Taxonomy.

Keywords: Phylogeny, Leguminosae, rRNA, Rubisco

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Com o progresso científico e tecnológico dos métodos laboratoriais, atividades como o sequenciamento de ácidos nucleicos e proteínas foram aperfeiçoadas, consentindo resultados rápidos e com menos custos (PEREIRA, 2006). Devido à grande produção de sequências de ácido nucleicos e proteínas, foi necessário a criação de um banco de dados para armazenar tais informações. Com esse propósito o GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) foi criado. Através dele a comunidade científica se aproximou a tal ponto que as distâncias intercontinentais deixaram de ser obstáculos. Considerando apenas as sequências biológicas, as quais são um bom exemplo da grande quantidade de informações fabricadas em larga escala. Utilizando-se sequenciadores automáticos, trabalhos que antes necessitavam de meses ou até mesmo anos para serem finalizados, precisam agora de hora ou de dias para serem concluídos (SOARES, 2004).

De acordo com Juchum (2007) análises filogenéticas baseadas em dados moleculares têm fornecido uma grande quantidade de informações, auxiliando na solução de algumas questões não resolvidas pelos métodos tradicionais de análises, além de questionar reconstruções filogenéticas propostas anteriormente. Na genética molecular, técnicas como o sequenciamento de DNA têm contribuído nos estudos filogenéticos (JUCHUM, 2007).

Por meio do uso de Bancos de Dados tais como o GenBank é possível fazer busca das sequências nucleotídicas e se inferir o grau de parentesco entre as mesmas. Aguardamos que, no futuro, a atenção dos sistematistas se altere da produção das sequências em si para a análise intelectualmente mais complexa dessas sequências (JUDD et al., 2009). Vale destacar que o sistema de classificação dos seres vivos necessita ser revisto e as técnicas de biologia molecular podem ser úteis para auxiliar na resolução dessa questão. Nosso objetivo foi contribuir com esclarecimentos sobre as relações filogenéticas na subfamília Mimosoideae (Fabaceae), utilizando sequências parciais dos genes 18S e *rbcL*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 As Fabaceae: Aspectos Botânicos e Filogenéticos.

Fabaceae é uma família com distribuição cosmopolita que compreende cerca de 730 gêneros e 19.300 espécies, sendo a terceira maior dentre as Angiospermas, depois de Orchidaceae e Asteraceae (LEWIS et al, 2005). Segundo esse, Fabaceae foi separada em três grupos: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, considerados como subfamílias pela maioria dos autores, fundamentada, especialmente, pelo tipo de simetria floral e de prefloração da corola, em que as Caesalpinioideae formam a ramificação basal do clado da família, com Mimosoideae e Papilionoideae divergindo independentemente de um ancestral comum, como linhagens distintas do clado. Características morfológicas e moleculares vêm apoiando o monofiletismo dessa família (WOJCIECHOWSKI et al., 2004, LEWIS et al., 2005).

Fabaceae é uma família de grande importância econômica, muitos gêneros desta família abrigam espécies de importância alimentícia tais como: *Arachis* (amendoim), *Cajanus* (feijão-guandu), *Cicer* (grão-de-bico), *Glycine* (Soja), *Lens* (Lentilha), *Phaseolus* (feijão), *Pisum* (ervilha) e *Tamarindus* (tamarindo). Igualmente existem gêneros que produzem substâncias tóxicas, dentre eles *Abrus* e *Astragalus*, são altamente venenosos. Outras espécies possuem importância forrageira, tais como o *Medicago* (alfafa), *Melilotus* (trevo-doce), *Trifolium* (trevo) e *Vicia* (fava). Podemos citar os seguintes gêneros como ornamentais: *Acacia*, *Albizia*, *Bauhinia* (pata-de-vaca), *Calliandra* (topete-de-cardeal), *Cássia*, *Cercis*, *Cytisus*, *Delonix* (flamboyant), *Erythrina* (mulungu), *Gleditsia*, *Laburnum*, *Latyrus*, *Lupinus* (lupino), *Mimosa* (sensitiva), *Parkinsonia*, *Robinia* e *Wisteria*. Gomas e resinas são removidas a partir de espécies de *Acacia* e *Hymenaea*; *Indigofera* é usada como fonte de uma tintura azul. Gêneros, como *Dalbergia* e *Pterocarpus* possuem uma alta qualidade como fontes de madeira (JUDD et al., 2009).

2.2 Subfamília Mimosoideae

A subfamília Mimosoideae comporta cerca de 78 gêneros e 3270 espécies, tradicionalmente distribuídos em 5 tribos: Mimoseae, Acacieae, Ingeae, Parkiae e Mimozygantheae (ELIAS, 1981, Tabela 1). Pode ser considerado um grupo monofilético, excluindo-se *Dinizia*, que aparentemente é mais relacionado às Caesalpinioideae (WOJCIECHOWSKI et al., 2004). As análises filogenéticas entre as tribos ainda é alvo de estudo, entretanto nenhuma delas é monofilética e tanto Parkiae como Mymozygantheae foram inseridas em Mimoseae (LUCKOW et al., 2005).

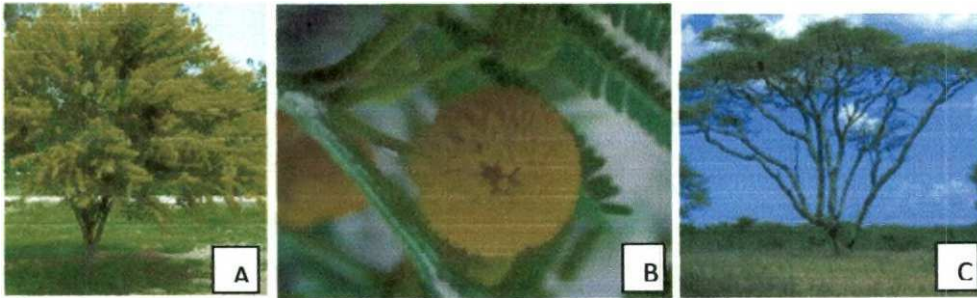
A maioria dos integrantes desta subfamília é mais comum em florestas tropicais de terras baixas, principalmente próximas de rios e lagos, sendo também bem adaptada a savanas e regiões desérticas na América Tropical e África, sendo ausente em grandes altitudes (ELIAS, 1981, Figura 1). Apresenta-se por sua importância na recomposição de florestas ciliares, recuperação de áreas degradadas, sombreamento em cultivos de café e cacau, fonte de alimento, como lenha para produção de energia, estabilização de solos ácidos e fitoterapia (PRITCHARD et al., 1995).

Tabela 1- Subfamília Mimosoideae com os representante de suas tribos e gêneros. Fonte:

www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez Acesso em 05 de maio de 2011.

Tribos	Gêneros		
Acacieae	<i>Acacia</i>	<i>Mariosousa</i>	<i>Vachellia</i>
	<i>Acaciella</i>	<i>Senegalia</i>	
Ingeae	<i>Abarema</i>	<i>Cathormion</i>	<i>Falcataria</i>
	<i>Albizia</i>	<i>Chloroleucon</i>	<i>Havardia</i>
	<i>Archidendron</i>	<i>Cojoba</i>	<i>Hesperalbizia</i>
	<i>Archidendropsis</i>	<i>Ebenopsis</i>	<i>Hydrochorea</i>
	<i>Calliandra</i>	<i>Enterolobium</i>	<i>Inga</i>
	<i>Pararchidendron</i>	<i>Faidherbia</i>	<i>Lysiloma</i>
	<i>Paraserianthes</i>	<i>Pithecellobium</i>	<i>Samanea</i>
	<i>Sphinga</i>	<i>Wallaceodendron</i>	<i>Zapoteca</i>
	<i>Zygia</i>		
Mimoseae	<i>Adenanthera</i>	<i>Dichrostachys</i>	<i>Microlobius</i>
	<i>Alantsilodendron</i>	<i>Dinizia</i>	<i>Mimosa</i>
	<i>Amblygonocarpus</i>	<i>Elephantorrhiza</i>	<i>Neptunia</i>
	<i>Anadenanthera</i>	<i>Entada</i>	<i>Newtonia</i>
	<i>Calliandropsis</i>	<i>Fillaeopsis</i>	<i>Parapiptadenia</i>
	<i>Calpocalyx</i>	<i>Gagnebina</i>	<i>Parkia</i>
	<i>Cylicodiscus</i>	<i>Kanaloa</i>	<i>Pentaclethra</i>
	<i>Desmanthus</i>	<i>Leucaena</i>	<i>Piptadenia</i>
	<i>Piptadeniopsis</i>	<i>Pityrocarpa</i>	<i>Piptadeniastrum</i>
	<i>Plathymenia</i>	<i>Prosopis</i>	<i>Pseudopiptadenia</i>
	<i>Stryphnodendron</i>	<i>Schleinitzia</i>	<i>Pseudoprosopis</i>
	<i>Tetrapleura</i>	<i>Xerocladia</i>	<i>Xylia</i>
	Mimozygantheae	<i>Mimozyganthus</i>	

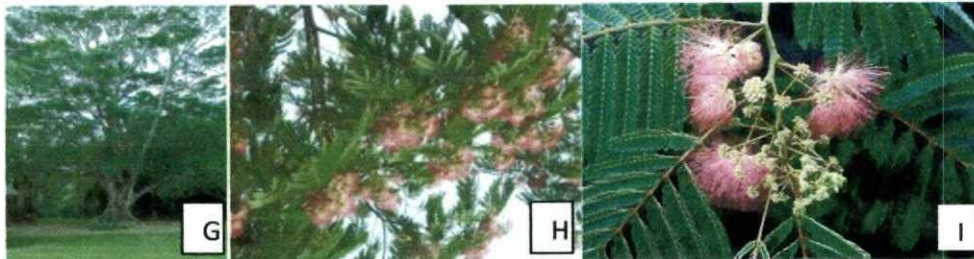
Acacieae



Mimoseae



Ingeae



Mimozygatae



Figura 1 - Imagens de representantes dos gêneros das tribos: Acacieae, Mimoseae, Ingeae e Mimozygatae, respectivamente. A- Arbusto da espécie de *Acacia cyanophylla*, B- Flor e Fruto do Gênero *Acacia*, C- Árvore da espécie de *Acacia tortilis*, D- Arbusto da espécie de *Mimosa tenuiflora*, E- Flor e fruto da espécie *Mimosa pudica*; F- Flor do Gênero *Parkia*; G- Árvore da espécie *Inga feuillei*; H- *Albizia julibrissin*; I- Flor e Fruto da espécie *Albizia julibrissin*; J- Fruto do gênero *Mimozyganthus*. Fonte: <http://www.plantsystematics.org> Acesso em 05 de maio de 2011.

2.3 O NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information)

Estabelecido em 4 de Novembro de 1988 por iniciativa do senador norte-americano Claude Pepper. Este apoiou a legislação para o reconhecimento de métodos de processamento da informação computadorizada para conduta da pesquisa biomédica no E.U.A. Dessa maneira, o NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) foi criado com uma divisão da *National Library of Medicine* (NLM) no *National Institute of Health* (NIH). A NLM foi escolhida para a experiência na criação e manutenção de banco de dados biomédicos e como parte do NIH para estabelecimento de programas em biologia molecular computacional (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez).

O GenBank nada mais é que um banco de dados virtual de sequências biológicas do NIH. Uma verdadeira coleção de todas as sequências de DNA disponíveis (Nucleic Acids Research). Sua atualização é feita a cada 2 meses e vale dizer ainda que o GenBank é parte do *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* que compreende também o DNA DataBank of Japan (DDBJ) e o European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Essas três organizações trocam informações diariamente (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez).

Como parte do NCBI, o NCBI's Taxonomy Project, tem o objetivo de organizar o maior banco de dados de sequências para taxonomia filogenética. O Taxonomy Database contém o nome de todos os organismos representados por pelo menos uma Sequência biológica (nucleotídeos ou aminoácidos) no banco de dados genético do NCBI. Trata-se de uma referência padrão no projeto de colaboração internacional de bancos de dados de sequências (GenBank, DDBJ, EMBL e Swiss-Prot) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez).

2.4 A Sistemática Filogenética

A cerca da evolução temos informações de que todos os organismos vivos compartilham um único ancestral comum e a composição dos seres de hoje traz armazenada em si parte de sua história evolutiva, assim surgiu um grande interesse no estudo das relações de parentesco entre os organismos (JUCHUM, 2007). Portanto, poderíamos determinar filogenia como uma suposta reconstrução da história evolutiva de um grupo, sugerindo os diversos níveis nas relações de ancestralidade das espécies com suas espécies descendentes (AMORIM, 2002).

Estudos filogenéticos têm sido realizados usando-se tanto dados morfológicos como moleculares (JUCHUM, 2007). As informações moleculares, para a sistemática filogenética, têm sido extensivamente empregadas tanto para esclarecer quanto confirmar ou discutir

relações filogenéticas sugeridas. Proporcionalmente ao avanço dos dados moleculares, os métodos de dedução filogenética vêm-se tornando cada vez mais comuns, sendo um utensílio fundamental como fonte de informação biológica em diversas áreas (RUSSO et al., 2001).

A sistemática filogenética pode ser representada por meio de árvores filogenéticas que apresentam a história evolutiva dos organismos presentes nela (MIYAKI et al., 2001). De acordo com o mesmo autor, as árvores são formadas por ramos e OTUs (*Operational Taxonomic Units*) - internos e terminais, esses contêm os táxons que podem ser famílias, gêneros, espécies ou populações.

Monofilia e polifilia são dois pontos que devem ser compreendidos quando se estiver falando de filogenia. Monofilético é todo grupo que possui um ancestral comum e não o compartilha com outro membro externo ao grupo. Polifilético é todo grupo cujos descendentes possuem mais de um ancestral (MIYAKI et al., 2001).

Outro conceito necessário para a compreensão da filogenia é saber o que seria grupo externo (*Outgroup*), sendo um grupo que contém caracteres primitivos, comparando-o a outro grupo de membros (SOARES, 2004). Assim, os grupos externos são capazes de dar sentido no tempo para análise filogenética (MIYAKI et al., 2001).

2.5 Os algoritimos para a reconstrução filogenética

Considerando sequências de DNA, a análise das taxas de mudanças (substituições) nas sequências em questão permite examinar a conveniência filogenética das mesmas. Os tipos de modificações observadas no DNA são as substituições de um nucleotídeo por outro, as deleções, as inserções e as inversões nucleotídicas (NEI & KUMAR, 2001). As substituições dividem-se em transições e transversões. As transições ocorrem com mais frequência e consistem na alteração de um tipo de base para outra do mesmo tipo (SOARES, 2004).

Considerando se um alinhamento múltiplo das sequências, em geral através de programas como o CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997), as análises filogenéticas se baseiam a partir desse procedimento. Assim as modificações observadas na filogenia resultante subordinam-se muito mais do alinhamento das sequências do que dos procedimentos de construção filogenética (PEREIRA, 2006).

Há muitos métodos de distância para se calcular as taxas de substituições das bases nucleotídicas, Tamura – Nei (TAMURA & NEI, 1993) é um desses métodos. Tal modelo considera o maior número de parâmetros e requer cálculos estatísticos mais complexos. Vale

advertir a necessidade de correção para cálculos das taxas mudanças em certos casos. Desse modo, o parâmetro γ é requerido como fator de correção para o cálculo de distância. Tal parâmetro adiciona o valor de correção para as taxas de substituições (RUSSO et al., 2001).

Um dos algoritmos mais utilizados é o agrupamento de vizinhos ou neighbor-joining (NJ; SAITOU & NEI, 1987). Esse método agrupa os pares por meio de busca de ramos cujos valores da soma total sejam menor possível. Tendo como efeito direto, o método sempre retoma as árvores totalmente resolvidas, mesmo com valores negativos para os nós (RUSSO et al., 2001). É um método rápido, adequado para grandes conjuntos de dados, consentindo linhagens com diversos tamanhos de ramos e substituições múltiplas, porém ele mostra apenas uma topologia possível (NEI & KUMAR, 2001). Adicionalmente, NJ solicita uma menor capacidade computacional sendo capaz de chegar a conclusões similares àquelas obtidas por métodos que requerem mais tempo, como Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança (NEI & KUMAR, 2001).

A Máxima Parcimônia (MP) é um método também utilizado para a construção de topologias. Segundo Miyaki et al., (2001) este método baseia-se em um modelo evolutivo no qual uma modificação é mais provável do que duas, tratando as substituições independentemente. É preciso ressaltar que tal método seleciona os sítios informativos (P_i) em primeiro lugar. Daí a necessidade de atenção para tais sítios, pois nem toda variabilidade é útil para o método da máxima parcimônia (MIYAKI et al., 2001). Apesar de examinar as diversas topologias, MP é um método que solicita um bom tempo para comparação, o tamanho dos ramos não é informativo e utiliza-se apenas dos sítios informativos (NEI & KUMAR, 2001).

Um teste de confiança muito utilizado em árvores de distância e de máxima parcimônia é o *bootstrap*. Representa uma simples reamostragem, mantendo o número total de dados constantes. A cada reamostragem uma árvore replica é construída e ao final das replicações a árvore final pode ser estimada (SOARES, 2004). Para o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) a topologia dessa árvore é a mesma da original, apresentando os valores percentuais de cada agrupamento quando da aparição dos mesmos nas réplicas (MIYAKI et al., 2001).

2.6 Marcadores moleculares 18S e *rbcL*

O gene *rbcL* (carboxilase do difosfato 1,5 da ribose – rubisco) codifica a grande subunidade da enzima Rubisco, sendo o principal receptor de carbono em todos os eucariontes fotossintéticos e cianobactérias. O gene *rbcL* é utilizado na sistemática molecular por ser quase universal entre as plantas, por não ser muito longo e não mostrar problemas de alinhamento. Uma restrição da *rbcL* como marcador filogenético é sua baixa taxa de mutação, contém uma proteína altamente conservada. Por isso, o gene da *rbcL* não é individualmente útil para deduzir relações dentro ou entre gêneros altamente relacionados (JUDD et al., 2009).

Os ribossomos são organelas citoplasmáticas presentes em todos os seres vivos. Sua estrutura é formada por grandes complexos de proteínas e ácidos ribonucléicos, formando subunidades. Nas células eucariontes duas subunidades são observadas, a primeira chamada de pequena (“*Small Subunit*” – SSU) que é formada pelo rRNA 18S, rRNA 5S e mais um total de 32 proteínas formando a subunidade 30S. A segunda subunidade, denominada de grande (“*large subunit*” – LSU), é formada pelo rRNA 26S, rRNA 5,8S e 50 proteínas formando a subunidade 50S. A função dos complexos ribossômicos está relacionada à síntese de proteínas (BROCCHIERI, 2001).

Os genes RNA ribossomais são os únicos genes nucleares com um grande número de cópias o que facilita seu estudo. A sequência 18S vem sendo utilizada para analisar o grau de parentesco entre grandes grupos de plantas. Esses genes contêm algumas regiões que são altamente conservadas, que auxiliam no alinhamento, e outras que são bastante variáveis, que auxiliam na distinção de grupos filogenéticos (JUDD et al., 2009). Analisando sequências moleculares para induções, Broccheri (2001), identificou que o gene que codifica para a subunidade pequena do RNA ribossômico possui lenta taxa de mutação, devido a isso possui função conservada. Os genes codificadores da região do rRNA são essenciais para o organismo, por isso evoluem de maneira mais lenta. No caso de relações filogenéticas entre espécies distantemente relacionadas deve-se utilizar sequências mais conservadas, como as sequências que codificam a subunidade 18S ribossomal (rDNA 18S, BROCCHIERI, 2001).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, D. S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. 2ª Edição. Holos Editora e Soc. Bras. de Entomologia, Ribeirão Preto. 2002, 156p.

BROCCHIERI, L. Phylogenetics Inference from Molecular Sequences: Review and critique. **Theoretical Population Biology**, v. 59, p. 27-40. 2001.

ELIAS, T. Mimosoideae. In: R.M. Polhill and P.H. Raven (editors). Advances in legume systematics, **Royal Botanic Gardens**, p. 143–151.1981.

JUDD, W. S., CAMPBELL C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F., DONOGHUE, M.J., **Sistemática Vegetal Um Enfoque Filogenético**. 3ª Edição. Artmed Editora. Porto Alegre. 2009, 632p.

JUCHUM, F. S., **Análise filogenética das variantes morfológicas foliares de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) da região sul baiana com base em seqüências de DNA**. Dissertação (Mestrado em Genética e biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007, 103f.

LEWIS, G.P.; SCHRINE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, M. . Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens**, p.1-12. 2005.

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.

MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A.M.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S.R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Holos Editora, Ribeirão Preto. 2001, 97-107 p.

NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez). Acesso em: 05 de Maio de 2011.

NEI, M. & KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, Inc. 2001, 333p.

PEREIRA, Júlio Otavio Portela, **Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará,2006, 142f.

Plants Systemics Disponível em : (<http://www.plantsystematics.org>). Acesso em 05 de Junho de 2011.

PRITCHARD, H.W., HAYE, A.J., WRIGHT, W.J. & STEADMAN, K.J. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. **Seed Science and Technology**, p.77-89. 1995.

RUSSO, C.A.M., MIYAKI, C.I., & PEREIRA, S.L. Reconstrução Filogenética. Métodos geométricos. In: MATIOLI, S.R. (ed) **Biologia molecular e evolução**. Holos editora. Ribeirão Preto, 2001, p.108-116.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v.4, p406-425,1987.

SOARES, C.E.A.; **Análise in silico da variabilidade Genética Interespecífica em *Glycine Wild.* (Leguminosae) e Intraespecífica em *G. tomentosa* Hayata Usando sequências da região ITS 5,8S do DNA Nuclear.** Monografia (Graduação em Bacharelado de Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, Julho de 2004, 56f.

TAMURA, K. & NEI, M, Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**. v.10, p.512-526. 1993.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** v. 24, p. 4876 – 4882, 1997.

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, p. 1846-1862, 2004.

CAPITULO II

1.INTRODUÇÃO

A família Fabaceae é dividida em três subfamílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae. A sistemática atual de leguminosas concorda que Mimosoideae é monofilética e divergiu a partir da Caesalpinoideae, possuindo um grupo irmão relacionado com a tribo Caesalpinieae (CLARKE et al., 2000).

Mimosoideae é a segunda maior das subfamílias, com aproximadamente 78 gêneros e 3270 espécies. Muitos destes gêneros são pequenos ou monotípicos, mas cerca de dois terços das espécies estão restritos a três grandes gêneros: *Acacia* s.l. Mill. (1450 espécies), *Mimosa* L. (530 espécies) e *Inga* Mill. (300 espécies) (LEWIS et al., 2005). De acordo com análises filogenéticas moleculares, foi sugerido que o sistema tribal de Mimosoideae necessita de uma revisão completa, com as tribos atuais que são poliféticas ou parafiléticas (LUCKOW et al., 2003; MILLER, 2008).

A Sistemática Molecular é um ramo da sistemática que se baseia no uso de técnicas de Biologia Molecular. Essa vertente permite que a informação biológica contida nas sequências de ácidos nucleicos e de proteínas seja utilizada no esclarecimento das relações evolutivas. Essa valiosa fonte de informação se encontra disponível em bancos de dados, tais como o GenBank, no site da National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esse repositório armazena tanto sequências de genes individuais, como de genomas inteiros (JUDD et al., 2009), sendo acessível gratuitamente.

Os genes nucleares representam uma fonte de informação ímpar, pois frequentemente estão associadas a características que exibem valor adaptativo. Dois marcadores comumente utilizados em estudos filogenéticos vegetais são 18S e *rbcL*. Nosso trabalho objetivou realizar busca em banco de dados públicos por sequências desses genes isolados de representantes da subfamília Mimosoideae, a fim de contribuir para o esclarecimento filogenético nesse sistema de classificação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a filogenia molecular da Subfamília Mimosoideae, utilizando sequências dos marcadores 18S (rRNA 18S), *rbcL* (Gene da Rubisco) com distintos métodos de construção de topologias.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar buscas em banco de dados públicos de sequências de rDNA 18S e *rbcL* para espécies da subfamília Mimosoideae;
- Utilizar programas de alinhamento múltiplo com os grupos de sequências de rDNA 18S e *rbcL* encontradas nas buscas em bancos de dados;
- Otimizar o alinhamento múltiplo dos dados por meio de inspeção visual;
- Construir dendrogramas utilizando o programa MEGA;
- Visualizar as árvores construídas com os métodos de máxima parcimônia e *Neighbor-Joining* pelo programa MEGA;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das sequências de nucleotídeos das espécies da subfamília Mimosoideae

Sequências do gene 18S (parciais) e do gene da rubisco (*rbcL*) de diferentes espécies da família Fabaceae, Subfamília Mimosoideae foram obtidas do banco público de sequências GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) através de busca utilizando-se as palavras chave: Mimosoideae, 18S e *rbcL*.

3.2 Alinhamento múltiplos das sequências obtidas

Os acessos obtidos por meio da busca foram salvos em formato FASTA num arquivo de texto e com auxílio do programa CLUSTAL X versão 1.82 (THOMPSON et al., 1997), os alinhamento múltiplos foram produzidos. As sequências alinhadas foram salvas num arquivo de formato ALN e por meio deste foi feita uma inspeção visual para otimização do alinhamento das sequências.

3.3 Determinação do modelo de substituição de nucleotídeos e cálculo das matrizes de distância

Com o auxílio do programa do MODELTEST (POSADA & CRANDALL, 1998) que é executado como uma subrotina do multipacote de inferência filogenética PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*; SWOFFORD, 1999), o modelo de substituição de nucleotídeos foi escolhido. Definido o modelo, foi possível calcular as matrizes de distância e estimar as topologias dos dendogramas utilizando o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*; KUMAR et al., 2001).

3.4 Inferência filogenética

Análises envolvendo os métodos de distância e de máxima parcimônia para a construção de dendogramas foram realizadas com o programa MEGA (KUMAR et al., 2001). A fim de verificar a estabilidade dos clados obtidos, o teste de *bootstrap* foi realizado para Neighbor-Joining (NJ) com 500 replicações e para o método da Máxima Parcimônia (MP) 100 replicações. Os dendogramas gerados pelo programa MEGA foram visualizados através do mesmo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Região 18S

4.1.1 Obtenção dos acessos de Mimosoideae

Através da busca de sequências biológicas no banco de dados do NCBI (GenBank), foram obtidos 26 acessos da subfamília Mimosoideae. Desses 7 acessos são sequências parciais de 18S (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequências 18S (parcial) de Mimosoideae foram obtidas no banco de dados de sequências biológicas do NCBI (GenBank).

Espécies – 18S	Número de acesso ao GenBank	Tamanho da Sequência
<i>Acacia aulacocarpa</i>	GU476370	1618 bp
<i>Acacia frigescens</i>	GU476371	1618 bp
<i>Parkia timoriana</i>	GU476372	1618 bp
<i>Albizia julibrissin 2</i>	GU476373	1610 bp
<i>Albizia procera</i>	GU476374	1610 bp
<i>Inga edulis</i>	GU476375	1610 bp
<i>Albizia julibrissin 1</i>	U42536	1737 bp

4.1.2 Alinhamentos múltiplos dos acessos obtidos

O alinhamento das sequências de 18S com o grupo externo (*Populus tremuloides*) - Malpighiales; Salicaceae; Saliceae; *Populus*. Esse apresentou uma extensão de 1742, incluídos pares de bases (pb) e gaps – são espaços inseridos no alinhamento. Desses sítios 1693 são conservados, 41 são variáveis e 9 são informativos para máxima parcimônia (Tabela 3). Todos os acessos desse marcador molecular são sequências parciais, exceto o outgroup sendo uma sequência completa. A região 18S apresentou um comprimento médio de 1610 pb a 1618 pb, com apenas um acesso com o comprimento de 1737 pb (Tabela 2).

Tabela 3 – Resultado do alinhamento múltiplo de sequências 18S com seus respectivos números de: sítios conservados, variáveis e sítios Informativos a MP.

18S	Sítios
Conservados	1693
Variáveis	41
Sítios Informativos MP (Pi)	9
Total	1742

4.1.3 Modelo de Substituição para os acessos de Mimosoideae

O melhor modelo relacionado as taxas de substituição nucleotídica dos sítios foi o modelo de Tamura-Nei, TrN, (TAMURA & NEI, 1993) de acordo com a implementação do programa MODELTEST (POSADA & CRANDALL, 1998, Tabela 4).

Esse modelo leva em consideração o maior número de parâmetros porque admite que as taxas de transição entre pirimidinas e purinas podem diferir e, desse modo, são incluídas em separado na análise (RUSSO et al., 2001). Vale ressaltar ainda a necessidade do parâmetro de correção gamma (γ) no cálculo da distância. Seu valor para os acessos de Mimosoideae 18S foi de 0,9116 (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultado da implementação do MODELTEST para o alinhamento das sequências da região 18S de Mimosoideae obtidas no GenBank.

Modelo Selecionado:	TrN+I
(Logaritmo da Verossimilhança) – InL	2683,3086
Frequência de bases:	
A	0,2482
C	0,2269
G	0,2762
T	0,2487
Modelo de substituição:	
Matriz de frequências:	
R(a) [A-C] =	1,0000
R(b) [A-G] =	2,9796
R(c) [A-T] =	1,0000
R(d) [C-G] =	1,0000
R(e) [C-T] =	19,0632
R(f) [G-C] =	1,0000
Varição entre os sítios	
Proporção de sítios invariáveis (I) =	0,9116
Sítios variáveis (G)	
Parâmetro Gamma =	

4.1.4 Análise dos cladogramas

4.1.4.1 Método *Neighbor-Joining*

Com base na matriz de distância, foi obtido um cladograma pelo método de agrupamento de vizinhos próximos (NJ, Figura 2). Esse método faz uma busca pela árvore com a menor soma total dos ramos e sempre totalmente resolvida mesmo com valores negativos para os ramos (RUSSO et al., 2001).

Para os diferentes acessos de Mimosoideae 18S uma árvore filogenética foi obtida. Os dois acessos de *Acacia* constituíram um clado externo com alto valor de *bootstrap* que foi de 96 e o clado que agrupou as espécies da tribo Ingeae com um valor de *bootstrap* igual a 77. E por fim *Parkia* foi agrupada com *Acacia* com um *bootstrap* igual a 96 (Figura 2).

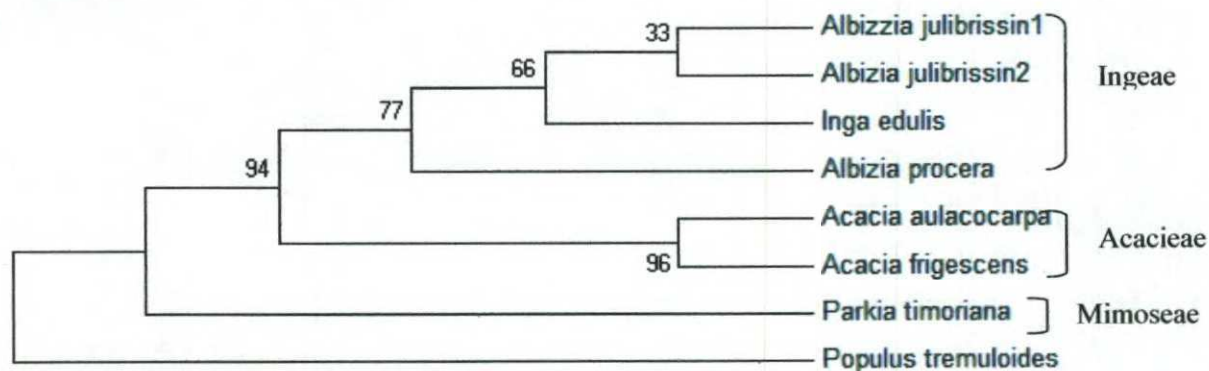


Figura 2 – Árvore construída através programa MEGA utilizando o método NJ representando as sequências de 18S de Mimosoideae.

A tribo Ingeae se mostrou monofilética de acordo com as espécies analisadas. Ocorreu uma irresolução no momento de agrupar os gêneros *Albizia* e *Inga* dessa tribo, o gênero *Albizia* não se mostrou monofilético de acordo com a topologia dada. O que corrobora com a literatura, segundo Grimes (1999) e Luckow (2003), sendo o gênero *Albizia* polifilético.

Ocorreu uma resolução adequada para a tribo Acacieae a qual pertence as espécies *Acacia frigescens* e *Acacia aulacocarpa*, estando essas relacionadas com a espécie *Parkia timoriana*. Por meio desse método também é possível inferir o tempo de divergência das espécies, assim podemos inferir que, *Albizzia julibrissin* é mais derivada, enquanto que *Parkia timoriana* é mais primitiva (Figura 2).

4.2 Região do gene *rbcL*

4.2.1 Obtenção dos acessos de Mimosoideae

Através da busca de sequências biológicas no banco de dados do NCBI (GenBank), foram obtidos 26 acessos da subfamília Mimosoideae. Desses 19 acessos são sequências parciais do gene *rbcL* (Tabela 5).

Tabela 5 – Sequências de Mimosoideae do tipo *rbcL* (parcial) obtidos no banco de dados de sequências biológicas do NCBI (GenBank).

Espécies – <i>rbcL</i>	Número de acesso ao GenBank	Tamanho das Sequências
<i>Calliandra</i> sp.	AB586309	1359 bp
<i>Parkia</i> sp.	AB586325	1298 bp
<i>Pentaclethra macrophylla</i>	AM234250	1421 bp
<i>Parkia multijuga</i>	AM234251	1408 bp
<i>Calliandra trinervia</i>	AM234252	1421 bp
<i>Archidendron hirsutum</i>	AM234253	1421 bp
<i>Inga</i> sp.	AM234254	1421 bp
<i>Cedrelinga cateniformis</i>	AM234256	1405 bp
<i>Calpocalyx dinklagei</i>	AM234257	1406 bp
<i>Acacia karroo</i>	AM235003	1389 bp
<i>Parkia roxburghi</i>	U74209	1461 bp
<i>Acacia cavenia</i>	Z70145	1368 bp
<i>Acacia farnesiana</i>	Z70146	1368 bp
<i>Albizia julibrissin</i>	Z70147	1368 bp
<i>Paraserianthes lophantha</i>	Z70148	1368 bp
<i>Albizia saman</i>	Z70149	1368 bp
<i>Pithecellobium mexicanum</i>	Z70150	1368 bp
<i>Mimosa spgazzinii</i>	Z70151	1368 bp
<i>Parkia roxburghii</i>	Z70152	1368 bp

4.2.2 Alinhamentos múltiplos dos acessos obtidos

Os acessos da região *rbcL* apresentaram comprimentos bem variados, esses variando de 1298 pb a 1461 pb (Tabela 5). O alinhamento múltiplo para essa região obteve um total de 1488 sítios alinhados, incluindo gaps, desses 1246 são conservados, 175 são variáveis e 78 são sítios informativos para máxima parcimônia (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultado do alinhamento múltiplo de sequências *rbcL* com seus respectivos números de: sítios conservados, variáveis e sítios Informativos a MP.

<i>rbcL</i>	Sítios
Conservados	1246
Variáveis	175
Sítios Informativos MP (Pi)	78
Total	1488

4.2.3. Modelo de Substituição para os acessos de Mimosoideae

O melhor modelo relacionado as taxas de substituição nucleotídica dos sítios foi o modelo de distância de Kimura 2 – parâmetros (KIMURA, 1980). Esse modelo leva em consideração o desvio na direção das transições, ou seja, se o nucleotídeo original for A então a probabilidade de ele ser substituído por G é maior do que por C e T (RUSSO et al., 2001). Isso pode ser estimado de acordo com a implementação do programa MODELTEST (POSADA & CRANDALL, 1998, Tabela 7).

Tabela 7 – Resultado da implementação do MODELTEST para o alinhamento das sequências da região *rbcL* de Mimosoideae obtidas no GenBank.

Modelo Selecionado:	K81uf+I
(Logaritmo da Verossimilhança) – InL	3540,3901
Frequência de bases:	
A	0,2746
C	0,1958
G	0,2370
T	0,2927
Modelo de substituição:	
Matriz de frequências:	
R(a) [A-C] =	1,0000
R(b) [A-G] =	3,3276
R(c) [A-T] =	0,6528
R(d) [C-G] =	0,7773
R(e) [C-T] =	3,3276
R(f) [G-C] =	1,0000
Varição entre os sítios	
Proporção de sítios invariáveis (I) =	0,7773
Sítios variáveis (G)	
Parâmetro Gamma =	

4.2.4 Análise dos cladogramas

4.2.4.1 Método *Neighbor-Joining*

Com base na Matriz de distância, foi obtido um cladograma pelo método de agrupamento de vizinhos próximos (*Neighbor-Joining*, NJ), (SAITOU & NEI, 1987, Figura 4). Todas as espécies da tribo Ingeae foram agrupadas dentro de um grande clado, porém as espécies do gênero *Albizia* não foram agrupadas adequadamente, em que *Albizia julibrissin* deveria ter sido agrupada com *Albizia saman*, porém aquela foi agrupada com *Paraserianthes lophantha*, esse clado externo obteve um nó de confiabilidade igual a 92 (Figura 4), o que confirma mais uma vez a polifilia do gênero *Albizia*. O clado de *Calliandra* foi agrupado com um *bootstrap* de 99.

Ocorreu uma irresolução no momento de agrupar as espécies da tribo Acacieae e Mimoseae (Figura 4). A topologia obtida mostra que essas tribos não são monofiléticas, pois *Parkia* deveria ter sido agrupada dentro de um mesmo clado com *Mimosa*, porém este gênero foi agrupado com a tribo Acacieae. As tribos Mimoseae e Acacieae de acordo com o resultado obtido se mostraram parafiléticas, apoiando o resultado de estudos anteriores (LUCKOW et al., 2003).

Os acessos *Pentaclethra macrophylla* e *Calpocalyx dinklagei* foram agrupados na raiz da filogenia com um valor de *bootstrap* igual a 50, sendo esse clado mais relacionado com a tribo da Acacieae do que com sua própria tribo Mimoseae (Figura 4). Parece que Mimoseae possui linhagens as quais evoluíram independentemente umas das outras e não compartilham um ancestral comum (LEWIS & ELIAS, 1981).

Pentaclethra por meio desse método é apresentada como sendo um dos gêneros mais primitivos de Mimosoideae, juntamente com *Calpocalyx* (Figura 4). Sendo *Pentaclethra* encontrado aninhados no outgroup de outros trabalhos (LUCKOW et al., 2003), mostrando que este gênero é um dos mais primitivos dentro da tribo Mimoseae. Segundo Lavin et al., (2005) *Pentaclethra* pode ser um dos gêneros mais primitivos da subfamília Mimosoideae, devido a isso esse tende a se aninhar no grupo externo das árvores.

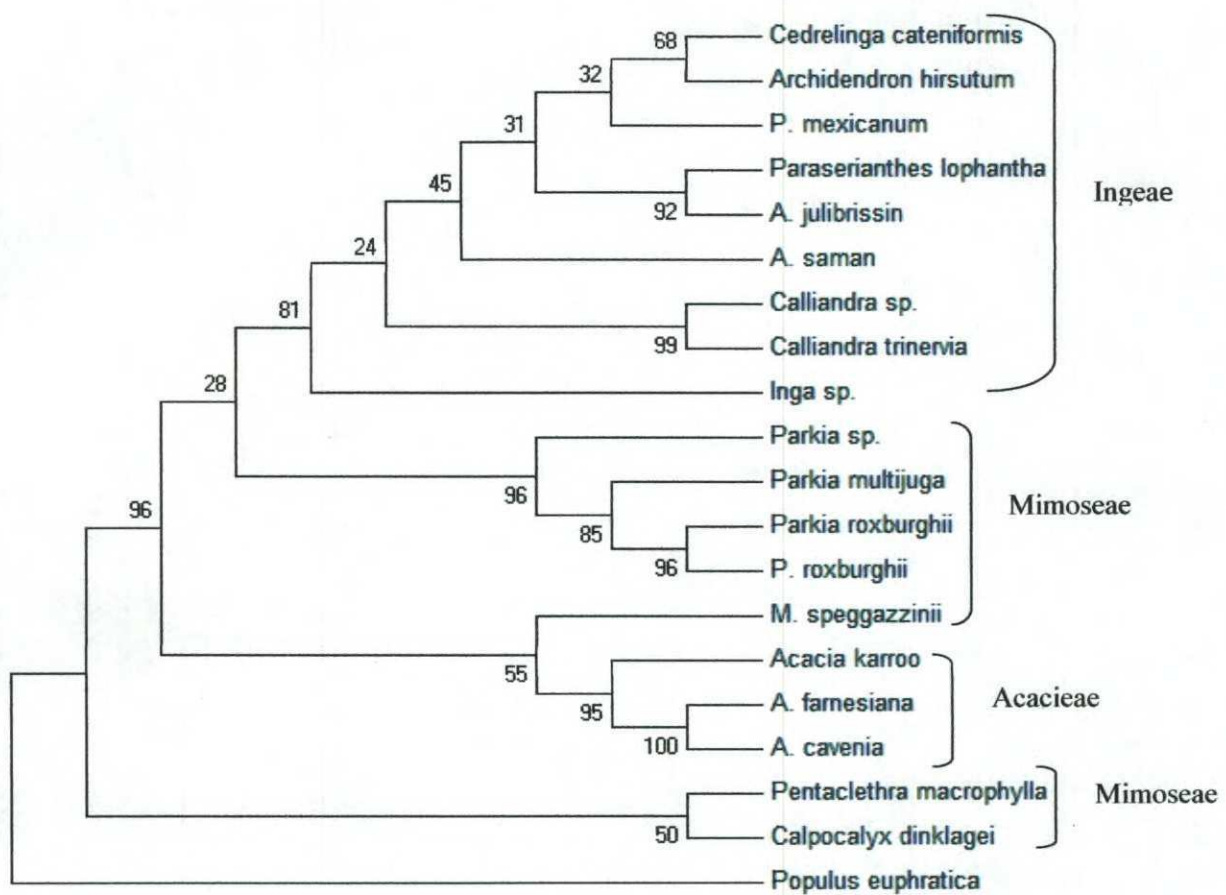


Figura 4 - Árvore construída através programa MEGA utilizando o método NJ representando as sequências de *rbcL* de Mimosoideae.

5 CONCLUSÕES

- Os marcadores 18S e *rbcL* não foram adequados para se inferir relação filogenética utilizando o método da MP, por serem conservados e devido a isso o total de sítios informativos para MP é baixo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

BROCCHIERI, L. Phylogenetics Inference from Molecular Sequences: Review and critique. **Theoretical Population Biology**, v. 59, p. 27-40. 2001.

CLARKE, H.D., DOWNIE, S.R., SEIGLER, D.S. Implications of chloroplast DNA restriction site variation for systematics of Acacia (Fabaceae: Mimosoideae). **Systematic Botany**, p. 618–632. 2000.

GRIMES, J. Inflorescence morphology, heterochrony, and phylogeny in the mimosoid tribes Ingeae and Acacieae (Leguminosae: Mimosoideae). **Botanical Review**, p. 317–347. 1999.

JUDD, W. S., CAMPBELL C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F., DONOGHUE, M.J., **Sistemática Vegetal Um Enfoque Filogenético**. 3ª Edição. Artmed Editora. Porto Alegre. 2009, 632p.

KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B., NEI, M. **MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis**. Arizona State University. Tempe, Arizona, USA. 2001.

LAVIN, M., HERENDEEN, P.S., WOJCIECHOWSKI, M.F. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. **Systematic Botany**, p.575–594. 2005.

LEWIS, G.P.; SCHRINE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, M. . Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens**, p.1-12. 2005.

LEWIS, G.P. & ELIAS, T.S. Mimoseae. In: R.M. Polhill and P.H. Raven(editors). Advances in legume systematic. **Royal Botanic Gardens**, p. 155–168. 1981

LUCKOW, M., MILLER, J.T., MURPHY, D.J. AND LIVSHULTZ, T. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. **Royal Botanic Gardens**, p. 197–220. 2003.

MILLER, J.T. A review of the classification of Acacia (Leguminosae, Mimosoideae). **Muelleria**, p. 10–26. 2008.

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**. Holos Editora, Ribeirão Preto. 2001, 97-107 p.

NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez). Acesso em: 15 de Fevereiro de 2011.

POSADA, D. & CRANDALL, K.A. ModelTest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**. v.14, n.9, p.817-818. 1998

RUSSO, C.A.M., MIYAKI, C.I., & PEREIRA, S.L. Reconstrução Filogenética. Métodos geométricos. In: MATIOLI, S.R. (ed). **Biologia molecular e evolução**. Holos editora, Ribeirão Preto. 2001, p.108-116.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v.4, p406-425,1987.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética um guia prático**. Holos Editora, Ribeirão Preto. 2003.

TAMURA, K. & NEI, M, Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**. v.10, p.512-526. 1993.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** v. 24, p. 4876 – 4882. 1997.

SWOFFORD, D.L. **PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods)**. Versão 4.0, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, 1999.