
Gene 16S rRNA e sua aplicação em sistemática filogenética

16S rRNA gene and its application in phylogenetic systematics

Carlos Alberto Machado da Rocha

Professor Titular do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA). Doutor em Neurociências e Biologia Celular pela Universidade Federal do Pará. **Endereço:** Av. Almirante Barroso, 1155. Bairro: Marco. CEP.: 66.093-020. Belém/PA. **E-mail:** carlos.rocha@ifpa.edu.br

RESUMO

Os genes que codificam para RNA ribossômico são altamente conservados, com taxas de mutação relativamente baixas, fornecendo uma visão da evolução abrangente, capaz de englobar todos os organismos vivos. Entre esses genes, o 16S rRNA, com aproximadamente 1500 pares de bases (pb) de comprimento, é responsável pela síntese do rRNA encontrado na subunidade menor dos ribossomos 70S presentes nas células procarióticas e no interior de mitocôndrias e cloroplastos. O gene 16S rRNA foi o principal marcador molecular utilizado na proposta de divisão dos seres vivos nos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya. Nesse artigo é abordada a aplicação do gene 16S rRNA na sistemática filogenética, incluindo seu uso no esclarecimento da parafilia de camarões e na identificação de bactérias.

Palavras-chave: Cladística. Genoma mitocondrial. Monofilia. Parafilia.

ABSTRACT

The genes encoding ribosomal RNA are highly conserved, with relatively low mutation rates, providing a comprehensive view of evolution capable of encompassing all living organisms. Among these genes, the 16S rRNA, approximately 1500 base pairs (bp) in length, is responsible for the synthesis of the rRNA found in the smaller subunit of the 70S ribosomes present in prokaryotic cells and within mitochondria and chloroplasts. The 16S rRNA gene was the main molecular marker used in the proposal to divide living beings into the Archaea, Bacteria and Eukarya domains. This article discusses the application of the 16S rRNA gene in phylogenetic systematics, including its use in clarifying shrimp paraphyly and in identifying bacteria.

Keywords: Cladistics. Mitochondrial genome. Monophyly. Paraphilia.

INTRODUÇÃO

Os ribossomos são organelas onipresentes (ocorrem em todos os tipos de células) e, do ponto de vista funcional, correspondem a máquinas de síntese de proteínas. Na sua constituição encontramos dezenas de proteínas e algumas variedades de RNA ribossômico (rRNA). Cada ribossomo tem duas subunidades que se reúnem na presença de um RNA mensageiro (mRNA).

A subunidade ribossômica menor atua como uma plataforma para o reconhecimento e pareamento entre o mRNA e as pequenas moléculas de RNA transportador (tRNA); a subunidade maior é responsável por uma atividade catalítica, permitindo que ocorram as ligações peptídicas entre os aminoácidos que vão sendo reunidos na formação de um polipeptídeo ou proteína. Há algumas diferenças entre os ribossomos de procariontes e eucariontes. As principais referem-se ao coeficiente de

sedimentação (S) e tipos de rRNA na sua composição. Quanto ao coeficiente de sedimentação, que depende do tamanho e da densidade, há ribossomos 70S (subunidades 30S e 50S) nos procariontes e 80S (subunidades 40S e 60S) livres no citosol e associados ao retículo endoplasmático dos eucariontes (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Alguns tipos de RNA são capazes de atuar como catalisadores biológicos, tal como as enzimas, geralmente catalisando a síntese e a quebra de ligações fosfodiéster. Os tipos de RNA com atividade catalítica são chamados ribozimas e são muito menos frequentes que os catalisadores proteicos. A formação das ligações peptídicas é catalisada pela peptidil-transferase, uma atividade intrínseca ao rRNA (23S dos procariontes e 28S dos eucariontes) encontrado na subunidade ribossomal maior. Como esse rRNA catalisa a reação, é considerado ribozima (ALBERTS et al., 2010).

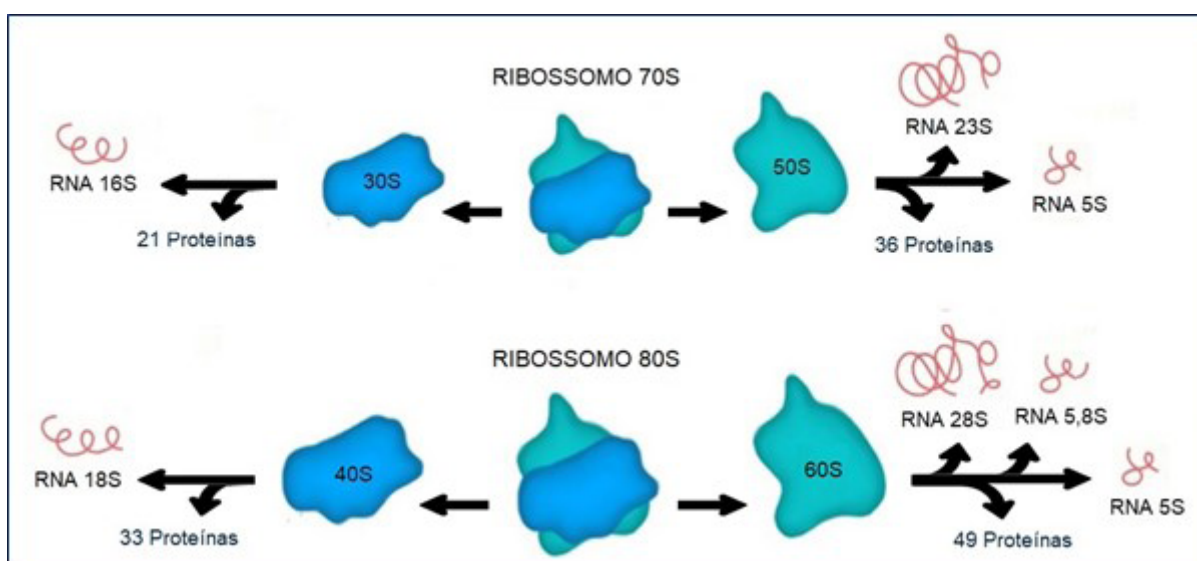


Figura 1. Comparação entre os ribossomos de procariontes e eucariontes.

Além de maiores, os ribossomos eucariontes são mais complexos. Enquanto nos procariontes, cada ribossomo possui três tipos de rRNA (23S, 16S e 5S), nos ribossomos eucariontes distinguem-se quatro tipos de rRNA: 5S, 5,8S, 18S e 28S. Em todos os casos, apenas um tipo de rRNA é encontrado na subunidade menor, sendo o 16S nos procariontes e o 18S nos eucariontes (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Em células eucariontes, no interior de cloroplastos e mitocôndrias, também ocorrem ribossomos e estes são mais assemelhados aos ribossomos procariontes. Tal semelhança era de ser esperada com base na **teoria endossimbiótica**, popularizada por

Lynn Margulis em 1981, que defende a origem evolutiva de mitocôndrias e cloroplastos a partir de microrganismos procariontes que se estabeleceram no interior de eucariontes primitivos (ROCHA, 2018).

O rRNA 16S, portanto, está presente nas células dos diferentes domínios de seres vivos propostos por Carl Woese e colaboradores em 1990: Archaea, Bacteria e Eukarya (Figura 2). O mais interessante é que essa proposta foi baseada principalmente nos estudos do gene rRNA 16S, que codifica um produto de função constante entre os organismos e apresenta discretas variações em sua sequência nucleotídica ao longo do tempo evolutivo.

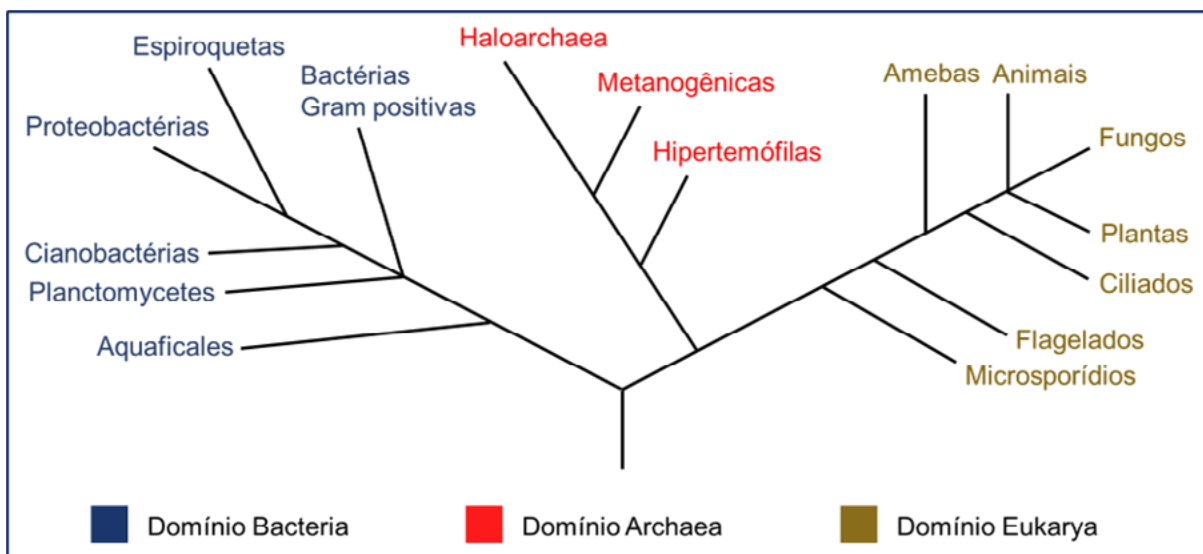


Figura 2. Árvore filogenética baseada em dados do gene rRNA 16S, destacando a separação de Bacteria, Archaea e Eukarya. (Adaptada da proposta de WOESE et al., 1990).

Nos domínios Bactéria e Archaea estão os organismos procariontes, que anteriormente eram denominados eubactérias e arqueobactérias, respectivamente. Estudos utilizando marcadores

moleculares, incluindo o gene rRNA 16S, mostram que as arqueias são evolutivamente mais próximas aos organismos eucariontes do que às bactérias. A interpretação mais aceita é que nos primórdios da vida

na Terra, um ancestral unicelular remoto ramificou-se para a esquerda e originou Bacteria, ao mesmo tempo em que se ramificava para a direita e originava a linhagem que veio a dividir-se em Archaea e Eukarya. Thomas Cavalier-Smith (1942–2021), inclusive, cunhou o nome Neomura para abranger as arqueias e seres eucarióticos e excluir as eubactérias (DAWKINS, 2009).

METODOLOGIA

Este estudo é uma revisão de literatura, realizada a partir de uma abordagem qualitativa. A escolha é baseada no entendimento de que a revisão da literatura é uma parte vital do processo de pesquisa, pois envolve localizar, analisar, sintetizar e interpretar a investigação preliminar. Foram utilizados materiais impressos e publicações em bases de dados na Internet, como Scielo e PubMed. A produção publicada eletronicamente, além de possibilitar o acesso às discussões atuais sobre o gene 16S rRNA, é a de mais fácil acesso. As publicações foram selecionadas em português e inglês, respectivamente a língua nativa do autor e a língua que é a das obras mais significativas publicadas em todos os continentes.

RESULTADOS

O GENE 16S rRNA

É o gene responsável pela síntese do rRNA encontrado na

subunidade menor dos ribossomos 70S. De modo geral, os genes são simbolizados por letras do alfabeto romano, geralmente abreviações com três letras e em itálico. Então podemos encontrar o gene 16S rRNA como “gene *rns*”, relativo a *small subunit ribosomal* RNA gene. A sequência completa do gene 16S rRNA tem cerca de 1500 pb de comprimento, intercalando regiões variáveis e conservadas. Seu comprimento pode apresentar pequenas diferenças de uma espécie para outra. Na *Escherichia coli* (Domínio Bacteria), por exemplo, ele apresenta 1541 pb, enquanto em *Halobacterium halobium* (Domínio Archaea) exibe 1473 pb.

As **regiões variáveis** do DNA mutam em taxas mais rápidas e são utilizadas para distinguir organismos relacionados, diferindo proporcionalmente à proximidade filogenética entre as espécies. **Regiões conservadas** do DNA são muito semelhantes entre diferentes espécies, geralmente regiões codificadoras ou reguladoras, podendo representar sítios de relevância biológica na expressão fenotípica dos genes.

Nos Eukarya, os estudos sobre o gene 16S rRNA são concentrados principalmente no genoma mitocondrial (mitogenoma). Pode-se assumir o genoma mitocondrial de animal típico como tendo uma região de controle não codificante (região *D-loop*, que contém uma origem das sequências promotoras da replicação e transcripcional do DNA) e 37 genes, sendo 13 codificadores de proteínas, dois genes para RNA

ribossômico (16S rRNA e 12S rRNA) e 22 genes que codificam para tRNA (RNA transportador ou RNA de transferência) espalhados ao longo da molécula de DNA circular. O gene 16S localiza-se entre dois genes que codificam tRNA: o da leucina (gene Leu-tRNA) e o da valina (gene Val-tRNA). Mais uma vez podem ser encontradas discretas variações no comprimento desse gene. A título de ilustração, são apresentados três exemplos: no salmão rei (*Oncorhynchus tshawytscha*) são 1683 pb, no urso negro asiático (*Ursus thibetanus*) são 1580 pb e em humanos são 1559 pb (WILHELM et al., 2003; HOU et al., 2006).

O genoma mitocondrial de Fungi é bem maior que em Animalia e, apesar da grande variação no tamanho, os mitogenomas fúngicos geralmente contêm 14 genes que codificam proteínas do sistema de fosforilação oxidativa, dois genes de rRNA (16S rRNA e 12S rRNA) e um conjunto de 18 a 38 genes de tRNA. A grande variação do tamanho do genoma mitocondrial em fungos é atribuída principalmente a diferentes comprimentos de seus íntrons e regiões intergênicas. No fungo fitopatogênico *Bipolaris sorokiniana*, por exemplo, o gene 16S rRNA tem 1659 pb, como uma sequência gênica completa, sem a presença de íntrons.

Em plantas, o genoma mitocondrial também é muito extenso e ainda apresenta maior número de genes. São 48 no mitogenoma de beterraba (*Beta vulgaris*), 49 no feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e 53 no arroz (*Oryza sativa*), por

exemplo. Diferentemente do que ocorre nos animais e fungos, entre os genes mitocondriais de plantas não encontramos o 16S rRNA, mas há três genes que codificam para rRNA: 25S, 18S e 5S. A montagem de genomas mitocondriais de plantas proporciona dados sobre o tamanho, a estrutura e o conteúdo gênico. Mas desvendar a sequência desses grandes e complexos genomas de organela mostra-se um desafio, devido à fragmentação, recombinação frequente e transferências de DNA de cloroplastos vizinhos.

Ao ser comparado com genomas mitocondriais, o genoma de cloroplastos é relativamente bem conservado em plantas terrestres e algas verdes. Muitos genomas plastidiais contêm uma grande repetição invertida e, por conta dela, vários genes estão presentes em duas cópias por genoma (YANG et al., 2023). O genoma do cloroplasto abriga genes para 30 diferentes tRNA, cerca de 80 genes que codificam polipeptídeos e quatro genes para os rRNAs (16S, 23S, 4,5S, 5S). Na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, o gene 16S plastidial tem 1475 pb, enquanto na cevada (*Hordeum vulgare*) são 1492 pb.

SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA

A multiplicidade da vida em seres de muitas formas, cores e tamanhos, adaptados à sobrevivência nos mais variados ambientes constitui a biodiversidade. Embora geralmente seja expressa pela variedade de

espécies, também é possível considerar a biodiversidade segundo diferentes escalas ou níveis de grandeza (ROCHA, 2018). Para facilitar as análises dessa biodiversidade é interessante classificar os seres vivos e, tal como para as outras coisas que classificamos, precisamos estabelecer critérios na formação dos grupos segundo a similaridade de seus integrantes.

Em biologia, a sistemática estuda a diversidade com a missão de organizar, compreender e classificar os seres vivos. Desde a antiguidade, diferentes sistemas de classificação vêm sendo organizados e propostos. Os primeiros, considerados sistemas artificiais, baseavam-se em um ou poucos caracteres, frequentemente numéricos e sem valorizar relações de afinidades entre os organismos. Ainda não incluíam em suas bases a teoria evolucionista, podendo ser considerados representações artificiais da biodiversidade.

Modernamente, sistemática é o ramo da biologia evolutiva que tem o objetivo de recuperar as relações genealógicas subjacentes à diversidade orgânica. No contexto evolutivo, sistemática biológica é uma ciência histórica, comparativa e inferencial que, baseada nos conceitos de ancestralidade comum e descendência com modificação, procura estabelecer relações evolutivas entre os grupos de organismos que conhecemos (SOBER, 1988).

A representação da diversidade biológica por meio de uma árvore surgiu com Charles Darwin (1809-1882), no

livro *On the Origin of Species* (1859). A única ilustração nesse livro é a primeira representação de relações evolutivas entre espécies em um diagrama em forma de árvore. O naturalista Ernst Haeckel (1834-1919) foi outro pioneiro na construção de árvores filogenéticas, baseadas na comparação de similaridades compartilhadas pelos seres vivos. Haeckel também criou o termo **filogenia** para identificar os diagramas que mostrassem as relações evolutivas. Entretanto, a escola filogenética ou cladística de classificação de seres vivos somente começou a ganhar a preferência dos pesquisadores a partir de 1966, com a divulgação dos trabalhos do entomólogo Willi Hennig (1913-1976). **Cladística** é a classificação biológica que organiza hierarquicamente as espécies ou outros táxons em grupos ou táxons baseada puramente em suas relações evolutivas. Apesar de alguns autores diferenciarem a sistemática filogenética da cladística, para fins didáticos elas são como sinônimas.

Na realidade, o método de reconstrução de árvores evolutivas foi criado por Hennig em sua obra magna *Phylogenetic Systematics* (1950), ampliada e traduzida para o inglês em 1966. A sistemática filogenética corresponde a um desenvolvimento do pensamento sistemático de Darwin, que fundamentou diferentes escolas classificatórias do século XX. Hennig introduziu um método teórico-operacional tão objetivo e explícito quanto a fenética e profundamente conectado à perspectiva evolutiva de

Darwin. A filogenética de Hennig visa à criação de um sistema classificatório que reflita caminhos da evolução, de modo que apenas grupos **monofiléticos** sejam considerados naturais, uma vez que somente eles realmente respeitam o conceito evolutivo da ancestralidade comum. Grupos monofiléticos, também denominados **clados**, são grupos naturais de seres vivos formados pela reunião de todos os descendentes de um ancestral comum, este incluso (SANTOS, 2008).

A **Fenética** é uma área da biologia que agrupa espécies com base na similaridade fenotípica. Também chamada de “escola numérica”, usa todas as características distinguíveis, podendo o agrupamento coincidir ou não com as filogenias.

Muitos grupos tradicionalmente aceitos e populares não se enquadram na definição de monofiléticos. Entre as plantas, um exemplo de grupos familiares que não são monofiléticos são as dicotiledôneas. Entre os animais, répteis, peixes e camarões também não são grupos monofiléticos. Em casos como esses, atribui-se a denominação de **parafiléticos**, ou seja, grupos de seres vivos que contêm o ancestral comum mais recente, mas nem todos os seus descendentes. Por isso, alguns especialistas não se referem a dicotiledôneas, répteis, peixes e camarões como clados, sugerindo que sejam chamados de grados.

Um **grado** é simplesmente um grupo de seres vivos que atingiu um estágio semelhante em uma tendência evolutiva, não refletindo afinidades

naturais entre seus componentes, mas apenas a inércia histórica estabelecida pelo uso acumulado. O caso dos répteis é, provavelmente, o que tem sido mais divulgado. Réptil, no entendimento tradicional, incluindo crocodilianos, quelônios, escamados (lacertílios e ofídios) e os rincocéfalos da Nova Zelândia, não constitui adequadamente um clado pelo fato de excluir as aves. Assim, répteis são referidos como parafiléticos. Para que se tenha uma ideia, marcadores morfológicos, enzimáticos e genéticos indicam que os répteis crocodilianos são filogeneticamente mais próximos das aves do que de outros répteis (tartarugas, por exemplo) (DAWKINS, 2009).

O gene mitocondrial rRNA 16S tem sido amplamente utilizado como marcador na análise de relações filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos, particularmente nos estudos intergenéricos e interespecíficos em vários organismos eucariontes. Nesses estudos, pode-se utilizar a sequência completa do gene ou sequências parciais, sendo o uso destas bem mais frequente até por conta de seu grande número disponível em bancos de dados públicos, facilitando a sua aplicação nas análises filogenéticas (ROCHA, 2000).

CAMARÕES NÃO CONSTITUEM UM GRUPO MONOFILÉTICO

Quanto à questão de os camarões constituírem ou não um grupo monofilético, a literatura tem

sido contraditória. Alguns autores, baseados na morfologia dos animais adultos, sugerem a monofilia dos camarões, colocando-os todos na subordem Natantia, enquanto os demais crustáceos da ordem Decapoda são colocados na subordem Reptantia.

Decapoda é a ordem de crustáceos com uma carapaça bem desenvolvida que recobre a câmara branquial, três pares de maxilípedes e cinco pares de pernas torácicas denominadas pereópodes.

A proposta alternativa, baseada predominantemente em registros fósseis, além de características reprodutivas e larvais, sugere a colocação de parte dos camarões na subordem Dendrobranchiata (camarões peneídeos e sergestídeos), e o restante dos camarões (incluindo paleomonídeos) na subordem Pleocyemata, juntamente com as lagostas, caranguejos, paguros e os demais crustáceos decápodes (ROCHA, 2000).

Para testar tal hipótese, fizemos uma análise filogenética com uma região de 443 pb do gene 16S de camarões da família Penaeidae como representantes da infraordem Penaeidea (*Litopennaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis* e *Xiphopennaeus kroyeri*) e da família Palaemonidae como representantes da infraordem Caridea (*Macrobrachium acanthurus* e *M. rosenbergii*). Também foram incluídas na análise sequências de 16S disponíveis no Genbank para lagostas da infraordem Astacidea e de uma espécie da ordem Isopoda).

GenBank é um banco de dados de

sequências genéticas (nucleotídeos, aminoácidos) do National Institute of Health (NIH) dos Estados Unidos.

A reconstrução filogenética por meio do gene 16S posicionou os camarões paleomonídeos mais próximos das lagostas Astacidea do que dos demais camarões, como mostrado na árvore filogenética enraizada da Figura 3. Tal arranjo apoia a proposta de camarões como um grupo parafilético, sugerindo que os representantes das infraordens Caridea e Astacidea têm em comum um ancestral que viveu mais recentemente do que o ancestral que eles têm em comum com os da infraordem Penaeidea. A **árvore filogenética enraizada** apresenta o ancestral comum de todos os táxons mostrados na árvore. Ela indica a direção do tempo evolutivo, já que todos os táxons evoluíram da raiz. As árvores não-enraizadas ilustram apenas relacionamentos, sem referência a ancestrais comuns.

Na construção de árvores filogenéticas enraizadas, devemos definir o posicionamento da raiz com base na determinação de pelo menos um grupo externo, ou seja, de pelo menos uma linhagem que não faça parte das linhagens de interesse, que são os grupos internos (DAWKINS, 2009). No caso dos camarões, por mais incertos que estejamos quanto às relações de parentesco entre os Penaeidea e Caridea, sabemos que o ancestral comum entre qualquer camarão e um Isopoda é mais antigo do que o ancestral comum entre qualquer camarão e outro camarão.

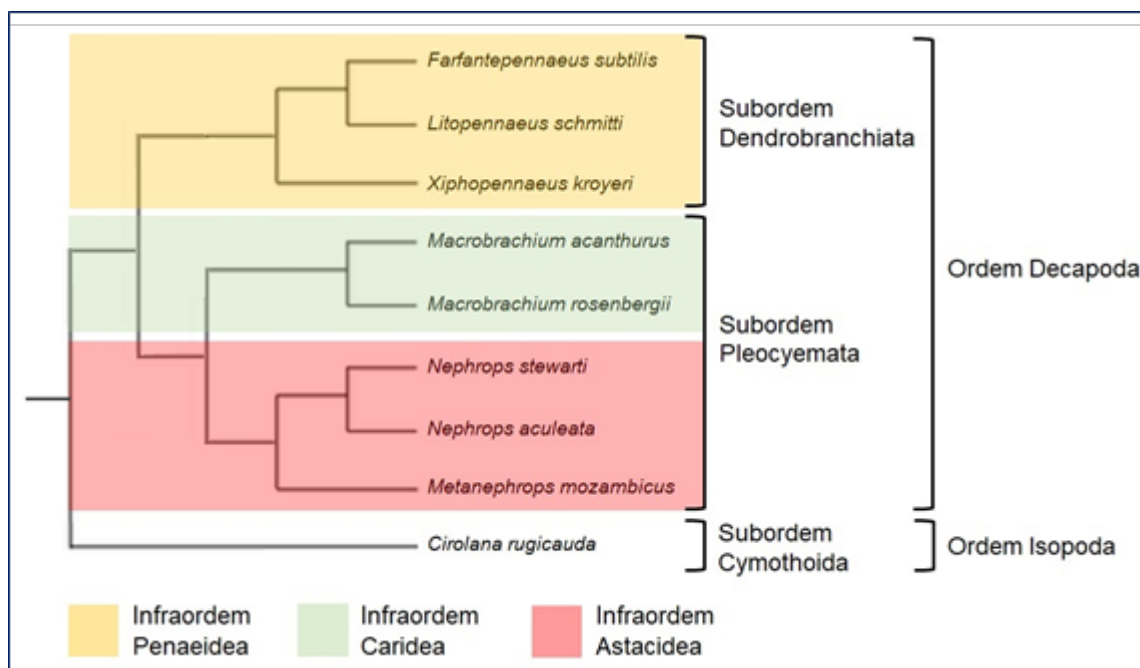


Figura 3. Árvore filogenética baseada em dados do gene rRNA 16S, com as relações evolutivas dentro da ordem Decapoda. A espécie *Cirolana rugicauda*, da ordem Isopoda, foi utilizada como grupo externo. (Adaptada de ROCHA, 2000).

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

A análise de genes ribossômicos é amplamente utilizada para as inferências filogenéticas, especialmente úteis na sistemática molecular de bactérias, aumentando em muito o conhecimento a respeito da diversidade procariótica em diferentes ecossistemas. O gene 16S rRNA está presente em todos os procariontes e um grande número de suas sequências obtidas está disponível em bancos de dados públicos, permitindo que sejam feitas comparações, as quais representam uma importante ferramenta na determinação das relações evolutivas e filogenéticas entre os organismos e na avaliação da diversidade em amostras ambientais.

O gene 16S rRNA tornou-se o principal marcador para inferências taxonômicas e filogenéticas em

bactérias. Trata-se de um gene universal em procariontes, o que respalda seu uso para distinguir linhagens de bactérias e arqueias, fornecendo identificações mais robustas, reprodutíveis e precisas do que aquelas obtidas por meio de análises fenotípicas. A comparação de sequências do gene 16S rRNA com finalidade taxonômica e filogenética é cada vez mais comum e passou a ser considerada o método de referência para a identificação bacteriana (CLARRIDGE, 2004). Novas sequências obtidas são comparadas com as que já estão depositadas em bancos de dados, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI).

No GenBank¹ são encontradas todas as sequências de DNA disponíveis publicamente. Em cada novo trabalho com obtenção e análise de sequências

1 - Acesso em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

gênicas, visitas ao GenBank tornam-se extremamente úteis, por conta de uma funcionalidade chamada BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), um algoritmo para comparar cada sequência obtida com quaisquer sequências disponíveis na imensa base de dados do GenBank. Ao final, o acesso é também indicado, para que as novas sequências obtidas sejam depositadas.

Em meu estágio pós-doutoral (2011-2012), atuei na bioprospecção de substâncias com atividade antitumoral, obtidas de microrganismos associados a duas espécies de Cnidários Zoantídeos: *Palythoa caribaeorum* e *Protopalythoa variabilis*. A coleta de amostras foi realizada no litoral do estado do Ceará e, ao final do isolamento e purificação, foram obtidas 20 cepas bacterianas. A cepa identificada como BRA-035, uma

Gram positivo isolada de *Protopalythoa variabilis*, foi a mais ativa nesse levantamento e, por isso, recebeu maior atenção, incluindo sua caracterização molecular por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

A sequência obtida da cepa BRA-035 (cerca de 1400 pb) foi comparada no banco de dados do NCBI, utilizando a ferramenta BLAST e a identificação molecular por sequenciamento de 16S rRNA mostrou que BRA-035 pertence ao gênero *Streptomyces*. Então, esta sequência foi comparada com as sequências parciais de rRNA 16S das espécies do gênero para que se determinasse o grau de similaridade entre elas. As relações filogenéticas entre a cepa BRA-035 e as cepas do gênero *Streptomyces* mais proximamente relacionadas podem ser observadas na árvore da Figura 4.

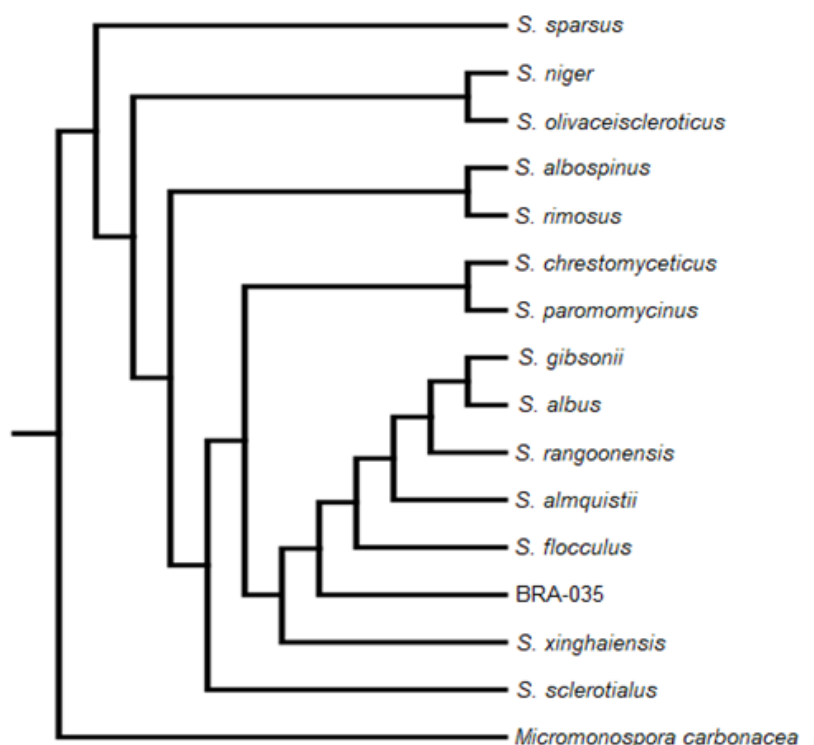


Figura 4. Árvore filogenética baseada em sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, com as relações entre espécies do gênero *Streptomyces* e a cepa BRA-035. A espécie *Micromonospora carbonacea* foi utilizada como grupo externo (ROCHA et al., 2012).

A construção da árvore filogenética acima levou à formação de um clado constituído pela linhagem BRA-035 e as espécies *S. gibsonii*, *S. albus*, *S. rangoonensis*, *S. almquistii* e *S. flocculus*. A análise filogenética baseada no gene 16S rRNA permite inferir que a BRA-035 constitui uma linhagem distinta, correspondendo possivelmente a uma espécie ainda não descrita, do gênero *Streptomyces* (ROCHA et al., 2012).

A hipótese de que a cepa BRA-035 pertença a uma nova espécie de *Streptomyces* é plausível. Entretanto, para sua confirmação, além dos dados do gene 16S rRNA, seria necessário reunir um conjunto maior de evidências, incluindo o sequenciamento e análise de mais alguns genes, bem como a avaliação dos chamados fenótipos bioquímicos, que dependem da atividade de enzimas e outros tipos de proteína.

CONCLUSÃO

O gene mitocondrial rRNA 16S tem se mostrado um ótimo recurso como marcador molecular na análise de relações filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos. O método filogenético distingue-se pela busca do mínimo possível de subjetividade, de modo a estabelecer melhor as relações evolutivas entre os grupos de seres vivos. Na prática, costuma ser gerada uma grande quantidade de informações, uma vez que se considera o maior número possível de caracteres, que podem ser morfológicos,

fisiológicos e moleculares, dentre outros. Para a análise do grande volume de dados, é comum o trabalho com programas especiais de computador, especificamente desenvolvidos para se tentar esclarecer as relações evolutivas entre seres vivos ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; PETER, W. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews.**, v.17, n. 4, p. 840-862, 2004.

DAWKINS, R. **A grande história da evolução: na trilha dos nossos ancestrais**. São Paulo: Companhia da Letras, 2009.

HOU, W. R.; CHEN, Y.; WU, X.; HU, J. C.; PENG, Z. S.; YANG, J.; TANG, Z. X.; ZHOU, C. Q.; LI, Y. M.; YANG, S. K.; DU, Y. J.; KONG, L. L.; REN, Z. L.; ZHANG, H. Y.; SHUAI, S. R. A complete mitochondrial genome sequence of Asian black bear Sichuan subspecies (*Ursus thibetanus mupinensis*). **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 85-90. 2006.

ROCHA, C. A. M. **Biodiversidade: genes – espécies – ecossistemas**. Belém: Editora SEE, 2018.

ROCHA, C. A. M. **Caracterização Molecular de Camarões do Estuário do Rio Caeté e Litoral do Município de Bragança, Pará, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil, 2000.

ROCHA, C. A. M.; WILKE, D. V.; FERREIRA, E. G.; MAIA, A. I. V.; SAHM, B. D. B.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of ethyl acetate extracts obtained from microorganisms associated to *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis*. In: **VIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e I International Symposium of Pharmacognosy**. Ilhéus, BA, 2012.

SANTOS, C. M. D. Os dinossauros de Hennig: sobre a importância do monofiletismo para a sistemática biológica. **Scientiae Studia**, v.6, n. 2, p. 179-200, 2008.

SOBER, E. **Reconstructing the Past: Parsimony, Evolution, and Inference**. Cambridge, MA: The MIT Press, 1988.

WILHELM, V.; VILLEGAS, J.; MIQUEL, A.; ENGEL, E.; BERNALES, S.; VALENZUELA, P. D.; BURZIO, L. O. The complete sequence of the mitochondrial genome of the Chinook

salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. **Biological Research**, v. 36, n. 2, p. 223-231, 2003.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

YANG C, WANG K, ZHANG H, GUAN Q, SHEN J. Analysis of the chloroplast genome and phylogenetic evolution of three species of *Syringa*. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 1, 665-677, 2023.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.