

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS VARIANTES MORFOLÓGICAS
FOLIARES DE *Caesalpinia echinata* LAM. (PAU-BRASIL) NA
REGIÃO SUL BAIANA COM BASE EM SEQÜÊNCIAS DE DNA

FABRÍCIO DO SACRAMENTO JUCHUM

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Janeiro de 2007

FABRÍCIO DO SACRAMENTO JUCHUM

ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS VARIANTES MORFOLÓGICAS
FOLIARES DE *Caesalpinia echinata* LAM. (PAU-BRASIL) NA
REGIÃO SUL BAIANA COM BASE EM SEQÜÊNCIAS DE DNA

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Janeiro de 2007

FABRÍCIO DO SACRAMENTO JUCHUM

ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS VARIANTES MORFOLÓGICAS
FOLIARES DE *Caesalpinia echinata* LAM. (PAU-BRASIL) NA
REGIÃO SUL BAIANA COM BASE EM SEQÜÊNCIAS DE DNA

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular.

Aprovada: 11 de janeiro de 2007

Prof. Dr. André Márcio Amorim
UESC

Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiroz
UEFS

Prof. Dra. Janisete Gomes da Silva Miller
UESC

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
UESC – Orientador

Dedicatória

Dedico este trabalho e tudo alcançado na minha vida aos meus pais Bruno e Diana, assim como, ao meu irmão Fernando.

AGRADECIMENTOS

A todos meus familiares, em especial aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado apoiando e mostrando-me o melhor caminho a ser seguido, nunca medindo esforços para o meu sucesso pessoal, assim como, ao meu irmão, pelo apoio e por suportar os meus dias difíceis.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade da realização do curso e pelo apoio logístico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa.

À Fundação Pau-brasil (FUNPAB/CEPLAC), IPCI, COMURNAT e ABA, pelo suporte financeiro parcial para a compra de materiais e reagentes utilizados nos trabalhos moleculares; especificamente ao Demosthenes, sempre disposto a ouvir e ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), projeto PADCT, pelo apoio financeiro parcial para a compra de materiais e reagentes, assim como, apresentação dos resultados no Congresso Brasileiro de Genética.

Desejo expressar minha homenagem e admiração aos cientistas que contribuíram de forma direta ao êxito deste trabalho:

- ao Prof. Ronan Xavier Corrêa, por depositar inteira confiança na minha pessoa; pela orientação segura no decorrer do trabalho, atenção constante e amizade. Uma pessoa admirável.

- ao Prof. Marco Antônio, professor e amigo, por todo profissionalismo e dedicação fundamentais ao sucesso desse trabalho. Essencial no meu aprendizado sobre filogenia molecular.
- ao Prof. André Márcio Amorim, pela disposição e atenção, como também, pelas sugestões e críticas construtivas que contribuíram na minha formação na graduação e na Botânica.

Ao NYBG, Projeto Mata Atlântica Nordeste, pelo apoio nas coletas do material foliar, em especial ao Dr. Wayt Thomas, pela atenção incondicionada.

Ao Dr. Gwilym Lewis, por toda atenção e ensinamentos sobre Leguminosae, principalmente no período em que fiquei no Herbário do Kew.

Ao José Lima, pela amizade, pelos momentos de descontração e pela incalculável ajuda na coleta do material foliar das árvores.

Ao Serginho e Carlinhos, sempre lembrando de coletar e acondicionar as folhas de pau-brasil durante as excursões.

Ao Antônio Bispo pelas excelentes pranchas, amizade e piadas.

Ao Dan e Robélio, pela atenção e ajuda na obtenção das mudas de pau-brasil. À Teresinha, sempre disponível para ajudar.

À Cristiane, pela ajuda incalculável em vários momentos na fase inicial dos trabalhos.

À Sônia, pela dedicação ao me ensinar os primeiros passos nas técnicas de Biologia Molecular, assim como, à Vanderly, pelas sugestões e parceria.

Ao Robson (Robinho), pela inestimável contribuição no processo de seqüenciamento do DNA neste trabalho.

Aos professores Fernanda Gaiotto, Júlio Cascardo, Leandro Loguercio e Paulo Terra, por contribuírem para o meu crescimento científico.

À Professora Janisete Miller, pela disposição e contribuição na revisão do segundo capítulo desta dissertação.

À Ana Acácia e ao Ramon, pela amizade e pelos momentos de descontração na hora do cafezinho.

Ao Eduardo, Cristiano, Braz e à Jeiza, por todos os auxílios e sugestões no decorrer do trabalho.

A todos os colegas do mestrado e laboratório, pela troca de experiências, ajuda, convívio e descontração.

Aos funcionários das secretarias do Programa de Pós-Graduação (Andréa e Luciana) e do Departamento (Geiza e Antônio), pela eficiência e disponibilidade.

Ao Dr. André Maurício de Carvalho, *in memoriam* (CEPEC), por ter aberto as portas para o meu futuro no mundo científico, ilustre pessoa e pesquisador.

Espero não ter esquecido de ninguém, contudo saibam que expresso minha gratidão a todos direta e indiretamente ligados ao desenvolvimento e êxito deste trabalho. Mesmo que seu nome não conste aqui, saiba que sou muito grato também.

ÍNDICE

EXTRATO	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Família Leguminosae	4
2.2. <i>Caesalpinia echinata</i> – Pau-brasil	7
2.2.1 Histórico e importância sócio-econômica	7
2.2.2 Características botânicas e ecológicas	10
2.3. Mata Atlântica: uma síntese	15
2.4. Filogenia Molecular	19
2.4.1 Genomas nuclear, mitocondrial e cloroplastídico.....	21
2.4.2 Ferramentas de análise de dados moleculares	25
3. CAPÍTULO 1- CARACTERIZAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS DE DNA CLOROPLASTÍDICO PARA ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS VARIANTES MORFOLÓGICAS FOLIARES DE <i>CAESALPINIA ECHINATA</i> LAM. (PAU- BRASIL).....	28
Resumo	28
3.1. Introdução	29
3.2. Material e métodos	30
3.2.1. Material vegetal.....	30
3.2.2. Extração do DNA	32
3.2.3. Amplificação das seqüências.....	33
3.2.4. Purificação dos produtos PCR.....	34
3.2.5. Seqüenciamento dos fragmentos	34
3.2.6. Análises filogenéticas.....	35

3.3. Resultados e discussão.....	35
3.4. Referências bibliográficas	42
4. CAPÍTULO 2 - PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG MORPHOTYPES OF CAESALPINIA ECHINATA LAM. (CAESALPINIOIDEAE: LEGUMINOSAE) EVIDENCED BY TRNL INTRON SEQUENCES.....	46
Abstract	46
Introduction.....	47
Material and Methods.....	48
Results and Discussion	49
References	54
5. CONCLUSÕES GERAIS	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
7. APÊNDICES	82
Apêndice A - Composição nucleotídica do fragmento do intron trnL das espécies estudadas. Exceto o total, os valores estão representados em porcentagem... 83	
Apêndice B - Divergência entre as seqüências do fragmento do intron trnL das espécies estudadas.....	84
Apêndice C - Sequências nucleotídicas do fragmento do intron trnL das espécies estudadas.....	85

EXTRATO

JUCHUM, Fabrício do Sacramento, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, janeiro de 2007. **Análise filogenética das variantes morfológicas foliares de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) da região sul baiana com base em seqüências de DNA.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadores: Marco Antônio Costa e André Márcio Amorim.

A família Leguminosae é a terceira maior família de angiospermas, com aproximadamente 730 gêneros e 19.400 espécies no mundo, sendo a segunda em importância econômica e agrícola. Em classificações mais recentes, Leguminosae tem sido tratada como uma única família com três subfamílias: Papilionoideae e Mimosoideae, recuperadas como monofiléticas em análises com *rbcL*, e Caesalpinioideae, que aparece como parafilética. O gênero *Caesalpinia*, pantropical e com cerca de 140 espécies conhecidas, apresentando uma história taxonômica extremamente complexa. A ocorrência natural de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) compreende o trecho de Mata Atlântica entre o Rio Grande do Norte e o Rio de Janeiro. Atualmente essa espécie encontra-se reduzida a alguns remanescentes desse bioma. Paralelamente, a acentuada redução na população de pau-brasil está intimamente ligada ao extrativismo para a produção de corantes e devido a ação antrópica sobre a Mata Atlântica. Na Mata Atlântica sul baiana foram encontrados espécimes de pau-brasil com variações na morfologia foliar, em simpatria e alopatria, que permitem levantar a hipótese da existência de um complexo de formas geneticamente diferenciadas em *C. echinata*. Nesse estudo, essas três variantes morfológicas (SV: variante pequeno; MV: variante médio; LV: variante grande) de *C. echinata* (pau-brasil) na região sul baiana foram caracterizadas por meio da técnica de seqüenciamento de DNA. No estudo de grupos de plantas com grande complexidade anatômica e

morfológica, as análises baseadas em dados moleculares como seqüências do DNA cloroplastídico (DNAcp) têm sido fundamentais. Assim, na primeira parte, objetivou-se validar o uso de seqüências de DNAcp na análise das relações filogenéticas dos variantes de *C. echinata*. Das duas regiões de DNAcp analisadas, os resultados baseados no gene *rbcL* foram limitados, caracterizando ainda essa região como muito conservada para o estudo proposto. Contudo, aqueles baseados no *intron trnL* foram caracterizados como eficientes para serem utilizados no auxílio de soluções ligadas a questões filogenéticas de *C. echinata*. Assim, concluiu-se que o *intron trnL* seria apropriado para o estudo proposto. Na segunda parte, objetivou-se investigar as relações filogenéticas entre as variantes morfológicas foliares de *C. echinata* com base no *intron trnL*. Os resultados revelaram diferenças no tamanho das seqüências, no conteúdo AT e no número de *indels* entre os variantes. Na matriz de 640 caracteres resultantes do alinhamento, 152 foram variáveis e 85 informativos para análise de parcimônia. Os cladogramas gerados apresentaram topologias semelhantes na distinção dos três variantes. Assim, nossas análises indicaram a ocorrência de um complexo de espécies, onde a grande divergência encontrada em *C. echinata* LV sugere a existência de uma nova espécie.

Palavras-chave: Caesalpinioideae; cpDNA; Filogenia molecular; Biodiversidade; Mata Atlântica.

ABSTRACT

JUCHUM, Fabrício do Sacramento, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, janeiro de 2007. **Phylogenetic analysis of the morphological leaf variants of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) in southeastern Bahia inferred from DNA sequences.** Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadores: Marco Antônio Costa e André Márcio Amorim.

Leguminosae is the third largest angiosperm family with approximately 730 genera and 19.400 species worldwide, being the second in economic and agricultural importance. In more recent classifications, Leguminosae has been treated as a single family with three subfamilies. Papilionoideae and Mimosoideae are recovered as monophyletic in *rbcL* analyses, while Caesalpinioideae appears as paraphyletic. The pantropical genus *Caesalpinia* includes about 140 species, presenting an extremely complex taxonomic history. The *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) which originally had a wide distribution in the Atlantic rainforest ranging from Cabo de São Roque, in the state of Rio Grande do Norte, through Cabo Frio, in the state of Rio de Janeiro is now reduced to remnants. The high reduction in the brazilwood population is intimately linked to the over-exploitation of this species for dye production and Atlantic forest destruction. In southern Bahia Atlantic Forest, brazilwood specimens with variations in the leaf morphology were found either in sympatry or allopatry, raising the hypothesis of a genetic species complex under the name *C. echinata*. In the present study, we characterized the three morphological variants (SV: small variant; MV: medium variant; LV: large variant) of *C. echinata* by DNA sequencing. In studies of plants with great anatomical and morphological complexity, analyses based on chloroplast DNA sequences have been largely used. Herein, we investigated the utility of two

different chloroplast DNA regions for the analyses of phylogenetic relationships among the *C. echinata* variants. Variation on the *rbcL* gene was limited, characterizing this chloroplast genome region as very conserved for the proposed study. However, the *trnL intron* presented more variable, confirming this alternative region as an informative marker to resolve the relationships within *C. echinata*. Therefore, based on this preliminary evaluation we proposed to investigate the relationships among the morphological variants of *C. echinata* employing the *trnL* intron. Sequencing results revealed differences in the fragment sizes, in the AT content and in the number of *indels* among the variants. Our aligned sequences produced a data matrix with 640 characters, being 152 variable and 85 informative for the parsimony analysis. The phylogenetics analysis produced cladograms with similar results considering the distinction among the three *C. echinata* variants. The present study provides evidence that suggest that at least one of the forms, the highly divergent *C. echinata* large variant, may represent a distinct species.

Key words: Caesalpinioideae; cpDNA; Molecular phylogeny; Biodiversity; Atlantic Forest.

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos diversos trabalhos com a família Leguminosae (*sensu* APG II, 2003; SOLTIS et al., 2005), inúmeras lacunas e discordâncias persistem, principalmente em nível específico da sua classificação, provavelmente, devido à grande variedade e complexidade morfológica desse grupo. Atualmente existe uma concordância sobre a necessidade de comparar as filogenias por diferentes bases de dados, buscando desta forma uma maior resolução nas filogenias dos organismos com base em técnicas de biologia molecular.

Caesalpinioideae é composta aparentemente por uma notável mistura de relictos e complexos de uma especiação relativamente recente, provendo muitas armadilhas para a sistemática tradicional e as interpretações biogeográficas. Assim, muitas características que se tornaram fixadas em grupos avançados de legumes podem ser transitórias e instáveis em alguns grupos dessa subfamília (POLHILL; VIDAL, 1981). *Caesalpinia* compreende cerca de 140 espécies (LEWIS et al., 2005), das quais *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), segundo Lima et al. (2002) possivelmente, é uma forma vegetal sobrevivente do Terciário ou Quaternário, uma “espécie relictual”, com características atípicas, apresentando poucas semelhanças com as espécies da subfamília na qual foi incluída. Tratando-se de *C. echinata*, variações na morfologia foliar e na coloração do lenho sustentam a hipótese de que, embora o pau-brasil continue sendo reconhecido como uma única espécie, novos estudos possivelmente virão comprovar, no futuro, a necessidade de distinguir pelo menos algumas variedades ou subespécies (LIMA et al., 2002). Na Mata Atlântica sul baiana foram encontradas plantas de pau-brasil com variações na morfologia foliar, podendo ocorrer tanto em simpatria quanto em alopatria, permitindo levantar a hipótese da existência de um complexo em *C. echinata*.

O pau-brasil – *Caesalpinia echinata* Lam. – é uma planta cuja distribuição se estendia por terras da Mata Atlântica, no trecho compreendido entre o Cabo de São Roque, no Rio Grande do Norte, até o município de Cabo Frio, no Rio de Janeiro (FONTES, 1995). A Mata Atlântica, que à época do descobrimento margeava toda a costa brasileira, foi reduzida a fragmentos de mata cercadas pelas cidades e áreas agrícolas (RIZZINI, 1983). A partir do início do período colonial, essa mata passou a ser explorada para extração de madeiras nobres como pau-brasil [*Caesalpinia echinata* Lam.], jacarandá-da-bahia [*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. Allem.], jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze], peroba-branca [*Tabebuia obtusifolia* (Cham.) Bur.], cedro-rosa [*Cedrela odorata* L.], entre outras. No sul da Bahia, esses fragmentos de mata encontram-se preservadas em áreas de reservas e associadas ao cultivo do cacau (THOMAS et al., 1998). Decorre desses fatos um crescente interesse pela preservação do patrimônio Mata Atlântica, assim como de seus elementos constituintes, como o pau-brasil. Nas estratégias de conservação, é importante dispor de informações sobre a estrutura populacional, especialmente quanto à diversidade genética das árvores remanescentes.

Análises filogenéticas baseadas em dados moleculares têm gerado uma grande quantidade de informações, ajudando a dirimir algumas questões não resolvidas pelos métodos tradicionais de análise, como também, para questionar reconstruções filogenéticas propostas anteriormente. Na genética molecular, ferramentas como o seqüenciamento de DNA têm contribuído nos estudos filogenéticos. No caso das leguminosas, o DNA cloroplastídico e nuclear têm sido os mais utilizados, tendo diferentes regiões estudadas de acordo com o nível taxonômico de interesse.

A reconstrução das relações filogenéticas é essencial para a compreensão da origem e diversificação ecológica de um grupo. O presente trabalho visa contribuir para o entendimento e uma maior compreensão filogenética das variantes morfológicas foliares de *C. echinata*, espécie de grande interesse econômico, ecológico e histórico. A partir dos resultados obtidos, objetiva-se delimitar uma filogenia mais robusta, assim como, fornecer dados que visem contribuir para futuros trabalhos da espécie em estudo. Os objetivos específicos foram:

1. Caracterizar regiões cloroplastídicas para o estudo filogenético de *Caesalpinia echinata*;
2. Construir uma hipótese filogenética com base em seqüências de DNACp, relacionando os resultados obtidos com as características morfológicas;
3. Contribuir, no sentido de enriquecimento do estudo filogenético do complexo *C. echinata* baseado no cpDNA;
4. Lançar bases para o enriquecimento de estudos do pau-brasil e outras plantas correlatas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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), ficando atrás apenas de Orchidaceae e Asteraceae (DOYLE; LUCKOW, 2003). Cronquist (1981, 1988), em seu esquema de classificação, considerou os legumes como três famílias independentes. Nos estudos recentes, existe um consenso no tratamento da família, com base em dados moleculares e não-moleculares, no qual 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.

Os legumes estão distribuídos 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 legumes 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, ficando atrás apenas de 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). Independentemente da ocorrência de fixação simbiótica de nitrogênio, aspecto menos comum entre as Caesalpinioideae, as folhas das Leguminosae, que geralmente são compostas e de vida curta, são ricas em nitrogênio, quando comparadas com outras espécies do mesmo ambiente (MCKEY, 1994). Segundo Lee e Langenheim (1975), as leguminosas da subfamília Caesalpinioideae compõem um dos grupos mais importantes em produção de resinas e um dos mais conspícuos componentes dos ecossistemas equatoriais na África e América do Sul.

Estudos recentes corroboram a 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 inferem que Faboideae e Mimosoideae são suportadas como monofiléticas (DOYLE, 1995; DOYLE et al., 2000; KAJITA et al., 2001; WOJCIECHOWSKI, 2003). Entretanto, Luckow et al. (2003) sugerem uma estreita relação de *Dinizia* com Caesalpinioideae, e que novos estudos melhor delimitarão ou não o monofiletismo de Mimosoideae. Por outro lado, a subfamília Caesalpinioideae é parafilética com sua divergência bastante precoce dentro da família e, segundo Lavim (1987), apresentando também alguns gêneros mais próximos a Mimosoideae e outros mais relacionados à Faboideae. Ainda, com razoável segurança, pode-se afirmar que Caesalpinioideae é a que apresenta o maior número de caracteres

plesiomórficos, entre as três subfamílias, devido às maiores semelhanças com as espécies fósseis que deram origem as plantas com vagens (LIMA et al., 2002).

Segundo os estudos mais recentes, existe uma concordância na organização de Caesalpinioideae, sendo esta dividida em cinco tribos: Cercideae, Caesalpinieae, Cassieae, Detarieae e Macrolobieae (BRUNEAU et al., 2001; TUCKER et al., 2003). Dentre estas tribos, com base nas últimas análises filogenéticas do grupo, Cassieae é considerada como não-monofilética (DOYLE, 1995; DOYLE et al., 2000; BRUNEAU et al., 2001) e resultados obtidos a partir da análise cladística do gênero *Caesalpinia*, tradicionalmente fixado, confirmam este como polifilético (LEWIS; SCHRIRE, 1995). Ao se propor a existência de uma filogenia que conecta táxons, passamos de modelos em que as espécies são entidades estanques (imutáveis e desconectadas umas das outras) para um modelo em que não apenas as espécies, mas também suas características são conectadas historicamente (AMORIM, 2002). Apenas Cercideae aparenta ser monofilética, sendo esta basal e o primeiro grupo a divergir em Leguminosae (BRUNEAU et al., 2001).

Na tribo Caesalpinieae, encontra-se *Caesalpinia*, pantropical e contendo cerca de 140 espécies. Algumas espécies deste gênero apresentam uma alta plasticidade fenotípica, especialmente em suas folhas, com acentuadas variações no tamanho e forma dos folíolos (Lewis, 1998). Lewis (1998) em uma revisão do gênero *Caesalpinia* organizou este em cinco grupos mais o subgênero *Guilandina*, com base em caracteres morfológicos, no qual fundiu-se *Poincianella* e *Erythrostemon*, formando um único grupo. Assim, segundo essa nova organização, foram reconhecidos os grupos *Libidibia*, *Brasilettia*, *Caesalpinia*, *Russellodendron* e *Poincianella-Erythrostemon*. As espécies deste último grupo citado, no Brasil, têm sua ocorrência limitada ao nordeste deste país e oeste do Mato Grosso e poucas ocupam habitats muito úmidos. Entretanto, Lewis et al. (2005) redefiniram *Caesalpinia sens. lat.* sem os grupos informais e com novos gêneros (*Coulteria*, *Erythrostemon*, *Guilandina*, *Libidibia*, *Mezoneuron*, *Poincianella* e *Tara*). *Caesalpinia sens. strict.* foi reduzido a um único gênero contendo 25 espécies.

Caesalpinia tem uma história taxonômica extremamente complexa, caracterizando em parte certa confusão na sua compreensão, refletindo desta

forma a necessidade de estudos mais detalhados das espécies, visando uma maior elucidação deste gênero (LEWIS, 1998). Ainda, segundo Lima et al. (2002), esse grupo apresenta enormes dificuldades em sua classificação devido ao grande polimorfismo morfológico e das poucas afinidades entre as plantas. Essa alta complexidade pode ser evidenciada quando se analisa uma única população de *Caesalpinia* e depara-se com indivíduos que podem apresentar frutos com ou sem glândulas, além de folhas com acentuado polimorfismo morfológico e com presença ou ausência de glândulas (LEWIS; SCHRIRE, 1995). Dentre estes grupos com alta variabilidade morfológica, tem-se *Caesalpinia echinata* Lam., a qual apresenta acentuada divergência na variação de sua morfologia foliar, sugerindo a hipótese de existência de variedades ou subespécies. Segundo Lima et al. (2002) essas e outras variações morfológicas, como dureza e coloração do lenho, estariam relacionadas à localização geográfica. No entanto, Juchum et al. (2005) observaram a ocorrência dessas variantes morfológicas em simpatria, em ambientes pouco variáveis bem como em ambientes distintos, permitindo descartar que essas variações não sejam devido a simples efeito ambiental, ratificando a necessidade de mais estudos e de novas ferramentas que possam ajudar na compreensão deste táxon.

2.2. *Caesalpinia echinata* – Pau-brasil

2.2.1 Histórico e importância sócio-econômica

Possivelmente, baseado em registros fósseis, os legumes surgiram ao longo do Cretáceo superior (POLHILL; RAVEN, 1981; LIMA et al., 2002), mais precisamente foi a partir do Eoceno na era Terciária que estes tornaram-se mais abundantes e diversos. Talvez, não coincidentemente, foi justamente ao final do Terciário ou início do Quaternário (LIMA et al., 2002) que surgiu uma das espécies de grande valor ecológico e econômico, futuramente vindo a se tornar um símbolo nacional e histórico do Brasil, *C. echinata* Lam. ou mundialmente “pau-brasil”.

Até o ano de 1500, o uso do pau-brasil resumia-se à fabricação de armas e obtenção de lenha pelos indígenas (CARDOSO et al., 2001). Apesar do

conhecimento das qualidades tintórias dessa árvore pelas populações locais, a natureza fornecia-lhes corantes provenientes do urucum e jenipapo, sendo mais rápidos e práticos (BUENO, 2002). Logo após a chegada dos portugueses, a espécie sofreu uma exploração ininterrupta e intensa, visando atender a indústria tintorial europeia, ocasionando uma drástica redução de suas populações naturais que eram bastante abundantes na Mata Atlântica brasileira (FONTES, 1995; BUENO, 2002).

O pau-brasil é considerado uma madeira de lei de alta qualidade, flexível, porém de extrema dureza. Nos primeiros anos do século XVI, o período em que foi abundante, era utilizado para construção de navios na indústria naval, assim como na construção civil e na fabricação de móveis e artesanato. Também foi amplamente utilizado, por volta do século XVII e XVIII, na Europa no tingimento de ovos de Páscoa, na produção de laca líquida, na composição de giz colorido e até na fabricação de uma pasta de dentes (BUENO; LIMA, 2002). Porém, o uso mais conhecido era mesmo para a fabricação de tinta, com a qual se tingia tecido e couro. Essa tinta era extraída do cerne da árvore, constituído pelo pigmento brasilina, e tinha a coloração alaranjada. Em contato com o ar, havia uma oxidação da brasilina, e essa substância se transformava em outra, chamada brasileína, de cor vermelha. O cerne era moído e reduzido a pó pelas indústrias da França e Itália para obtenção do pigmento vermelho usados para tingir os tecidos (OLIVEIRA et al., 2002). Ressalta-se que a popularização do pau-brasil na Europa, a partir do século XVI, não se deveu tanto a qualidade de sua pigmentação, mas às variadas matizes obtidas de seus pigmentos em tons vermelhos até arroxeados (REZENDE et al., 2004).

No entanto, a partir de meados do século XIX, com a síntese do primeiro corante artificial, a malveína, seguiu-se uma intensa atividade industrial resultando na síntese da brasilina (REZENDE et al., 2004). Com o declínio do interesse da tintura do pau-brasil devido às facilidades do corante sintético, imaginou-se que a exploração do mesmo acabasse. Segundo Cardoso et al. (2001), no mesmo período que desmoronou o mercado do pau-brasil com a descoberta dos corantes sintéticos, descobriu-se que sua madeira era excelente para fabricar arcos de violino, violoncelo, viola e contrabaixo, desde então vem sendo usada para a confecção de arcos profissionais de alta qualidade.

Há alguns anos, com a descoberta das propriedades adstringentes, fortificantes e secantes, o uso medicinal do pau-brasil vem crescendo. Sua casca, cozida, vem sendo utilizada no combate a diarreia e disenterias, assim como, moída e reduzida a pó limpa e fortalece as gengivas. Além disso, estudos recentes sugerem que o uso do extrato do pau-brasil pode se revelar um agente no combate ao câncer, inibindo o crescimento de tumores. Ainda, segundo Cruz-Silva et al. (2004), as sementes de *C. echinata* podem possuir uma importante aplicação biomédica devido à presença da proteinase serina, enzima envolvida em diferentes processos biológicos ligados à coagulação sanguínea e fibrinogênese.

O papel econômico do pau-brasil é incontestável, influenciando na economia mundial, seja na moda, nas finanças ou na indústria. Tornou-se um dos produtos mais negociados da época, iniciando o primeiro ciclo econômico do Brasil, também, o primeiro monopólio estatal (BUENO, 2002). Antes de seu tratamento botânico e da intitulação de seu nome científico, o pau-brasil recebeu várias sinônimas segundo a nacionalidade do grupo explorador dos países europeus, como Pau-brasil dos portugueses, Verzino dos Italianos, Fernambukholz dos alemães, Bois de Fernambouc dos franceses, Palo Brasil dos espanhóis e Brazil-wood ou Pernambuco wood dos ingleses. Para os povos nativos, era denominado Ibirapitanga, que na língua Tupi se representa por “ibirá = pau + pitãga = vermelho”, traduzindo-se como pau-vermelho. Tornou-se conhecido, ainda, por diversos outros nomes: Pau-rosado, Pau-de-tinta, Pau-de-pernambuco, Muirapiranga, Arubutan, Orobutan e outros (FONTES, 1995).

Contudo, o pau-brasil realmente entrou para o mundo científico no ano de 1785, quando o naturalista Lamarck procedeu à descrição da espécie. O gênero *Caesalpinia* (Lineu, 1753) derivou de uma homenagem ao pai da nomenclatura botânica Andréa Cesalpino (1519-1603). *Caesalpinia echinata*, assim batizado fazendo uma referência ao termo “echinata” que quer dizer “similar a um ouriço” característica conferida da observação do seu fruto, o qual apresenta acúleos na face externa, aspecto similar ao do ouriço (LIMA et al., 2002). Adicionalmente, segundo Fontes (1995) o epíteto “echinata” faz uma alusão as características dos acúleos presentes em extensões do caule e frutos da árvore, lembrando um ouriço do mar.

2.2.2 Características botânicas e ecológicas

Trata-se de uma planta de porte arbóreo, segundo Lewis (1998) variando de 5 a 15 m altura. Entretanto, Lima et al. (2002) descrevem que o porte dos exemplares atuais é de 10 a 12 m, trata-se de uma espécie mediana que raramente apresenta altura superior a 20 m, contudo existem registros do período colonial de indivíduos com até 30 m. Ainda, Fontes (1995) ratifica que *C. echinata* pode alcançar até 30 m de altura em seu habitat natural. Sua copa é bastante irregular e densa, tendo a tendência de torna-se frondosa e arredondada, repleta de galhos quase sempre ascendentes, com tons variando de cinza-claro nas partes mais velhas a verde-escuro nas terminações. Em indivíduos jovens são detectados acúleos na extensão do caule, assim como, nos ramos mais novos (FONTES, 1995; LIMA et al., 2002). O tronco geralmente irregular, segundo Rizzini (1971) e Lima et al. (2002) apresenta um DAP (diâmetro a altura do peito) variando entre 30 e 50 cm, raras vezes alcança os 70 cm. Contudo, Fontes (1995) afirma que em indivíduos adultos o DAP pode variar de 80 cm a 1 m. A casca geralmente apresenta tonalidade acinzentada, contudo nas plantas adultas possam surgir manchas castanho-avermelhadas por toda a superfície do tronco após o desprendimento da placas irregulares (Figura 1). No interior do tronco, na parte mais interna encontra-se o cerne, que na planta adulta varia sua tonalidade de castanho-alaranjado ao vermelho-escuro, mais externamente encontra-se o alburno, parte mais clara e menos densa do lenho (LIMA et al., 2002).

Suas folhas são compostas e bipenadas, possuindo alternadamente 3 a 10 pinas que contêm cada uma, 3 a 21 folíolos oblongo trapeziformes dispostos de forma alternada. Adicionalmente, é importante salientar a existência de variações na morfologia foliar no que se refere ao número e tamanho dos folíolos (FONTES, 1995; LEWIS, 1998; LIMA et al., 2002; JUCHUM et al., 2005). O primeiro tipo possui um maior número de pinas (5-10) com numerosos folíolos (12-21), porém são menores. Em um segundo material observaram-se indivíduos com pinas (3-5) e folíolos (3-8) menos numerosos, contudo maiores. Por fim, um terceiro tipo com amplos folíolos (LIMA et al., 2002) (Figura 2).

A inflorescência do pau-brasil pode ser descrita como uma panícula terminal ou racemo, raramente axilar, podendo conter cerca de 15 a 40 flores (FONTES, 1995; LEWIS, 1998). Suas flores são hermafroditas e pentâmeras (JUDD et al., 1999; TUCKER, 2003). O cálice de cor verde-amarelada é formado por cinco sépalas com pilosidade em ambas as faces. A corola possui cinco pétalas com intensa coloração amarela, pequenas estrias avermelhadas na parte basal e com a pétala mediana destacando-se pela presença de uma mancha central vermelho-escura (FONTES, 1995; LEWIS, 1998; LIMA et al., 2002). Acredita-se que essa pétala modificada esteja associada à estratégia reprodutiva e tenha sua função diretamente relacionada com a atração de agentes polinizadores, ou seja, funcione como um bio-sinalizador (LIMA et al., 2002; TUCKER, 2003; ZAIA, 2004). O androceu é formado por dez estames livres, com tamanhos variados e pilosos. Já o gineceu possui um ovário unilocular de superfície densamente pilosa com pequenos acúleos esparsos e muitos óvulos (LEWIS, 1998; LIMA et al., 2002) (Figura 3).

Seus frutos são do tipo legume, conhecidos também como vagem, de coloração verde quando imaturos e de cor marrom quando maduros possuem deiscência explosiva e são totalmente recobertos por acúleos que se formam logo após a floração. Segundo Lira et al. (2003), cada fruto desenvolve de uma a quatro sementes, irregularmente orbiculares, chatas e de coloração acastanhada, que no momento de abertura da vagem são dispersas até quatro a cinco metros da árvore genitora (Figura 4).



Figura 1 - Detalhes do tronco e ramo de *Caesalpinia echinata*. A. ausência de acúleos no caule de indivíduo adulto; B. presença de acúleos na extensão do caule de indivíduos jovens; C. presença de acúleos nos ramos mais novos. (Fotos: Amorim, 2005).

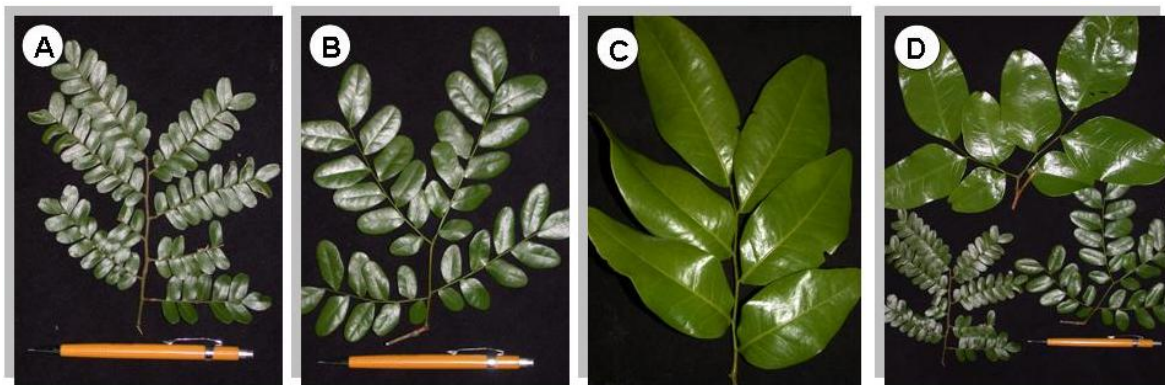


Figura 2 - Variantes morfológica foliares de *C. echinata*: A. variante pequena (SV); B. variante média (MV); C. variante grande (LV); D. comparação entre as variantes. (Fotos: Amorim, 2005).

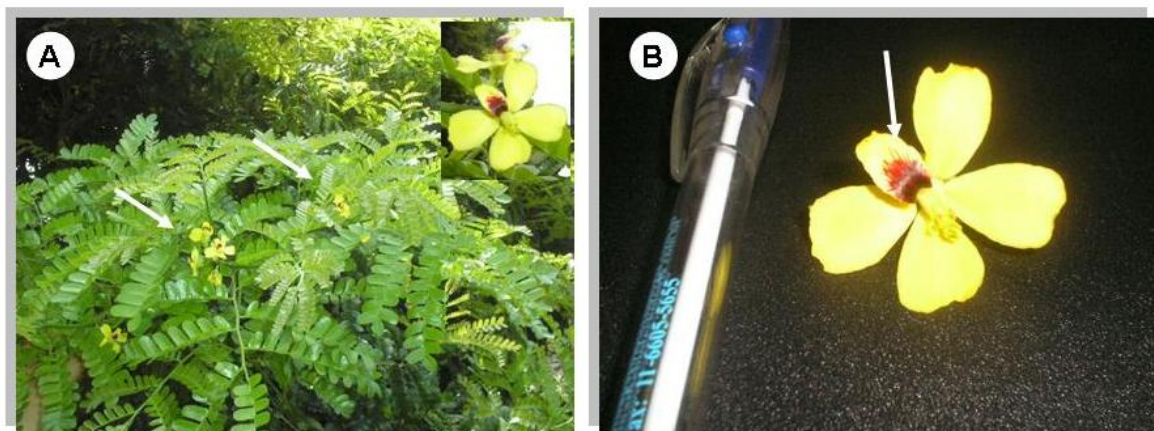


Figura 3 - Flores de *C. echinata*: A. ramo com inflorescência; B. detalhe da flor, em destaque mancha vermelho-escuro na pétala mediana. (Fotos: Fabrício, 2006).

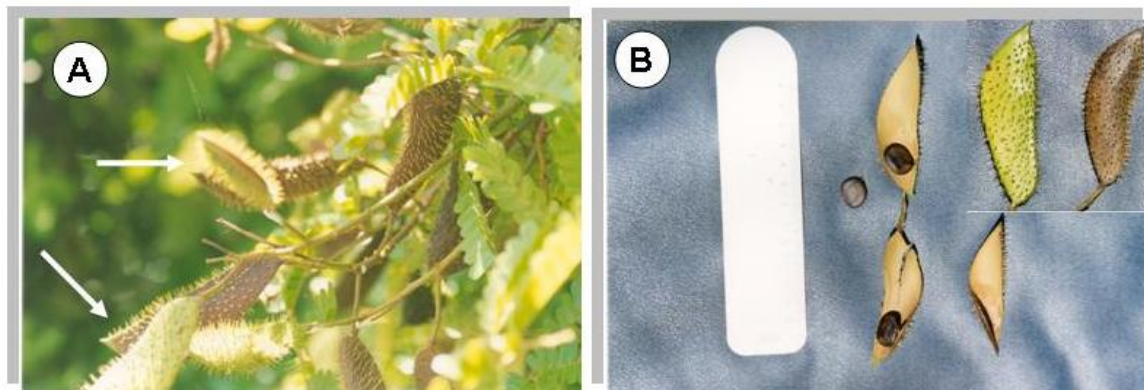


Figura 4 - Frutos de *C. echinata*: A. planta em estágio de frutificação; B. detalhe do fruto aberto e das sementes. (Fotos: Fabrício, 2006).

Em seu habitat natural, um dos fatores que podem influenciar o crescimento e determinar o porte de *C. echinata* é a disponibilidade de luz. Em condições naturais, competindo por luminosidade, a espécie apresenta crescimento lento, com caule mais retilíneo e diâmetro reduzido. Por outro lado, na ausência de competição por luz observa-se uma formação de copa mais rápida e um maior diâmetro do seu caule, além de ser mais ramificado (FONTES, 1995; LIMA et al., 2002). Em estudos realizados em fragmentos florestais do estado do Rio de Janeiro, demonstrou-se que a luminosidade pode influenciar a taxa de sobrevivência e mortalidade das plântulas, tendo-se verificado que em clareiras e bordos da floresta, locais de maior disponibilidade de luz, as taxas de mortalidade foram menores e ocorreram maior número de plântulas (LIMA et al., 2002). Tratando-se de uma espécie “em perigo” de extinção (VARTY, 1998) e visando sua reintrodução e conservação *in situ*, essas informações seriam de extrema importância nos programas de plantio do pau-brasil (MELO, 2005).

Nas populações naturais de *C. echinata* observou-se que em raras situações ocorreu florações em plantas com menos de 10 anos, ainda, pode-se definir sua estratégia reprodutiva como supra anual, ou seja, os intervalos de produção de flores numa mesma árvore costumam ser superiores a um ano. Suas flores são efêmeras, permanecendo abertas após a antese por 12 a 24 horas. Por volta de um mês passada a floração, o pau-brasil frutifica e, com cerca de 30 a 40 dias os frutos estão maduros e dispersando suas sementes. Ressalta-se que

tanto a floração quanto a frutificação tendem a acontecer em momentos distintos em diferentes regiões do Brasil, sendo que, no nordeste a espécie geralmente floresce nos meses de outubro e novembro, e frutificar entre novembro e janeiro. Adicionalmente, variações na temperatura e nos índices pluviométricos são determinantes na quebra de dormência das gemas florais. Assim, o início da floração coincide com o final dos períodos secos aparecendo freqüentemente logo após as primeiras chuvas os botões florais (LIMA et al., 2002).

Segundo Zaia (2004), devido à presença de uma pétala modificada, característica favorecedora na atração de agentes polinizadores, acredita-se que a espécie em estudo seja alógama, ratificando-se essa informação quando se verifica o sistema reprodutivo em outras espécies do gênero. Entretanto, devido ao tipo de florescimento supra-anual do pau-brasil, a autofecundação não pode ser descartada.

As flores das leguminosas são bastante variáveis em tamanho, forma, cor e tipo de polinização. Os polinizadores podem ser abelhas, vespas, formigas, borboletas, besouros, pássaros e morcegos, contudo a polinização por abelhas é a mais comum (ARROYO, 1981). Ainda, segundo Lewis e Gibbs (1999) e Queiroz et al. (2000), várias espécies de *Caesalpinia* são polinizadas por abelhas carpinteiras (*Xylocopa* sp.). No estudo da morfologia floral de *C. echinata*, Zaia (2004) constatou que a espécie apresenta características capazes de atrair polinizadores. Corroborando essa última informação, Lewis et al. (2000) concluíram que as abelhas são orientadas pela mancha vermelha presente na pétala mediana que reflete a luz ultravioleta absorvida pela combinação vermelha ou laranja em várias espécies de *Caesalpinioideae*. Complementa ainda descrevendo que a polinização por abelhas em *Caesalpinioideae* ocorre exclusivamente pelas generalistas.

Uma planta nativa do litoral brasileiro, cujo habitat natural estendia-se por terras da Mata Atlântica, no trecho compreendido entre o Cabo de São Roque, no Rio Grande do Norte, até o município de Cabo Frio, no Rio de Janeiro (LIMA, 1992; FONTES, 1995; LIMA et al., 2002). Segundo Carvalho (1994), sua ocorrência é em floresta estacional semidecidual. Adicionalmente, Lima et al. (2002) ressaltam que embora o pau-brasil possa ser encontrado em florestas pluviais, este é um elemento típico da floresta estacional, com preferência pelo

clima árido e solos secos. *C. echinata* era amplamente dispersa em todas as regiões da costa brasileira, pelo menos no trecho entre Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte, contudo nos últimos 10 anos constatou-se ocorrências de populações remanescentes nos estados do RN, PB, PE, AL, BA, ES, RJ e SP (LIMA, 1992). Atualmente existem evidências de que sua distribuição geográfica esteja restrita à costa brasileira, contudo, devido ao grande extrativismo predatório gerando acentuada redução das populações, não se sabe com que frequência essa espécie esteja distribuída ao longo dessa área (CORRÊA, 2003). Rocha (2004) observou que a espécie é ainda encontrada nos estados do RJ, AL, PE, PB, RN e BA, no entanto, requer medidas de conservação, plantio e divulgação. Associada à exploração predatória do pau-brasil, a agricultura extensiva e o crescimento das áreas urbanas tem devastado o bioma Mata Atlântica, seu habitat natural. Assim, desde 1992 o pau-brasil encontra-se na lista das espécies “em perigo” de extinção (BRASIL, 1992; CARDOSO et al., 1998).

2.3. Mata Atlântica: uma síntese

A história evolutiva da Mata Atlântica pode ser resumida em períodos de contato com outras biotas de florestas sul-americanas seguidos de períodos de isolamento (RIZZINI, 1997). Pode-se inferir ainda que a biota Mata Atlântica é um conjunto composto por elementos muito antigos, oriundos do Plioceno, assim como, por elementos mais recentes, que colonizaram a região em momentos compreendidos no Pleistoceno-Holoceno (HACKETT; LEHN, 1997). Contudo, Lima et al. (2002) destacam o início da formação desse bioma no Terciário, mais precisamente no Eoceno, o qual se expandiu pelas rugosidades rochosas e planícies adjacentes a Serra do Mar ao longo de 50 milhões de anos.

No entanto, um dos pontos de maior discussão acerca da Mata Atlântica seria a delimitação de seus domínios, sobre o qual diversos autores consideram diferentes limites para as divisões fitogeográficas propostas para o Brasil (JOLY et al. 1991). Assim, o Domínio Mata Atlântica é considerado como uma área geográfica que engloba as diferentes fisionomias florestais: Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional

Semidecídua e Floresta Estacional Decídua; fisionomias não florestais: campos de altitude e as formações pioneiras de influência marinha, fluvio-marinha e fluvio-lacustre; e áreas florestais disjuntas no nordeste (IBGE,1992; CÂMARA, 1996). Nos últimos anos, a conclusão geral é que a Floresta Atlântica trata-se de um domínio fitogeográfico com diversas fisionomias florestais e não florestais. Pressupõe-se ainda que o elevado grau de interdependência entre elas seja importante na conservação da biodiversidade e que uma não pode ser plenamente conservada sem a outra (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000; SCUDELER, 2002). A acentuada heterogeneidade fisionômica e florística desse conjunto de florestas é, em sua grande maioria, decorrente da complexa combinação de fatores geomorfológicos, climáticos, hidrológicos e pedológicos. Em síntese, eventos paleoclimáticos também merecem destaque como critério para a enorme biodiversidade dessa floresta. No Cenozóico, falhas de grande profundidade criaram diferenças pronunciadas no relevo, influenciando os biomas, assim como, períodos alternados de clima frio e seco durante o Quaternário, principalmente no Pleistoceno, contribuíram na formação de acentuadas diferenciações regionais (CÂMARA, 2005).

Originalmente, a floresta ocupava uma área de cerca de 1.363.000 km², o que correspondia a 16% do território nacional e, abrangia total ou parcialmente os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul (IBGE, 1993). Contudo, de acordo com os trabalhos mais recentes a realidade física da Mata Atlântica é outra, restando menos de 10% de sua área original, mais precisamente, segundo Morellato e Haddad (2000) cerca de 7,6%, ou apenas 7,25% de acordo com dados do MMA (2000) e Câmara (2005). Essa drástica redução da floresta está intrinsecamente relacionada com as formas de uso da terra e dos modos de produção, ou seja, ao extrativismo (madeira, ouro) e aos impactos dos diferentes ciclos econômicos (cana-de-açúcar, café, algodão, fumo, agropecuária). Também, devido à concentração das maiores cidades e núcleos industriais e de silvicultura (cerca de 80% PIB brasileiro é gerado na região da Mata Atlântica), além da acentuada intervenção antrópica caracterizada pela alta densidade demográfica com aproximadamente 70% da população brasileira

vivendo nessa área (SOUZA, 2000; FAUSTO, 2002; BACKES; IRGANG, 2004; PINTO; BRITO, 2005).

No nordeste brasileiro, com base na distribuição dos tipos vegetacionais, estima-se que a Floresta Atlântica cobria uma área contínua com cerca de 76.938 km², ou 6,4% da extensão da floresta Atlântica brasileira, distribuídas em cinco tipos vegetacionais: áreas de tensão ecológica, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila aberta, floresta ombrófila densa e formações pioneiras (IBGE, 1985). Assim como em outras regiões do Brasil, essa floresta no nordeste apresenta-se bastante fragmentada e, já em 1998, segundo MMA (2000), restava de 5,6 a 8,8% de sua área original. Contudo, Thomas et al. (1998) destacam que o percentual da floresta atlântica nordestina em condições de ser preservada é de apenas 2%. O mesmo contexto negativo segue-se quando analisamos a situação dessa floresta na Bahia, onde as estimativas assustadoras do SOS Mata Atlântica (1992) já refletiam lamentavelmente uma enorme perda, onde somente 0,4% da floresta original permanecia intacta.

Estendendo-se do sul de Salvador ao norte do Espírito Santo, a Mata Atlântica ocupava uma área de 70.500 km², reduzidos, atualmente, a 27.250 km² (ALMEIDA, 2000), e uma zona de aproximadamente 100-200 km de largura, tornando-se mais secas à medida que entra no continente. Essa área engloba quatro tipos florestais, passando de: Floresta de Restinga para Floresta Úmida Sul Baiana, desta para Floresta Estacional e finalmente Floresta de Cipó. A média pluviométrica anual também varia em uma faixa de mais de 800 a 1000 mm, e de estações sem período seco a períodos secos e chuvosos bem definidos. Adicionalmente, cada tipo florestal ocupa uma área aproximada de 50 km de largura podendo ainda variar em sua composição (GOUVÊA, 1976; MORI, 1983; BARBOSA; THOMAS, 2002).

Entretanto, apesar de toda a devastação sofrida por essa floresta e dos valores negativamente assustadores dessa destruição em massa, o bioma Mata Atlântica foi eleito um dos “hotspots” de biodiversidade do mundo, possuindo ainda uma alta riqueza biológica a ser descoberta e conservada (MYERS et al., 2000). Segundo Silva e Casteleti (2005), acredita-se que esse complexo florestal abrigue de 1 a 8% da biodiversidade mundial, mesmo com extensas áreas pouco conhecidas do ponto de vista biológico. Em linhas gerais a riqueza pontual desse

bioma é alta, calcula-se que essa floresta abrigue 20.000 espécies de plantas vasculares, sendo 8.000 endêmicas (MYERS et al., 2000). Adicionalmente, Mori et al. (1981) estimaram que 53% das espécies lenhosas eram endêmicas da Mata Atlântica. Thomas et al. (1998) ratificaram essa riqueza num estudo da flora da Reserva Biológica de Una (Município de Una) e de Serra Grande (Município de Uruçuca), onde, respectivamente, 44,1 e 41,6% das espécies eram endêmicas para a floresta costeira e, 28,1 e 26,5% foram endêmicas para BA-ES.

O alto grau de devastação e fragmentação ao qual a Mata Atlântica tem sido submetida reflete-se em um acentuado número de espécies ameaçadas ou extintas, atualmente, pelo menos 367 espécies de plantas e arbustos são consideradas ameaçadas (BERNARDES et al., 1990; HILTON-TAYLOR, 2000). Segundo Tabarelli et al (2005), além dessas 367 espécies ameaçadas, no plano regional, pelo menos 151 espécies de árvores e arbustos são considerados ameaçados. Ações antrópicas são os principais fatores responsáveis pela degradação e fragmentação de habitats, assim como redução do número de indivíduos de muitas espécies. Um exemplo notório é *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), a primeira espécie vegetal brasileira a tornar-se ameaçada (MELLO FILHO et al., 1992). Já no primeiro século de exploração, dois milhões de árvores foram derrubadas, uma média de 20 mil por ano ou quase 50 toras por dia (SOUSA, 1938; DEAN, 1989; SOUZA, 2000; LIMA et al., 2002). Neste contexto, Câmara e Galindo-Leal (2005) ratificam que os fragmentos da Mata Atlântica original continuam a deteriorar-se, assim como, que a perda da biodiversidade estaria diretamente relacionada com a perda de ecossistemas, populações, variabilidade genética e espécies, além dos processos ecológicos e evolutivos responsáveis pela manutenção dessa diversidade. Em síntese, observa-se que nas estratégias de conservação, manejo e recuperação é importante dispor do máximo de informações sobre a estrutura do grupo, especialmente no sentido de preenchimento das lacunas existentes. Atualmente, os marcadores moleculares têm sido extensivamente utilizados como ferramentas em diversas análises de vários grupos (populações, espécies), possibilitando dentre diversos fins detectar variações genéticas (AVISE, 2004).

A extinção de espécies reflete-se em um dano imensurável, isso porque, as informações genéticas e as interações ecológicas associadas aos milhões de

anos de evolução são únicas de cada espécie. A diminuição dessa variabilidade genética e de interações ecológicas está estritamente relacionada com a perda de biodiversidade, culminando na extinção de populações locais de plantas e animais, causando assim mudanças nos processos ecossistêmicos (GALINDO-LEAL et al., 2005). Destaca-se que além dos diversos elementos do conjunto de variabilidade ecológica, o componente genético da biodiversidade é fundamental, pois para a evolução das espécies a variação genética será fornecedora do material básico da seleção natural (ALLCOCK et al., 1995). Nos últimos anos, diversos estudos baseados em marcadores moleculares têm contribuído na ampliação dos conhecimentos biológicos e na melhor compreensão dos inúmeros componentes das populações e espécies arbóreas da Mata Atlântica, dentre eles pode-se citar: *C. echinata* (CARDOSO et al., 1998; LIRA et al., 2003; MELO, 2005); *Euterpe edulis* (GAIOTO et al., 2003); *Dalbergia nigra* (ALMEIDA, 2001).

Nesse contexto, as técnicas genético-moleculares passaram a estar associadas às diversas áreas, complementando e sendo complementadas, seja pela ecologia, evolução, genética ou botânica. Dentre os vários campos beneficiados por estas técnicas, destacamos a sistemática filogenética, na qual os dados moleculares têm sido usados para resolver questões filogenéticas de grandes grupos, assim como relações filogenéticas de populações e espécies ou, ainda, estudos sobre a evolução de características morfológicas, fisiológicas e comportamentais (RUSSO, 2001).

2.4. Filogenia Molecular

Com as noções acerca da evolução de que todos os seres vivos partilham um único ancestral comum e a estrutura dos organismos de hoje traz gravada em si parte de sua história evolutiva, surgiu um grande interesse no estudo das relações de parentesco entre os organismos. Desta forma, quando propomos a existência de conexões entre as espécies, ou seja, existência de uma filogenia, passamos de um modelo estanque 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, através da análise filogenética, pode-se compreender os processos evolutivos como a especiação, extinção, adaptação e dessa forma inferir a história da evolução (SYSTEMATICS AGENDA 2000, 1994).

Assim, várias abordagens para inferir as relações filogenéticas foram sendo desenvolvidas ao longo do século XX, resultando em diversas controvérsias acerca tanto de tais relações quanto dos métodos e tipos de dados utilizados para chegar-se a elas (AMORIM, 1997, 2002). Estudos filogenéticos têm sido realizados utilizando-se tanto dados morfológicos quanto moleculares. Atualmente as análises de macromoléculas, em especial do DNA, vêm sendo amplamente utilizadas para este fim, caracterizando uma linha de pesquisa denominada sistemática molecular. Em grande parte, isto ocorre porque o DNA é o próprio material hereditário, cujos dados têm sido gerados de forma rápida e em grande quantidade, frente aos recentes avanços tecnológicos na área de biologia molecular (JUDD et al. 1999; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

Os dados moleculares associados às novas ferramentas de análise têm contribuído acentuadamente nas mais diversas pesquisas, envolvendo estudos sobre irradiações adaptativas (GIVNISH, 2001), a história da diferenciação geográfica entre espécies (SCHAAL; OLSEN, 2001), o fluxo gênico e variabilidade genética entre populações (CAIN et al. 2000), os impactos da hibridação e poliploidia sobre a especiação, adaptação, expressão gênica e evolução cromossômica (RIESERBERG et al. 1996). Essas informações moleculares, para a sistemática filogenética, têm sido extensivamente utilizadas tanto para esclarecer quanto corroborar ou questionar relações filogenéticas propostas. Paralelamente ao avanço dos dados moleculares, os métodos de

inferência filogenética vêm-se tornando cada vez mais comuns, sendo ferramenta fundamental como fonte de informação biológica em diversas áreas (RUSSO, 2001).

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 nuclear, mitocondrial e cloroplastídico

A natureza genética das plantas é complexa e de entendimento evolutivo em parte limitado. A célula vegetal possui genomas de origem nuclear, mitocondrial (DNAm_t) e cloroplastídico (DNA_cp), cada um com características que definem sua utilidade para resolver questões evolutivas nos diferentes níveis (STEBBINS, 1950; WALBOT; CULLIS, 1985; NAHUM, 2001). O DNAm_t e o DNA_cp diferem grandemente em relação ao genoma nuclear, no tamanho e número de genes e, principalmente nas taxas e nos padrões de evolução (NAHUM, 2001). Segundo Birky (1995, 2001), as mitocôndrias e os cloroplastos são herdados de uma maneira não-Mendeliana em todos os organismos estudados. Adicionalmente, Koperlainen (2004) afirma que a herança dos genomas citoplasmáticos é freqüentemente materna, mas existem numerosas exceções que resultam em diferentes graus de herança paterna ou biparental do DNA_cp e DNAm_t.

A maior parte das informações genéticas das células vegetais está localizada no núcleo. Contudo, no estudo do genoma nuclear nas angiospermas, são encontradas algumas dificuldades por causa de seu grande tamanho e complexidade, com extensas regiões não-codificantes. As plantas com flores possuem um dos maiores genomas entre os organismos vivos (BENNETT et al., 2000). Estes grandes genomas em parte devem-se à origem poliplóide de muitas espécies. 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, 1980; WHITHAM et al., 1999), o que torna mais complexo o estudo evolutivo de alguns grupos.

Dentre os genes nucleares, o DNA ribossomal (DNAr) é um dos mais utilizados nos estudos filogenéticos de plantas (BAKER et al., 2000; CRISP et al., 2000; JER-MING, 2000; CHAW et al., 2000; MACKINDER 2000; SOLTIS et al., 2000; MURPHY, et al. 2003; MCMAHON; HUFFORD, 2004). O rDNA é uma região do genoma que codifica os componentes do RNA dos ribossomos. O DNAr eucariótico está organizado em *tandem*, com milhares de cópias no genoma. Ainda sobre essa região, cada unidade de repetição é formada por genes que codificam a subunidade menor (18S) e a subunidade maior (26S), ambas separadas pelo rDNA nuclear 5,8S. Essas regiões gênicas são separadas pelos espaçadores transcritos internos (ITS), transcritos externos (ETS), assim como, pelos espaçadores não transcritos (NTS) e espaçadores intergênicos (IGS) (JUDD et al., 1999).

Diversos autores têm publicado filogenias robustas em diversos grupos de plantas com diferentes regiões nucleares, por exemplo, o gene da desidrogenase alcoólica (Adh) (SMALL; WENDEL, 2000; FUKUDA et al., 2005). Esse gene codifica uma enzima glicolítica (CLEGG et al., 1997; MIYASHITA, 2001), sendo esta essencial para o metabolismo anaeróbico das plantas (DOLFERUS et al., 1994; DOLFERUS et al., 1997). Adicionalmente, esta região pode ser tanto usada em estudos filogenéticos em categorias taxonômicas superiores quanto nas inferiores (SANG et al., 1997). Outra interessante região para estudos filogenéticos seria a histona H3-D (DOYLE et al., 1996; MILLER; BAYER, 2000). A H3-D é membro da família multigênica da histona H3, sendo considerada por alguns autores como uma alternativa para ITS (KANAZIN et al., 1996; DOYLE et al., 1999). Pode-se destacar ainda que as aplicações dessa região vão além do seu uso na filogenia, sendo utilizada em estudos de poliploidia (DOYLE et al., 2002; JOLY; BRUNEAU, 2003), especiação (BARRACLOUGH; VOGLER, 2000) e hibridação (TEMPLETON, 2001; DOYLE et al., 2002), dentre outros.

O genoma do cloroplasto corresponde a uma molécula de DNA circular, podendo variar de 120 kb a 220 kb, localizada no interior dos cloroplastos existentes no citoplasma de vegetais superiores (NAHUM, 2001). Esse 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. Adicionalmente, no cpDNA encontramos regiões repetidas invertidas (IR, inverted repeat), formada por dois segmentos idênticos em sentidos opostos, separando os SSC e LSC (DOYLE et al., 1995; NAHUM, 2001). As regiões IR podem apresentar um tamanho variável, de 12 a 25 kb cada, porém algumas linhagens, nas leguminosas, tem perdido estas regiões (DOYLE et al., 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 taxa de mutação. Nos últimos anos, ocorreu uma explosão de publicações sobre filogenia molecular, nos diferentes níveis taxonômicos, construídas a partir do cpDNA ou em consórcio 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).

A grande maioria das análises filogenéticas relacionado a plantas, dependendo do nível taxonômico, envolvem o gene *rbcL*, codificador da subunidade maior da rubisco (DOYLE et al., 2000; SOLTIS et al, 2000, APG II, 2003, SALAMIN et al., 2005). Taberlet et al. (1991) publicaram primers universais para regiões não-codificadoras plastidiais. Dentre as regiões plastidiais não codificadoras melhor estudadas no grupo das angiospermas, nas análises filogenéticas, encontram-se o espaçador intergênico *trnL-trnF* e o intron *trnL* (MES et al., 2000; HOLT et al, 2004; LLEDÓ et al. 2005) (Fig. 1). Essas regiões têm sido amplamente utilizadas nas análises filogenéticas nos mais variados níveis taxonômicos (MES et al., 2000; BRUNEAU et al., 2001; LEE; WEN, 2003; MUSCHNER et al., 2003; HASTON et al., 2005). Não podemos desconsiderar que a viabilidade dessas regiões, dentro de um mesmo nível taxonômico, pode ser variável dentro dos grupos de organismos, assim como, que já existem diversas outras regiões desse genoma com ótima funcionalidade para estudos filogenéticos e evolutivos.

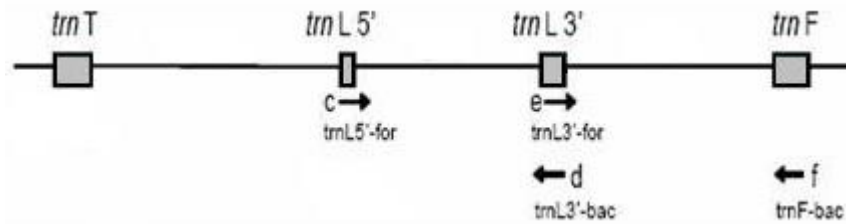


Figura 5. Caracterização da região cloroplastídica *trnL* e *trnL-F* (Taberlet et al., 1991). O quadrados representam regiões codificantes.

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

A mitocôndria vegetal, semelhantemente ao cloroplasto, apresenta seu material genético na forma de DNA circular. Contudo, o tamanho do seu genoma pode alcançar grandes valores, variando de 6 kb a 2000kb (JUDD et al., 1999; NAHUM, 2001). Pode-se destacar que o genoma mitocondrial (DNAm) 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 e Herbon (1988), a pouca utilização do DNAm 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 DNAm de plantas tem sido pouco aplicado em estudos filogenéticos por causa das características da estrutura e 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 a promissora eficiência dessas seqüências para a sistemática molecular (FREUDENSTEIN;

CHASE, 2001; DUMINIL et al., 2002; DOMBROVSKA; QIU, 2004). Uma das primeiras regiões investigadas com uso para filogenia é o gene da NADH desidrogenase, principalmente os fragmentos correspondentes a subunidade I (WISSINGER et al., 1991) e subunidade II (DEMASURE et al., 1995). Adicionalmente, Chen e Sun (1998) em seus estudos baseados no DNAm encontraram variação compatível ao 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 tem 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 e reconstrução de uma árvore que leva em consideração as relações entre todas as distâncias (RUSSO et al., 2001; SCHNEIDER, 2003). 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, 2003). 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). Adicionalmente, NJ requer uma menor capacidade computacional podendo levar a conclusões similares às aquelas obtidas por métodos que requerem mais tempo, 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) e suporta a 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 (2003), 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 um grande tempo de comparação, o tamanho dos ramos não é informativo e utiliza-se apenas dos 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 melhor se adequou ao modelo utilizado (PEREIRA et al. 2001; NEI; KUMAR, 2000; SCHNEIDER, 2003). Essa metodologia apresenta menor variância em comparação com outros métodos, tendendo a ser robusto ao assumir o modelo evolutivo, sendo caracterizado ainda por uma boa base estatística. Contudo, devido ao seu grande consumo de memória, trata-se de um método moroso quando utilizado na análise com grandes bancos de dados (NEI; KUMAR, 2000).

A caracterização de uma filogenia é baseada sempre em uma estimativa que se faz sobre algum processo do passado de um organismo, ao qual não se tem mais acesso. Assim, as análises moleculares são ferramentas úteis para avaliar, dentre outras coisas, a filogenia das espécies como também para a compreensão dos processos de especiação. Desta forma, podemos inferir que a

reconstrução das relações filogenéticas é essencial para a compreensão da origem e diversificação morfológica e ecológica de uma espécie ou de um grupo.

3. Capítulo 1- CARACTERIZAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS DE DNA CLOROPLASTÍDICO PARA ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS VARIANTES MORFOLÓGICAS FOLIARES DE *Caesalpinia echinata* Lam. (PAU-BRASIL)

Resumo

Caesalpinia echinata Lam. (pau-brasil) é uma leguminosa de distribuição restrita à Mata Atlântica. Na Mata Atlântica sul baiana foram encontrados indivíduos de *C. echinata* com grandes variações na morfologia foliar, que permitem levantar a hipótese da existência de distintas variedades, subespécies ou espécies. Recentemente, a taxonomia baseada em caracteres morfológicos vem buscando maior resolução nas filogenias dos organismos junto à biologia molecular. Em estudos filogenéticos de plantas, o DNA cloroplastídico têm sido um dos mais utilizados. Neste trabalho objetivou-se validar o uso de seqüências de DNA cloroplastídico para a reconstrução filogenética das variantes morfológicas de *C. echinata*. O DNA total de tecido foliar de 82 indivíduos foi extraído pelo método CTAB, amplificado por PCR com *primers* específicos para o gene *rbcl* e o *intron trnL*. As seqüências obtidas dos produtos PCR foram alinhadas com auxílio dos programas BioEdit e ClustalW. As análises filogenéticas tiveram um papel exclusivamente de ratificar a viabilidade das regiões escolhidas no estudo filogenético. Os dados obtidos apresentaram congruência com as diferenças morfológicas das variantes da espécie. A análise preliminar dos dendrogramas sugere maior proximidade genética entre as variantes pequena e média, e o maior distanciamento da variante com folíolos grandes, caracterizando a necessidade de mais estudos sobre a evolução da espécie. A região *rbcl* apresentou limitações, sugerindo-se melhoramento dos

métodos. De acordo com os resultados obtidos com a região *trnL*, esse foi caracterizado como eficiente para ser utilizado no auxílio de soluções ligadas a questões filogenéticas.

Palavras-chave: Caesalpinioideae; cpDNA; regiões genômicas informativas; evolução.

3.1. Introdução

As leguminosas (Leguminosae) são compostas, aparentemente, por uma mistura de complexos resultantes de uma especiação relativamente recente, e pouco definida pela sistemática tradicional, assim como, pelas interpretações biogeográficas. Desta forma, pode-se inferir que muitas características que se tornaram fixadas em grupos avançados de Leguminosae são transitórias e instáveis em alguns grupos da subfamília Caesalpinioideae (POLHILL; VIDAL, 1981). Nesta subfamília encontramos o gênero *Caesalpinia*, pantropical, contendo de 120 a 130 espécies e cerca de 25 sinônimos, tendo sua organização composta por cinco grupos informais e mais um subgênero. Destaca-se ainda que algumas espécies desse gênero são caracterizadas por uma alta plasticidade fenotípica, com acentuadas variações no tamanho e forma dos folíolos (LEWIS, 1998).

Na Mata Atlântica sul baiana foram encontradas plantas com variações na morfologia foliar, em *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), que permitem levantar a hipótese da existência de variedades, subespécies ou até mesmo espécies diferentes dentro da espécie nominal. Lima et al. (2002) acreditam que esta espécie seja uma forma vegetal oriunda do Terciário ou Quaternário, destacando a existência de poucas semelhanças desta espécie com as integrantes do grupo (caesalpiníáceas) no qual foi integrada. Neste contexto, espécies com grande complexidade anatômica e morfológica representam um problema para os estudos taxonômicos, surgindo assim a necessidade de novas ferramentas que venham corroborar, complementar ou até mesmo redefinir organizações vigentes.

Nos últimos anos são notórios os inúmeros trabalhos das mais diversas áreas que adicionam informações de origem molecular aos estudos. Dentre estes, a taxonomia convencional vem buscando maior resolução nas filogenias dos organismos junto à biologia molecular. Deste modo, podemos inferir que análises filogenéticas baseadas em dados moleculares têm gerado uma grande quantidade de informações, ajudando a dirimir algumas questões não-resolvidas pelos métodos tradicionais de análise.

Em estudos filogenéticos de plantas, o DNA de cloroplasto tem sido um dos mais utilizados, tendo diferentes regiões estudadas de acordo com o nível taxonômico de interesse (TABERLET et al. 1991; GIELLY; TABERLET, 1994). Dentre as regiões desse genoma, extensivamente utilizados na inferência filogenética, podemos destacar o gene *rbcl* (carboxilase do difosfato 1,5 da ribose – rubisco), geralmente usados nos estudos de categorias taxonômicos superiores. Contudo, Gielly e Taberlet (1994), baseados em trabalhos desenvolvidos por diferentes autores em distintas famílias, inferiram que este gene pode ser usado em categorias taxonômicos inferiores (inter e intra-genéricos).

Adicionalmente, as regiões plastidiais não-codificadoras têm sido amplamente utilizadas nas análises filogenéticas nas mais variadas categorias taxonômicas. Entre estas, poderíamos destacar o espaçador intergênico *trnL-trnF* e o intron *trnL* como integrante das regiões melhor estudadas no grupo das angiospermas (MES et al., 2000; HOLT et al, 2004; LLEDÓ et al. 2005). Entretanto, existem inúmeras outras regiões desse genoma com grande aplicabilidade na filogenia e nos estudos evolutivos das plantas que não podem ser desconsideradas. Neste trabalho, objetivou-se validar o uso de seqüências de DNA cloroplastídico na análise das relações filogenéticas das variantes morfológicas foliares de *C. echinata*.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Material vegetal

As coletas das três variantes morfológicas foliares de *Caesalpinia echinata* (SV- variante pequeno, MV- variante médio, LV- variante grande) foram realizadas em populações naturais na região de mata atlântica no Sul da Bahia. Assim, neste trabalho, utilizamos materiais provenientes dos municípios de Buerarema, Guaratinga, Ilhéus, Itajú do Colônia, Jussari, Mascote, Potiraguá e Porto Seguro (Figura 1).

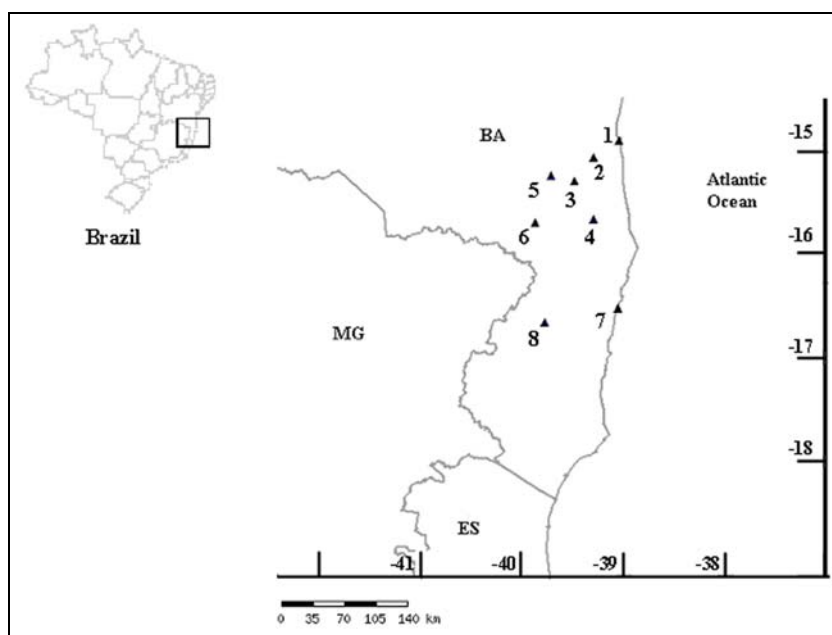


Figura 1 – Áreas de coleta de *Caesalpinia echinata* na Mata Atlântica no estado da Bahia, Brasil. Números representam: 1, Ilhéus; 2, Buerarema; 3, Jussari; 4, Mascote; 5, Itajú do Colônia; 6, Potiraguá; 7, Porto Seguro; 8, Guaratinga.

Amostras de folhas de 89 indivíduos foram acondicionadas em sílica-gel entre o período de coleta e extração de DNA. Parte desse material botânico coletado está depositado no Herbário CEPEC (Vouchers:). Além disso, adotamos como estratégia coletar somente indivíduos com DAP ≥ 5 (DAP – diâmetro à altura do peito). Foram incluídos na análise seqüências do Genbank (*Bauhinia* sp. – AF206739; *Bauhinia hookeri* - AF365059 e *Caesalpinia ferrea* – AF430718), utilizados na polarização das árvores. O grupo externo foi selecionado com base na literatura (LEWIS; SCHRIRE, 1995). Para essa primeira caracterização foram analisados apenas seis indivíduos de *C. echinata*, sendo dois indivíduos representando cada variante morfológica.

3.2.2. Extração do DNA

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

O material foliar foi macerado em tubos Eppendorf (2 mL) na presença de nitrogênio líquido e com auxílio de uma “chave estrela” previamente modificada. Posterior à maceração, foram adicionados 700 µL de tampão de extração CTAB 2% às amostras, agitando-se no vórtex e incubando em banho-maria 65° C por cerca de 30-40 minutos, sendo vertidas suavemente a cada 10 minutos.

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

Posteriormente, iniciou-se a precipitação dos ácidos nucléicos, onde foi adicionado ao tubo contendo o produto transferido isopropanol gelado (4° C) na proporção de 1:1 (sobrenadante:isopropanol), os quais, após suave agitação foram incubados por 30 minutos a -20° C. Em seguida, os materiais foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4° C, formando-se ao final um precipitado esbranquiçado. A fase aquosa foi descartada e o pellet (precipitado) foi lavado duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 95%, sendo secado a temperatura ambiente. Por fim, o pellet foi ressuspenso em 70 µL de TE-RNAase (Tris-HCL 10 mmol.L⁻¹ / EDTA, pH 8,0 a 1 mmol.L⁻¹ + RNAase a 10 µg/mL) e incubado em banho-maria por 30 minutos a 37° C para degradar os RNAs presentes.

Após a extração, a avaliação da qualidade e a quantificação do DNA foram realizados por meio de gel de agarose 1%. Cada amostra aplicada no gel continha 3 µL de DNA, mais 2 µL de H₂O e 1 µL de tampão de carregamento tipo IV. Adicionalmente, visando estimar a concentração das bandas obtidas do DNA, eram aplicadas no gel amostras do DNA λ nas concentrações 50, 100 e 200 ng/

μL. A partir desta fase, todo o DNA obtido foi diluído para a concentração de 10 ng/ μL, sendo estocado em freezer -20° C.

3.2.3. Amplificação das seqüências

Amostras de DNA de dois indivíduos de cada variante foram amplificadas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em termociclador GeneAmp PCR System 9700 da PerkinElmer. Cada amostra a ser amplificada era constituída por 3 μL de DNA (10 ng/μL) e 22 μL de uma mistura composta por Tampão 10X, dNTP (2,5 mM), BSA (2,5 mM), MgCl₂ (50 mM), Primer F (0,9 μm), Primer R (0,9 μm), Taq polimerase (1u) e H₂O Mili-Q autoclavada.

Nesse estudo foram selecionados o gene *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase – RUBISCO) e o *intron trnL*. Esse último corresponde à combinação dos *primers trnL-c* e *d* (TABERLET et al., 1991). As seqüências dos *primers* estão indicados na tabela 1.

Tabela 1 – Seqüências dos *primers* utilizados no estudo das variantes morfológicas de *Caesalpinia echinata*.

Primer	Seqüência	Sentido
<i>trnL-c</i>	5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3'	<i>Forward</i>
<i>trnL-d</i>	5' GGGGATAGAGGGACTTGAAC 3'	<i>Reverse</i>
<i>rbcL F</i>	5' ATGTCACCACAAACAGARACTAAA 3'	<i>Forward</i>
<i>rbcL R</i>	5' CTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG 3'	<i>Reverse</i>

A amplificação dos fragmentos seguiu as recomendações de Taberlet et al., (1991) e Gielly e Taberlet (1994), com pequenas modificações no tempo e na temperatura. Para a amplificação dos fragmentos, as amostras foram submetidas a um passo inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos seguido por 35 ciclos de amplificação, após os quais realizou-se um passo de extensão final com cinco minutos a 72°C. Os passos dos 35 ciclos foram realizados com a desnaturação a 94° C por um minuto, pelo anelamento com a temperatura de 53° C para o *primer rbcL* e 52,3° C para o *primer trnL*, por fim, o alongamento ou extensão a 72° C por dois minutos.

Finalizada as ampliações, seus produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corados com brometo de etídio (25 µg/µL) para confirmar a presença dos modelos esperados. O tamanho dos fragmentos amplificados foi identificado por meio de comparações com padrões conhecidos em número de pares de bases de um marcador de peso molecular de 1kb. Os resultados obtidos foram observados nos géis sob luz ultravioleta e arquivados em forma de imagens digitalizadas no EDAS 240 da KODAK (Figura 2).

3.2.4. Purificação dos produtos PCR

Como etapa inerente ao sequenciamento procedeu-se a purificação do produto PCR por via enzimática, sendo utilizado nessa fase as enzimas exonuclease (EXO1) e fosfatase alcalina (SAP – *Shrip Alkaline Phosphatase*). A primeira degrada o excesso de primer fita simples e a segunda degrada os nucleotídeos não incorporados. Para purificação de 12 µL de produto PCR foram utilizados 0,66 µL de exonuclease, 0,66 µL de fosfatase alcalina e 0,68 µL de H₂O Mili-Q autoclavada. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 minutos a 37° C e 15 minutos a 80° C, essa última temperatura visa a inativação das enzimas.

3.2.5. Seqüenciamento dos fragmentos

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 variante foram feitas seis repetições de cada amostra, assim como, foi adotado o volume de 1,5 µL como ótimo para a reação de seqüenciamento para o pau-brasil. 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 Mili-Q autoclavada e 2 µL de Mix (integrante do kit).

No termociclador a reação passou por 40 ciclos de amplificação, apresentando três ciclos, o primeiro com uma temperatura de 95° C por 10 segundos, um segundo com 53° C ou 52,3° C (varia com o primer) por 15

segundos e o terceiro com 60° C por 1,20 minutos. As temperaturas utilizadas para os primers nessa reação são as mesmas da reação de amplificação. Posteriormente, os produtos provenientes dessa amplificação foram direcionados ao seqüenciador MegaBace DNA Analysis System 1000 (Amersham & Life Science) para análise.

3.2.6. Análises filogenéticas

Após obtenção das seqüências, procedeu-se ao alinhamento dos fragmentos de DNA seqüenciados, para o qual foi usado o programa ClustalW implementado no programa BioEdit (HALL, 1999), seguido de ajustes manuais quando necessários. Ressalta-se que a seqüência consenso de cada indivíduo foi resultado da análise de seis seqüências, oriundas três do *primer forward* e três *reverse*. Foram utilizadas na análise apenas as regiões que apresentaram boa qualidade, eliminando trechos terminais que poderiam gerar erros de leitura. Os caracteres foram polarizados utilizando-se *Bauhinia hookeri* e *Caesalpinia ferrea* como grupo externo.

As análises filogenéticas tiveram um papel exclusivamente de ratificar a aplicabilidade das regiões escolhidas no estudo filogenético de *C. echinata*, visando verificar a viabilidade das regiões para o estudo proposto. Para isso, de posse da matriz, construiu-se uma árvore utilizando o agrupamento de vizinhos (NJ – neighbor-joining) (SAITOU; NEI, 1987), baseado no modelo de Jukes e 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 verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981) implementado no programam BioEdit (HALL, 1999).

3.3. Resultados e discussão

Nesta primeira fase do trabalho, foi avaliada a utilidade tanto do gene *rbcl* quanto do *intron trnL* para o estudo filogenético de *C. echinata*, levando em consideração fatores como a facilidade de amplificação e seqüenciamento e o número de caracteres variáveis e informativos filogeneticamente. Assim, podemos

inferir que ambas as regiões selecionadas para o presente estudo apresentaram produtos de amplificação com padrões de bandas similares (Figura 2) ao exposto em materiais depositados no banco de dados *Genbank*, em torno de 560 pb para *trnL* e 1400 pb para a região do *rbcl*, e na literatura consultada (TABERLET et al. 1991; GIELLY; TABERLET, 1994; KAJITA et al., 2001; HASTON et al., 2005).

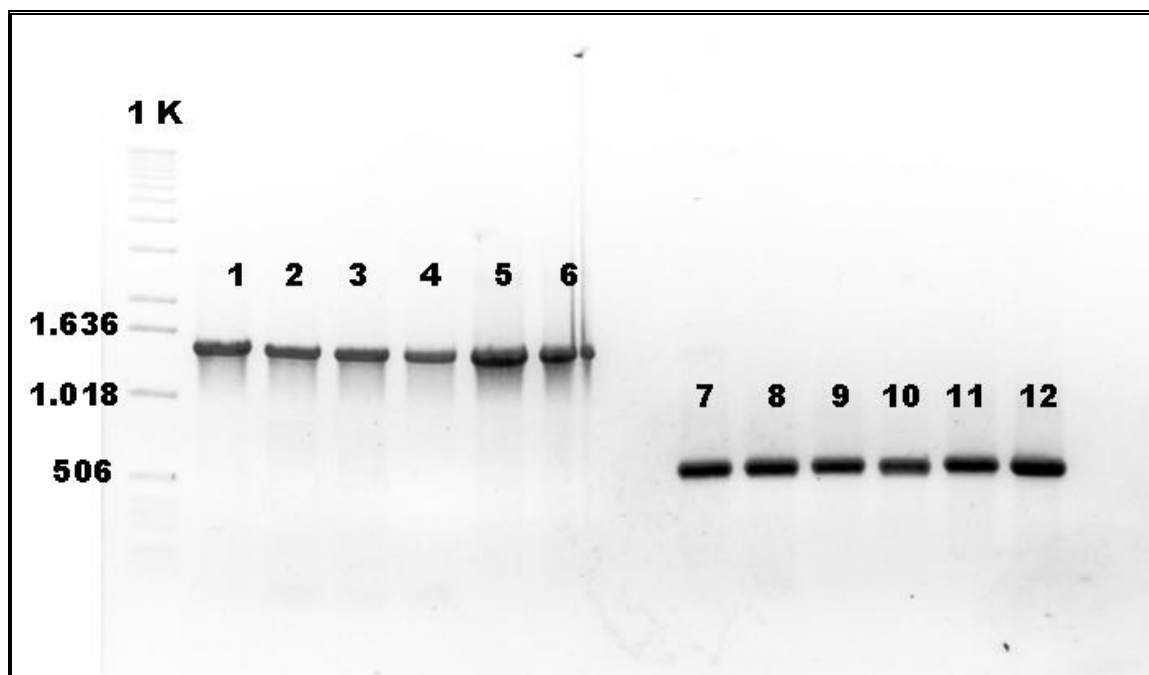


Figura 2 – Análise da qualidade dos produtos PCR com os *primers rbcl* (1 a 6) e *trnL* (7 a 12) em gel de agarose 1% das variantes morfológicas foliares.

Entretanto, a qualidade dos resultados apresentados no seqüenciamento não foram semelhantes ao das amplificações tratando-se do gene *rbcl*. O produto de seqüenciamento oriundo dessa região não apresentou o comprimento de sua seqüência igual ao descrito na literatura, apresentando limitações. Assim, sugerimos o melhoramento dos métodos para melhor qualificar essa região. Outro problema com esse gene é a condição muito conservada de suas seqüências observada para a espécie aqui analisada, que seria limitado para um estudo de categorias taxonômicos inferiores. Contudo, apesar de muitos trabalhos ratificarem essa condição conservada do gene (GIELLY; TABERLET, 1994; DOYLE et al., 2000), existem trabalhos com diferentes grupos de plantas que sugerem o uso desse gene para trabalhos com categorias taxonômicos inferiores

(XIANG et al, 1993; GADEK; QUINN, 1993; KRON; CHASE, 1993; PRICE; PALMER, 1993; CONTI et al., 1993; SOLTIS et al., 1993). O padrão de comprimento da seqüência, apresentado pelo *intron trnL* (SV- 547 pb, MV- 554 pb e LV- 565 pb), enquadrado-se nos padrões encontrados na literatura para as leguminosas (TABERLET et al. 1991; BRUNEAU et al. 2001; HASTON et al., 2005).

A freqüência dos pares de bases variou entre as regiões estudadas, sendo que nas seqüências do gene *rbcL* foi mais uniforme, aproximadamente 50%. Contudo na região do *trnL* foi desigual, com a proporção de bases A-T em torno de 65%. Essa maior concentração de A-T é pertinente, haja vista que *trnL* é uma região de *intron* do cloroplasto, já tendo sido observado esse padrão em outros trabalhos (PALMER, 1991; SMALL et al., 1998). O número de *indels* também foi diferenciado entre as variantes do pau-brasil, sendo um em LV, três em MV e seis em SV (Figura 3). Kelchner (2000) considera que os *indels* podem dificultar o alinhamento das seqüências e a determinação das homologias, mas alega que esses trechos contêm informações filogenéticas importantes e que devem ser incluídas nas análises. Adicionalmente, Golenberg et al. (1993), Gielly e Taberlet (1994) e Small et al. (1998) inferem que seqüências não-codificantes geralmente acumulam *indels* e substituições em taxas muito mais altas que as regiões gênicas, sendo de grande valia para estudos filogenéticos.

No agrupamento feito com base na distância genética de Jukes Cantor, pelo método de neighbor-joining, a partir dos dados da região do *rbcL*, as variantes não foram agrupados conforme suas características morfológicas, apresentando-se de forma incongruente no cladograma (Figura 4), ou seja SV (variante pequena) com LV (variante grande) e LV com MV (variante média). Ressalta-se que em uma das amostras, PC1 (MV), o resultado do seqüenciamento não foi satisfatório, sendo este descartado da análise (Figura 4). Apesar de sua aplicabilidade demonstrada na literatura em estudos filogenéticos de leguminosas e diversos outros táxons, a região *rbcL* mostrou-se ineficiente neste estudo que trata de categorias taxonômicas inferiores. Possivelmente, isto se deve a uma baixa taxa de evolução desta região genômica, que é considerada bastante conservada, limitando seu uso em filogenia de plantas (GIELLY; TABERLET, 1994; JUDD et al., 1999). Por outro lado, a análise com base na

região do *intron trnL* foi mais efetiva na distinção entre os variantes morfológicos de *C. echinata*, assim como, no agrupamento dos variantes em congruência com a morfologia (SV - ESP08/BU1; MV - PC1/PC2; LV - GL1/GL3) (Figura 5).

Os resultados das análises filogenéticas realizadas no BioEdit, utilizando o método da máxima verossimilhança, foram congruentes com aquelas apresentadas no programa MEGA, onde *rbcL* foi considerado inadequado para estudo intra-específico de *C. echinata*, gerando um resultado incongruente com a morfologia (Figura 6). Esses variantes ocorrem tanto em alopatria quanto em simpatria, contudo para esse estudo foram utilizados dois materiais de cada variante, sendo que SV são oriundos de populações alopátricas e os representantes de MV e LV de populações simpátricas. Enfim, em nenhuma árvore proveniente de dados da região *rbcL* obteve-se um padrão, o que nos leva a acreditar que novos trabalhos venham complementar e melhor explicar os resultados encontrados para esta região. Os motivos dessa incongruência não estão bem definidos, poderiam ser em decorrência de ausência de polimorfismo entre as variantes, um evento de introgressão no passado, seleção direcional, evolução recente, etc.

A região do *primer trnL* apresentou novamente boa viabilidade para o estudo proposto, agrupando os variantes com similaridade morfológica (Figura 7). Diferentemente, da região do *rbcL*, caracterizado no cladograma da figura 6, os materiais analisados são distintamente agrupados quando comparados com a morfologia. De acordo com os resultados obtidos com o *primer trnL*, esse foi caracterizado como eficiente para ser utilizado no auxílio de soluções ligadas a questões filogenéticas.

	5	15	25	35	45	55
CE SV	CTTAATTAGA	TTGAGCCTTT	GTATGGAAAC	CTACCAAGTG	AGAACTTTCA	AATTCAGAGA
CE MV	CTTAATTAGA	TTGAGCCTTT	GTATGGAAAC	CTACCAAGTG	AGAACTTTCA	AATTCAGAGA
CE LV	CTTAATTAGA	TTGAGCCTTT	GTATGGAAAC	CTACCAAGTG	ATAACTTTCA	AATTCAGAGA

	65	75	85	95	105	115
CE SV	AACCCTGGAA	TTAACAATGG	GCAATCCTGA	GCCAAATCCT	GTTTTCCGAA	AACCAAGAAG
CE MV	AACCCTGGAA	TTAACAATGG	GCAATCCTGA	GCCAAATCCT	GTTTTCCGAA	AACCAAGAAG
CE LV	AACCCTGGAA	TTAACAATGG	GCAATCCTGA	GCCAAATCCT	GTTTTCCGAA	AACCAAGAAG

	125	135	145	155	165	175
CE SV	AGTTCAGAAA	GGGAAAGGGA	GAATAAAAAA	AGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ACGGAAGCTG
CE MV	AGTTCAGAAA	GGGAAAGGGA	GAATAAAAAA	AGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ACGGAAGCTG
CE LV	AGTTCAGAAA	GGGAAAGGGA	GAATAAAAAA	AGGATAGGTG	CAGAGACTCA	ACGGAAGCTG

	185	195	205	215	225	235
CE SV	TTCTAACAAA	TGGAGTTGAC	GACATTTTCGT	T-----AGTA	AAGGAATCCT	TCCATCGAAA
CE MV	TTCTAACAAA	TGGAGTTGAC	GACATTTTCGT	TTCGTTAGTA	AAGGAATCCT	TCCATCGAAA
CE LV	TTCTAACAAA	TGGAGTTGAC	GACATTTTCGT	TTCGTTAGTA	AAGGAATCCT	TCCATCGAAA

	245	255	265	275	285	295
CE SV	CTCCAGAAAA	GAAAGGATCA	A-----GGAT	GAACATATAT	ATACGTA----	---CTGAAAT
CE MV	CTCCAGAAAA	GAAAGGATCA	A-----GGAT	GAACATATAT	ATACGTA----	---CTGAAAT
CE LV	CTCCAGAAAA	GAAAGGATCA	AATCAAGGAT	GAACATATAT	ATACGTATAC	GTACTTAAAT

	305	315	325	335	345	355
CE SV	ACTATTTCAA	TTGATTAG-A	CCAGACAGAT	CCCAAATCTC	TATTTTTTAA	TATTTATATG
CE MV	ACTATTTCAA	TTGATTAG-A	CCAGACAGAC	CCCAAATCTC	TATTTTTTAA	TATTTATATG
CE LV	ACTATTTCAA	TTGATTAGTA	CCAGACAGAC	CCCAAATCTC	TATTTTTTAA	TATTTATATT

	365	375	385	395	405	415
CE SV	ACAAATGAAA	GATGTGAATA	GATTCCAAGT	TGAAGAAAGA	ATCGAATATT	TATTGATCAA
CE MV	ACAAATGAAA	GATGTGAATA	GATTCCAAGT	TGAAGAAAGA	ATCGAATATT	TATTGATCAA
CE LV	ACAAATGAAA	GATGTGAATA	GATTCCAAGT	TGAAGAAAGA	ATCAAATATT	TATTGATCAA

	425	435	445	455	465	475
CE SV	ATCATTCACT	CCATCATAGT	CTGATAGATC	TTTTGAAGAA	CTGATTAATC	GGACGAGAAT
CE MV	ATCATTCACT	CCATCATAGT	CTGATAGATC	TTTTGAAGAA	CTGATTAATC	GGACGAGAAT
CE LV	ATCATTCAAT	CCATCATAGT	CTGATAGATC	TTTTGAAGAA	CTGAT--AATC	GGACGAGAAT

	485	495	505	515	525	535
CE SV	AAAGATAGAG	TCCCATTTCTA	CATGTCAA-A	CCGACA-CAA	TGAAATTTAT	AGTAAGAGGA
CE MV	AAAGATAGAG	TCCCATTTCTA	CATGTCAATA	CCGACAACAA	TGAAATTTAT	AGTAAGAGGA
CE LV	AAAGATAGAG	TCCATTCTAG	CATGTCAATA	CCGACAACAA	TGAAATTTAT	AGTAGAGGGA
			
	545	555	565			
CE SV	AAATCCGTCG	ACTTTAGAAA	TCGTGA			
CE MV	AAATCCGTCG	ACTTTAGAAA	TCGTGA			
CE LV	AAATCCGTCG	ACTTTAGAAA	TCGTGA			

Figura 3 – Sequências nucleotídicas do fragmento do *intron trnL*, na quais os trechos com realce correspondem às substituições e aos *indels*.

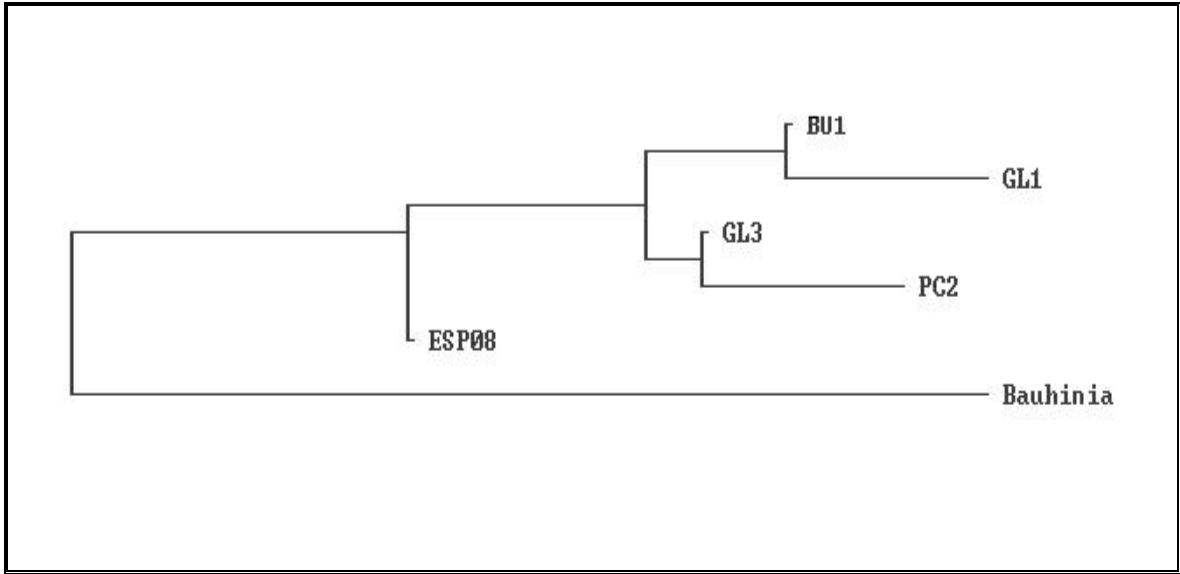


Figura 4 – Cladograma das variantes morfológicas foliares de *C. echinata* e do grupo externo (*Bauhinia* sp.), obtido a partir de seqüências do gene *rbcL*, com base no método de neighbor-joining (SV – BU1/ESP08; MV – PC2; LV – GL1/GL3).

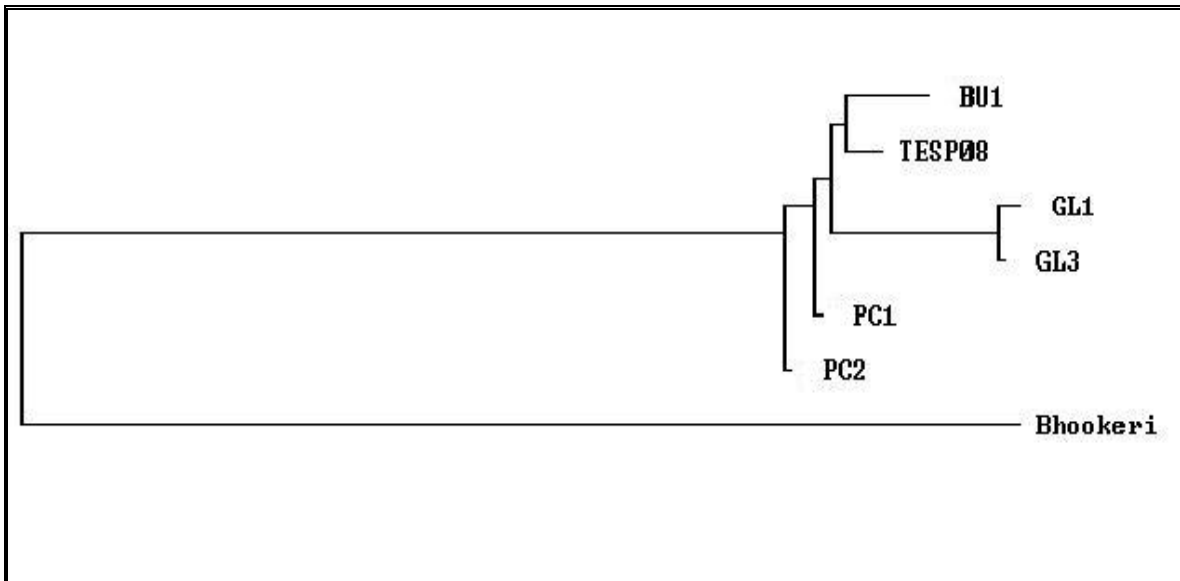


Figura 5 - Cladograma das variantes morfológicas foliares de *C. echinata* e do grupo externo (*Bauhinia hookeri*), obtido a partir de seqüências do *intron trnL*, com base no método de neighbor-joining (SV – BU1/ESP08; MV – PC1/PC2; LV – GL1/GL3).

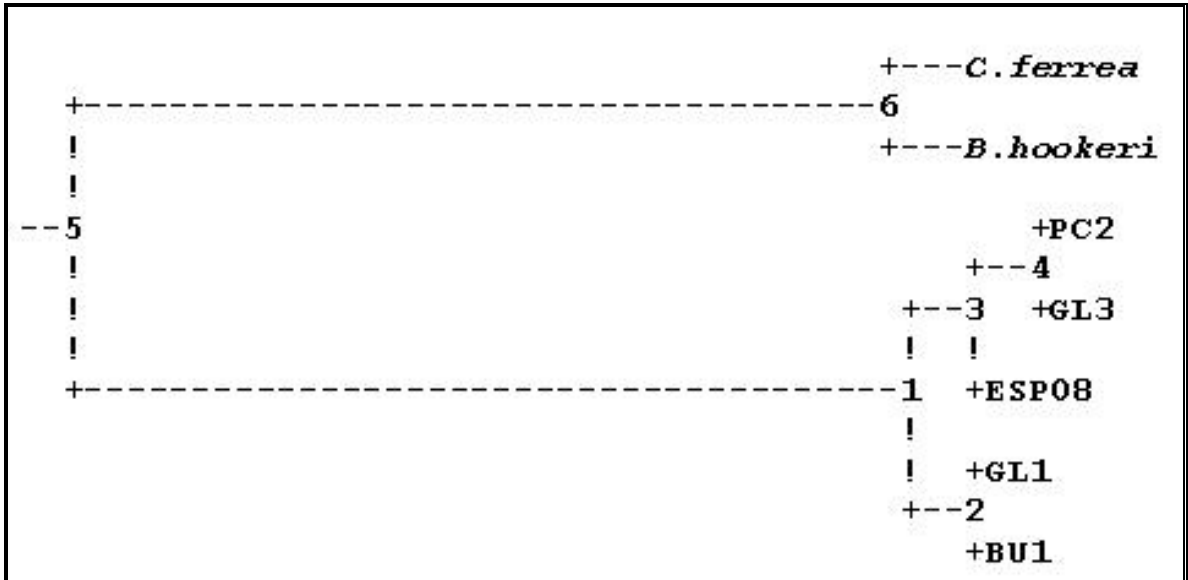


Figura 6 - Cladograma baseado no método da máxima verossimilhança, obtido a partir de seqüências do gene *rbcL* das variantes morfológicas foliares de *C. echinata*. Foram utilizados como grupos externos na polarização das árvores: *Bauhinia hookeri* e *Caesalpinia ferrea* (SV – BU1/ESP08; MV – PC2; LV – GL1/GL3).

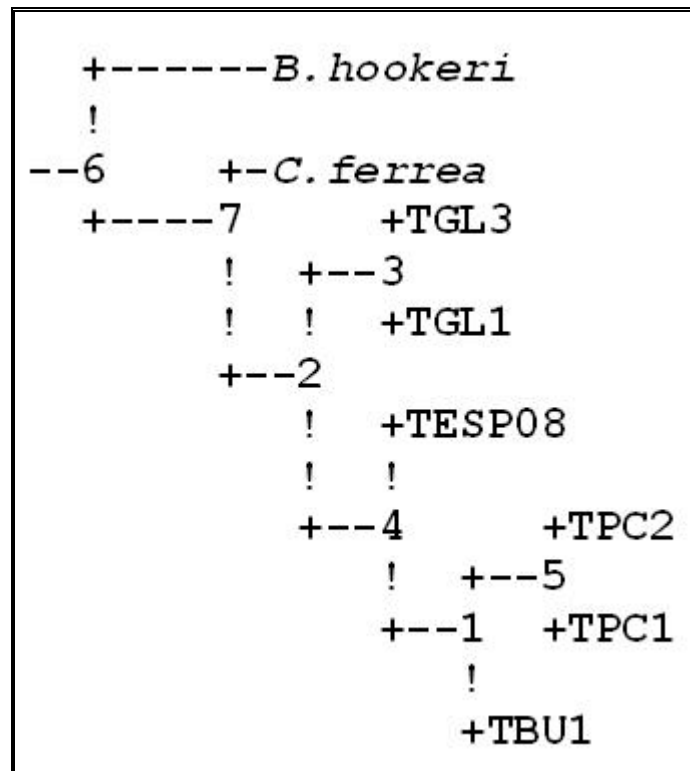


Figura 7 - Cladograma baseado no método de máxima verossimilhança, obtido a partir de seqüências do *intron trnL* das variantes morfológicas foliares de *C. echinata* (SV – BU1/ESP08; MV – PC1/PC2; LV – GL1/GL3). Foram utilizados como grupos externos na polarização das árvores: *Bauhinia hookeri* e *Caesalpinia ferrea*.

De fato, segundo Gielly e Taberlet (1994) regiões não-codificantes do DNA cloroplastídico podem ser muito apropriadas em estudos filogenéticos, principalmente por apresentar muitos sítios informativos em seqüências relativamente pequenas. Adicionalmente, podemos destacar que o *intron trnL* vem sendo usado para reconstruir filogenias de grupos em vários níveis taxonômicos (BRUNEAU et al., 2001; LEE; WEN, 2004; HASTON et al., 2005; SOLTIS et al., 2005). Adicionalmente, antecipamos que estão sendo analisadas novas regiões cloroplastídicas e nucleares, objetivando uma maior robustez aos resultados aqui encontrados, assim como, a previsão de um maior suporte principalmente entre os variantes pequeno (SV) e médio (MV).

3.4. 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, 2001. p. 268-294.

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.

CONTI, E.; FISCHBACH, A.; SYTSMA, K.J. Tribal relationships in Onagraceae: implications from *rbcl* sequence data. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 80, p. 672-685, 1993.

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, p. 15-23, 1999.

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.; 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, 2000. p. 1-20.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**. v. 17, p. 368-376, 1981.

GADEK, P.A.; QUINN, C.J. An analysis of relationships within the Cupressaceae sensu stricto based on *rbcL* sequences. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 80, p. 581-586, 1993.

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.

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.

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.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp.** 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.

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.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant Systematics a Phylogenetic Approach**. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 1999. 464 p.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N. (ed). **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.

KAJITA, T.; OHASHI, H.; TATEISHI, Y.; BAILEY, C.D.; DOYLE, J.J. *RbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. **Systematic Botany**. v. 26, p. 515-536, 2001.

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.

- KRON, K.A.; CHASE, M.W. Systematics of the Ericaceae, Empretaceae, Epacridaceae and related taxa based upon *rbcL* sequence data. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 80, p. 735-741, 1993.
- 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.
- 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.
- LLEDO, 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.
- LEWIS, G.P. **Caesalpinia, a revision of the Poincianella – Erythrostemon group**. London: Royal Botanic Gardens, Kew. 1998. 233p.
- LIMA, H.C.; LEWIS, G.P. & BUENO, E. Pau-Brasil. In: BUENO, E. et al. (eds) **Pau-brasil: uma biografia**. São Paulo: Axis Mundi, 2002. p. 39-76.
- 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). **Genome**. v. 43, p. 634-641, 2000.
- PALMER, J.D. Plastid chromosomes: structure and evolution. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. v. 7A, p. 5-53, 1991.
- POLHILL, R.M.; VIDAL, J.E. Caesalpinieae. In: POLHILL, R.M.; HAVEN, P.V. (eds). **Advances in Legume Systematics 1**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1981. p. 81-95.
- PRICE, R.A.; PALMER, J.D. Phylogenetic relationships of the Geraniaceae and Geraniales from *rbcL* sequences comparisons. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 80, p. 661-671, 1993.
- 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.
- SMALL, R.L.; RYBURN, J.A.; CRONN, R.C.; SEELANAN, T.; WENDEL, J.F. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastone 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.; MORGAN, D.R.; GRABLE, A.; SOLTIS, P.S.; KUZOFF, R. Molecular systematics of Saxifragaceae sensu stricto. **American Journal of Botany**, v. 80, p. 1056-1081, 1993.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; ENDRESS, P.K.; CHASE, M.W. **Phylogeny and Evolution of Angiosperms**. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 2005. p. 370.

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.

XIANG, Q.-Y.; SOLTIS, E.D.; MORGAN, D.R.; SOLTIS, P.S. Phylogenetic relationships of *Cornus* L. sensu lato and putative relatives inferred from *rbcL* sequence data. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 80, p. 723-734, 1993.

4. Capítulo 2 - Phylogenetic relationships among morphotypes of *Caesalpinia echinata* Lam. (Caesalpinioideae: Leguminosae) evidenced by *trnL* intron sequences

Fabício Sacramento Juchum, *Marco Antônio Costa, André Márcio Amorim, Ronan Xavier Corrêa

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km16, Salobrinho, CEP: 45662-000, Ilhéus, Bahia, Brazil. *Autor for correspondence (phone/fax: 55-73-3680-5226; e-mail: costama@uesc.br)

Abstract

Caesalpinia echinata (brazilwood or pernambuco) comprises a complex of three morphological leaf variants, characterized by differences in the number and size of the pinnae and leaflets, and occurring in allopatric and sympatric populations. In the present study, we evaluate the utility of the cpDNA *trnL* intron in a phylogenetic analysis of the three leaf variants along with other species of *Caesalpinia* and generic relatives. Our results support the hypothesis of a species complex occurring under the name *C. echinata* represents a complex of species. The study provides evidence to suggest that at least one of the forms, the highly divergent *C. echinata* large leafleted variant, represents a distinct taxon.

Key words: brazilwood, cpDNA, new species, noncoding region, pernambuco, phylogeny

Introduction

Caesalpinia echinata is an endangered species in a highly threatened ecosystem (Lima et al. 2002). The species originally had a wide distribution in the Atlantic rainforest, ranging from Cabo de São Roque, in the state of Rio Grande do Norte, to Cabo Frio, in the state of Rio de Janeiro (Fontes 1995; Lima et al. 2002). Currently, this species is found naturally in Atlantic Forest remnants, which represent a total of only 7% of the original Atlantic Forest (Morellato and Haddad 2000; MMA 2000; Câmara 2005). These remnants occur in some states of the northeastern region and in the state of Rio de Janeiro (Rocha 2004).

Remarkable variations in the leaf morphology of brazilwood or pernambuco trees occur naturally throughout the Atlantic Forest of southeastern Bahia, Brazil. The variation observed by Lewis (1998) and Lima et al. (2002) is characterized by differences in the number and size of the pinnae and leaflets and resolves into three groups which are often recognized by local inhabitants. The most common form presents 5-10 pinnae with 12-21 small leaflets per pinna and has a more extended distribution along the Brazilian coast. The second form presents 3-5 pinnae with 3-8 larger leaflets per pinna, differing slightly from the most common form, and occurring in the states of Bahia and Espírito Santo. This form is also found in the region of Potiraguá, Bahia, (100 km from the coast) showing that the distribution extends farther inland. The third form, found in the Rio Pardo valley, in southern Bahia, presents much larger leaflets. These three distinct morphotypes are hereafter named SV (small variant), MV (medium variant), and LV (large variant), respectively (Figure 1) and can occur in sympatry or allopatry. Additional differences among the variants are observed in the leaf segmentation. SV and MV are bipinnate and LV pinnate. According to Lima et al. (2002) there are also differences in the wood

colouring. Due to the morphological variations, the current delimitation of the *C. echinata* is broad. Additionally, we emphasize the lack of an important information about morphologic character, as observed in flower and fruit structures of the *C. echinata* morphotypes.

The intra- and interspecific relationships should be better understood through a molecular phylogenetic reconstruction. In the case of brazilwood, the lack of easily diagnosed, suitable morphological characteristics makes molecular markers a helpful tool.

Chloroplast DNA sequences have been widely used in phylogenetic studies of Leguminosae at different taxonomic levels (Chase et al. 1993; Doyle et al. 2000; Brouat et al. 2001; Pennington et al. 2001; Doyle and Luckow et al. 2003; Herendeen et al. 2003; Luckow et al. 2003; Wojciechowski 2003; Simpson et al. 2003; McMahon and Hufford 2004; Wojciechowski et al. 2004; Luckow et al. 2005; Haston et al. 2005). In the present investigation of the relationships among the morphological variants of *C. echinata* we employed the *trnL* intron. This chloroplast genome region has been successfully used in previous interspecific, intrageneric and intergeneric phylogenetic reconstructions (Gielly et al. 1996; Bruneau et al. 2000; Bruneau et al. 2001; Lee and Wen 2004). A preliminary evaluation of the *trnL* sequence divergence, found in *C. echinata*, showed that this noncoding region would be informative for the present study.

Material and Methods

Leaf samples from 89 individuals of the three morphological variants were collected from natural populations in southeastern Bahia (in the municipalities of Buerarema, Guaratinga, Ilhéus, Itajú do Colônia, Jussari, Mascote, Potiraguá and Porto Seguro) (Figure 2) and stored in silica.

Total DNA was extracted from the leaves following the CTAB protocol (Doyle and Doyle, 1990), as modified by Grattapaglia and Sederoff (1994), Corrêa et al. (1999) and Almeida et al. (2001). The PCR amplifications followed the conditions described by Taberlet et al. (1991) using the primers *trnL-c* and *trnL-d*. The same primers were used for the direct sequencing of double stranded PCR products in a MEGABACE automated sequencer. Additional accesses for a joint analysis sequence of *Caesalpinia* and related genera were selected from GenBank databases for use in a joint analysis. A list of the taxa used in the analysis is shown in table 1. We examined DNA at least six individuals of each *C. echinata* morphotype, with six repetition DNA sequences from each individual. Was selected the best sequences representing all morphological variants of the *C. echinata* complex, producing a consensus sequence of each morphotype.

Sequence alignments were performed with the program Clustal W, and implemented in the programs BioEdit (Hall 1999) and MEGA 3.1 (Kumar et al. 2004). Indels were treated as new characters. Unweighted maximum parsimony and neighbor joining analyses using Jukes-Cantor distance were performed using program MEGA 3.1. The robustness of nodes was inferred by bootstrap and jackknife analysis of 10,000 replicates.

For the outgroup taxa, we selected two species from the genus *Ceratonia* and two species of *Gleditsia*, all considered to be close relatives of *Caesalpinia* (Doyle 1995; Lewis and Schrire 1995; Lewis 1998; Bruneau, 2001).

Results and Discussion

Double-stranded DNA amplifications and sequences were obtained for all taxa studied. The length of the sequenced fragments in the *C. echinata* variants ranged from 547

bp in SV, 554 bp in MV to 565 bp in LV. Similar fragment sizes were obtained for other Leguminosae by Taberlet et al. (1991). Our aligned sequences produced a 640 character data matrix. Total A-T content in the *trnL* sequences was around 65%. The A-T proportions varied among *C. echinata* variants, *i.e.* 65% in the MV, 65,1% in the SV and 65,8% in the LV variant. The estimated A-T content was similar to that found in previous studies for this intron region (Palmer 1991; Small et al. 1998). A variable number of indels was also found, being six in the SV, three in the MV and one in the LV variant. Noncoding sequences generally accumulate indels and nucleotide substitutions at higher rates than coding sequences (Golenberg et al. 1993; Gielly and Taberlet 1994; Small et al. 1998). Several of the indels observed show a higher differentiation of the LV compared with the other two variants, and this is congruent with the morphological data.

After the exclusion of the autapomorphies and unvariable characteristics from the dataset, 106 variable sites remained, of which 55 were informative for the parsimony analysis. The uncorrected sequence divergence ranged from 0% to 8.6% among the *Caesalpinia* species, and the lowest distance (0.2%) was observed between the SV and MV variants. The sequence divergence of LV from MV and SV was 3.2% and 3.4%, respectively. Additionally, less distance were observed between some well define *Caesalpinia sens. lat.* species when compared with the sequence divergence of *C. echinata* morphotypes. A possible explanation for the low molecular divergence of *C. echinata* SV and *C. echinata* MV could be the low levels of informative characters of the cpDNA region selected or a recent occurrence of the morphotypes, would not have had sufficient time to fix the characters.

Phylogenetic analyses using the genetic distance method and unweighted parsimony produced similar results regarding the distinction between the *C. echinata* morphotypes (Figures 3 and 4), reproducing the morphological differences observed.

Genetic divergence estimated by neighbor-joining shows a clear differentiation between *C. echinata* LV and the *C. echinata* MV-SV group. This distance is even higher than some distances observed, in the same analysis, among several well-established species. Such divergence on a molecular level suggests the presence of additional taxa (see Figure 3). On the other hand, *C. echinata* MV and *C. echinata* SV, although showing some differentiation, are more closely related to each other.

The inclusion of the gap regions in the parsimony analysis improved the support for the branches, especially within the ingroup, although bootstrap support for most clades was low. Gap inclusion was also efficiently used in other previous analyses *e.g.* Lee and Wen (2004) in *Panax* and Haston et al. (2005) in the *Peltophorum* group of Caesalpinieae. 50% or higher majority rule bootstrap consensus and jackknife values from the analyses with indels included are shown in figures 4. The two methods are congruent, representing similar topologies with moderate support to *C. echinata* clade.

According to Lewis (1998), the use of morphological characters for the precise positioning of *C. echinata* within the genus is problematic. An additional problem for the study and positioning of this species complex is probably the lack of informations about flower and fruit structures. At the moment, no there are taxonomic descriptions of this structure on literature, and the unique available information is summarizing in leaf morphology and wood colouring. On the other hand, there are high morphological variations in the leaf morphology among *C. echinata* morphotype. Especially in LV pinnae and leaflets, the size, number e segmentation are very distinct of the others two variants. However, for some plants is necessary prudence because variations in morphological characters would be explained by a high plasticity of the species in relation to environmental pressures (Brouat et al. 2001). In our case, should be very important to infer

that the three *C. echinata* morphotype can be find in sympatry, could be unjustified to consider the leaf morphological differences by plasticity or simple environmental effects.

Based in molecular data, brazilwood variants were grouped in an unique clade. The relationships shown among the three *C. echinata* variants in the parsimony analysis based on the *trnL* intron sequences show interspecific divergence between the large and small-medium variants. This result provides support for the suggestion that LV would be better recognized as a distinct taxon.

An alternative or complementary hypothesis to *Caesalpinia sensu lato* phylogenetic relationship not reported before is *C. echinata* segregate as sister group of the *Libidibia* species (figure 4). Lewis et al. (2005), showed a new positioning for the *Caesalpinia* species where *Caesalpinia coriaria*, *C. sclerocarpa*, *C. ferrea* and *C. glabrata* now are recognize as *Libidibia* genus. The point is, *C. echinata* was positioned in the informal group *Poincianella-Erythrostemon* (Lewis, 1998), however Simpson et al. (2003) suggested that the species of this informal group would be sister of *Pomaria*. Additionally, Lewis and Schrire (1995) suggested *Libidibia* as sister group of *Russellodendro*. Perhaps, new considerations and workers about *C. echinata* using morphological and molecular data should be important for the best positioning of this species in *Caesalpinia sensu lato*, and useful to define another clades.

In our analyses were not found significant data to infer about variations inter and intra-population, possibly in next works and with the improvement of the technique those information will be show. Populations of *C. echinata* variants can be finding in allopatric and sympatric. Perhaps, an alternative or complementary hypothesis would be a recent evolution of this species complex. This would be easily applied when observe the relationship of SV and MV, where morphologic and molecular data address for a great proximity of these variants. Additionally, observations of morphological and molecular

data suggest the hypothesis of hybridization events. Natural populations of the *C. echinata* MV and *C. echinata* LV are very rare, it difficult to infer about population variations.

In the present analysis, we reaffirm some relationships well supported by morphological data and suggest some alternative relationships among other taxa. We also confirm the utility of the *trnL* intron as an informative marker to resolve the interspecific relationships within *Caesalpinia*. We confirm the distinction among the three variants of *C. echinata*. There is a need to study other regions of the genome, especially faster evolving nuclear genes, to better delimit the medium and small leafleted variants. Additional studies with another genome region are in progress, and studies about genetic variability inter- and intra population. The results from the present study will assist reproductive biology, conservation and evolutionary biology studies of *C. echinata*.

Acknowledgments

This research received financial support from FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia, Bahia, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil), IPCI/COMURNAT (International Pernambuco Conservation Initiative) and ABA (Associação Brasileira de Archetiros). We also thank Dr. Júlio César de Mattos Cascardo (Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC) for providing the laboratory and sequencing facilities. We thank Robson José Costa Dias for all the DNA sequencing collaboration. We also thank José Lima da Paixão, Luís Carlos de Jesus Gomes and William Wayt Thomas for sending us sample material for this study. Thanks are also due to Dr. Janisete Gomes da Silva-Miller for improving the final version of the manuscript.

References

- Almeida CAS, Bonvicino CR, Lachtermacher M, Moreira MAM, Olício R, Seuánez HN (2001) Técnicas de avaliação da diversidade genética. In: Garay, I, Dias, B (eds) Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais. Petrópolis, Vozes, pp 268-294
- Brouat, C, Gielly L, McKey D (2001) Phylogenetic relationships in the genus *Leonardoxa* (Leguminosae: Caesalpinioideae) inferred from chloroplast *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer sequences. *Am. J. Bot.* 88(1): 143-149
- Bruneau, A, Breteler FJ, Wieringa JJ, Gervais GYF, Forest F (2000) 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
- Bruneau, A, Forest F, Herendeen PS, Klitgaard BB, Lewis GP (2001) Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Syst Bot* 26:487–514
- Câmara, IG (2005) Breve história da conservação da Mata Atlântica. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (eds) *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas* Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional, São Paulo, pp 31-42
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Qiu Y-L, Kron KA, Rettig JH, Conti E, Palmer JD, Manhart JR, Sytsma KJ, Michaels HJ, Kress WJ, Karol KG, Clark WD, Hedrén M, Gaut BS, Jansen RK, Kim K-J, Wimpee CF, Smith JF, Furnier GR, Strauss SH, Xiang Q-Y, Plunkett GM, Soltis PS, Swensen SM, Williams SE, Gadek PA, Quinn CJ, Eguiarte LE, Golenberg E, Learn Jr GH, Graham SW, Barrett SCH, Dayanandan S, Albert VA

- (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann Missouri Bot Gard* 80:528-580
- Corrêa RX, Abdelnoor RV, Faleiro FG, Cruz CD, Moreira MA, Barros EG (1999) Genetic distances in soybean based on RAPD markers. *Bragantia* 58(1):15-23
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1):13-15
- Doyle JJ (1995) DNA data and Legume Phylogeny: A progress report. In: Crisp M, Doyle JJ (eds) *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 11-30
- Doyle JJ, Chappill JA, Bayle DC, Kajita T (2000) Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* and non-molecular data. In: Herendeen PS, Bruneau A (eds) *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 1-20
- Doyle JJ, Luckow MS (2003) The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131:900-910
- Fontes RS (1995) *Pau-Brasil, um sonho de resgate*. Funbrasil, Recife
- Gielly L, Taberlet P (1994) The Use of Chloroplast DNA to Resolve Plant Phylogenies: Noncoding versus *rbcL* Sequences. *Mol Biol Evol* 11(5):769-777
- Gielly L, Yuan Y-M, Kupfer P, Taberlet P (1996) Phylogenetic use of noncoding regions in the Genus *Gentiana* L.: chloroplast *trnL* (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Mol Phylogenet Evol* 5(3):460-466
- Golenberg EM, Clegg MT, Durbin ML, Doebley J, Ma DP (1993) Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome. *Mol Phylogenet Evol* 2:52-64
- Grattapaglia D, Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137:1121-1137

- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp 41:95-98
- Haston EM, Lewis GP, Hawkins JA (2005) A phylogenetic reappraisal of the *Peltophorum* group (Caesalpinieae: Leguminosae) based on the chloroplast *trnL-F*, *rbcL* and *rps16* sequence data. Am J Bot 92(8):1359-1371
- Herendeen PS, Bruneau A, Lewis GP (2003) Phylogenetic relationships in Caesalpinioid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data. In: Klitgaard BB, Bruneau A (eds) Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 37-62
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163
- Lee C, Wen J (2004) Phylogeny of *Panax* using chloroplast *trnC-trnD* intergenic region and the utility of *trnC-trnD* in interspecific studies of plants. Mol Phylogen Evol 31:894-903
- Lewis GP, Schrire BD (1995) A reappraisal of the *Caesalpinia* group (Caesalpinioideae: Caesalpinieae) using phylogenetic analysis. In: Crisp M, Doyle JJ (eds) Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 41-52
- Lewis GP (1998) *Caesalpinia*, a revision of the *Poincianella-Erythrostemon* group. Royal Botanic Gardens, Kew, UK
- Lewis GP, Schrire B, Mackinder B, Lock M (2005) Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 577 p.
- Lima HC, Lewis GP, Bueno E (2002) Pau-Brasil. In: Bueno E et al.(eds) Pau-brasil: uma biografia. Axis Mundi, São Paulo, pp 39-76

- Luckow L, Miller JT, Murphy DJ, Livshultz T (2003) A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In: Klitgaard BB, Bruneau A (eds) *Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 197-220
- Luckow M, Fortunato RH, Sede S, Livshultz T (2005) The Phylogenetic Affinities of two Mysterious Monotypic Mimosoids from Southern South America. *Syst Bot* 30(3):585-602
- MMA (2000) Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Brasília: MMA. MMA (Ministério do Meio Ambiente). 1998. Plano de ação para a Mata Atlântica. Brasília: MMA
- McMahon M, Hufford L (2004) Phylogeny of *Amorpheae* (Fabaceae: Papilionoideae). *Am J Bot* 91(8):1219-1230
- Morellato L, Haddad CFB (2000) The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32:786-792
- Palmer JD (1991) Plastid chromosomes: structure and evolution. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* 7A:5-53
- Pennington RT, Lavin M, Ireland H, Klitgaard B, Preston J, Hu J-M (2001) Phylogenetic relationships of basal papilionoid legumes based upon sequences of the chloroplast *trnL* intron. *Syst Bot* 26(3):537-556
- Rocha YT (2004) Conservação do Pau-brasil. *Anais do XV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Ubatuba, SP*
- Simpson BB, Larkin LL, Weeks A (2003) Progress towards resolving relationships of the *Caesalpinia* group (Caesalpinieae: Caesalpinioideae: Leguminosae) In: Klitgaard BB, Bruneau A (eds) *Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 123-148.

- Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T, Wendel JF (1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastid and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *Am J Bot* 85(9):1301-1315
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109
- Wojciechowski MF (2003) Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In: Klitgaard BB, Bruneau A (eds) *Advances in Legume Systematics 10, Higher Level Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 5-35
- Wojciechowski MF, Lavin M, Sanderson MJ (2004) A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matk* gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am J Bot* 91(11):1846-1862

Table 1. List of the species of Caesalpinioideae included in the present study and their GenBank accession numbers.

Taxon	GenBank Accession number	Reference
<i>Ceratonia oreothauma</i> Hillc. et al.	AY232782	Herendeen et al. 2003
<i>C. siliqua</i> L.	AF365075	Bruneau et al. 2001
<i>Gleditsia caspica</i> Desf.	AY232785	Herendeen et al. 2003
<i>Gl. triacanthos</i> L.	AF365096	Bruneau et al. 2001
<i>Peltophorum dubium</i> (Spreng.) Taub.	AY904432	Haston et al. 2005
<i>P. pterocarpum</i> (DC.) K. Heyne	AY899713	Haston et al. 2005
<i>Parkinsonia microphylla</i> Torr.	AY899716	Haston et al. 2005
<i>P. raimondoi</i> Brenan	AY899726	Haston et al. 2005
<i>Tachigali myrmecophila</i> (Ducke) Ducke	AY899706	Haston et al. 2005
<i>T. paniculata</i> Aubl.	AF430790	Simpson et al. 2003
<i>Hoffmannseggia prostrate</i> DC.	AF430753	Simpson et al. 2003
<i>H. ternata</i> Phil.	AF430756	Simpson et al. 2003
<i>Caesalpinia calycina</i> Benth.	AF365064	Bruneau et al. 2001
<i>C. coriaria</i> (Jacq.) Willd.	AY899692	Haston et al. 2005
<i>C. ferrea</i> Mart.	AF430718	Simpson et al. 2003
<i>C. glabrata</i> Kunth.	AF430722	Simpson et al. 2003
<i>C. sclerocarpa</i> Standl.	AF430736	Simpson et al. 2003
<i>C. exostemma</i> DC.	AF430717	Simpson et al. 2003
<i>C. gilliesii</i> (Hook.) D. Dietr.	AF430721	Simpson et al. 2003
<i>C. exilifolia</i> Griseb.	AF430716	Simpson et al. 2003
<i>C. hughesii</i> G.P. Lewis	AF430725	Simpson et al. 2003
<i>C. pluviosa</i> DC.	AF430731	Simpson et al. 2003
<i>C. trichocarpa</i> Griseb.	AF430740	Simpson et al. 2003
<i>C. yucatanensis</i> Greenm.	AF430743	Simpson et al. 2003
<i>C. echinata</i> Lam. – SV *	DQ832647	Present study
<i>C. echinata</i> Lam. – MV *	DQ832648	Present study
<i>C. echinata</i> Lam. – LV *	DQ832649	Present study

* *C. echinata* voucher are deposited at Herbaria CEPEC. Voucher are Juchum 131 (*C. echinata* – SV), Juchum 135 (*C. echinata* – MV) and Juchum 124 (*C. echinata* – LV).

Figures

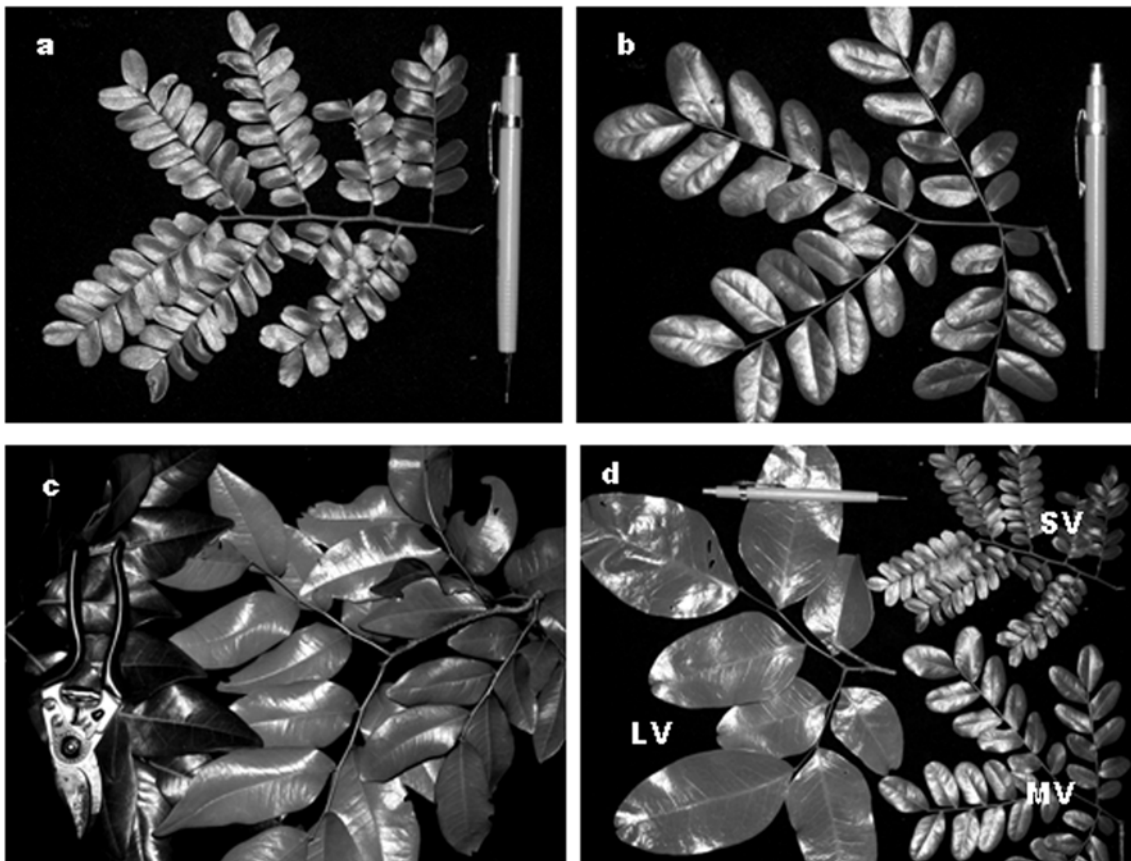


Figure 1. Morphological leaf variants of *Caesalpinia echinata*: a. SV (small variant); b. MV (medium variant); c. LV (large variant); d. comparative morphology of leaves and pinnae.

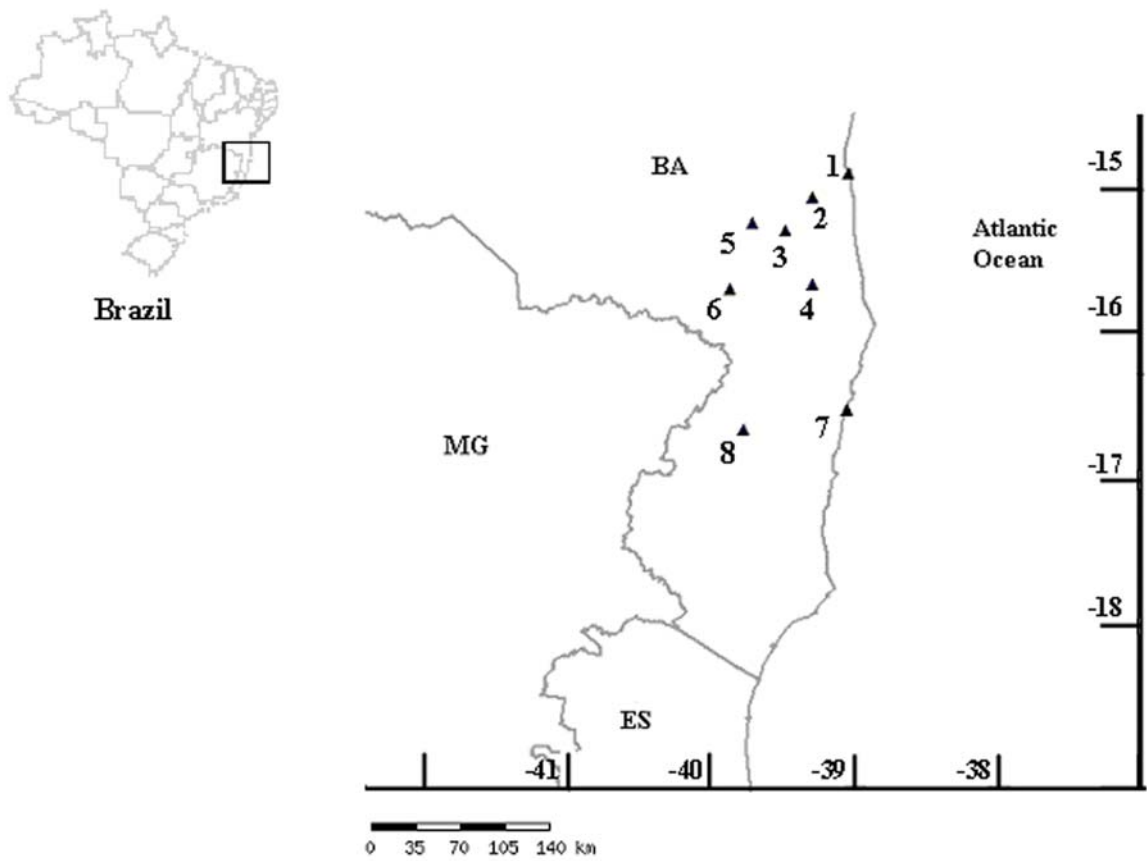


Figure 2. Collecting sites of *Caesalpinia echinata* in the Atlantic Forest in the state of Bahia (BA), Brazil. Location numbers represents: 1, Ilhéus; 2, Buerarema; 3, Jussari; 4, Mascote; 5, Itajú do Colônia; 6, Potiraguá; 7, Porto Seguro; 8, Guaratinga.

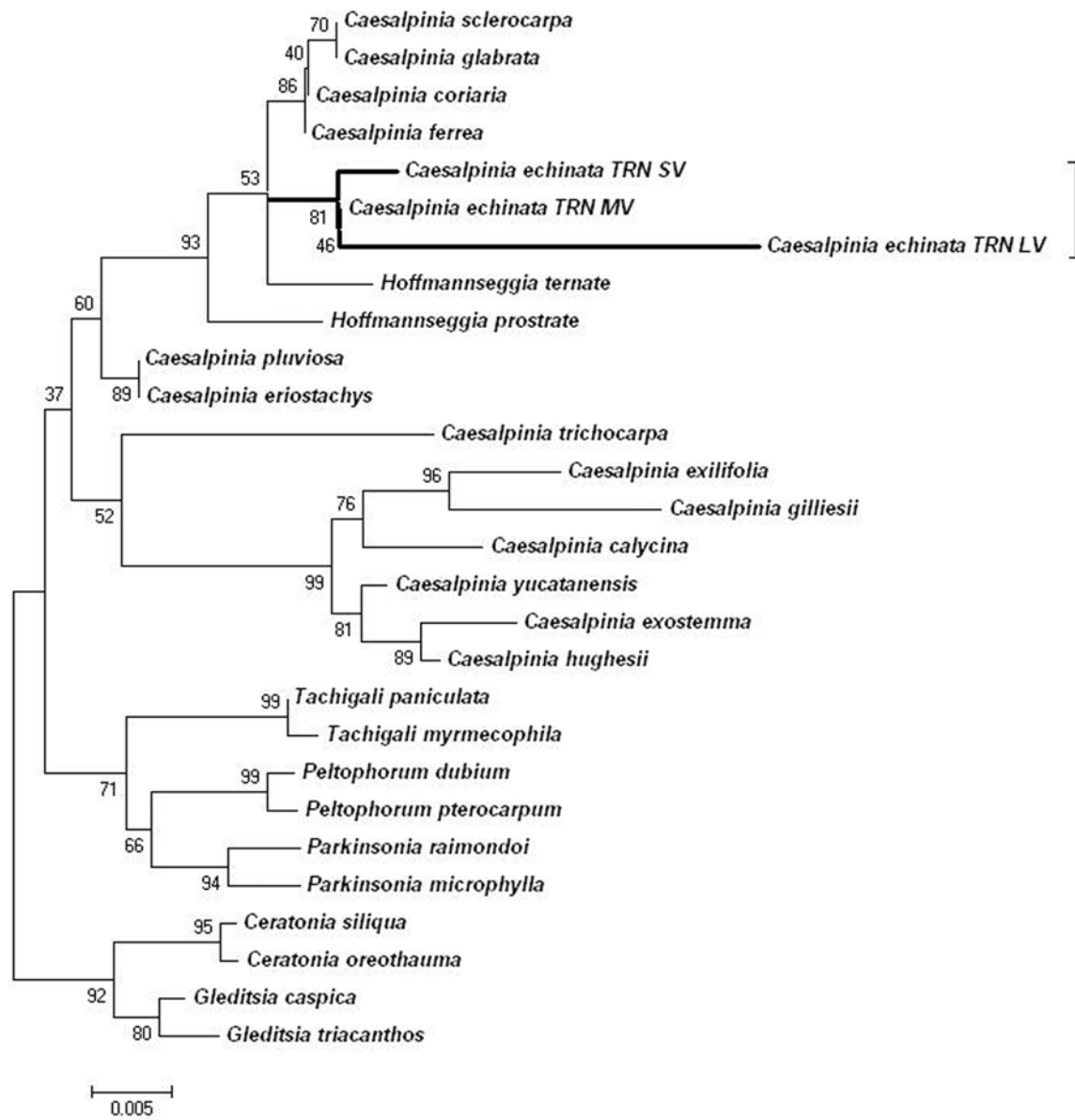


Figure 3. Neighbor Joining tree considering *Caesalpinia echinata* and relatives based on plastid trnL intron sequence data. The numbers along the branches represent bootstrap values calculated in 10,000 replications.

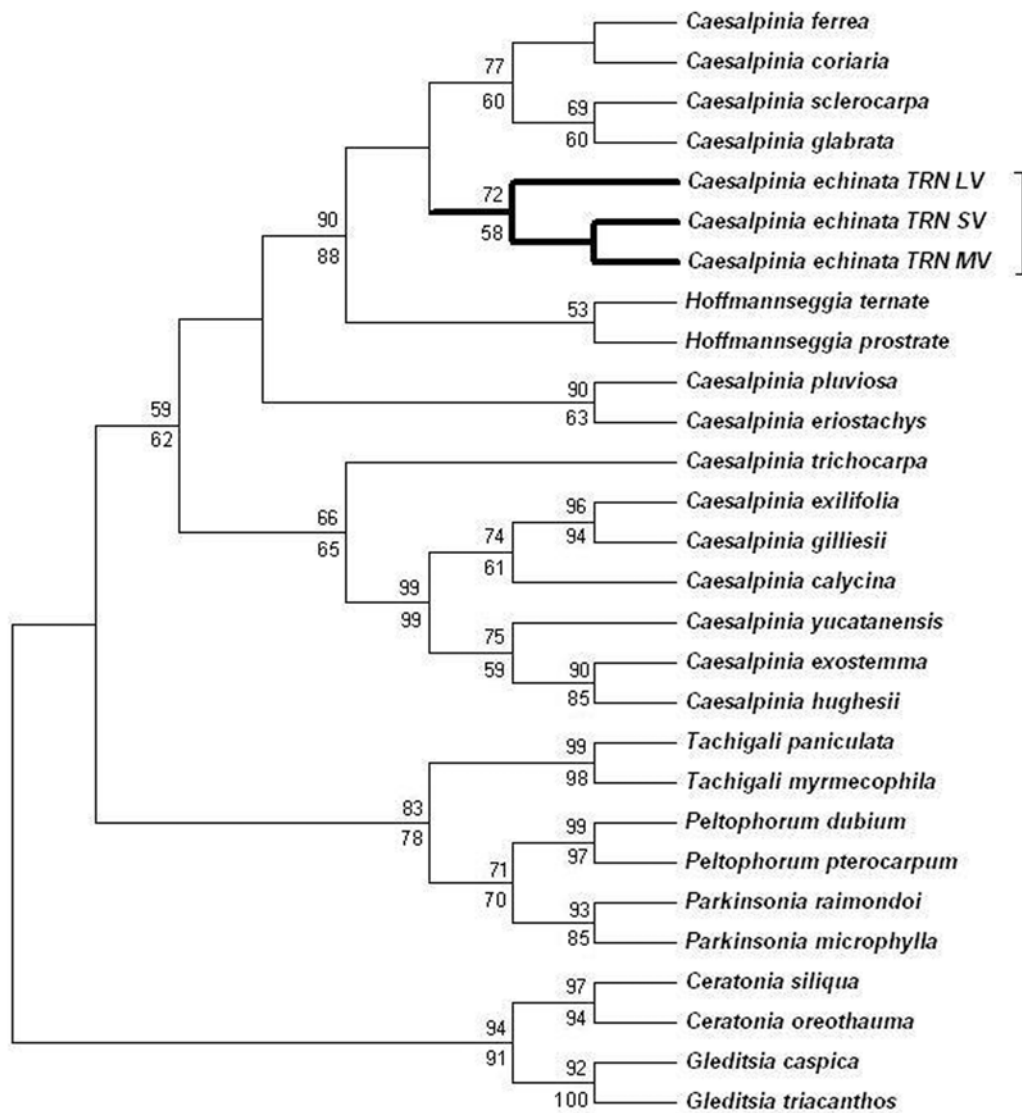


Figure 4. The 50% majority rule bootstrap consensus tree of the 25 most parsimonious trees of the trnL intron sequence for *Caesalpinia echinata* including indels. Numbers above the branches represents bootstrap values calculated in 10,000 replications (tree= 25, length = 133 steps, CI = 0,88 RI = 0,92), and those below are jackknife in 10,000 replications.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Devido às limitações apresentadas pelo *primer rbcL*, os resultados baseados nessa região genômica foram limitados quanto ao número de caracteres informativos e dificuldade de seqüenciamento, além de contrariarem a congruência dos dados morfológicos. Adicionalmente, essa região foi reconhecida como muito conservada para o estudo proposto. Assim, sugere-se um melhoramento dos métodos.
- De acordo com os resultados obtidos com o *primer trnL*, esse foi caracterizado como eficiente para ser utilizado no auxílio de soluções ligadas às questões filogenéticas para estudos que envolvam grupos com baixos níveis taxonômicos.
- Os dendrogramas obtidos apresentaram topologias consistentes e os resultados corroboram a robustez dos dados oriundos da região *trnL*. A análise com base na região do *intron trnL* foi efetiva na distinção entre os variantes morfológicos foliares de *C. echinata*, congruentemente com a morfologia.
- Os resultados do presente estudo suportam a ocorrência de um complexo de espécies dentro do nome *C. echinata*. A grande divergência encontrada entre o variante *C. echinata* LV e os outros dois (SV e MV), sugere que o LV seja considerado uma espécie distinta.
- Possivelmente, novos estudos envolvendo regiões mais variáveis do genoma virão corroborar nossos resultados, assim como, melhor delimitar as relações entre *C. echinata* SV e *C. echinata* MV.

- Adicionalmente, os resultados do presente estudo serão uma importante referência para futuros trabalhos com *C. echinata*, principalmente aos ligados a biologia evolutiva do grupo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLCOCK, A.L.; CHAUVET, M.; GRANDALL, K.A.; GIVEN, D.R.; HALL, S.J.G.; IRIONDO, J.M.; LEWINSOHN, T.M.; LYNCH, S.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; STACKEBRANDT, E.; TEMPLETON, A.R.; WATTS, P.C. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: HEYWOOD, V.H.; WATSON, R.T. (eds). **Global biodiversity assessment**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 57-88.
- 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, 2001. p. 268-294.
- ALMEIDA, D.S. **Recuperação ambiental da Mata Atlântica**. Ilhéus: Editus, 2000. 130 p.
- 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.
- AMORIM, D.S. **Elementos Básicos de Sistemática e Filogenia**. 2a ed., Ribeirão Preto: Holos e SBE, 1997. 276 p.
- AMORIM, D.S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto: Holos, 2002. 156 p.
- APG II (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 141, p. 399-436. 2003.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York: Chapman e Hall, 2004. 511 p.
- BAKER, N.P.; SCHRIRE, B.D.; KIM, J.-H. Generic relationships in the tribe Indigofereae (Leguminosae: Papilionoideae) based on sequence data and

morphology. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 9**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. p. 311-337.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Mata Atlântica as árvores e a paisagem**. 1° ed. Rio de Janeiro: Editora Paisagem do Sul, 2004. 393 p.

BARBOSA, M.G.V.; THOMAS, W.W. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Mata Atlântica no Nordeste. In: ARAÚJO, E.L. et al. (eds). **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Flora do Brasil**. Recife: UFRPE. 2002. p.19-22.

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.

BERNARDES, A.T.; MACHADO, A.B.M.; RYLANDS, A.B. **Fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1990.

BIRKY, C.W. Uniparental inheritance of mitochondria and chloroplast genes: mechanisms and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 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.

BARRACLOUGH, T.G.; VOGLER, A.P. Detecting the geographical pattern of speciation from species-level phylogenies. **American Naturalist**. v. 155, p. 419-434. 2000.

BRASIL. 1992. Portaria no. 006/92-N, de 05 de janeiro de 1992. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1992.

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.; 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.

BUENO, E. Pau-Brasil. In: BUENO, E. et al. (eds). **Nova viagem à terra do Brasil**. São Paulo: Axis Mundi. 2002. p. 21-38

BUENO, E.; LIMA, H.C. Epílogo: Raízes do futuro. In: BUENO, E. et al. (eds). **Pau-Brasil**. São Paulo: Axis Mundi. 2002. p. 251-266

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.

CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, S.R. et al. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 51-63.

CÂMARA, I.G. **Plano de ação para a Mata Atlântica – roteiro para a conservação de sua biodiversidade**. São Paulo: CETESB. Cadernos da Reserva da Biosfera 4, 1996.

CÂMARA, I.G. Breve história da conservação da Mata Atlântica. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. p. 31-42.

CARDOSO, M.A.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G. Protegendo os remanescentes de pau-brasil. **Ciência Hoje**. v. 29, n. 174, p. 65-68, 2001.

CARDOSO, M.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**. v. 7, p. 601-608, 1998.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras**. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994. p. 640.

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.; BRUIJN, A.Y. de; COX, A.V.; REEVES, G.; RUDALL, P.J.; JOHNSON, M.A.T.; EGUIARTE, L.E. Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): An Analysis of Plastid rbcL and trnL-F DNA Sequences. **Annals of Botany**. v. 86, p. 935-951, 2000.

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.

CHAW, S.-M.; PARKINSON, C.L.; CHENG, Y.; VINCENT, T.M.; PALMER, J.D. Seed plants phylogeny inferred from all three plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 97, p. 4086-4091, 2000.

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.

CLEGG, M.T.; CUMMINGS, M.P.; DURBIN, M.L. The evolution of plant nuclear genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, p. 7791-7798, 1997.

CORRÊA, M.A. Morfologia polínica de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 35-359, 2003.

CORRÊA, R.X. **Genes de resistência a doenças do feijoeiro: identificação de marcadores moleculares, organização e identificação de análogos**. 1999. 116 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

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, p. 15-23, 1999.

CRISP, M.D.; GILMORE, S.; VAN WYK, B. Molecular phylogeny of the gesnistoid tribes of Papilionoid legumes. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 9**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. p. 249-276.

DEAN, W. **A Ferro e Fogo: A História e a Devastação da Mata Atlântica Brasileira**. São Paulo: Companhia das Letras, 1995.

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.

DOLFERUS, R.; BRUXELLES, G.D.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J. Regulation of the Arabidopsis *Adh* gene by anaerobic and other environmental stress. **Annals of Botany**. v. 74, p. 301-308, 1994.

DOLFERUS, R.; OSTERMAN, J.C.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Cloning of the Arabidopsis and rice formaldehyde dehydrogenase genes: implications for the origin of plant ADH enzymes. **Genetics**. v. 146, p. 1131-1141, 1997.

- 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: Phylogeny**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1995. p. 11-30.
- DOYLE, J.J.; KANAZIN, V.; SHOEMAKER, R.C. Phylogenetic utility of histone H3 intron sequences in the perennial relatives of soybean (*Glycine*: Leguminosae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 6, p. 438-447, 1996.
- DOYLE, J.J. Origins, colonization, and lineage recombination in a widespread perennial soybean polyploid complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 96, p. 10741-10745, 1999.
- 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, 2000. p. 1-20.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; BROWN, A.H.D.; PALMER, R.G. Genomes, multiple origins, and lineage recombination in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex: histone H3-D gene sequences. **Evolution**. v. 56, p. 1388–1402, 2002.
- 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.
- EVANS, T.M.; SYTSMA, K.J.; FADEN, R.B.; GIVNISH, T.J. Phylogenetic Relationships in the Commelinaceae: II. A Cladistic Analysis of rbcL Sequences and Morphology. **Systematic Botany**. v. 28, n. 2, p. 270–292, 2003.
- FAUSTO, B. **História do Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. 657p.

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.

FONTES, R.S. **Pau-Brasil, um sonho de resgate**. Recife: FUNBRASIL, 1995. 217p.

FUKUDA, T.; YOKOYAMA, J.; NAKAMURA, T.; SONG, I.-J.; ITO, T.; OCHIAI, T.; KANNO, A.; KAMEYA, T.; MAKI, M. Molecular phylogeny and evolution of alcohol dehydrogenase (Adh) genes in legumes. **BMC Plant Biology**. v. 5, n. 6, p. 1-10, 2005.

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.

GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**. v. 94, n. 5, p. 399-406, 2003.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. p. 3-11.

GALINDO-LEAL, C.; JACOBSEN, T.R.; LANGHAMMER, P.F.; OLIVIERI, S. Estado dos hotspots: a dinâmica da perda de biodiversidade. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. p. 12-23.

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.

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 noncoding region of the chloroplast genome. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 2, p. 52-64, 1993.

GOUVÊA, J.B.S.; MATTOS SILVA, L.A.; HORI, M. Fitogeografia. In: **Diagnóstico Socioeconômico da Região Cacaueira**. Recursos Florestais. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira e Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas – OEA, Ilhéus, Bahia, Brasil, v. 7, p. 1-7, 1976.

- GRANT, V. **Plant speciation**. New York: Columbia University Press. 1971. 435 p.
- 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, 2000. 481 p.
- HACKETT, S.J.; LEHN, C.A. Lack of genetic divergence in a genus (*Pteroglossus*) of neotropical birds: the connection between life-history characteristics and levels of divergence. **Ornithological Monographs**. v. 48, p. 267-279, 1997.
- 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.
- HAUSEN, B.M. & HERRMANN, B. Bowmaker's disease: an occupational disease in the manufacture of bows for string instruments. **Dtsch Med Wochenschr**. v. 115, n. 5, p. 169-173, 1990.
- HENNING, W. **Phylogenetic systematics**. Urbana: University of Illinois Press, 1966. 263 p.
- 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, 2003. p. 37-62.
- 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. S393-S407, 2003.
- HILTON-TAYLOR, C. **2000 IUCN red list of threatened species**. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: The World Conservation Union, 2000.
- 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.
- HSIAL, C.; CHATTERTON, N.J.; ASAY, K.H.; JENSEN, K.B. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in Monocots. **Genome**. v. 38, p. 211-223, 1994.

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.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Mapa de vegetação do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 1993. 112 p.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Manual técnico da vegetação brasileira**. Manuais técnicos em Geociências 1, 1992. 92 p.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Atlas nacional do Brasil: região Nordeste**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 1985.

JER-MING, H. Phylogenetic relationships of the tribe Millettieae and allies – the current status. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 9**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. p. 299-310.

JOLY, C.A.; LEITÃO FILHO, H.F.; SILVA, S.M. O patrimônio florístico. In: CÂMARA, G. (ed). **Mata Atlântica. Index e S.O.S. Mata Atlântica**. São Paulo, 1991. p. 9-128.

JOLY, S.; BRUNEAU, A. Evolution of triploidy in *Apios americana* (LEGUMINOSAE) revealed by genealogical analysis of the histone H3-D gene. **Evolution**. v. 58, n. 2, p. 284-295, 2003.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant Systematics a Phylogenetic Approach**. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 1999. 464 p.

JUCHUM, F.S.; AMORIM, A.M.; COSTA, M.A.; CORRÊA, R.X. **Caracterização de seqüências de dna cloroplastídico para análise filogenética dos variantes morfológicos foliares de *Caesalpinia echinata* Lam. (PAU-BRASIL)**. In: Congresso Nacional de Genética, 51, 2005, Águas de Lindóia, SP. Resumos..., Ribeirão Preto: SBG, 2005.

KAJITA, T.; OHASHI, H.; TATEISHI, Y.; DOYLE, J.J. rbcL and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae and allies. **Systematic Botany**. v. 26, p. 515-536, 2001.

KANAZIN, V.; BLAKE, T.; SHOEMAKER, R.C. Organization of the histone H3 genes in soybean, barley and wheat. **Molecular and General Genetics**. v. 250, p. 137-147, 1996.

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.

LAVIN, M. A cladistic analysis of the tribe Robinieae (Papilionoideae, Leguminosae). In: STIRTON, C.H. (ed). **Advances in Legume Systematic 3**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1987. p. 31-64.

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.

LEE, Y.; LANGENHEIM, J.H. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publications in Botany**. v. 69, p. 1-36, 1975.

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. A reappraisal of the *Caesalpinia* group (Caesalpinioideae: Caesalpinieae) using phylogenetic analysis. In: CRISP, M.; DOYLE, J.J. (eds). **Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1995. p. 41-52.

LEWIS, G.P. **Caesalpinia, a revision of the Poincianella – Erythrostemon group**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1998. 233p.

LEWIS, G.P.; GIBBS, P. Reproductive biology of *Caesalpinia calycina* and *C. pluviosa* (Leguminosae) of the caatinga of north-eastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 217, p. 43-53, 1999.

LEWIS, G.P.; SIMPSON, B.B.; NEFF, J.L. Progress in understanding the reproductive biology of the *Caesalpinioideae* (Leguminosae). In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 9**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. p. 65-78.

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, 2003. p. 1-3.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577 p.

LI, W.-H. **Molecular Evolution**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1997. 284p.

LIMA, H.C. Aspectos botânicos do pau-brasil. In: CUNHA, M.W.; LIMA, H.C. (eds). **Viagem a terra do pau-brasil**. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura, 1992. p. 23-38.

LIMA, H.C.; LEWIS, G.P.; BUENO, E. Pau-brasil: uma biografia. In: BUENO, E. et al. (eds). **Pau-Brasil**. São Paulo: Axis Mundi, 2002. 39-76 p.

LIRA, C.F.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A.; PROVAN, J. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3219-3225, 2003.

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, 2003. p. 197-220.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 153-161.

McMAHON, M.; HUFFORD, L. Phylogeny of Amorpheae (FABACEAE: PAPILIONOIDEAE). **American Journal of Botany**. v. 91, n. 8, p. 1219-1230, 2004.

McKEY, D. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of nitrogen-demanding lifestyle. In: SPRENT, J.J.; MCKEY, D. (eds). **Advances in Legume Systematics: The Nitrogen Factor**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1994. p. 211-228.

MACKINDER, B.A. The monophyly and taxonomic position of *Berlinia* Hook. f. (Leguminosae-Caesalpinioideae) a preliminary study. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 9**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. p.151-163.

MCMAHON, M.; HUFFORD, L. Phylogeny of Amorpheae (FABACEAE: PAPILIONOIDEAE). **American Journal of Botany**. v. 91, n. 8, p. 1219-1230, 2004.

MELO, S.C.O. **Estrutura genética e fluxo gênico de *Caesalpinia echinata* (Pau-brasil) por meio de marcadores microssatélites**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

MELO-FILHO, L.E.; SOMNER, G.V.; PEIXOTO, A.L. **Centuria plantarum Brasiliensium extionsionis minitata**. Rio de Janeiro: Sociedade Botânica do Brasil, 1992.

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.

MILLER, J.T.; BAYER, R.J. Molecular phylogenetics of *Acacia* (Fabaceae: Mimosoideae) based on chloroplast *trnK* and nuclear H3-D DNA sequences. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 9**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. p. 181-200.

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, 2001. 97-107 p.

MIYASHITA, N.T. DNA variation in the 5' upstream region of the *Adh* locus of the wild plants *Arabidopsis thaliana* and *Arabis gemmifera*. **Molecular Biology and Evolution**. v. 18, p. 164-171, 2001.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). 2000. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília: MMA. MMA (Ministério do Meio Ambiente). 1998. Plano de ação para a Mata Atlântica. Brasília: MMA, 1998.

MORELLATO, L.; HADDAD, C.F.B. The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**. v. 32, p. 786-792, 2000.

MORELL, M.K.; PEAKALL, R.; APPELS, R.; PRESTON, L.R.; LLOYD, H.L. DNA profiling techniques for plant variety identification. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v. 35, p. 807-819, 1995.

MORI, S.A.; BOOM, B.M.; CARVALHO, A.M.; SANTOS, T.S. A southern Bahian moist Forest. **Botanical Review**. v. 49, p. 155-232, 1983.

MUASYA, A.M.; SIMPSON, D.A.; CHASE, M. W.; CULHAM, A. An assessment of the suprageneric phylogeny in Cyperaceae using *rbcL* DNA sequences. **Plant Systematics and Evolution**. v. 211, p. 257-271, 1998.

MURPHY, D.J.; MILLER, J.T.; BAYER, R.J.; LADIGES, P.Y. Molecular phylogeny of *Acacia* subgenus *Phyllodineae* (Mimosoideae: Leguminosae) based on DNA sequences of the internal transcribed spacer region. **Australian Systematic Botany**. v. 16, p. 19-26, 2003.

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.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. v. 403, p. 853-273, 2000.

NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S.R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 82-96.

NETO, L.E.S.; MENCK, C.F.M. Estabilidade do material genético: mutagênese e reparo. In: MATIOLI, S.R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 40-50.

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, 2000. 333 p.

OLIVEIRA FILHO, A.; FONTES, M.A. Patterns of floristic differitiation among Atlantic Forest in south-eastern Brazil, and the influence of climate. **Biotropica**. v. 32, p. 793-810. 2000.

OLIVEIRA, L.F.C.; EDWARDS, H.G.M.; VELOZO, E.S.; NESBITT, M. Vibrational spectroscopic study of brazilian and brazilain, the main constituents of brazilwood from Brazil. **Vibrational Spectroscopy**. v. 28, p. 243-249, 2002.

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, 1992. p. 36-49.

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, 1998. p. 375-408.

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.

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, 2001. p.117-129.

PINTO, L.P.; BRITO, M.C.W. Dinâmica da perda da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira: uma introdução. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds).

Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005, p. 27-30.

POLHILL, R.M.; VIDAL, J.E. Caesalpinieae. In: POLHILL, R.M.; HAVEN, P.V. (eds). **Advances in Legume Systematics 1.** London: Royal Botanic Gardens, Kew. 1981. p. 81-95.

QUEIRÓS, W.T. **Mapeamento genético do cacauero e identificação de QTLs para resistência à vassoura-de-bruxa.** 1999. 64 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

QUEIROZ, L.P.; LEWIS, G.P.; ALLKIN, R. A revision of the genus *Moldenhawera* Schrader (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Kew Bulletin.** v. 54, p. 817-852, 2000.

RADMAN, M. Enzymes of evolutionary change. **Nature.** v. 401, p. 866-869, 1999.

REZENDE, C.M.; CORRÊA, V.F.S., COSTA, A.V.M.; CASTRO, B.C.S. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Química Nova.** v. 27, n. 3, 414-416, 2004.

RIESEBERG, L.H.; SINERVO, B.; LINDER, C.R.; UNGERER, M.C.; ARIAS, D.M. Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient and experimental hybrids. **Science.** v. 272, p. 741-744, 1996.

RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil.** Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1997.

RIZZINI, C.T. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia.** v. 25, n. 1, p. 3-64, 1983.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil.** Manual de Dendrologia Brasileira. E. Blucher, São Paulo, 1971. 294 p.

ROCHA, Y.T. **Conservação do Pau-brasil.** In: Anais do Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, XV, 2004, Ubatuba, SP. Resumos..., Ubatuba, 2004.

RUSSO, C.A.M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: Matioli, S.R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução.** Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 130-136.

RUSSO, C.A.M.; MIYAKI, C.Y.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética. Método geométricos. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia Molecular e Evolução.** Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 108-116

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.

SANG, T.; DONOGHUE, M.J.; ZHANG, D. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in paeonies (*Paeonia*): phylogenetic relationships of putative nonhybrid species. **Molecular Biology and Evolution**. v. 14, p. 994-1007, 1997.

SANTOS, L. M.; CORRÊA, R. X. **Diversidade Genética in situ de Jacarandá. 1-Extração e amplificação de DNA**. In: Livro de Resumos Seminário Anual de Iniciação Científica da UESC, 6, 2000, Ilhéus: PIBIC/CNPq; EDITUS, 18 a 20 de julho de 2000. p. 115.

SANTOS, T.S. Plant endemism in two forests in southern in Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**. v. 7 n. 3, p. 311-322, 1998.

SCHAAL, B.A.; OLSEN, K.M. Gene genealogies and population variation in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 97, p. 7024-7029, 2001.

SCHNEIDER, H. **Métodos de Análise Filogenética um guia prático**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

SCUDELER, V.V. **Análise fitogeográfica da Mata Atlântica – Brasil**. 2000. 204 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Campinas, Campinas, 2000.

SILVA, J.M.C.; CASTELETTI, C.H.M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. p. 43-59.

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, 2003. p. 123-148.

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.

SMALL, R.L.; WENDEL, J.F. Phylogeny, duplication and intraspecific variation of *Adh* sequences in New World diploid cottons (*Gossypium* L.. Malvaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 16, n. 1, p. 73-84, 2000.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; CHASE, M.W.; MORT, M.E.; ALBACH, D.C.; ZANIS, M.; SAVOLAINEN, V.; HAHN, W.H.; HOOT, S.B.; FAY, M.F.; AXTELL, M.; SWENSEN, S.M.; PRINCE, L.M.; KRESS, W.J.; NIXON, K.C.; FARRIS, J.S.

Angiosperm phylogeny inferred from a combined dataset of 18SrDNA, rbcL and atpB sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 133, p. 381-461, 2000.

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, 2005. 370 p.

SOS Mata Atlântica. **Dossiê Mata Atlântica**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 1992.

SOUSA, B.J. de. **O Pau-brasil na História Nacional**. São Paulo: Companhia Editora Nacional/MEC, 1978.

SOUZA, I.M.G. et al. Suplemento da Revista SENAC Ambiental. Rio de Janeiro: Editora SENAC, 2000. 46 p.

SPRENT, J.I. **Nodulation in legumes**. London: Royal Botanical Gardens, Kew, 2001. 146 p.

STACE, C.A. Hybridization and the plant species. In: Urbanska, K.M., (ed). **Differentiation patterns in higher plants**. New York: Academic Press, 1987. p 115-127.

STEBBINS, G.L. **Variation and evolution in plants**. New York: Columbia University Press, 1950.

SWOFFORD D. L. PAUP*. **Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods), Version 4**, Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.

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, 1996. p. 407-514.

SYSTEMATICS AGENDA 2000. **Charting the Biosphere – Technical Report**. New York: American Society of Plant Taxonomists, Society of Systematic Biologists, Willi Hennig Society, and Association of Systematics Collections, 1994.

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; COSTA, C.M.R. Espécies ameaçadas e planejamento da conservação. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (eds). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. p. 86-94.

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.

TEMPLETON, A.R. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. **Molecular Ecology**. v. 10, p. 779–791, 2001.

THOMAS, W.W.; CARVALHO A.M.V.; AMORIM, A.M.; GARRISON, J. ARBELÁEZ, A.L. Plant endemism in two forest in southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**. v. 7, n. 3, p. 311-322, 1998.

TUCKER, S.C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**. v. 131, p. 911-926, 2003.

VARTY, N. (1998). *Caesalpinia echinata*. In: IUCN 2006. **2006 IUCN Red List of Threatened Species**. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 31 July 2006.

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, 2003. p. 5-35.

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.

ZAIA, H.A.B.A. **Desenvolvimento floral de *C. echinata* Lam., *C. peltophoroides* Benth. e *C. ferrea* var. *leyotachia* Benth. (Fabaceae /Caesalpinioideae)**. 2004, 53 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

7. APÊNDICES

Apêndice A - Composição nucleotídica do fragmento do intron trnL das espécies estudadas. Exceto o total, os valores estão representados em porcentagem.

Espécie	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	Total
<i>Caesalpinia echinata</i> TRN SV	26.0	16.1	39.1	18.8	547
<i>Caesalpinia echinata</i> TRN MV	26.2	16.4	38.8	18.6	554
<i>Caesalpinia echinata</i> TRN LV	26.9	16.1	38.9	18.1	565
<i>Caesalpinia yucatanensis</i>	27.3	15.6	38.8	18.2	556
<i>Caesalpinia trichocarpa</i>	26.9	16.6	38.3	18.1	535
<i>Caesalpinia pluviosa</i>	26.1	16.8	38.4	18.6	547
<i>Caesalpinia exilifolia</i>	27.7	15.3	38.7	18.2	548
<i>Caesalpinia exostemma</i>	27.2	15.8	38.5	18.5	556
<i>Caesalpinia gilliesii</i>	27.9	14.9	38.8	18.5	552
<i>Caesalpinia hughesii</i>	27.0	16.0	38.8	18.2	556
<i>Caesalpinia eriostachys</i>	26.1	17.0	38.3	18.5	540
<i>Caesalpinia calycina</i>	27.5	15.8	39.1	17.6	550
<i>Caesalpinia ferrea</i>	26.2	16.8	37.9	19.0	546
<i>Caesalpinia sclerocarpa</i>	26.0	16.8	38.2	19.0	553
<i>Caesalpinia glabrata</i>	26.0	16.8	38.2	19.0	553
<i>Caesalpinia coriaria</i>	26.3	16.6	37.8	19.3	555
<i>Peltophorum dubium</i>	26.5	16.8	37.8	19.0	548
<i>Peltophorum pterocarpum</i>	26.2	16.6	37.9	19.2	541
<i>Tachigali paniculata</i>	26.6	17.3	37.7	18.5	531
<i>Tachigali myrmecophila</i>	26.6	17.4	37.5	18.5	530
<i>Parkinsonia raimondoi</i>	26.0	17.7	37.7	18.6	549
<i>Parkinsonia microphylla</i>	26.3	17.5	38.0	18.2	548
<i>Hoffmannseggia ternate</i>	26.0	16.8	38.3	18.8	553
<i>Hoffmannseggia prostrate</i>	26.2	16.8	38.3	18.7	546
<i>Ceratonia siliqua</i>	26.9	16.8	38.3	17.9	457
<i>Ceratonia oreothauma</i>	26.9	16.8	38.1	18.2	457
<i>Gleditsia caspica</i>	26.8	16.9	37.9	18.4	544
<i>Gleditsia triacanthos</i>	27.3	16.7	37.8	18.2	545

Apêndice B - Divergência entre as seqüências do fragmento do intron *trnL* das espécies estudadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
[1]																												
[2]	0.002																											
[3]	0.034	0.032																										
[4]	0.047	0.044	0.073																									
[5]	0.012	0.010	0.037	0.044																								
[6]	0.042	0.039	0.067	0.010	0.039																							
[7]	0.042	0.039	0.062	0.039	0.034	0.034																						
[8]	0.014	0.012	0.039	0.047	0.002	0.042	0.037																					
[9]	0.022	0.019	0.052	0.029	0.019	0.024	0.024	0.022																				
[10]	0.054	0.052	0.081	0.017	0.052	0.017	0.044	0.049	0.037																			
[11]	0.054	0.052	0.081	0.022	0.052	0.012	0.047	0.054	0.037	0.029																		
[12]	0.060	0.057	0.086	0.022	0.057	0.022	0.052	0.060	0.042	0.019	0.034																	
[13]	0.014	0.012	0.039	0.047	0.002	0.042	0.037	0.000	0.022	0.049	0.054	0.060																
[14]	0.049	0.047	0.073	0.017	0.044	0.007	0.039	0.047	0.032	0.024	0.010	0.029	0.047															
[15]	0.022	0.019	0.052	0.029	0.019	0.024	0.024	0.022	0.000	0.037	0.037	0.042	0.022	0.032														
[16]	0.012	0.010	0.037	0.044	0.000	0.039	0.034	0.002	0.019	0.052	0.052	0.057	0.002	0.044	0.019													
[17]	0.034	0.032	0.060	0.042	0.027	0.032	0.032	0.029	0.017	0.044	0.044	0.049	0.029	0.037	0.017	0.027												
[18]	0.034	0.032	0.060	0.042	0.027	0.032	0.032	0.029	0.017	0.044	0.044	0.049	0.029	0.037	0.017	0.027	0.000											
[19]	0.034	0.032	0.060	0.042	0.027	0.037	0.029	0.029	0.017	0.049	0.049	0.054	0.029	0.042	0.017	0.027	0.019	0.019										
[20]	0.037	0.034	0.062	0.044	0.029	0.039	0.032	0.032	0.019	0.052	0.052	0.057	0.032	0.044	0.019	0.029	0.022	0.022	0.002									
[21]	0.032	0.029	0.057	0.039	0.024	0.034	0.029	0.027	0.014	0.042	0.047	0.047	0.027	0.039	0.014	0.024	0.007	0.007	0.017	0.019								
[22]	0.034	0.032	0.060	0.042	0.027	0.037	0.032	0.029	0.017	0.044	0.049	0.049	0.029	0.042	0.017	0.027	0.010	0.010	0.019	0.022	0.002							
[23]	0.014	0.012	0.044	0.047	0.012	0.037	0.042	0.014	0.022	0.054	0.047	0.060	0.014	0.044	0.022	0.012	0.029	0.029	0.034	0.037	0.032	0.034						
[24]	0.014	0.012	0.044	0.042	0.012	0.032	0.037	0.014	0.017	0.049	0.044	0.054	0.014	0.039	0.017	0.012	0.024	0.024	0.029	0.032	0.027	0.029	0.010					
[25]	0.039	0.037	0.070	0.037	0.037	0.032	0.039	0.039	0.022	0.044	0.044	0.049	0.039	0.039	0.022	0.037	0.029	0.029	0.029	0.032	0.027	0.029	0.039	0.034				
[26]	0.039	0.037	0.070	0.037	0.037	0.032	0.039	0.039	0.022	0.044	0.044	0.049	0.039	0.039	0.022	0.037	0.029	0.029	0.029	0.032	0.027	0.029	0.039	0.034	0.000			
[27]	0.037	0.034	0.067	0.034	0.034	0.029	0.039	0.037	0.019	0.037	0.042	0.042	0.037	0.037	0.019	0.034	0.022	0.022	0.027	0.029	0.019	0.022	0.037	0.032	0.012	0.012		
[28]	0.039	0.037	0.070	0.037	0.037	0.032	0.042	0.039	0.022	0.039	0.044	0.044	0.039	0.039	0.022	0.037	0.024	0.024	0.029	0.032	0.022	0.024	0.039	0.034	0.014	0.014	0.002	

[1] *Caesalpinia echinata* TRN SV; [2] *Caesalpinia echinata* TRN MV; [3] *Caesalpinia echinata* TRN LV; [4] *Caesalpinia calycina*; [5] *Caesalpinia férrea*; [6] *Caesalpinia yucatanensis*; [7] *Caesalpinia trichocarpa*; [8] *Caesalpinia sclerocarpa*; [9] *Caesalpinia pluviosa*; [10] *Caesalpinia exillifolia*; [11] *Caesalpinia exostemma*; [12] *Caesalpinia gilliesii*; [13] *Caesalpinia glabrata*; [14] *Caesalpinia hughesii*; [15] *Caesalpinia eriostachys*; [16] *Caesalpinia coriaria*; [17] *Peltophorum dubium*; [18] *Peltophorum pterocarpum*; [19] *Tachigali paniculata*; [20] *Tachigali myrmecophila*; [21] *Parkinsonia raimondoi*; [22] *Parkinsonia microphylla*; [23] *Hoffmannseggia ternate*; [24] *Hoffmannseggia prostrate*; [25] *Ceratonia siliqua*; [26] *Ceratonia oreothauma*; [27] *Gleditsia caspica*; [28] *Gleditsia triacanthos*.

Apêndice C - Sequências nucleotídicas do fragmento do intron trnL das espécies estudadas.

Caesalpinia_echinata_TRN_SV	CTTAATTAGA	TTGAGCCTTT	GTATGGAAAC	CTACCAAGTG	AGAACTTTCA	AATTCAGAGA	AACCCCTGGAA	TTAACAATGG
Caesalpinia_echinata_TRN_MV
Caesalpinia_echinata_TRN_LVT.....
Caesalpinia_calycinaG..GT.....
Caesalpinia_ferreaG..GT.....
Caesalpinia_yucatanensisG..GT.....
Caesalpinia_trichocarpa	...M..G..GT.....
Caesalpinia_sclerocarpaG..GT.....
Caesalpinia_pluviosaG..G
Caesalpinia_exilifoliaG..GT.....
Caesalpinia_exostemmaG..GT.....
Caesalpinia_gilliesiiG..G	T...T.....
Caesalpinia_glabrataG..GT.....
Caesalpinia_hughesiiG..GT.....A.....
Caesalpinia_eriostachysG..G
Caesalpinia_coriariaG..GT.....
Peltophorum_dubiumG..GT.....
Peltophorum_pterocarpumG..GT.....
Tachigali_paniculataG..GT.....
Tachigali_myrmecophilaG..GT.....
Parkinsonia_raimondoiG..GT.....
Parkinsonia_microphyllaG..GT.....
Hoffmannseggia_ternateGA.G
Hoffmannseggia_prostrateG..G
Ceratonia_siliquaG..G
Ceratonia_oreothaumaG..G
Gleditsia_caspicaG..G
Gleditsia_triacanthosG..G
Caesalpinia_echinata_TRN_SV	GCAATCCTGA	GCCAAATCCT	GTTTTCCGAA	AACCAAGAAG	AGTTCAGAAA	GGGAAAAGGGA	GAATAAAAAAA	A-GGATAGGT
Caesalpinia_echinata_TRN_MV	-.....
Caesalpinia_echinata_TRN_LV	-.....
Caesalpinia_calycinaT...A.G.ATA.	A..-----.	-.....
Caesalpinia_ferreaG.ATA.	A..-----.	-.....
Caesalpinia_yucatanensisT...G.ATA.	A..-----.	-.....
Caesalpinia_trichocarpaT.T...G.ATA.	A..-----.	-.....
Caesalpinia_sclerocarpa	-.....
Caesalpinia_pluviosaG.ATA.	A..-----.	--.....

Caesalpinia_exilifolia	T.....	G.ATA.	A.-----	.-.....
Caesalpinia_exostemma	T.....	G.ATA.	A.-----	.-.....
Caesalpinia_gilliesii	T.....	G.ATA.	A.-----	.-.....
Caesalpinia_glabrata	-----	.-.....
Caesalpinia_hughesii	T.....	G.ATA.	A.-----	.-.....
Caesalpinia_eriostachys	G.ATA.	A.-----	--.....
Caesalpinia_coriaria	-----	.-.....
Peltophorum_dubium	G.....	G.ATA.	A.-----	.-.....
Peltophorum_pterocarpum	G.....	G.ATA.	A.-----	.-.....
Tachigali_paniculata	G.ATA.	A.-----	.-.....
Tachigali_myrmecophila	G.ATA.	A.-----	.-.....
Parkinsonia_raimondoi	G.....	G.ATA.	A.-----	.-.....
Parkinsonia_microphylla	G.....	G.ATA.	A.-----	.-.....
Hoffmannseggia_ternate	-----	.-.....
Hoffmannseggia_prostrate	T.....	A.....	-----	.-.....
Ceratonia_siliqua	C.CG.ATA.	A.-----	.-.....
Ceratonia_oreothauma	C.CG.ATA.	A.-----	.-.....
Gleditsia_caspica	C.G.ATA.	A.C-----	.-.....
Gleditsia_triacanthos	C.G.ATA.	A.C-----	.-.....

Caesalpinia_echinata_TRN_SV	GCAGAGACTC	AACGGAAGCT	GTTCTAACAA	ATGGAGTTGA	CGACATTTTCG	TT-----AGT	AAAGGA---A	TCCTTCCATG
Caesalpinia_echinata_TRN_MV	TCGTT...---C
Caesalpinia_echinata_TRN_LV	TCGTT...---C
Caesalpinia_calycina	A.....C	TCGTT...---C
Caesalpinia_ferrea	TCGTT...---C
Caesalpinia_yucatanensisC	TCGTT...---T
Caesalpinia_trichocarpaC	TCGTT...---C
Caesalpinia_sclerocarpa	TCGTT...---C
Caesalpinia_pluviosa	TCGTT...---C
Caesalpinia_exilifoliaC	TCGTT...---	..T..T..C
Caesalpinia_exostemmaC	TCGTT...---C
Caesalpinia_gilliesiiC	TCGTT...---T..C
Caesalpinia_glabrata	TCGTT...---C
Caesalpinia_hughesiiC	TCGTT...---C
Caesalpinia_eriostachys	TCGTT...---C
Caesalpinia_coriaria	TCGTT...---C
Peltophorum_dubium	TCGTT..G---C
Peltophorum_pterocarpum	TCGTT...	-----	-----C
Tachigali_paniculata	TCGTT...---C
Tachigali_myrmecophila	TCGTT...---C
Parkinsonia_raimondoi	A...C...	TCGTT...---C
Parkinsonia_microphylla	A.....	TCGTT...---C

Hoffmannseggia_ternate TCGTT... ---.C
Hoffmannseggia_prostrate C ..TCGTT... ---.C
Ceratonia_siliqua T..... --- ---
Ceratonia_oreoethauma T..... --- ---
Gleditsia_caspica T..... TCGTT... ---.C
Gleditsia_triacanthos T..... T.. TCGTT... ---.C

Caesalpinia_echinata_TRN_SV GAAACTCCAG AAAAGAAAAGG ATCAA----- GGATGAACAT ATATA----- -TACGTA--- ----- --CTGAAATA
Caesalpinia_echinata_TRN_MV -----
Caesalpinia_echinata_TRN_LV ATCAA T-- -----ACG TA..T....
Caesalpinia_calycina TAT-- --GTA.. --- ---
Caesalpinia_ferrea --- ---
Caesalpinia_yucatanensis TAT-- --GTA.. --- ---
Caesalpinia_trichocarpa T.. T--- -- TACG TA.....
Caesalpinia_sclerocarpa --- ---
Caesalpinia_pluviosa T--- -- ---C.
Caesalpinia_exilifolia T--- --GTA.. --- ---
Caesalpinia_exostemma TAT-- --GTA.. --- ---
Caesalpinia_gilliesii G.. TATA- .GTA.. --- ---
Caesalpinia_glabrata --- ---
Caesalpinia_hughesii TAT-- --GTA.. --- ---
Caesalpinia_eriostachys T--- -- ---C.
Caesalpinia_coriaria --- ---
Peltophorum_dubium T... ..G.. T--- -- ---
Peltophorum_pterocarpum T... ..G.. T--- -- ---
Tachigali_paniculata CG.. T--- -- ---CTGAAA TA..--.T.T
Tachigali_myrmecophila CG.. T--- -- ---CTGAAA TA..--.T.T
Parkinsonia_raimondoi C.GG.. T--- -- ---
Parkinsonia_microphylla T.. .CG.. T--- -- ---
Hoffmannseggia_ternate ATATA --- ---
Hoffmannseggia_prostrate T.. --- ---
Ceratonia_siliqua --- ---TAC--- ---GTA--- ---
Ceratonia_oreoethauma --- ---TAC--- ---GTG--- ---
Gleditsia_caspica T..... --- ---TA.. --- --CGTATACG TA.....
Gleditsia_triacanthos T..... --- ---TA.. --- --CGTATATG TA.....

Caesalpinia_echinata_TRN_SV -----CTAT TTCAATTGAT TAG-ACCAGA CAGATC----- -CCAAATCTC TATTTTTTT-- -AATATTTTAT ATGACAAATG
Caesalpinia_echinata_TRN_MV -----... ..C. --- ---
Caesalpinia_echinata_TRN_LV -----... ..T..... .C. --- ---T.....
Caesalpinia_calycina -----T... ..-G..... .C. --- ---
Caesalpinia_ferrea -----... ..-G..... .C. --- ---C.
Caesalpinia_yucatanensis -----T... ..-G..... .C. --- ---C.

Caesalpinia_trichocarpa	-----	-G.....	C.----	-.....	G--	-.....
Caesalpinia_sclerocarpa	-----	-G.....	C.AGAC	C.....	--	-.....	C.....
Caesalpinia_pluviosa	-----	-G.....	C.----	-.....	--	-.....
Caesalpinia_exilifolia	-----	T...	-G.....	CT----	-.....	--	-C.....
Caesalpinia_exostemma	-----	T...	T.G.....	-G.....	C.----	-.....	C.....	--	-.....
Caesalpinia_gilliesii	-----	T...	-G.....	C.----	-AA.....	A.....	G.--	-C.....
Caesalpinia_glabrata	-----	-G.....	C.AGAC	C.....	--	-.....	C.....
Caesalpinia_hughesii	-----	T...	G.....	-G.....	C.----	-.....	C.....	--	-.....
Caesalpinia_eriostachys	-----	-G.....	C.----	-.....	--	-.....
Caesalpinia_coriaria	-----	-G.....	C.----	-.....	--	-.....	C.....
Peltophorum_dubium	-----	-G.....	C.----	-.....	C.....	--	-C.....
Peltophorum_pterocarpum	-----	-G.....	C.----	-.....	C.....	G.--	-C.....
Tachigali_paniculata	-----	.A..	-G.....	C.----	-.....	--	-.....
Tachigali_myrmecophila	-----	.A..	-G.....	C.----	-.....	--	-.....
Parkinsonia_raimondoi	-----	-G.....	C.----	-.....	T-	-C.....
Parkinsonia_microphylla	-----	-G.....	C.C.----	-.....	--	-C.....
Hoffmannseggia_ternate	-----	-G.....	C.----	-.....	C.....	--	-.....
Hoffmannseggia_prostrate	-----	-C.....	C.----	-.....	C.....	--	-.....
Ceratonia_siliqua	-----	-----	--	C.----	-.....	--	-.....
Ceratonia_oreothauma	-----	-----	--	C.----	-.....	--	-.....
Gleditsia_caspica	-----	-----	--	C.----	-.....	--TG	TC.....
Gleditsia_triacanthos	-----	-----	--	C.----	-.....	--TT	TC.....

Caesalpinia_echinata_TRN_SV	AAAGATGTGA	ATAGATTCCA	AGTTGAAG--	-----	AAAGA	ATCGAATATT	TAT-----	T	GATCAAATCA	TTCACTCCAT
Caesalpinia_echinata_TRN_MV	--	-----
Caesalpinia_echinata_TRN_LV	--	A.....	-----	T.....
Caesalpinia_calycina	A.....	--	T.....	-----	C.....	T.....
Caesalpinia_ferrea	--	-----
Caesalpinia_yucatanensis	--	-----	T.....
Caesalpinia_trichocarpaT..AA-	-----	-----	--	-----	-----	C.....	T.....
Caesalpinia_sclerocarpa	--	-----	-----	A.....
Caesalpinia_pluviosa	--	-----	-----
Caesalpinia_exilifolia	--	-----	-----	AA..C...	T.T...
Caesalpinia_exostemma	--	-----	-----	C.....	T.....
Caesalpinia_gilliesii	--	-----	-----	C.....	T.T...
Caesalpinia_glabrata	--	-----	-----	A.....
Caesalpinia_hughesii	--	-----	-----	C.....	T.....
Caesalpinia_eriostachys	-----	--	-----	-----
Caesalpinia_coriaria	GT	TGAAG.	-----
Peltophorum_dubium	C.....T..	--	-----	C.....	-----	T.....
Peltophorum_pterocarpum	C.....T..	--	-----	C.....	-----	T.....
Tachigali_paniculataG...-	-----	-----	--	-----	C.....	-----

Tachigali_myrmecophilaG...--	-----	-----	-----	C..-----
Parkinsonia_raimondoiC.....	..--	-----	C..-----
Parkinsonia_microphyllaC.....	..--	-----	C..-----
Hoffmannseggia_ternate--	-----
Hoffmannseggia_prostrate--	-----
Ceratonia_siliquaC.....	..--	-----	C..-----
Ceratonia_oreoethaumaC.....	..--	-----	C..-----
Gleditsia_caspicaC.....	..--	-----	C..-----
Gleditsia_triacanthosC.....	..--	-----	C..-----
Caesalpinia_echinata_TRN_SV	CATA-----	-----	-----	--GTCTGATA	GATCTTTTGA	AGAACTGATT	AATCGGACGA	GAATAAAGAT
Caesalpinia_echinata_TRN_MV-----	-----	-----	-----
Caesalpinia_echinata_TRN_LV-----	-----	-----	-----
Caesalpinia_calycina	G...-----	-----	-----	-----	A.....
Caesalpinia_ferrea-----	-----	-----	-----
Caesalpinia_yucatanensis	G...ATGATA	-----	-----	-----	A.....
Caesalpinia_trichocarpa	G...-----	-----	-----	-----C.....
Caesalpinia_sclerocarpa-----	-----	-----	-----
Caesalpinia_pluviosa-----	-----	-----	-----
Caesalpinia_exilifolia	G...-----	-----	-----	-----	A.....
Caesalpinia_exostemma	G...ATGATA	-----	-----	-----	A.....
Caesalpinia_gilliesii	G...-----	-----	-----	-----	A.....
Caesalpinia_glabrata-----	-----	-----	-----
Caesalpinia_hughesii	G...ATGATA	-----	-----	-----	A.....
Caesalpinia_eriostachys-----	-----	-----	-----
Caesalpinia_coriaria-----	-----	-----	-----
Peltophorum_dubium-----	-----	-----	-----
Peltophorum_pterocarpum-----	-----	-----	-----
Tachigali_paniculata-----	-----	-----	-----
Tachigali_myrmecophila-----	-----	-----	-----
Parkinsonia_raimondoi-----	-----	-----	-----C.....
Parkinsonia_microphylla-----	-----	-----	-----C.....
Hoffmannseggia_ternate-----	-----	-----	-----
Hoffmannseggia_prostrate-----	-----	-----	-----
Ceratonia_siliqua-----	-----	-----	-----A.....
Ceratonia_oreoethauma-----	-----	-----	-----A.....
Gleditsia_caspica-----	-----	-----	-----
Gleditsia_triacanthos-----	-----	-----	-----
Caesalpinia_echinata_TRN_SV	AGAGTCCCAT	TCTACATGTC	AA-ACCGACA	-CAATGAAAT	TTATAGTAAG	AGGAAAAATCC	GTCGACTTTA	GAAATCGTGA
Caesalpinia_echinata_TRN_MVT.....	A.....
Caesalpinia_echinata_TRN_LVAT.	CTAG.....	..T.....	A.....GA	G.....

Caesalpinia_calycina	T.....	A.....
Caesalpinia_ferrea	T.....	A.....
Caesalpinia_yucatanensis	T.....	A.....
Caesalpinia_trichocarpa	T.....	A.....
Caesalpinia_sclerocarpa	T.....	A.....
Caesalpinia_pluviosa	T.....	A.....
Caesalpinia_exilifolia	T.....	A.....
Caesalpinia_exostemma	T.....	A.....	GT.....
Caesalpinia_gilliesii	T.....	A.....
Caesalpinia_glabrata	T.....	A.....
Caesalpinia_hughesii	T.....	A.....
Caesalpinia_eriostachys	T.....	A.....
Caesalpinia_coriaria	T.....	A.....
Peltophorum_dubium	T.....	A.....
Peltophorum_pterocarpum	T.....	A.....
Tachigali_paniculata	T.....	A.....
Tachigali_myrmecophila	T.....	A.C.....	-
Parkinsonia_raimondoi	T.....	A.....
Parkinsonia_microphylla	T.....	A.....
Hoffmannseggia_ternate	T.....	A.....	C.....
Hoffmannseggia_prostrate	T.....	A.....
Ceratonia_siliqua	T.....	A.....
Ceratonia_oreothauma	T.....	A.....
Gleditsia_caspica	T.....	A.....	-
Gleditsia_triacanthos	T.....	A.....