**ESTUDO EVOLUTIVO DE ESPÉCIES E HÍBRIDOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR POR ANÁLISE COMPARATIVA COM OUTRAS
ESPÉCIES DA FAMÍLIA *POACEAE* (ARROZ, MILHO, SORGO E
TRIGO) UTILIZANDO REGIÕES DO
GENOMA CLOROPLASTIDIAL**

DANILA MONTEWKA MELOTTO-PASSARIN
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Profa. Dra. **HELAINÉ CARRER**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Junho – 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Melotto-Passarin, Danila Montewka

Estudo evolutivo de espécies e híbridos de cana-de-açúcar por análise comparativa com outras espécies da família *Poaceae* (arroz, milho, sorgo e trigo) utilizando regiões do genoma cloroplastidial / Danila Montewka Melotto-Passarin. – Piracicaba, 2004.
134 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Cloroplasto vegetal 3. Evolução vegetal 4. Filogenia 5. Melhoramento genético vegetal 6. Polimorfismo 7. Sequência de nucleotídeo I. Título

CDD 633.61

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Nossas vidas tocam algumas vidas uma vez nesta caminhada; e depois os caminhos se separam para nunca mais se encontrarem. Portanto não chore porque terminou, mas sorria porque aconteceu. Siga tranquilamente, entre a inquietude e a pressa, lembrando-se que sempre há paz no silêncio. Quando virmos em Jesus nossos caminho e paz, Deus colocará beleza e cor nas pequenas coisas que nos acontecem, pois tudo sucede por alguma coisa. Então mantenha boas relações com outras pessoas, amando ao seu próximo como a si mesmo, falando a sua verdade, mansa e claramente, e ouça a dos outros, mesmo a dos insensatos e ignorantes, pois também eles têm sua própria história. Portanto, somos agora mais fortes e prontos para continuar em nossa caminhada.

Em memória a Elias Melotto,
Meu querido pai,
Pelo amor, compreensão e carinho
DEDICO

À minha mãe Helena Montewka Melotto,
Às minhas irmãs Carolina e Ludimila,
Ao meu marido Rogério e ao meu filho Matheus
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente em toda caminhada de minha vida, me dando força, saúde e paz.

Agradeço ao meu marido Rogério, pelo incentivo e apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu filho Matheus, por sua existência e alegria, renovando e multiplicando a plenitude da família.

Agradeço aos meus pais, Elias e Helena, pela vida, educação e companheirismo. A eles minha total gratidão, e a esperança de seguir este exemplo para com meu filho. Aos meus avós, Stanislaw, Catarina e Atanásia por me ensinarem os valores da terra e da vida. Às minhas queridas irmãs, Carolina e Ludimila, pela amizade, incentivo, apoio e afeto.

A toda a minha família pelo incentivo e participação em todas as etapas da minha vida.

À Profa. Helaine Carrer, agradeço pela oportunidade e contínua orientação, exemplo, apoio e condições para meu desenvolvimento pessoal e profissional na Pesquisa Científica.

Agradeço a todos os integrantes do Centro de Biotecnologia Agrícola, do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ-USP. Aos professores Otto Jesu Crocomo, Murilo de Melo e Luiz Antonio Gallo, pela amizade e orientação em inúmeros momentos. Aos funcionários Maria Solizete G. Silva, Antonio F. C. do Amaral, Enio Tiago de Oliveira, agradeço pela amizade e pelo auxílio nas etapas deste trabalho.

Agradeço ao Tercilio Calsa Junior, pela experiência partilhada na pesquisa com sugestões importantes, pela amizade e exemplo.

À Valentina de Fátima de Martin, agradeço pela participação no desenvolvimento da pesquisa, sugestões, críticas e pela amizade.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia Agrícola, Depto. de Ciências Biológicas – ESALQ-USP, pelo convívio em equipe, pela amizade e companheirismos, pelas sugestões, críticas e opiniões, favorecendo o desenvolvimento deste trabalho. Aos amigos Simone, Valesca, Maria Clara, Rosana, Keini, Vivian, Raquel, Letícia, Flávia, Adriano, Henrique, Irving, Reimar, Danilo, Antonio Mathias, Carlos e Eduardo pelo convívio alegre.

Agradeço à FAPESP pelo incentivo e apoio financeiro disponibilizado para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, enfim, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E EXPRESSÕES.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Importância e Classificação Botânica da Cana-de-Açúcar.....	3
2.2 Centros de Origem de Espécies da Família <i>Poaceae</i>	4
2.3 Melhoramento Genético e Evolução.....	5
2.4 Características e Origem dos Plastídios.....	7
2.5 Regulação Gênica nos Cloroplastos.....	10
2.6 Análise Filogenética e Evolução dos Cloroplastos.....	12
2.7 Análise Comparativa de Plastomas da Família <i>Poaceae</i>	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Material Vegetal.....	21
3.2 Isolamento do DNA.....	22
3.2.1 DNA cloroplastidial.....	22
3.2.2 Extração de DNA total.....	23
3.3 Identificação das Regiões dos Plastomas.....	23
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das Sequências Alvo.....	24
3.5 Clonagem de Sequências Alvo.....	27

3.6 Sequenciamento.....	28
3.7 Análise das Seqüências.....	29
3.8 Análise Comparativa de Edição de mRNA por RT-PCR.....	32
3.8.1 Extração de RNA total.....	34
3.8.2 Síntese de cDNA.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Material Vegetal.....	36
4.2 Isolamento do DNA dos Cloroplastos.....	36
4.3 Extração de DNA Total.....	37
4.4 Clonagem de Seqüências Alvo.....	37
4.5 Sequenciamento dos Clones e Produtos de PCR.....	38
4.6 Análise Comparativa das Seqüências de Nucleotídeos.....	45
4.6.1 Comparação das posições das intersecções dos plastomas de espécies <i>Poaceae</i>	46
4.6.2 Análise das regiões divergentes dos plastomas de espécies e híbridos de cana-de-açúcar comparados com outras espécies da família <i>Poaceae</i>	49
4.6.3 Análise filogenética das espécies <i>Poaceae</i> estudadas.....	59
4.7 Análise Comparativa de Edição do mRNA de Sorgo.....	66
5 CONCLUSÕES.....	72
ANEXOS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Variação entre os plastomas de plantas terrestres na região intergênica <i>trnI-trnL</i> . Linhas tracejadas representam deleções no grupo <i>Poaceae</i> . * <i>S. spontaneum</i> apresenta 3.882 pb.....	42
2 Variação entre os plastomas de plantas terrestres na região intergênica <i>rbcL-petA</i> . Comparando tabaco, arroz, trigo, sorgo, milho e cana-de-açúcar, é observada uma tendência para perda do gene <i>accD</i> , onde o arroz ocupa um lugar intermediário. * <i>S. robustum</i> e <i>S. spontaneum</i> apresentam, respectivamente, 5.670 pb e 5.672 pb.....	44
3 Comparação das relativas posições das intersecções LSC/IR _A , IR _A /SSC, SSC/IR _B , IR _B /LSC e os genes <i>psbA</i> , <i>ndhH</i> , <i>ndhF</i> e <i>rpl22</i> , respectivamente, entre os plastomas da cana-de-açúcar, sorgo, milho, arroz e trigo.....	47
4 Destaque de parte do alinhamento da região que inclui o gene <i>ndhF</i> representados por A e B. Os pontos alinhados representam as mesmas bases nitrogenadas do híbrido SP80-3280. Os traços representam os <i>gaps</i> (deleções de bases nitrogenadas). As mutações são apresentadas pelas bases nitrogenadas em negrito que diferem do híbrido SP80-3280.....	50
5 Destaque de parte do alinhamento da região intergênica <i>trnI-trnL</i> representados por A e B. Os pontos alinhados representam as mesmas bases nitrogenadas do híbrido SP80-3280. Os traços representam os <i>gaps</i> (deleções de bases nitrogenadas). As mutações são apresentadas pelas bases nitrogenadas em negrito que diferem do híbrido SP80-3280.....	51

- 6 Destaque de parte do alinhamento da região intergênica *rbcL-petA* representados por A e B. Os pontos alinhados representam as mesmas bases nitrogenadas do híbrido SP80-3280. Os traços representam os *gaps* (deleções de bases nitrogenadas). As mutações são apresentadas pelas bases nitrogenadas em negrito que diferem do híbrido SP80-3280..... 52
- 7 Relação filogenética entre espécies e híbridos de cana-de-açúcar e outras espécies gramíneas como trigo, arroz, milho e sorgo. Esta é uma árvore de parcimônia considerando todas as regiões do ptDNA selecionadas. Os números são valores de *Bootstrap* com porcentagens acima de 50%..... 60
- 8 Relação filogenética entre espécies e híbridos de cana-de-açúcar e outras espécies gramíneas como trigo, arroz, milho e sorgo. Esta é uma árvore de parcimônia considerando a região do ptDNA que inclui somente o gene *ndhF*. Os números são valores de *Bootstrap* com porcentagens acima de 50%..... 62
- 9 Relação filogenética entre espécies e híbridos de cana-de-açúcar e outras espécies gramíneas como trigo, arroz, milho e sorgo. Esta é uma árvore de parcimônia considerando a região intergênica *trnI-trnL*. Os números são valores de *Bootstrap* com porcentagens acima de 50%..... 63
- 10 Relação filogenética entre espécies e híbridos de cana-de-açúcar e outras espécies gramíneas como trigo, arroz, milho e sorgo. Esta é uma árvore de parcimônia considerando a região intergênica *rbcL-petA*. Os números são valores de *Bootstrap* com porcentagens acima de 50%..... 64
- 11 RT-PCR para análise de edição de transcritos de sorgo. (A) Bandas correspondentes às regiões editadas dos genes *ycf3* (1), *ndhB* (2), *rpoC2* (3), *ndhD* (4), *rpl2* (5), *rpoB* (6), *rps14* (7), *ndhF* (8), *rpl20* (9) amplificadas a partir do cDNA obtido de RNA não tratado com DNase I. (B) Bandas correspondentes às regiões amplificadas do DNA total das regiões dos genes *ycf3* (1), *ndhB* (2), *ndhA* (3) e a partir do cDNA obtido de RNA tratado com DNase I das regiões editadas dos genes *ndhB* (4), *ndhA* (5), *petB* (6), *ndhD* (7), *rpl2* (8), *atpA* (9), *rps8* (10). L = 1 kb DNA ladder plus..... 68

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Espécies e híbridos de cana-de-açúcar estudadas.....	21
2 Plastomas de gramíneas estudadas.....	24
3 <i>Primers</i> utilizados para amplificação de regiões de interesse do ptDNA.....	25
4 Quantificação de amostras de DNA para reação de sequenciamento.....	29
5 <i>Primers</i> para análise de edição de mRNA no plastoma de sorgo.....	33
6 Comprimento das seqüências alvo analisadas em pares de base.....	38
7 Tamanho dos fragmentos amplificados a partir do DNA e cDNA total de sorgo.....	67
8 Sítios de edição do mRNA detectados no plastoma de sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>) e comparados aos sítios presentes em cana-de-açúcar (Calsa Junior, 2001) e milho (Maier et al., 1995).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E EXPRESSÕES

A	Adenina
A. C.	Antes de Cristo
C	Citosina
C ₃	Fotossíntese com fixação inicial de CO ₂ em composto de 3 carbonos
C ₄	Fotossíntese com fixação inicial de CO ₂ em composto de 4 carbonos
cDNA	DNA complementar ao mRNA
cpDNA	Abreviatura de DNA cloroplastidial em inglês
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
ddH ₂ O	Água destilada, deionizada (Milli-Q) e esterilizada
DEPC	Dietilpirocarbonato
DH5- α	Cepa de células competentes de <i>Escherichia coli</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse I	Desoxirribonuclease I
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>Forward</i>	<i>Primer Direto</i>
G	Guanina
<i>Gap</i>	Deleção de base nitrogenada
<i>Hotspot</i>	Ponto de divergência
<i>Indel</i>	Inserção e deleção de base nitrogenada
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
IR	Repetição invertida
Kb	Kilobases

LSC	Região grande de cópia única
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Nicotinamida-adenosina-di-fosfato
ORF	Seqüência de leitura aberta (<i>open reading frame</i>)
pb	Pares de bases
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PS I	Fotossistema I
PS II	Fotossistema II
ptDNA	DNA cloroplastidial
rDNA	Seqüência de DNA codificador de RNA ribossômico
<i>Reverse</i>	<i>Primer</i> reverso
RNase	Ribonuclease
rRNA	RNA ribossômico
Rubisco	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
SSC	Região pequena de cópia única
T	Timina
TAE	Tampão de eletroforese Tris – Acetato – EDTA
TBE	Tampão de eletroforese Tris – Ácido Bórico – EDTA
tRNA	RNA transportador
U	Uracila
V.cm ⁻¹	Volts.cm ⁻¹
xg	Múltiplos de força gravitacional terrestre (rcf)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosídeo
<i>ycf</i>	Genes putativos cloroplastidiais conservados (<i>hypothetical chloroplast frames</i>)

**ESTUDO EVOLUTIVO DE ESPÉCIES E HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
POR ANÁLISE COMPARATIVA COM OUTRAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA
POACEAE (ARROZ, MILHO, SORGO E TRIGO) UTILIZANDO REGIÕES DO
GENOMA CLOROPLASTIDIAL**

Autora: DANILA MONTEWKA MELOTTO-PASSARIN

Orientadora: Profa. Dra. HELAINE CARRER

RESUMO

Nos últimos anos, o sequenciamento de nucleotídeos do genoma cloroplastidial está sendo utilizado como uma eficiente ferramenta para estudar a evolução em plantas superiores. O completo sequenciamento do genoma cloroplastidial (plastoma) de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) revelou uma molécula circular fechada de 141.182 pb. Este plastoma contém um par de regiões invertidas repetidas (IR_A e IR_B), separadas por uma região de cópia única pequena (SSC) e uma região de cópia única grande (LSC). Os genes do cloroplasto têm sido muito utilizados para reconstruir a filogenia em espécies relacionadas. Para contribuir com a quantidade de informação disponível para a reconstrução filogenética, múltiplas regiões do cloroplasto têm sido analisadas, incluindo genes e espaçadores intergênicos. O DNA cloroplastidial (ptDNA) tem a característica de ser muito conservado entre as espécies de plantas, o que o torna apropriado para os estudos filogenéticos em vários níveis taxonômicos. Além disso, a herança uniparental apresenta reduzido impacto da recombinação intermolecular e auxilia na simplificação das teorias de evolução do ptDNA em muitos táxons vegetais.

O objetivo deste trabalho foi contribuir com os estudos de evolução do cloroplasto em várias espécies e híbridos de cana-de-açúcar pela identificação de regiões polimórficas e sinais filogenéticos ou “hotspots” que possam ser utilizados como marcadores filogenéticos. Para isso, outras espécies pertencentes à família *Poaceae*, principalmente sorgo, milho, arroz e trigo também foram utilizadas nas análises. As regiões selecionadas para este estudo foram: região intergênica entre *rbcL* e *petA*; região intergênica entre *trnI* e *trnL*; região *16S rDNA* e um segmento das quatro intersecções do ptDNA que unem as duas regiões invertidas repetidas com a LSC e SSC. Estas seqüências foram amplificadas por PCR, seqüenciadas e alinhadas utilizando os programas computacionais *ClustalW* e *Phred-Phrap-Consed*. As análises de parcimônia foram realizadas pelo programa *PAUP** versão 4.0 e as árvores filogenéticas foram desenhadas pelo programa *TreeView*. As comparações dos “hotspots” do ptDNA forneceram informações quanto a evolução do cloroplasto e sobre os mecanismos responsáveis pela divergência entre os plastomas destas espécies estudadas. Também foi observada maior identidade entre os plastomas de cana-de-açúcar, sorgo e milho, que são plantas C_4 , do que entre os plastomas de cana-de-açúcar e de gramíneas C_3 como arroz e trigo, incluindo a organização estrutural dos genes.

**EVOLUTIVE STUDY OF SUGARCANE SPECIES AND HYBRIDS BY
COMPARATIVE ANALYSIS WITH OTHERS SPECIES OF *POACEAE*
FAMILY (RICE, MAIZE, SORGHUM AND WHEAT) USING REGIONS OF
CLOROPLASTIDIAL GENOME**

Author: DANILA MONTEWKA MELOTTO-PASSARIN

Adviser: Profa. Dra. HELAINE CARRER

SUMMARY

In the past few years, nucleotide sequencing of chloroplast genome is being used as an efficient tool to study evolution in higher plants. Sequencing of the total chloroplast genome (plastome) from sugarcane (*Saccharum officinarum*) revealed a 141,182 bp circular double-stranded molecule. This plastome contains a pair of inverted repeat regions (IR_A and IR_B), separating a small single copy region (SSC) and a large single copy region (LSC). Chloroplast genes have been extensively used to reconstruct the phylogeny in related species. In order to contribute to the amount of information available for phylogenetic reconstruction, it has been analyzed multiple chloroplast regions, including genes and intergenic spacers. The chloroplast DNA (cpDNA) has the feature of being well conserved among the plant species, which makes it appropriate for phylogenetic studies at high taxonomic levels. Furthermore, uniparental inheritance presents low impact of intermolecular recombination and helps to simplify theories of ptDNA evolution in most plant taxa. The objective of this work was to contribute to chloroplast evolution studies in several sugarcane species and hybrids by identifying

polymorphic regions and phylogenetic signals or hotspots signals that can be useful as phylogenetic markers. For that, other species belonging to *Poaceae* family, mainly sorghum, maize, rice and wheat have also been comprised in the analyses. The regions selected to this study were: intergenic region between *rbcL* and *petA*; intergenic region between *trnI* and *trnL*; *16S rDNA* region and a segment of the four cpDNA intersections that link the two inverted repeat regions with the LSC and SSC. These sequences have been amplified by PCR, sequenced and aligned by using the computer programs *ClustalW* and *Phred-Phrap-Consed*. The parsimony analyses were performed by *PAUP** version 4.0 program and the phylogenetic trees were designed by *TreeView* program. The comparisons of cpDNA hotspots have provided useful information on chloroplast evolution and about the mechanisms responsible for divergence among plastomes of these studied species. Also, it was observed larger identity among sugarcane, sorghum and maize plastomes, which are C₄ plants, than between sugarcane and C₃ grasses plastomes like rice and wheat, including structural gene organization.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família *Poaceae*, sendo considerada uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, principalmente pelo complexo industrial que gira em torno do seu cultivo, gerando empregos e contribuindo para a alimentação humana e animal. Neste sentido, o melhoramento genético da cana-de-açúcar aparece como base fundamental para se obter novas variedades para a manutenção e incremento no agronegócio brasileiro.

As espécies de cana-de-açúcar são originárias do continente asiático, mais especificamente da Índia. No gênero *Saccharum* ocorrem seis espécies: *Saccharum officinarum* L. ($2n = 80$), *S. robustum* Brandes e Jeswit ($2n = 60-205$), *S. barberi* Jeswit ($2n = 81-124$), *S. sinense* Roxb ($2n = 111-120$), *S. spontaneum* L. ($2n = 40-128$) e *S. edule* Hassk ($2n = 60-80$) (Daniels & Roach, 1987). Muito pouco é conhecido sobre o nível de similaridade entre estas espécies e sobre a herança genética citoplasmática dos híbridos utilizados em plantios comerciais. As variedades comerciais de cana-de-açúcar são oriundas principalmente de cruzamentos interespecíficos de *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum* seguidos de retrocruzamentos usando *Saccharum officinarum* como espécie genitora recorrente, podendo possuir apenas 5 a 10% do genoma nuclear das espécies parentais doadoras (Lu et al., 1994). O resultado é um germoplasma com elevado nível de ploidia e de complexo comportamento meiótico, sendo talvez por isto, dentre os membros da família *Poaceae*, a espécie menos caracterizada do ponto de vista genético.

O conhecimento das relações filogenéticas das espécies e híbridos comerciais de cana-de-açúcar é fundamental para a organização, caracterização e conservação do

germoplasma e, principalmente, para o uso do recurso genético existente em cruzamentos viáveis nos programas de melhoramento genético.

A avaliação molecular é uma forma eficiente de se estudar a partição da variabilidade genética entre as espécies cultivadas e seus parentais selvagens, esclarecendo suas relações filogenéticas e promovendo estratégias racionais para o melhoramento, coleta de germoplasma, conservação e utilização de recursos genéticos.

Os genes cloroplastidiais têm sido muito utilizados para reconstruir a filogenia em espécies relacionadas. Estudos recentes sobre a evolução do genoma do cloroplasto têm revelado um alto grau de conservação em tamanho, estrutura, conteúdo gênico e ordem linear dos genes entre espécies aparentadas. Além disso, a herança uniparental reduz o impacto da recombinação intermolecular e contribui para simplificar as teorias de evolução do ptDNA na maioria dos táxons vegetais. Este modo conservativo de evolução do ptDNA sugere que qualquer mudança em estrutura, arranjo ou conteúdo do genoma pode ter implicações filogenéticas significativas. Para aumentar a quantidade de informações disponíveis para a reconstrução filogenética, múltiplas regiões do cloroplasto têm sido analisadas, incluindo genes e espaçadores intergênicos.

A disponibilidade de seqüências completas de nucleotídeos de genomas cloroplastidiais de várias espécies torna possível utilizá-las em estudos evolutivos dos cloroplastos em plantas. A comparação estrutural dos plastomas fornece também elementos relacionados aos processos regulatórios da expressão gênica, destacando-se, quanto aos cloroplastos, a ocorrência de edição do mRNA, um processo de modificação pós-transcricional já descrito nos cloroplastos de várias espécies de plantas.

Os objetivos deste trabalho foram o sequenciamento de regiões específicas do genoma cloroplastidial de diferentes espécies e híbridos de cana-de-açúcar e de um cultivar de sorgo cujas seqüências não estavam disponíveis nos bancos de genes, e a análise comparativa das mesmas seqüências disponíveis dos plastomas de milho, arroz e trigo, espécies pertencentes à família *Poaceae*, para identificar sinais filogenéticos e regiões polimórficas pela avaliação de similaridades e divergências ao nível de nucleotídeos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância e Classificação Botânica da Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar é produzida em 130 países, sendo cultivada principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil ela é cultivada em quase 5,5 milhões de hectares sendo destinada, principalmente, à produção de açúcar e de álcool, à fabricação de aguardente e à alimentação de bovinos. O Brasil é líder na produção e exportação de derivados de cana-de-açúcar, bem como na utilização desta planta como fonte de energia líquida renovável (Matsuoka et al., 1999), apresentando extrema importância para a economia do Estado de São Paulo e para o país. Considerando a atual crise energética brasileira, a cultura também é relatada como promissora na produção de energia elétrica a ser extraída do bagaço da cana (Oliveira & Vasconcelos, 2001).

De acordo com a entidade União da Agroindústria Canavieira de São Paulo (Única), na safra 2003/2004 o Brasil produziu 338,3 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com extensas áreas plantadas nas regiões Centro-Oeste, Sul (principalmente Paraná), Sudeste e Nordeste, sendo que a safra paulista atingiu 207,5 milhões de toneladas. O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, com cerca de 3,3 milhões de hectares plantados. Segundo a entidade Única, somente neste estado o setor gera cerca de 300 mil empregos no campo e outros 90 mil na indústria (ÚNICA, 2004).

A cana-de-açúcar é uma planta alógama que pertence à família *Poaceae*, tribo *Andropogoneae*, gênero *Saccharum*. A família *Poaceae* é considerada uma das mais importantes famílias de plantas cultivadas, ocupando um terço das áreas terrestres do planeta, e inclui as culturas de cereais importantes na alimentação humana (Clayton &

Renvoize, 1986). A tribo *Andropogoneae*, a qual pertence à família *Poaceae*, é uma das maiores, mais especializadas (Celarier, 1956), e a mais definida taxonomicamente entre as tribos de gramíneas (Hartley, 1958; Clayton & Renvoize, 1986). Esta tribo é dividida em três subtribos: *Saccharinae*/*Germainiinae*, a *Sorghinae*, e a *Ischaeminae*/*Dimeriinae*/*Coicinae* (Clayton & Renvoize, 1986). A subtribo *Saccharinae* é tipicamente alta e higrófila, o que é considerada uma condição ecologicamente primitiva (Hartley, 1958). Dentre as *Saccharinae*, o ‘complexo *Saccharum*’ inclui os genótipos agronomicamente importantes de *Saccharum* spp., que são produtos freqüentemente obtidos de longos programas de melhoramento por cruzamentos entre *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. robustum* (Grivet & Arruda, 2002).

Mukherjee (1957) introduziu o termo ‘complexo *Saccharum*’ para representar o agrupamento dos gêneros *Erianthus*, *Sclerostachya*, *Narenga*, e *Saccharum* devido a uma coincidência geográfica na fronteira da região Indo-Burma-China, pela capacidade de produzir descendentes F_1 férteis, e pela observação do florescimento sincronizado em alguns dos arranjos coincidentes.

No gênero *Saccharum* ocorrem seis espécies: *Saccharum officinarum* L. ($2n = 80$), *S. robustum* Brandes e Jeswit ($2n = 60-205$), *S. barberi* Jeswit ($2n = 81-124$), *S. sinense* Roxb ($2n = 111-120$), *S. spontaneum* L. ($2n = 40-128$) e *S. edule* Hassk ($2n = 60-80$) (Daniels & Roach, 1987). Os cultivares modernos são híbridos oriundos de cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* seguidos de retrocruzamentos usando *S. officinarum* como espécie parental recorrente. O resultado é um germoplasma com elevado nível de ploidia, de complexo comportamento meiótico e que pode possuir até 5 a 10% do genoma das espécies parentais doadoras (Lu et al., 1994). Uma compreensão da taxonomia e evolução do gênero *Saccharum* e seus parentais têm sido dificultados devido à ocorrência comum de poliploidia e pela reprodução vegetativa opcional.

2.2 Centros de Origem de Espécies da Família *Poaceae*

Estimativas baseadas em fósseis sugerem que a cana-de-açúcar e o sorgo divergiram de um ancestral comum a cinco milhões de anos atrás (Al-Janabi et al.,

1994), o arroz e o milho dividiram um ancestral comum aproximadamente a 45 – 55 milhões de anos atrás (Stebbins, 1981), as monocotiledôneas e dicotiledôneas divergiram entre 110 milhões (Dahlgren et al., 1985) e 200 milhões de anos atrás (Wolfe et al., 1989) e as plantas vasculares aparentemente divergiram entre 350 a 400 milhões de anos atrás (Wolfe et al., 1989). A divergência das espécies de cana-de-açúcar e sorgo ocorreu pelo acúmulo de mutações pouco consistentes (Kellogg & Watson, 1993; Mason-Gamer et al., 1998; Spangler et al., 1999). Devido às considerações acima, as reconstruções filogenéticas da tribo *Andropogoneae* freqüentemente resultam em clados com baixo suporte interno, havendo poucos caracteres informativos para se obter uma topologia confiável (Spangler et al., 1999).

Apesar das espécies gramíneas de importância econômica dividirem ancestrais comuns a milhões de anos atrás, elas apresentam centros de origem distintos, sendo que a cana-de-açúcar é originária do continente asiático, mais especificamente na Índia. O sorgo, por sua vez, se originou provavelmente na África, embora algumas evidências indiquem que possa ter havido duas regiões de dispersão independentes: África e Índia (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Milho e Sorgo, 2004). Há indicações de que a origem do milho tenha sido no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos (EMBRAPA Milho e Sorgo, 2004). Diversos historiadores e cientistas apontam o sudeste da Ásia como o local de origem do arroz, mais especificamente na Índia (EMBRAPA Arroz e Feijão, 2004). O centro de origem do trigo está localizado junto ao Oriente Médio e Ásia Menor (Irã, Iraque, Síria, Turquia e Israel) (EMBRAPA Trigo, 2004).

Sobral et al. (1994) demonstraram que os gêneros *Saccharum* e *Sorghum* possuem alta proximidade genética, apesar de o gênero *Sorghum* ter se dispersado da África, e o gênero *Saccharum* ter se estabelecido no sudeste asiático.

2.3 Melhoramento Genético e Evolução

O melhoramento genético da cana-de-açúcar aparece como base fundamental para se obter novas variedades para a manutenção e incremento no agronegócio

brasileiro, mas pouco é conhecido sobre o nível de similaridade entre estas espécies e sobre a herança genética citoplasmática dos híbridos utilizados em plantios comerciais. O conhecimento das relações filogenéticas das espécies selvagens e híbridos comerciais é fundamental para a organização, caracterização e conservação do germoplasma e, principalmente, para orientar os programas de melhoramento genético utilizando os recursos genéticos existentes em cruzamentos viáveis.

Exemplos de espécies selvagens utilizadas nos cruzamentos para obtenção dos híbridos comerciais são: *S. robustum* (variedade Molokai 5099), *S. spontaneum* (variedade Krakatau), *S. barberi* Saretha (variedade Chunnee), *S. officinarum* (variedade Badila). Alguns dos híbridos comerciais obtidos em programas de melhoramento que visam à alta produtividade e a produção de açúcar são SP80-3280 (programa de melhoramento da Copersucar - Brasil), H72-1522 (programa de melhoramento do Havai - EUA) e CP72-1210 (programa de melhoramento da Flórida - EUA). O híbrido POJ 2878 apresenta origem norte-americana e está presente na maioria das genealogias dos cruzamentos que deram origem aos híbridos comerciais em vários países, inclusive no Brasil.

Na espécie *S. officinarum* são encontradas as principais variedades comerciais utilizadas na produção de açúcar antes da existência dos programas de melhoramento. Geralmente, as variedades (híbridos clonais) desta espécie são denominadas “canas nobres” e apresentam alto teor de sacarose, baixo teor de fibra, colmos longos e grossos, boa despalha natural e alta produção nas condições de cultivo favorável (Pires, 1993).

Saccharum spontaneum é uma espécie altamente variável, pois sua distribuição geográfica é a mais ampla de todos os membros do gênero (Roach & Daniels, 1987), seu número de cromossomos varia de $2n = 40$ a $2n = 128$ (Panje & Babu, 1960), as isoenzimas e rDNA nuclear (seqüência de DNA codificador de RNA ribossômico) são as mais variáveis do gênero (Glaszmann et al., 1989, 1990), e tem uma ampla variação morfológica. A espécie *S. spontaneum* tem sido considerada primária dentro do gênero, e desta espécie, outras espécies como *S. robustum* e, ultimamente, *S. officinarum* foram derivadas, potencialmente pela introgressão com outros membros do complexo, durante a migração para o sul da fronteira Indo-Burma-China que foi postulada ser o centro de

radiação e diversidade de *Saccharum* (Brandes et al., 1939; Roach & Daniels, 1987). As espécies *S. barberi* e *S. sinense* foram derivadas de cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Daniels & Roach, 1987; Berding & Roach, 1987).

Sobral et al. (1994) realizaram análises filogenéticas das mutações nos sítios de restrição enzimáticos do genoma cloroplastidial na subtribo *Saccharinae* da tribo *Andropogoneae*. A inferência filogenética sob várias pressuposições mostrou que as linhagens maternas de *Narenga*, *Miscanthus*, *Sclerostachya*, e *Saccharum* formaram um grupo monofilético, expondo poucas variações. O gênero *Saccharum* foi separado em dois clados por um único sítio de mutação: um contendo *S. spontaneum*, e o outro contendo todas as outras espécies de *Saccharum* e oito híbridos comerciais de várias regiões do mundo.

De acordo com Al-Janabi et al. (1994), dentro do complexo poliplóide *Saccharum* observa-se reduzido nível de variação nos genomas de cloroplasto e de mitocôndria. Neste caso, verificou-se a ausência de variação entre as variedades comerciais de cana-de-açúcar analisadas (híbridos de *Saccharum*), sugerindo a existência de uma monocultura citoplasmática mundial. Por outro lado, análises filogenéticas baseadas nos genomas nucleares e cloroplastidiais (plastomas) têm mostrado que *S. spontaneum* é a mais variável das espécies *Saccharum* e os genótipos de *S. robustum* e *S. officinarum* são muito relacionados. Devido a grande variabilidade de *S. spontaneum*, não se pode inferir que haja apenas um tipo de citoplasma (Burnquist, 1991).

2.4 Características e Origem dos Plastídios

As células vegetais contêm diversas organelas, entre elas os plastídios que estão presentes desde algas até angiospermas. Os plastídios se multiplicam por divisão e apresentam herança materna na maioria das espécies cultivadas (Leech et al., 1981; Scott & Wilkinson, 1999). Eles contêm seu próprio sistema genético. A descoberta de um único DNA nos cloroplastos levou vários pesquisadores a estudarem a estrutura

genômica e funções destas organelas (Palmer & Stein, 1986; Kato et al., 2000; Martin et al., 2002; Leister, 2003).

As moléculas do DNA cloroplastidial (ptDNA) estavam entre as primeiras seqüenciadas devido ao seu tamanho pequeno e estrutura simples comparado aos genomas nucleares (Odintsova & Yurina, 2003). Até maio de 2004, a estrutura primária dos DNAs plastidiais de 36 espécies de plantas superiores e algas foram determinadas (presentes no banco de dados do NCBI – *National Center for Biotechnology Information*, 2004). Isto promoveu evidências quanto à natureza conservada do DNA plastidial, até entre táxons pouco aparentados. De fato, a seqüência completa do genoma da cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko et al., 1996), representando o possível plastoma ancestral, promoveu evidências sobre os eventos evolucionários que levam nos dias atuais aos DNAs plastidiais, incluindo a transferência gênica para o núcleo e/ou mitocôndria e perda de gene.

De acordo com a origem endossimbionte, os plastídios descendem de determinadas cianobactérias fotossintetizantes, as quais foram eventualmente integradas ao interior de células eucarióticas primitivas, que provavelmente já haviam adquirido de maneira semelhante outras bactérias aeróbicas (ancestrais das mitocôndrias) (Baginsky & Gruissem, 2004). O resultado deste processo forneceu vantagens adaptativas ao eucarioto primitivo fotossintetizante, iniciando o processo evolutivo no qual se desenvolveram interações entre os compartimentos intracelulares cada vez mais específicas, capazes de permitir o estabelecimento e a diversidade dos organismos vegetais. A ordem cronológica e o número de eventos endossimbiontes cientificamente propostos ainda são questionados (Palmer, 1992). De acordo com Odintsova & Yurina (2003), as análises filogenéticas de genes homólogos e a comparação da organização do grupo gênico em plastídios de eucariotos fotossintéticos e cianobactéria indicam que os plastídios apresentam uma origem monofilética, sendo derivados de um único ancestral cianobactéria. A observação de que os genomas plastidiais de diferentes plantas e algas contêm genes similares complementares também apóia a origem monofilética dos plastídios (Odintsova & Yurina, 2003).

O DNA cloroplastidial existe como uma molécula circular fechada de aproximadamente 150 (± 30) kb na maioria das plantas (Palmer & Stein, 1986). Ele geralmente apresenta um par de regiões repetidas invertidas (seqüências convencionalmente denominadas IR_A e IR_B), as quais são separadas por uma região de cópia única pequena (SSC) e uma região de cópia única grande (LSC). Alguns genes podem ser rearranjados nas suas posições relativas no plastoma, de acordo com a espécie (Kato et al., 2000).

A análise da estrutura e organização do genoma cloroplastidial de cana-de-açúcar (*S. officinarum* L.) foi realizado após o seu sequenciamento (Calsa Junior, 2001), fornecendo elementos para a análise de aspectos evolutivos e aplicações biotecnológicas (como a transformação do DNA cloroplastidial), que podem também ser útil para futuros estudos de regulação da expressão gênica. Pelas análises comparativas entre o plastoma de cana-de-açúcar (híbrido SP80-3280) e os de outras espécies, Calsa Junior (2001) observou que todos os grupos funcionais dos genes cloroplastidiais de milho foram localizados no plastoma de cana-de-açúcar, como também *ycf's* (genes putativos cloroplastidiais conservados – *hypotetical chloroplast frames*) deste plastoma e de outras espécies. Além disso, o pesquisador verificou maior identidade entre os plastomas de cana-de-açúcar e milho do que entre cana-de-açúcar e arroz com base na organização estrutural e na regulação da expressão gênica (edição de mRNA).

Os cloroplastos são organelas semi-autônomas, que dependem de uma grande quantidade de proteínas codificadas pelo núcleo que são importadas para dentro do plastídio depois de traduzidas no citossol. Os plastídios são essenciais para as funções celulares e abrigam uma maquinaria biossintética complexa para fixação de nitrogênio, biossíntese de aminoácidos, metabolismo sulfúrico, biossíntese de isoprenóides, e expressão gênica (Staehelin & Newcomb, 2000). Martin et al. (2002) compararam 24.990 proteínas codificadas no genoma de *Arabidopsis thaliana* com três genomas de cianobactérias, o genoma de uma levedura, e 16 genomas de procariotos. Foram identificadas 9.368 proteínas conservadas para uma comparação de seqüência primária. Deste grupo de proteínas, considera-se que 1.700 proteínas são codificadas pelos genes que foram transferidos do plastídio para o núcleo. As proteínas das cianobactérias não

retornaram de suas origens, mas foram distribuídas para diferentes localizações subcelulares no decorrer da evolução (Martin et al., 2002; Leister, 2003).

Durante a evolução, alguns genes foram transferidos dos cloroplastos para os núcleos. Os produtos destes genes são re-importados pelos cloroplastos com o auxílio dos peptídeos de trânsito e um mecanismo específico de importação de proteínas. Eventos similares ocorrem nas mitocôndrias, que também têm origem endossimbiótica. Os plastídios contêm mais proteínas do que o *ptDNA* codifica, sendo que grande número de proteínas é importado. Pelo fato dos processos de regulação sob controle do núcleo serem mais complexos e inter-relacionados do que aqueles sob o controle das organelas, e devido às organelas naturalmente tenderem a estar sob controle dos genes reguladores nucleares, os processos regulatórios da organela estão provavelmente entre os primeiros a serem transferidos com sucesso para o núcleo (Herrmann, 1997).

2.5 Regulação Gênica nos Cloroplastos

Em plantas superiores, a estrutura genômica e a composição dos genes são altamente conservadas. Os plastomas codificam proteínas envolvidas na transcrição e tradução, assim como proteínas do aparato fotossintético e metabolismo fotossintético (Odintsova & Yurina, 2003).

Os cloroplastos contêm genes para todas as espécies de *rRNA*, a maioria dos genes *tRNA* plastidiais, genes para as subunidades da RNA-polimerase, muitas proteínas ribossomais e fatores traducionais. Em adição, eles codificam os componentes do aparato fotossintético incluindo a subunidade maior da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), os componentes dos fotossistemas I e II (PS I e PS II), complexo citocromo *b₆f*, e ATP sintase. Uma das principais características dos plastomas é a presença de genes *ndh* que codificam para as subunidades do complexo NADH desidrogenase da cadeia respiratória. Os genomas cloroplastidiais contêm um número de ORFs das quais algumas são conservadas (*ycfs*) enquanto outras são espécie específicas. Assim originalmente 82 genes foram identificados no plastoma de tabaco

(Shinozaki et al., 1986) e houve identificação de mais 24 genes (um gene que codifica para um RNA de baixo peso molecular e 23 genes que codificam proteínas) (Wakasugi et al., 1998), até este momento.

A expressão na forma de *operon* resulta em grandes transcritos primários policistrônicos processados para mRNA oligo e monocistrônico e sujeito a *splicing* e edição. A edição freqüentemente restabelece os resíduos de aminoácidos conservados nas proteínas correspondentes e assim representam uma função importante, eliminando os erros nas seqüências genômicas ao nível de mRNA. Segundo Odintsova & Yurina (2003), a edição foi relatada para transcritos em todas as plantas superiores analisadas até o momento, mas não para algas e cianobactéria. Nos genomas mitocondriais, os eventos de edição ocorrem com mais freqüência do que nos cloroplastos (Odintsova & Yurina, 2003). Pelo fato da edição modificar a informação armazenada no ptDNA, não é sempre possível prever a estrutura das proteínas codificadas pelo ptDNA para as seqüências gênicas. Além disso, a edição pode levar a formação de novas ORFs (Wakasugi et al., 2001; Odintsova & Yurina, 2000).

A modificação pós-transcricional das moléculas de RNA nas organelas representa um nível principal de controle genético regulatório em células eucarióticas (Brennicke et al., 1999; Monde et al., 2000; Bock, 2000; Rochaix, 2001).

Até o momento foram identificados 27 diferentes sítios de edição em milho que afetam a expressão de 15 diferentes genes (*atpA*, *ndhA*, *ndhB*, *ndhD*, *ndhF*, *ndhG*, *rpoB*, *rpoC2*, *rps8*, *rps14*, *rpl20*, *rpl2*, *petB*, *matK* e *ycf3*), observando-se maior transição na segunda posição do códon. Todos os eventos de edição são transições de C por U e, contrário à edição dos transcritos mitocondriais de plantas onde a transição geralmente é de U por C, o que não é detectado para os transcritos de cloroplastos (Odintsova & Yurina, 2003). As transições mais freqüentemente observadas (UCA para UUA e CCA para CUA) convertem os códons serina e prolina para o códon leucina. A perda do códon de iniciação do gene de milho *rpl2* foi observada por Hoch et al. (1991), embora os eventos de edição geralmente ocorram nos códons internos dos mRNAs do cloroplasto, que são conservados ao nível de DNA em outras espécies (Maier et al., 1992). Por esta razão a edição pode também ser considerada como processo genético de

reparo ao nível transcricional. Raramente a edição cria o códon de iniciação e terminação, e também ocorre nas regiões não traduzidas (5'-UTR) (Corneille et al., 2000). De acordo com Corneille et al. (2000), a edição do mRNA pode ser importante para alguns, mas não todos os sítios existentes, mesmo quando ocorre em genes essenciais. Um exemplo é a edição parcial do gene *rpoB*, cujos sítios estão localizados na região correspondente a um domínio não-essencial da subunidade β da RNA-polimerase plastidial.

O número de sítios de edição identificados e previstos até o momento nos transcritos dos genes cloroplastidiais de cana-de-açúcar, arroz, milho e trigo são, respectivamente, 23 presentes em 13 transcritos (Calsa Junior, 2001), 21 presentes em 11 transcritos, 27 em 14 transcritos e 28 em 21 transcritos (Odintsova & Yurina, 2003).

2.6 Análise Filogenética e Evolução dos Cloroplastos

As análises filogenéticas de seqüências de DNA e proteínas se tornaram uma ferramenta importante para estudar a história evolutiva dos organismos desde bactérias até humanos. Desde que a taxa de evolução da seqüência varie extensivamente com o segmento do gene ou do DNA (Nei, 1987; Wilson et al., 1977), pode-se estudar a relação evolutiva em todos os níveis de classificação dos organismos (reinos, filos, classes, famílias, gêneros, espécies, e populações intraespecíficas). Análises filogenéticas são importantes também para esclarecer o modelo evolucionário das famílias de múltiplos genes que codificam proteínas nos genomas cloroplastidiais (Martin et al. 1998, 2002; Turmel et al., 1999, 2002; Adachi et al. 2000; Lemieux et al., 2000; De Las Rivas et al., 2002) assim como para compreender a evolução adaptativa ao nível molecular (Chandrasekharan et al., 1996; Jermann et al., 1995) e estudar a origem das endossimbioses primária e secundária (Delwiche, 1999; McFadden, 2001a). Esta técnica também fornece mais indícios sobre o mecanismo de manutenção dos alelos polimórficos nas populações (Takahata, 1993).

Segundo Mاتيoli (2001), a reconstrução filogenética consiste em estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de organismos (táxons). Uma

árvore filogenética representa a história evolutiva dos organismos presentes nela. Nos métodos da máxima parcimônia, um dado grupo de seqüências de nucleotídeos (ou aminoácidos) é considerado, e as seqüências dos ancestrais para uma topologia hipotética são inferidas sob a suposição que as mudanças ocorrem em todas as direções entre os quatro nucleotídeos diferentes (ou 20 aminoácidos). O menor número de substituição de nucleotídeos que explica todo o processo evolutivo para uma dada topologia é então computada. Isto é realizado para todas as outras topologias, e a topologia que requerer o menor número de substituições é escolhida como a melhor árvore (Eck & Dayhoff, 1966; Fitch, 1971).

Em plantas, os genomas do cloroplasto e da mitocôndria apresentam modelos diferentes de diferenciação genética comparado com os alelos nucleares devido aos seus meios de transmissão geralmente uniparental (Birky, 1988). Assim, para a compreensão da diferenciação populacional da planta e sua evolução, os três genomas inter-relacionados devem ser considerados. O plastoma é altamente conservado e apresenta menor taxa de mutação do que os genomas nucleares (Wolfe et al., 1987; Clegg et al., 1994).

Segundo Odintsova & Yurina (2003), as regiões repetidas invertidas (IRs) dos plastomas pertencem à região mais conservada da molécula contendo todos os rRNAs e os dois genes tRNA (tRNA^{Ile} (GAU) e tRNA^{Ala} (UGC)). As seqüências das IRs divergem duas a três vezes mais lentamente do que as seqüências únicas (SSC e LSC). As repetições constituem a estabilidade dos genomas cloroplastidiais, prevenindo a recombinação. A região de cópia única grande é a mais variável. O sequenciamento dos genomas cloroplastidiais de plantas superiores revelou as inversões, translocações, inserções/deleções de bases nitrogenadas até em espécies relacionadas, e permitiu identificar os “hotspots” de mutações. Assim, a comparação da estrutura do ptDNA em *Oenothera elata* (Hupfer et al., 2000) e algumas dicotiledôneas [tabaco (Shinozaki et al., 1986), *A. thaliana* (Sato et al., 1999), e espinafre (Schmitz-Linneweber et al., 2001)] demonstraram que elas diferem em uma grande inversão de 54 kb no LSC entre os genes *accD* e *rps16* presentes em *Oenothera*. O plastoma de espinafre é 5.214 pb menor que o ptDNA de tabaco. Isto resulta das regiões intergênicas que são mais curtas em

comprimento nos segmentos das IRs e em todo o genoma. Na LSC de ptDNA de *Lotus japonicus*, uma inversão de 51 kb entre os genes *rbcL* e *rps16* foi identificada. Uma inversão similar foi detectada no ptDNA de soja, sugerindo que é típica de legumes (Kato et al., 2000).

De acordo com Ingvarsson et al. (2003), inserções, deleções e inverções no genoma cloroplastidial de plantas superiores mostraram ser extremamente úteis para resolver as relações filogenéticas entre táxons proximamente relacionados e entre linhagens mais basais. Íntrons e espaçadores intergênicos do plastoma são muito usados nos estudos filogenéticos (Kelchner, 2000) e de genética de população (McCauley, 1995) de uma única espécie, sendo interessante saber se os *indels* (inserção e deleção de nucleotídeos) podem providenciar dados para aumentar a robustez dos estudos intraespecíficos.

Muitos processos moleculares são conhecidos por criarem *indels*, entre eles, o deslizamento da polimerase durante a replicação, conhecido por desapareamento de fitas por deslizamento (Levinson & Gutman, 1987), que adiciona ou remove pequenas seqüências repetidas, freqüentemente um ou poucos pares de base no comprimento. *Indels* grandes são freqüentemente associados com a formação de estruturas *hairpins* (Kelchner & Wendel, 1996) ou *stem-loop* na estrutura secundária do DNA (Kelchner, 2000), e estes *indels* podem ou não apresentar similaridade na seqüência com a região que flanqueia o sítio *indel*.

Seqüências de DNA do genoma cloroplastidial são amplamente utilizadas no campo da sistemática molecular vegetal. Comumente usados como marcadores moleculares cloroplastidiais para as análises filogenéticas em plantas, pode-se citar o gene *matK* (Johnson & Soltis, 1994; Steele & Vilgalys, 1994), *ndhF* (Olmstead & Sweere, 1994), a região não-codificadora *trnL-F* (Taberlet et al., 1991), o espaçador *atpB-rbcL* (Setoguchi et al., 1997), o íntron *rps16* (Downie & Katz-Downie, 1999), região *trnC-trnD* (Lee & Wen, 2004). O DNA nuclear tem sido relativamente pouco explorado nos estudos de filogenia vegetal, com a exceção da região nuclear ribossomal do DNA, que foi seqüenciada em grande escala. Nesta região, especialmente os espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) são aplicados extensivamente para a

reconstrução da filogenia em níveis taxonômicos inferiores. Entretanto, as seqüências ITS às vezes não são convenientes para os estudos filogenéticos, devido ao alto grau de divergência da seqüência (Wilson, 2003), às extensivas variações no comprimento entre cópias (Liston et al., 1996), aos problemas de paralogia (Baker et al., 2000), ou falta de robustez para resolução da filogenia (Whitcher & Wen, 2001).

Segundo Lee & Wen (2004), os marcadores cloroplastidiais para estudos em níveis taxonômicos inferiores são especialmente necessários, pois os dados da maioria dos plastomas herdados maternalmente podem fornecer importantes indícios sobre a hibridização e poliploidia, dois processos evolutivos comuns em plantas.

Dos estudos comparativos de todas as seqüências do ptDNA de arroz (família *Poaceae*) (Hiratsuka et al., 1989) com as de tabaco (família *Solanaceae*) (Shinozaki et al., 1986), seis tipos de alterações estruturais do plastoma foram identificados nos ptDNAs de gramíneas. Estas alterações são as seguintes: (1) três inversões (Hiratsuka et al., 1989) na região de cópia única grande (LSC), (2) perda de um íntron no gene *rpoC1*, (3) inserção de uma seqüência adicional no gene *rpoC2* (Igloi et al., 1990; Shimada et al., 1990), (4) deleção das ORFs na região invertida repetida (Downie & Palmer, 1992), (5) rearranjo do gene *accD* (Ogihara et al., 1992), e (6) uma translocação não-recíproca do gene *rpl23* para uma região montante (*downstream*) de *rbcL* (Bowman et al., 1988; Ogihara et al., 1988). Com a limitada exceção das mudanças estruturais, a ordem dos genes no ptDNA de tabaco é considerada como um padrão entre as angiospermas (Palmer et al., 1988).

Embora a estrutura genômica básica dos ptDNAs seja conservada na maioria das plantas superiores, algumas alterações estruturais foram encontradas nas comparações estruturais dos ptDNAs em plantas relacionadas. Drescher et al. (2000) verificaram diferenças em seqüências de polipeptídios homólogos codificados pelos cromossomos plastidiais de *Atropa belladonna* e tabaco, ocorrendo substituições de aminoácidos e, menos freqüentemente, inserções e deleções. Os oito códons não presentes no gene *accD* de *A. belladonna*, que codifica a subunidade β da acetil-CoA-carboxilase procariótica, ocorre numa região de baixa conservação entre as espécies vegetais. Inserções e deleções de nucleotídeos adicionais também foram encontradas nos genes *ycf1* e *ycf2* de

A. belladonna. Para *ycf2*, as duas inserções encontradas em tabaco, uma delas com três códonos em tamanho, a outra com oito códonos, formam repetições diretas com os elementos da sequência adjacente e estão também situados fora dos domínios altamente conservados (Drescher et al., 2000).

A natureza conservada do plastoma em plantas superiores (Wolfe et al., 1987) tem algumas implicações práticas para pesquisas genéticas. O alto grau de conservação da sequência tem facilitado o uso de sondas de hibridização heterólogas e *primers* na reação em cadeia da polimerase (PCR) em espécies não relacionadas, assim driblando a necessidade em clonar o DNA cloroplastidial de cada e todas as espécies sob estudo (Olmstead & Palmer, 1994). Pares de *primers* de PCR universais foram construídos com base em sequências codificadoras conservadas de genes do ptDNA e usados para amplificar o DNA localizado entre os sítios de ancoragem dos *primers* (Taberlet et al., 1991; Demesure et al., 1995; Dumolin-Lapegue et al., 1997). O sequenciamento direto ou análise de restrição dos produtos de PCR freqüentemente produziram polimorfismos informativos, que foram explorados para estudar a relação taxonômica e filogenética de vários níveis sistemáticos (Cipriani et al., 1995; Wolfe et al., 1997).

Chu et al. (2003) verificaram que os cloroplastos estão separados em dois grandes clados. Um deles corresponde às plantas verdes (clorófitas; Palmer & Delwiche, 1998), que inclui todos os táxons com um cloroplasto, ambos com origem endossimbionte primária e secundária. O outro clado compreende as glaucófitas como *Cyanophora* e membros das rodófitas, que se referem a algas vermelhas e seus derivados simbióticos secundários (Palmer & Delwiche 1998). As angiospermas estão separadas em dois clados correspondendo às monocotiledôneas e dicotiledôneas, os dois grandes clados obtidos com a filogenia de angiospermas (Crane et al., 1995), embora deveria ser observado que todas as monocotiledôneas incluídas na árvore são membros de uma única família (*Poaceae*). Uma simples análise de correlação dos genomas de cloroplasto completos proporcionou uma árvore que está de acordo com o conhecimento da origem dos cloroplastos e a relação filogenética de diferentes grupos de eucariotos fotossintetizantes como elucidado previamente pelas análises tradicionais dos genomas

cloroplastidiais e outras aproximações moleculares e ultra-estruturais (Martin et al., 2002; De Las Rivas et al., 2002; Palmer & Delwiche, 1998; McFadden, 2001a, b).

2.7 Análise Comparativa de Plastomas da Família *Poaceae*

Com o sequenciamento das bibliotecas plastômicas de *Saccharum officinarum* e a sua análise através do programa BLAST/NCBI (Altschul et al., 1990), demonstraram-se elevada similaridade (acima de 97%) com várias regiões dos plastomas de milho, arroz, cevada e trigo (Calsa Junior, 2001). Foi observado alto grau similaridade dos clones obtidos tanto com regiões intergênicas quanto codificadoras de *operons* cloroplastidiais relacionados com subunidades dos fotossistemas, ATPase, RNA-polimerase plastidial, NADH-desidrogenase plastidial, ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase, proteínas ribossômicas, RNA ribossômico plastidial, RNA transportador plastidial, citocromo *b₆f* e as ORF's (genes putativos) denominadas ORF 31 e ORF 48 (Calsa Junior, 2001).

Os membros da família *Poaceae* foram especialmente estudados quanto à divergência de seus plastomas e mutações no comprimento, sendo identificadas através da comparação de seqüências de nucleotídeos (Ogihara et al., 1988; Maier et al, 1995).

Segundo Calsa Junior (2001), a similaridade estrutural entre os plastomas de milho e cana-de-açúcar apresentam-se significativamente elevada, indicando que tanto regiões codificadoras como intergênicas são muito similares nestas duas espécies. Por outro lado, o plastoma de arroz se apresenta menos similar à cana-de-açúcar, sendo observada maior similaridade apenas nas regiões codificadoras.

Apesar do plastoma de milho apresentar conteúdo gênico e posição relativa dos genes idênticos aos do arroz, Maier et al. (1995) verificaram a presença de regiões localizadas de divergência nas regiões intergênicas. A região entre os genes *trnI* e *trnL*, pode refletir um evento de transferência gênica de *ycf2* para o núcleo, e a degradação do respectivo gene cloroplastidial resultando em fragmentos do mesmo; na região intergênica entre *rbcL* e *petA* a divergência parece ocorrer devido à perda completa do gene plastidial *accD* e à sua substituição funcional por um homólogo nuclear (Maier et

al., 1995). As regiões referentes aos genes cloroplastidiais *ycf2* e *accD*, mostraram-se praticamente idênticas entre cana-de-açúcar e milho (Calsa Junior, 2001).

De acordo com Calsa Junior (2001), a região entre *trnI* e *trnL* do ptDNA de cana-de-açúcar apresenta uma identidade superior a 98% com a mesma região do plastoma de milho, indicando maior similaridade quanto a organização entre os plastomas de cana-de-açúcar e milho, assim como a divergência em relação ao plastoma de arroz.

As intersecções entre as duas regiões de repetição invertida (IR_A e IR_B) e as duas regiões de cópia única (LSC e SSC) freqüentemente diferem entre os plastomas de várias espécies, sendo consideradas regiões polimórficas. Expansões e reduções do tamanho do plastoma são geralmente causadas por expansão ou redução das regiões de repetição invertida (Palmer, 1991). Existem estudos que mostram que todas as posições de intersecções podem variar inclusive entre os plastomas de espécies proximamente relacionadas tais como milho e arroz (Maier et al., 1995). Em milho o códon de iniciação do gene *ndhH* é desfeito pela borda IR_A/SSC e SSC/IR_B está localizada dentro da região codificadora do gene *ndhF*. Em arroz a borda IR_A/SSC se desloca para dentro da região central do gene *ndhH*, ao passo que todo o gene *ndhF* está dentro da região pequena de cópia única (SSC) (Maier et al., 1990).

Para reconstruir a filogenia da família *Poaceae*, subfamília *Pooideae*, Catalan et al. (1997) se basearam em seqüências do gene *ndhF*. Este gene é amplamente usado em estudos evolutivos de angiospermas, com a maior taxa de variabilidade exibida na segunda metade do gene (Kim & Jansen, 1995; Catalan et al., 1997). Esta constatação colaborou para a família *Poaceae* pelo estudo de Clark et al. (1995), demonstrando que 60% das substituições de nucleotídeos e todos os *gaps* (deleções) no alinhamento estavam posicionados na extremidade 3' do gene, também relatado por Olmstead & Sweere (1994) e Olmstead & Reeves (1995) em *Solanaceae* e *Scrophulariaceae*. Além disso, este gene (*ndhF*) apresenta duas vezes mais sítios variáveis e tamanho 50% maior do que o gene *rbcL*, que também é usado em análises filogenéticas, fornecendo assim mais caracteres informativos para estabelecer relações filogenéticas seguras (Olmstead & Sweere, 1994; Kim & Jansen, 1995).

Dos cereais domesticados, o milho, o arroz e o trigo são os mais importantes para a população mundial. Taxonomicamente, tais espécies representam diferentes subfamílias da família *Poaceae*: *Panicoideae* (milho), *Ehrhartoideae* (arroz), e *Pooideae* (trigo). Tais espécies de cereais são modelos importantes para estudos evolutivos de gramíneas devido aos seus vários aspectos biológicos (Kellogg, 1998).

Comparando os plastomas de milho, arroz e trigo para obter implicações da diversidade gênica do cloroplasto e analisar filogeneticamente estes cereais, Matsuoka et al. (2002) verificaram que oito genes tRNAs, foram invariáveis para tais espécies. Além disso, os genes rRNAs se apresentam altamente conservados. Para inferir uma filogenia baseada em uma ampla comparação do genoma, tais pesquisadores focaram seus estudos nas substituições de nucleotídeos de 106 genes cloroplastidiais. Nas análises filogenéticas, sugere-se que o arroz e o trigo apresentam apenas um ancestral comum que não está envolvido com a linhagem que conduziu ao milho. Recentemente, Ogihara et al. (2002) sugeriram que o arroz e o trigo estão mais proximamente relacionados um ao outro do que com relação ao milho, baseando-se nas similaridades estruturais dos plastomas.

Muitos trabalhos que estudam a variação intraespecífica no ptDNA objetivam delinear a quantidade, localização geográfica e natureza genética da variação, freqüentemente por comparação de cultivares e parentais selvagens (Kochert et al., 1991). Análises de variação intraespecífica do ptDNA sugerem que o polimorfismo é comum, mas que o nível de variação depende da espécie analisada (Hong et al., 1993).

A diversidade do DNA cloroplastidial (ptDNA) foi verificada dentro e entre populações de cevada selvagem, *Hordeum vulgare* L. spp. *spontaneum* Koch de Israel e Iran. Três sítios de restrição polimórficos que definem três linhagens distintas de ptDNA foram detectadas (Neale et al., 1986). O ptDNA de *Hordeum* parece ter herança estritamente maternal, assim o polimorfismo do ptDNA reflete as linhagens maternas e a estrutura genética das populações de cevada reflete o fluxo gênico devido a dispersão da semente (Birky et al., 1983). A presença de variação no ptDNA dentro de espécies conduz a um ponto importante sobre as reconstruções filogenéticas da planta baseando-se na variação dos fragmentos de restrição do ptDNA.

Renno et al. (2001) estudaram a variação haplotípica do DNA cloroplastidial em seis espécies da seção *Brevivalvula* (*Poaceae*) de gramíneas poliplóides do complexo *Pennisetum* utilizando análises do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) em 54 plantas correspondendo a 14 espécies elementares, cada uma caracterizada com base na morfologia e nível de ploidia. A variação no ptDNA foi geograficamente estruturada, sugerindo baixa dispersão entre locais, uma vez que a diversidade no haplotipo substancial observada nos locais pode indicar que a reprodução agâmica é responsável pela manutenção de distintos clones geneticamente isolados.

A evolução de gramíneas tem sido estudada principalmente por análise do grau de diversidade observado em estudos moleculares, morfológicos e citológicos (Kellogg, 1998). Embora as análises do ptDNA tenham contribuído significativamente para o conhecimento da evolução das gramíneas, a maioria das conclusões se baseiam na variação na sequência de nucleotídeos em um único gene ou íntron tais como *rbcL* (Doebley et al., 1990; Soltis et al., 1999; Soltis & Soltis, 2000), *ndhF* (Clark et al., 1995), *rpoC2* (Cummings et al., 1994), *rps4* (Nadot et al., 1994), *matK* (Hilu & Alice, 1999), íntron do gene *rpl16* (Zhang, 2000). Em contraste aos amplos estudos realizados com enfoque baseado em um único gene, apenas poucos estudos enfocaram a evolução das gramíneas ou evolução do gene cloroplastidial de gramíneas se baseando em múltiplas sequências de genes cloroplastidiais (Wolfe et al., 1987; Wolfe et al., 1989; Gaut & Clegg, 1993). As alterações estruturais no ptDNA dos ancestrais dos cereais ocorreram simultaneamente (Katayama & Ogihara, 1996; Ogihara et al., 2002). Assim, a variação na estrutura do ptDNA pode servir como um marcador filogenético (Odintsova & Yurina, 2003).

Os objetivos deste trabalho foram o sequenciamento de regiões específicas do genoma cloroplastidial de diferentes espécies e híbridos de cana-de-açúcar e de um cultivar de sorgo cujas sequências não estavam disponíveis nos bancos de genes e a análise comparativa das mesmas sequências disponíveis dos plastomas de milho, arroz e trigo, espécies pertencentes à família *Poaceae*, para identificar sinais filogenéticos e regiões polimórficas pela avaliação de similaridades e divergências ao nível de nucleotídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades referentes à presente Dissertação foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Ciência Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

3.1 Material Vegetal

As diferentes espécies e híbridos de canas-de-açúcar utilizadas como material vegetal foram gentilmente fornecidas pelo Centro de Tecnologia Copersucar, Piracicaba-SP e estão descritas na Tabela 1. As genealogias de algumas das variedades selecionadas estão presentes no Anexo A.

Tabela 1. Espécies e híbridos de cana-de-açúcar estudadas

<i>ESPÉCIE</i>	<i>VARIEDADE</i>
<i>Saccharum officinarum</i>	Badila
<i>Saccharum barberi</i> Sarethia	Chunnee
<i>Saccharum spontaneum</i>	Krakatau
<i>Saccharum robustum</i>	Molokai 5099
SP71-1088 x H57-5028	Híbrido SP80-3280
POJ2364 x EK28	Híbrido POJ2878
CP65-357 x CP56-63	Híbrido CP72-1210
H59-3775 x H58-8019	Híbrido H72-1522

Segmentos nodais obtidos de plantas adultas cultivadas em campos experimentais da Copersucar foram trazidos ao laboratório e tratados por imersão em água destilada a 50°C durante 30 minutos, e subsequente plantio em substrato comercial *Plantimax* (vasos contendo aproximadamente 1.000 cm³ / segmento nodal).

A espécie de sorgo (*Sorghum bicolor*) também foi estudada. Sementes de sorgo cultivar 822, gentilmente fornecidas pelo Departamento de Sementes da ESALQ/USP, foram semeadas em substrato comercial *Plantimax*.

Cana-de-açúcar e sorgo foram mantidos em casa-de-vegetação do Laboratório de Biologia Molecular.

3.2 Isolamento do DNA

Para a obtenção do DNA de cana-de-açúcar e sorgo, folhas jovens foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e maceradas em almofariz, e subsequentemente utilizadas para extração de DNA plastidial ou DNA total.

3.2.1 DNA cloroplastidial

Para realizar o isolamento de cloroplastos intactos de folhas jovens de todas as espécies em estudos, utilizou-se o método do Triton X-100 (Mariac et al., 2000). A fração correspondente aos cloroplastos, obtida no método do Triton X-100, foi submetida ao isolamento do ptDNA. Para isto, utilizou-se o método aplicado à extração de DNA total de tecidos foliares descrito por Doyle & Doyle (1990).

Após a obtenção da fração correspondente aos cloroplastos pelo método do Triton X-100, realizou-se o isolamento do ptDNA partindo da lise destas organelas. Para isto, estas organelas foram adicionadas de 500 µL do tampão de extração de DNA [2 % CTAB (p/v); 100 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 1 % 2-mercaptoetanol (v/v)] e incubadas a 55°C durante 10 minutos, e subsequentemente incubadas em gelo por 1 minuto. Posteriormente, procedeu-se a uma extração com

clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), e a fase aquosa final foi adicionada de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 1 volume de 2-propanol para a precipitação dos ácidos nucleicos (-70°C durante 1 hora). Após centrifugação a 12.000xg (4°C, 30 minutos), o sedimento foi lavado em 0,5 mL de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente durante 20 minutos e ressuspensionado em 20 µL de água destilada deionizada esterilizada (Calsa Junior, 2001).

3.2.2 Extração de DNA Total

Uma alternativa mais simples para obter o DNA molde para as reações de amplificação foi utilizar o método de extração de DNA total vegetal de Doyle & Doyle (1990) ao invés da extração do DNA de cloroplasto. Esta metodologia foi possível, pois os pares de *primers* utilizados nestas reações foram desenhados em regiões conservadas do plastoma, além de serem específicos para as seqüências do cloroplasto em estudo.

3.3 Identificação das Regiões dos Plastomas

As regiões do plastoma selecionadas para verificar o grau de similaridade ou diversidade entre híbridos e espécies de cana-de-açúcar e posicioná-las evolutivamente com relação a outras espécies gramíneas de milho, arroz, trigo e sorgo, foram:

- Região *16S rDNA* (*16S ribosomal DNA*) que geralmente apresenta seqüência de nucleotídeos conservada nos plastomas.
- Região intergênica entre *rbcL* (subunidade maior da ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase) e *petA* (citocromo f apoproteína). Esta região refere-se ao gene plastidial *accD* (forma procariótica da acetil-CoA-carboxilase) que está presente no plastoma de algumas espécies e apresenta polimorfismo.

- Região intergênica entre *trnI* e *trnL* (RNA transportador plastidial). Esta região pode refletir um evento de transferência gênica de *ycf2* para o núcleo, e a degradação do respectivo gene cloroplastidial, resultando em fragmentos do mesmo, dependendo das espécies.

- Um segmento das quatro intersecções do DNA cloroplastidial que ligam as duas regiões repetidas invertidas (IR_A e IR_B) com a região de cópia única grande (LSC) e a região de cópia única pequena (SSC). Nestas regiões buscou-se verificar a posição dos genes que se encontram nas intersecções ou próximos delas, os quais são: gene *rpl22* (proteína ribossomal L22), *ndhH* (NADH-Desidrogenase H), *ndhF* (NADH-Desidrogenase F) e *psbA* (codifica a proteína D1 do fotossistema II presente no tilacóide).

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das Seqüências Alvo

Devido à disponibilidade das seqüências de nucleotídeos dos plastomas de milho, arroz, trigo no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2004) (Tabela 2) e do plastoma de cana-de-açúcar (*S. officinarum*, variedade SP80-3280) na *homepage Sugar Cane Chloroplast Genome Project* (2004), realizou-se os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos das regiões do cloroplasto em estudo utilizando o programa *Vector NTI Suite v.6.0* (Informax Inc., USA). Posteriormente fez-se a seleção de pares de *primers* específicos a serem utilizados no trabalho. Para isto, baseou-se nas seqüências flanqueadoras dos consensos (*contigs*) supostamente vizinhos das regiões alvo do ptDNA de cana-de-açúcar, considerando a homologia com o plastoma de milho, arroz e trigo para amplificação dos fragmentos entre os sítios de ancoragem dos *primers* por PCR.

Tabela 2. Plastomas de gramíneas estudadas

<i>Espécie</i>	<i>Nº de acesso no NCBI</i>	<i>Referência</i>
<i>Zea mays</i>	X86563	Maier et al., 1995
<i>Oryza sativa</i>	X15901	Hiratsuka et al., 1989
<i>Triticum aestivum</i>	AB042240	Ogihara et al., 2002

Tanto o DNA total, como o DNA cloroplastidial foram utilizados nas reações de amplificação realizadas no aparelho PTC-100 (*MJ Research Incorporation*), utilizando-se as seguintes condições: 10 pmoles/ μ L dos *primers forward* e *reverse*; 5 mM de dNTP; 10 ng de DNA; 0,3 U de enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*), 3 μ L de tampão de reação 10X (*Invitrogen Life Technologies*) e 0,9 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, em um volume final de 30 μ L. Os pares de *primers* utilizados no trabalho (sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies*) estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3. *Primers* utilizados para amplificação de regiões de interesse do ptDNA

<i>Região estudada e tamanho do fragmento esperado (pb)</i>	<i>Pares de Primers</i>	<i>Posição no plastoma da cana-de-açúcar*</i>
<i>16S rDNA</i> (1.603 pb)	<i>Forward: 5'-CCG AAT CCG CTT TGT CTA CG-3'</i> <i>Reverse: 5'-TTG GGC GTG AAG CAG TGT C-3'</i>	48.859 – 48.840 47.256 – 47.274
<i>16S rDNA</i> Interno 1 (890 pb)	<i>Forward: 5'-GAG ACA CGG CCC AGA CTC C-3'</i> <i>Reverse: 5'-TGT AGC ACG TGT GTC GCC C-3'</i>	48.513 – 48.495 47.623 – 47.641
Intersecção IR _A /SSC gene <i>ndhH</i> (1.650 pb)	<i>Forward: 5'-AAG CTT CCA TCT GCT ATA GCT TGA AGC-3'</i> <i>Reverse: 5'-GAG CTC GTT TGC TGG CTT ATT TGG C-3'</i>	37.417 – 37.437 39.064 – 39.046
Gene <i>ndhH</i> Interno 1 (1.007 pb)	<i>Forward: 5'-CCC GGT GGA CGA ATT TTC C-3'</i> <i>Reverse: 5'-GCA TGG TGT TCT TCG ACT G-3'</i>	37.760 – 37.778 38.767 – 38.749
Intersecção IR _A /LSC gene <i>psbA</i> (1.627 pb)	<i>Forward: 5'-AAG CTT GGT TGG CCA TAC AAT CGC GA-3'</i> <i>Reverse: 5'-GAG CTC AAT TAT CTA CTC CAT CCG AC-3'</i>	61.439 – 61.458 63.065 – 63.046
Gene <i>psbA</i> Interno1 (712 pb)	<i>Forward: 5'-GCA GTG AAC CAG ATC CCT AC-3'</i> <i>Reverse: 5'-ATC GCC TTC ATC GCT GCT CC-3'</i>	61.920 – 61.939 62.632 – 62.613
Intersecção LSC/IR _B gene <i>rpl22</i> (827 pb)	<i>Forward: 5'-AAG CTT GGT TGT GCG AAC CAA AAG GA-3'</i> <i>Reverse: 5'-GGT ACC TGG CCA TAC AAT CGC GAT TC-3'</i>	2.853 – 2.872 3.678 – 3.659
Intersecção SSC/IR _B gene <i>ndhF</i> (2.872 pb)	<i>Forward: 5'-TCT AGA CAC CAA TAA GAT ACG GAG AC-3'</i> <i>Reverse: 5'-GGT ACC ATT ACG AAA CAA CAG AGC TC-3'</i>	25.957 – 25.976 28.829 – 28.810
Gene <i>ndhF</i> Interno 1 (2.146 pb)	<i>Forward: 5'-GAT AAG ACG ATA TTC GCC CTC-3'</i> <i>Reverse: 5'-AGA AGA GGA ATT ACC CAG GCA-3'</i>	26.309 – 26.329 28.435 – 28.455
Gene <i>ndhF</i> Interno 2 (1.108 pb)	<i>Forward: 5'-CCC GTT TCA TGA GGA TAG ACA-3'</i> <i>Reverse: 5'-CCA ATT GCA GCG AGT GCT TGT-3'</i>	26.863 – 26.883 27.971 – 27.951

Tabela 3. *Primers* utilizados para amplificação de regiões de interesse do ptDNA

<i>Região estudada e tamanho do fragmento esperado (pb)</i>	<i>Pares de Primers</i>	<i>Posição no plastoma da cana-de-açúcar*</i>
Entre genes <i>rbcL</i> e <i>petA</i> (5.848 pb)	<i>Forward:</i> 5'-AGG ATA GAA CGT ACA CAG GG-3' <i>Reverse:</i> 5'-TGC ATG AGA TAG AAA TAA GG-3'	118.873 – 118.892 124.813 – 124.794
Entre <i>rbcL</i> e <i>petA</i> Interno 1 (5.253 pb)	<i>Forward:</i> 5'-CCG CCT GAA GAA GCA GGA GC-3' <i>Reverse:</i> 5'-ATC CGA CGC ATC CAC TAT GGA-3'	119.227 – 119.246 124.480 – 124.460
Entre <i>rbcL</i> e <i>petA</i> Interno 2 (4.377 pb)	<i>Forward:</i> 5'-CGG TAG AGC GTG TTA TGA GTG-3' <i>Reverse:</i> 5'-AGC AGT GCT TCC TGA TAC TGT-3'	119.637 – 119.657 123.994 – 124.014
Entre <i>rbcL</i> e <i>petA</i> Interno 3 (3.453 pb)	<i>Forward:</i> 5'-CCG GTA CAG TAG TAG GTA AGT-3' <i>Reverse:</i> 5'-CAA GTG AAG GAG ATA GAC GGT-3'	120.065 – 120.085 123.518 – 123.498
Entre <i>rbcL</i> e <i>petA</i> Interno 4 (2.542 pb)	<i>Forward:</i> 5'-GCC GCA GCT TGT GAA ATA TG-3' <i>Reverse:</i> 5'-CGG ATT GCC TGG TAT TCC A-3'	120.448 – 120.467 122.990 – 122.972
Entre <i>rbcL</i> e <i>petA</i> Interno 5 (1.759 pb)	<i>Forward:</i> 5'-CAT TGG GTC GAA CTC TTC TT-3' <i>Reverse:</i> 5'-GAT CTA AAT GGA GTG GAA TAG A-3'	120.912 – 120.931 122.671 – 122.650
Entre <i>rbcL</i> e <i>petA</i> Interno 6 (770pb)	<i>Forward:</i> 5'-GAG ACA CAT ATT CTA TGA CAG-3' <i>Reverse:</i> 5'-CGA ATC GGT CAT AAC CAC T-3'	121.444 – 121.464 122.214 – 122.196
Entre genes <i>trnI</i> e <i>trnL</i> (4.043 pb)	<i>Forward:</i> 5'-CGA GTT CTT ATT GTT CTT ATG-3' <i>Reverse:</i> 5'-TCG AAG CTA TTT GAT GTC TG-3'	59.217 – 59.197 55.171 – 55.190
Entre <i>trnI</i> e <i>trnL</i> Interno 1 (3.397 pb)	<i>Forward:</i> 5'-GGA TTG AAC AAC CGA GAT CCA-3' <i>Reverse:</i> 5'-GGA GGT TCG AGT CCT CTT CAA-3'	58.766 – 58.746 55.369 – 55.389
Entre <i>trnI</i> e <i>trnL</i> Interno 2 (2.578 pb)	<i>Forward:</i> 5'-CGA GGC CCT ATC CAT TAG TAT-3' <i>Reverse:</i> 5'-GCG AAT CCC TGT TTG TAT CCT-3'	58.312 – 58.292 55.754 – 55.734
Entre <i>trnI</i> e <i>trnL</i> Interno 3 (1.559 pb)	<i>Forward:</i> 5'-CGG TCC GAA CCA AGG AAT C-3' <i>Reverse:</i> 5'-GGT GAC TTA CCC ATT CAG TGA-3'	57.796 – 57.778 56.237 – 56.257
Entre <i>trnI</i> e <i>trnL</i> Interno 4 (590pb)	<i>Forward:</i> 5'-CAG GCC TTT GTC TCT GTG T-3' <i>Reverse:</i> 5'-GGC AGT TCA TAT CAT CCC ATA-3'	57.316 – 57.298 56.726 – 56.746

*Variedade de cana-de-açúcar SP80-3280, espécie *Saccharum officinarum* (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/sc-chloroplast/>). As bases nitrogenadas em negrito são sítios de restrição para a clonagem em vetor *pBS*.

A amplificação foi realizada nas condições: 94°C por 2 minutos; 35 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a temperatura adequada para o par de *primers* por 30 segundos e extensão a 72°C por tempo variando com o tamanho da sequência a ser amplificada (para cada 1 kb foi utilizado 1 minuto); extensão final a 72°C por 10 minutos; e finalização a 4°C. As amostras dos produtos de amplificação foram armazenadas a -20°C. Para verificar a quantidade de DNA amplificado e confirmar a amplificação, amostras dos produtos da PCR (10 % do

volume total da amostra amplificada) foram analisadas em gel de agarose 0,8 % (TAE 1x, 3 V.cm⁻¹). Os resultados serviram para quantificar o DNA para as reações de sequenciamento.

3.5 Clonagem de Seqüências Alvo

A clonagem das regiões alvo do ptDNA no vetor *pBS* (*Plasmid Blue Script cloning vector*) foi realizado nos casos em que as seqüências de DNA cloroplastidial apresentaram dificuldade no sequenciamento de produtos de PCR ou produziram seqüências de baixa qualidade. A região que inclui o gene *ndhF* (NADH-desidrogenase F), localizado na intersecção de SSC e IR_B do plastoma de todas as espécies e híbridos de cana-de-açúcar e do cultivar 822 de sorgo em estudo, foi clonada.

Os fragmentos de 2.872 pb, obtidos das diferentes espécies e híbridos de cana-de-açúcar e do cultivar de sorgo, foram purificados com o *kit GFX PCR DNA Purification* (Amersham Biosciences, Cat.N. 27-9602-01) de acordo com o fabricante. Em seguida foi realizado o reparo das extremidades do DNA usando: 16 µL do produto de PCR purificado, 1 µL de *Klenow Fragment*, 2 µL de 10X *Blunting/Kinasing Buffer*, 1 µL de *Polynucleotide Kinase*, obtendo um volume final de 20 µL. Tal reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Realizou-se novamente a purificação dos fragmentos de DNA reparados nas extremidades com o mesmo *kit* citado acima. Em seguida, fez-se a ligação do inserto no vetor, utilizando 15 µL de DNA (500 a 1.000 ng), 1 µL de vetor *pBS* desfosforilado (50 ng.µL⁻¹), 4 µL de 2X *Ligation Buffer*, 1 µL de solução de *DTT*, 1 µL de *T₄ DNA Ligase*. As reações de ligação foram incubadas a 14°C por 18 horas. Células competentes de *Escherichia coli* (cepa *DH5α*) foram transformadas por choque térmico a 42°C por 45 segundos. Para a recuperação das células bacterianas transformadas, foi adicionado 900 µL de meio LB, incubando a 37°C por 1 hora sob agitação. As transformações foram distribuídas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido, substrato X-Gal (50 mg.mL⁻¹) / IPTG (100 mM) e antibiótico

ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e depois incubadas a 37°C durante a noite. Foram realizadas mini-preparações de colônias selecionadas utilizando o método da lise alcalina, proposto por Birboim & Doly (1979). Para identificar clones contendo o inserto, foram feitas digestões com a enzima de restrição *XhoI* (fragmento esperado: 5.836 pb) e com as enzimas *XhoI* e *XbaI* (fragmentos esperados: 2.971 pb e 2.901 pb), cujos sítios de restrição estão presentes apenas no vetor *pBS*. O DNA plasmidial dos clones obtidos foram armazenados a -20°C . A quantidade e integridade do DNA foram verificadas através da eletroforese de uma alíquota (10 % do volume de eluição do sedimento - *pellet* - obtido na mini-preparação) em gel de agarose 0,8 % (TAE 1x, 3 V.cm^{-1}), também para quantificação do DNA para reação de sequenciamento.

3.6 Sequenciamento

As amostras amplificadas por PCR e os plasmídios isolados que apresentaram os insertos esperados foram utilizados como molde na reação de sequenciamento a qual se baseou nos protocolos fornecidos pelo fabricante do *kit* utilizado (*Applied Biosystems*, *kit BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing v3.0*, Cat.N. 4314419), em seqüenciador automático ABI-3100 (*Applied Biosystems*). Estas reações foram realizadas em microplacas para termocicladores (96 poços, $200 \mu\text{L/poço}$), seguindo-se as coordenadas de posição das amostras. Os plasmídios foram seqüenciados com *primer Forward* (5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3') ou *Reverse* (5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3') e no caso dos DNAs produtos de PCR, utilizou-se *primer Forward* ou *Reverse* específico de cada região amplificada por PCR (ver Tabela 3, item 3.4). A quantidade de DNA adicionada variou de acordo com a fonte de DNA utilizada (DNA de dupla fita ou produto de PCR) e o tamanho do fragmento a ser seqüenciado. A Tabela 4 apresenta a quantidade de amostra de DNA (ng) a ser utilizada em cada reação de sequenciamento.

Tabela 4. Quantificação de amostras de DNA para reação de sequenciamento

<i>Tipo de amostra</i>	<i>Tamanho do Fragmento (pb)</i>	<i>Quantidade (ng)</i>
Produto de PCR	100 – 200	1 – 3
	200 – 500	3 – 10
	500 – 1.000	5 – 20
	1.000 – 2.000	10 – 40
	>2.000	40 – 100
DNA dupla fita	independe	200 – 500

Antes de realizar o sequenciamento, cada microplaca foi incubada a 95°C por 3 minutos para que as amostras de DNA fossem desnaturadas, e imediatamente incubou-se no gelo para evitar a renaturação.

Os programas de coleta (*ABI-Prism Collection, Applied Biosystems*) e de análise (*Sequencing Analysis, Applied Biosystems*) dos sinais emitidos pelo seqüenciador geram os cromatogramas e as seqüências de nucleotídeos referentes a cada amostra seqüenciada. Os cromatogramas são representações gráficas da intensidade da fluorescência emitida por cada nucleotídeo do DNA seqüenciado, e indicam a confiabilidade dos dados obtidos durante o sequenciamento.

3.7 Análise das Seqüências

Os programas apresentados a seguir foram utilizados nas análises das seqüências de nucleotídeos do plastoma selecionadas para o estudo [*16S rDNA*, *rpl22* (IR_B/LSC), *ndhH* (IR_A/SSC), *ndhF* (SSC/IR_B), *psbA* (LSC/IR_A), regiões intergênicas entre *rbcL* e *petA* e entre *trnI* e *trnL*] tendo em vista identificar marcadores filogenéticos ou *hotspots* no DNA cloroplastidial através da análise comparativa destas seqüências dos híbridos e

espécies de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e de outras espécies gramíneas como sorgo, milho, arroz e trigo, e posicionar filogeneticamente todas as espécies estudadas:

- **NCBI / Entrez / Nucleotide** (*National Center of Biotechnology Information, USA*) (acesso <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>): utilizado para buscar as seqüências das regiões em estudo das espécies *Poaceae* de milho (número de acesso: X86563), arroz (número de acesso: X15901) e trigo (número de acesso: AB042240).

- **Vector NTI Suite v.6.0** (*Informax Inc., USA*): utilizado para o alinhamento das seqüências.

- **Algoritmo Phred-Phrap-Consed** (Ewing et al., 1998; Ewing & Green, 1998; Gordon et al., 1998): *software* para produção do cromatograma processado, realização do agrupamento de seqüências e montagem de contíguos genômicos – permite edição de bases e verificação da qualidade das seqüências.

- **BLAST/NCBI** (*Basic Local Alignment Search Tool – National Center of Biotechnology Information, USA*) (Altschul et al., 1990) (acesso na *homepage* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/BLAST/>): programa utilizado para verificar a existência de similaridade entre o DNA cloroplastidial das espécies e híbridos de cana-de-açúcar e as outras espécies, como sorgo, milho, trigo e arroz.

- **MultiAlin** (*Multiple Sequence Alignment*) (Corpet, 1988) (acesso: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>): utilizado para analisar o alinhamento de seqüências de nucleotídeos, em que o resultado obtido foi salvo no formato de *BOXSHADE*. Para tal, copiou-se o formato FASTA da análise feita no programa *MultiAlin* e inseriu-se no programa *BOXSHADE* (acesso: http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

- ***BioEdit Sequence Alignment Editor*** (Hall, 1999) (acesso: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Para realizar os alinhamentos múltiplos e obter as matrizes que foram material para as análises filogenéticas, utilizou-se o programa acessório *ClustalW* (Thompson et al., 1994), o qual faz o alinhamento se baseando em distância. Tal programa ocorre em duas etapas: a) *Pairwise* (aos pares) – todas as seqüências são comparadas par a par e uma medida da similaridade máxima entre cada duas seqüências é calculada. Para calcular essa medida de similaridade máxima, uma matriz de pontos é construída onde seus dois eixos representam as duas seqüências comparadas. Com base nessa matriz de pontos, o programa irá maximizar a similaridade entre as seqüências, usando para isto as penalidades (penalidade de intervalo que é o número de bases idênticas que devemos adicionar para inserir um intervalo e a penalidade de substituição); b) O programa de alinhamento múltiplo começa alinhando primeiro as seqüências mais semelhantes, em seguida as que se conectam a estas e, assim por diante, até que todas as seqüências estejam alinhadas.

- ***PAUP*4.0b10 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods)*** (Swofford, 2003) (acesso: <http://paup.csit.fsu.edu/>): utilizado nas análises filogenéticas, havendo disponibilidade de três métodos: máxima parcimônia, *likelihood* (probabilidade ou verossimilhança) e distância.

O método selecionado foi o da parcimônia que considera que a mutação *indel* (evento que envolve deleção ou inserção nucleotídica, verificado através da comparação de cadeias nucleotídicas homólogas com comprimentos diferentes) ocorre com menor frequência do que a mutação do tipo substituição de nucleotídeos. É a adoção da hipótese mais simples.

Para testar o grau de confiabilidade das árvores filogenéticas foi selecionado o teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). A técnica do *bootstrap* revela a consistência interna dos dados, ou seja, se a topologia muda muito conforme a reamostragem dos dados. Este procedimento é usado para verificar a proporção de vezes em que uma determinada estimativa ocorre além de um limite pré-estabelecido através de sorteios repetidos, com reposição, dos dados originais. De acordo com Schneider (2003),

considera-se como bootstrap significativo (robusto) valores acima de 95 %, independente da repetibilidade. Já valores moderados (70 - 94 %) ou fracos (51 - 69 %), se repetidos com vários marcadores diferentes, poderiam ser considerados como indicativos de suporte para o clado (representação gráfica de um grupo monofilético → grupo constituído de uma espécie ancestral e todos os seus descendentes).

- *TreeView* (acesso: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>), programa desenvolvido por Page (1996): utilizado para disponibilizar as árvores filogenéticas resultantes das análises desenvolvidas no programa *PAUP*4.0b10*.

3.8 Análise Comparativa de Edição de mRNA por RT-PCR

Para obter dados que auxiliem nas análises de filogenia foi realizada a análise de edição do mRNA dos genes *ycf3*, *ndhA*, *ndhB*, *ndhD*, *ndhF*, *rpoB*, *rpoC2*, *rps8*, *rps14*, *rpl20*, *rpl2*, *petB* e *atpA* de sorgo (*Sorghum bicolor* cv 822), milho e cana-de-açúcar. Desde que os sítios de edição para cana e milho estão disponíveis (Maier et al., 1995; Calsa Jr., 2001), o sequenciamento de cDNA foi realizado somente para o sorgo. Os *primers* que amplificam as regiões de edição foram desenhados com base nas seqüências de nucleotídeos dos genes apresentados acima dos plastomas de milho e cana-de-açúcar os quais estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. *Primers* para análise de edição de mRNA no plastoma de sorgo

<i>Pares de Primers</i>	<i>Seqüência (5' - 3')</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Posição no Plastoma de milho</i>
<i>ycf3</i> (R)	TCATTGATAAGACCTCCTCG	44,6	46.167 – 46.148
<i>ycf3</i> (F)	GAAGGGGTTTCGTTCTAGCG	48,7	46.148 – 45.167
<i>ndhB</i> (R)	AGACCTAGCAGCTAAAAGAG	44,6	89.228 – 89.247 133.515 – 133.496
<i>ndhB</i> (F)	GTGGTGCTAACGATTTAATA	40,5	91.045 – 91.026 131.698 – 131.717
<i>rpoC2</i> (R)	CGTGTGATAAATTCTTTGAG	40,5	29.913 – 29.894
<i>rpoC2</i> (F)	GATATTCATTTTCCTGAAGA	38,5	29.599 – 29.618
<i>petB</i> (R)	CCCTATAACGGACCCGAAAT	46,7	74.548 – 74.529
<i>petB</i> (F)	ACCCCGTGAATTAACCTTGGG	46,7	74.234 – 74.253
<i>ndhD</i> (R)	GGGGAAGCGCATTACAGTAC	48,7	110.929 – 110.910
<i>ndhD</i> (F)	GTGTAGCACCGATAAATCCA	43,8	110.611 – 110.630
<i>rpl2</i> (R)	CCACTTCTAGATAGAGAAAC	42,6	84.462 – 84.443 138.281 – 138.300
<i>rpl2</i> (F)	CCATCCCCATAGTGTATGAG	46,7	84.128 – 84.147 138.615 – 138.596
<i>ndhA</i> (R)	TTCTTACTGTTATTGTATTC	36,4	114.322 – 114.341
<i>ndhA</i> (F)	GGGTAGAGGTAGAAACTATC	44,6	116.444 – 116.425
<i>atpA</i> (R)	GGTGTTTACGTAACTCATCC	44,6	37.965 – 37.946
<i>atpA</i> (F)	GCGGATCTATTCAATGCCGG	46	37.611 – 37.630
<i>rpoB</i> (R)	CCTAATTCACATTTTGTG	38,5	22.237 – 22.218
<i>rpoB</i> (F)	ATACCGAATTGTGATCAATC	40,5	21.815 – 21.834
<i>rps14</i> (R)	AAAGTTTGATTCAGAGGGAG	42,6	38.964 – 38.945
<i>rps14</i> (F)	CTTGTTGCACCCGGTAACAA	46,7	38.676 – 38.695

Tabela 5. *Primers* para análise de edição de mRNA no plastoma de sorgo

<i>Pares de Primers</i>	<i>Seqüência (5' - 3')</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Posição no Plastoma de milho</i>
<i>ndhF</i> (R)	TACATATCAATATGCCTGGG	42,6	107.283 – 107.264
<i>ndhF</i> (F)	GAACTAAGATTCCTACAGTA	40,5	106.970 – 106.989
<i>rpl20</i> (R)	CAAAAATGCGTTCATTTGCC	42,6	68.587 – 68.568
<i>rpl20</i> (F)	CCTTTAATTGATGATCCTTA	38,5	68.268 – 68.287
<i>rps8</i> (R)	ACTGTTCGAGTAGTATCCAC	44,6	78.835 – 78.816
<i>rps8</i> (F)	CTTCTCCCCCAATTCTGTTT	44,6	78.511 – 78.530

T_m: Temperatura *melting* (temperatura de anelamento do *primer*).

**Primers* R: *reverse*; F: *forward*.

Ao realizar a comparação das seqüências genômicas e dos respectivos cDNAs destes genes, é possível detectar os eventos de edição do mRNA nos cloroplastos de sorgo, devido à ocorrência de substituição de uma base nitrogenada citosina (C) por outra uracila (U) nos sítios de edição.

3.8.1 Extração de RNA total

O material foliar coletado de sorgo (cultivar 822, obtido conforme item 3.1) foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e triturado em almofariz. Pequenas quantidades foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL até atingir a marca de aproximadamente 0,1 mL para o isolamento de RNA total com o reagente Trizol (Gibco-BRL), de acordo com o método recomendado pelo fabricante. O RNA isolado foi analisado em gel de agarose 1 % (TBE 1x tratado com DEPC 0,01 %, 3 V.cm⁻¹). Aproximadamente 5,0 µg do RNA total foram tratados com *Amplification grade* DNase I livre de RNase (*Invitrogen Life Technologies*), de acordo com as instruções do fabricante. O tratamento do RNA total com DNase I é indicado para

eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, o que pode comprometer a amplificação correta da sequência dos cDNAs.

3.8.2 Síntese do cDNA

O RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA total foliar de sorgo, obtido através do *kit SuperScriptTM Preamplification System (Invitrogen Life Technologies)*, tendo os hexâmeros randômicos do *kit* como *primers*.

Para verificar a possível presença de DNA plastômico contaminante, *primers* foram desenhados para amplificação da região editada em transcritos dos genes *ndhA*, *ndhB* e *ycf 3* (ORF 170), que possuem íntron, sendo que cada *primer* se localiza em um éxon diferente, permitindo a distinção por tamanho dos produtos amplificados a partir do cDNA (sem íntron) e a partir do DNA contaminante (com íntron). Tais *primers* se encontram na Tabela 5 (item 3.8).

O cDNA total foi usado como molde para a amplificação da região de interesse com os *primers* presentes na Tabela 5, via PCR convencional: 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a temperatura adequada para o par de *primers* por 30 segundos e extensão a 72°C por tempo variando com o tamanho da sequência a ser amplificada (para cada 1 kb foi utilizado 1 minuto); extensão final a 72°C por 10 minutos; e finalização a 4°C. Como controle, realizou-se a amplificação das mesmas regiões usando como molde o DNA total de sorgo.

Uma alíquota referente a 10 % do volume de cada produto de RT-PCR foi analisada em gel de agarose 1 % (TAE 1x, 3 V.cm⁻¹), e, após a verificação do tamanho esperado para cada produto de amplificação, estes foram utilizados como molde para a reação de sequenciamento (ver item 3.6).

Posteriormente, o alinhamento das sequências de nucleotídeos foi analisado através dos programas *Vector NTI Suite v.6.0 (Informax Inc., USA)* e *ClustalW* (programa acessório do *BioEdit*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Material Vegetal

A metodologia utilizada para propagação vegetativa de segmentos nodais de plantas adultas cultivadas em campo das diferentes espécies e híbridos de cana-de-açúcar apresentou-se adequada. Observou-se que o brotamento de folhas ocorreu após o período de aproximadamente sete dias do plantio, sendo as plantas mantidas em casa-de-vegetação. As folhas entre 5,0 e 20,0 cm de comprimento são mais favoráveis ao isolamento de cloroplasto e do seu DNA, além da extração de DNA total, o que pode ocorrer devido à menor quantidade de fibras e sílica no tecido foliar.

O material vegetal de sorgo foi obtido após cinco dias da germinação de suas sementes. As folhas de sorgo selecionadas para realizar o isolamento de cloroplasto e do seu DNA e a extração de DNA total apresentaram entre 5,0 e 15,0 cm de comprimento. O tecido vegetal de sorgo apresenta menos fibras e sílica do que o tecido vegetal de cana-de-açúcar, o que facilita as etapas de extração de DNA cloroplastidial e DNA total de suas folhas.

4.2 Isolamento do DNA dos Cloroplastos

O método do Triton X-100 (Mariac et al., 2000) selecionado para o isolamento de cloroplastos de folhas jovens das espécies e híbridos de cana-de-açúcar e do cultivar de sorgo, seguido pela extração do ptDNA utilizando o método de extração de DNA total (Doyle & Doyle, 1990), forneceu resultados adequados em relação à integridade e

pureza do DNA cloroplastidial. O método do Triton X-100 se baseia na composição lipídica diferencial entre as membranas do cloroplasto e a carioteca, principalmente em relação aos constituintes glicerolipídicos. A composição lipídica das membranas do cloroplasto também difere das membranas do retículo endoplasmático e das mitocôndrias (Taiz & Zeiger, 1998). As membranas da carioteca, do retículo endoplasmático e das mitocôndrias não apresentam galactosildiacilgliceróis e sulfolipídios os quais estão presentes nas membranas do cloroplasto.

4.3 Extração de DNA Total

Com o desenvolvimento do projeto, optou-se pela extração de DNA total vegetal (método descrito por Doyle & Doyle, 1990) de folhas jovens das espécies e híbridos de cana-de-açúcar e do cultivar de sorgo ao invés da extração do DNA de cloroplasto, pois os pares de *primers* utilizados nas reações de PCR são específicos para as seqüências de cloroplasto em estudo. O método de extração de DNA total vegetal mostrou-se mais eficiente devido ao menor tempo dispensado para o seu isolamento, comparado com o método de extração de DNA cloroplastidial. O rendimento médio de DNA total obtido foi de 20 µg/g de tecido foliar.

4.4 Clonagem de Seqüências Alvo

Após verificar a dificuldade no sequenciamento de produtos de PCR da região que inclui o gene *ndhF* de todas as espécies e híbridos de cana-de-açúcar e do cultivar 822 de sorgo em estudo, optou-se por realizar a clonagem desta região alvo no vetor *pBS* (*Plasmid Blue Script cloning vector*). No total foram obtidos 54 clones incluindo todas as espécies e híbridos de cana-de-açúcar e o cultivar de sorgo, havendo, em média, cinco clones de cada um deles.

4.5 Sequenciamento dos Clones e Produtos de PCR

Foram completamente seqüenciadas as seguintes regiões: *16S rDNA*, intersecção entre IR_A e SSC correspondendo ao gene *ndhH*, intersecção entre IR_A e LSC correspondendo ao gene *psbA*, intersecção entre LSC e IR_B correspondendo ao gene *rpl22*, intersecção entre SSC e IR_B correspondendo ao gene *ndhF*, regiões intergênicas entre *rbcL* e *petA* e entre *trnI* e *trnL*. Todas essas seqüências apresentaram alta qualidade quando analisadas pelo programa *Phred/Phrap/Consed* o qual fez o alinhamento (*clustering*) das mesmas, formando as seqüências consenso (*contigs*). O comprimento em pares de base (pb) das seqüências alvo analisadas encontra-se no Tabela 6.

Tabela 6. Comprimento das seqüências alvo analisadas em pares de base

<i>Região do ptDNA</i>	<i>Comprimento em pares de base</i>
<i>16S rDNA</i>	1.497 (todas espécie e híbridos de cana, o cultivar de sorgo, milho, arroz e trigo)
Intersecção IR _A /SSC – gene <i>ndhH</i>	1.564 (todas espécies e híbridos de cana) 1.546 (sorgo e milho) 1.550 (arroz) 1.557 (trigo)
Intersecção IR _A /LSC – gene <i>psbA</i>	1.531 (todas espécies e híbridos de cana, exceto Krakatau) 1.530 (<i>S. spontaneum</i> – Krakatau) 1.529 (sorgo) 1.524 (milho e arroz) 1.542 (trigo)
Intersecção LSC/IR _B – gene <i>rpl22</i>	722 (todas espécies e híbridos de cana) 724 (sorgo e milho) 697 (arroz) 690 (trigo)

Tabela 6. Comprimento das seqüências alvo analisadas em pares de base

Região do ptDNA	Comprimento em pares de base
Intersecção SSC/IR _B – gene <i>ndhF</i>	2.800 (Híbridos de cana: SP80-3280, H72-1522, POJ2878, CP72-1210)
	2.801 (<i>S. robustum</i> – Molokai 5099)
	2.798 (<i>S. spontaneum</i> , <i>S. barberi</i> Saretha, <i>S. officinarum</i> – Badila)
	2.762 (sorgo)
	2.784 (milho)
	2.981 (arroz)
	2.919 (trigo)
Região intergênica entre <i>trnI</i> e <i>trnL</i>	3.888 (todas espécies e híbridos de cana, exceto Krakatau)
	3.882 (<i>S. spontaneum</i> - Krakatau)
	3.887 (sorgo)
	3.885 (milho)
	1.762 (arroz)
	1.761 (trigo)
Região intergênica entre <i>rbcL</i> e <i>petA</i>	5.674 (todos espécies e híbridos de cana, exceto <i>S. robustum</i> e <i>S. spontaneum</i>)
	5.670 (<i>S. robustum</i> – Molokai 5099)
	5.672 (<i>S. spontaneum</i> – Krakatau)
	5.616 (sorgo)
	5.582 (milho)
	6.485 (arroz)
	5.690 (trigo)

Embora a estrutura completa do plastoma seja conservada por estabilização das repetições invertidas longas, alterações estruturais nos plastomas, tais como inversões (Howe et al., 1988; Hiratsuka et al., 1989), translocações (Ogihara et al., 1988), e deleções de bases nitrogenadas (Palmer, 1991), são encontradas entre as angiospermas. Além disso, análises de seqüência dos DNAs cloroplastidiais em plantas relacionadas tem permitido a identificação de “hotspots” para mutações em comprimento (Ogihara et

al., 1988), e este enfoque comparativo é importante para a compreensão dos mecanismos de evolução do plastoma.

Ao analisar o comprimento das seqüências alvo presentes na Tabela 6, observa-se que realmente a região *16S rDNA* dos plastomas estudados apresenta-se muito conservada, não havendo mutações que resultem no polimorfismo de comprimento. As regiões repetidas invertidas (IRs) dos plastomas pertencem à região mais conservada da molécula contendo todos os rRNAs e os genes tRNAs (Odintsova & Yurina, 2003). As outras seqüências alvo analisadas apresentam variações no comprimento entre as espécies estudadas, havendo diferenças nos números de pares de bases. As intersecções do plastoma que correspondem aos genes *ndhH*, *psbA*, *rpl22* e *ndhF* mostram-se aproximadamente iguais em todas as espécies, havendo variações em alguns pares de base. A região codificadora dos genes *ndhH*, *psbA*, *rpl22* apresentam poucas inserções e deleções de bases nitrogenadas (*indels*) (dados não apresentados). A intersecção entre SSC e IR_B que corresponde ao gene *ndhF* apresenta alguma variação no comprimento, variando de 2.762 pb (sorgo) a 2.981 pb (arroz). Estas variações se devem aos *indels*, além de ocorrer mutações do tipo transição e transversão. Catalan et al. (1997) se basearam em seqüências do gene *ndhF* para realizar estudos evolutivos de angiospermas, apresentando maior taxa de variabilidade na segunda metade do gene. Isto pode ser observado no Anexo B que apresenta o alinhamento das seqüências da região que inclui o gene *ndhF* das espécies estudadas.

A região intergênica entre *trnI* e *trnL* apresenta polimorfismo no comprimento (Tabela 6), sendo que tal região é menor nas espécies de arroz e trigo quando comparada com a mesma região intergênica de cana, sorgo e milho (Figura 1). Este resultado já foi observado por Maier et al. (1995) que sugeriu que esta região reflete um evento de transferência gênica de *ycf2*, presente em tabaco (Figura 1), para o núcleo, e a degradação do respectivo gene cloroplastidial, resultando em fragmentos do mesmo, dependendo das espécies. A eliminação do *ycf2*, que apresenta um tamanho de 2.181 pb para cada região invertida repetida (IR_A e IR_B), é mais avançada nos plastomas de arroz e trigo. De acordo com Maier et al. (1995), a fragmentação do *ycf2* provavelmente

reflete diferentes estágios de deleção do gene após sua função original ter sido assumida por uma cópia do gene *ycf2* transferida para o genoma nuclear. Geralmente o evento de transferência gênica é considerado como a principal razão para a redução no tamanho do genoma da bactéria endossimbionte original para os genomas dos cloroplastos atuais (Palmer, 1991; Gray, 1991). Assim, os fragmentos remanescentes do *ycf2* ainda observados nos plastomas das espécies analisadas provavelmente promovem um exemplo representativo dos estágios de transição da deleção do gene cloroplastidial, que se acredita ter ocorrido durante a evolução dos plastomas.

Figura 1 - Variação entre os plastomas de plantas terrestres na região intergênica *trnI-trnL*. Linhas tracejadas representam deleções no grupo *Poaceae*. **S. spontaneum* apresenta 3.882 pb

A região intergênica entre *rbcL* e *petA* está localizada na região de cópia única grande (LSC) e apresenta polimorfismo no comprimento (Tabela 6), sendo que o arroz apresenta tamanho maior (6.485 pb) do que as outras espécies estudadas (Figura 2). Esta região refere-se ao gene plastidial *accD* (forma procariótica da acetil-CoA-carboxilase) que foi reduzido para um quadro de leitura de apenas 106 códons (ORF106) no plastoma de arroz e está ausente nos plastomas de cana-de-açúcar, sorgo, milho e trigo. De acordo com Maier et al. (1995), a completa deleção nestas espécies sugere que a ORF106 em arroz representa um estágio intermediário na degradação do gene *accD*. Tal gene parece ter sido completamente perdido em cana-de-açúcar, sorgo, milho e trigo, havendo substituição da função deste gene organelar por um gene codificado pelo genoma nuclear de origem eucariótica.

Figura 2 - Variação entre os plastomas de plantas terrestres na região intergênica *rbcL*-*petA*. Comparando tabaco, arroz, trigo, sorgo, milho e cana, é observada uma tendência para perda do gene *accD*, onde o arroz ocupa um lugar intermediário. **S. robustum* e *S. spontaneum* apresentam, respectivamente, 5.670 pb e 5.672 pb

4.6 Análise Comparativa das Sequências de Nucleotídeos

Para identificar marcadores filogenéticos ou “hotspots” em sequências de nucleotídeos do DNA cloroplastidial de espécies e híbridos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), foram realizadas análises comparativas de regiões alvo de seus plastomas com os de outras espécies de gramíneas, como sorgo, milho, arroz e trigo, buscando analisar as similaridades e diversidades entre eles. As sequências de nucleotídeos das regiões estudadas [*16S rDNA*, *rpl22* (IR_B/LSC), *ndhH* (IR_A/SSC), *ndhF* (SSC/IR_B), *psbA* (LSC/IR_A), regiões intergênicas entre *rbcL* e *petA* e entre *trnI* e *trnL*], obtidas no sequenciamento de 8 variedades de cana e 1 cultivar de sorgo, e através de busca no banco de dados NCBI (2004) dos plastomas do milho, trigo e arroz, foram concatenadas para cada espécie analisada. Então, realizou-se o alinhamento com o programa acessório *ClustalW* presente no programa *BioEdit* (2004).

Observou-se que a região *16S rDNA* e as regiões que incluem os genes *psbA*, *rpl22* e *ndhH* são conservadas entre as espécies e híbridos de cana-de-açúcar (100% de similaridade ao nível de nucleotídeos), existindo alguma divergência na composição de bases nitrogenadas quando se comparou com as mesmas regiões dos plastomas de sorgo, milho, arroz e trigo (dados não apresentados), também verificado em outras espécies por Maier et al., 1990; Matsuoka et al., 2002 e Odintsova & Yurina 2003. Por outro lado, a região que inclui o gene *ndhF* e as duas regiões intergênicas (*rbcL-petA* e *trnI-trnL*) apresentam algumas mutações pontuais de nucleotídeos entre algumas espécies de cana-de-açúcar e outras espécies como sorgo, milho, arroz e trigo, exibindo mutações do tipo transversão (mutação em que uma purina originou uma pirimidina ou vice-versa), transição (mutação onde uma purina foi substituída por outra purina ou uma pirimidina foi substituída por outra pirimidina) e *indel* de nucleotídeo (evento que envolveu deleção ou inserção nucleotídica, verificado através da comparação de cadeias nucleotídicas homólogas com comprimentos diferentes), também verificado em outras espécies (Maier et al., 1995; Catalan et al., 1997). Os alinhamentos da região que inclui o gene *ndhF* e

das regiões intergênicas *trnI-trnL* e *rbcL-petA* estão nos Anexos B, C e D, respectivamente.

4.6.1 Comparação das posições das intersecções dos plastomas de espécies *Poaceae*

As intersecções entre as duas regiões de repetição invertida (IR_A e IR_B) e as duas regiões de cópia única (LSC e SSC) freqüentemente diferem entre os plastomas de várias espécies. Expansões e reduções do tamanho do plastoma são geralmente causadas por expansão ou redução das regiões de repetição invertida (Palmer, 1991). Neste sentido, buscou-se verificar a posição dos genes que se encontram nas intersecções ou próximos delas, os quais são: gene *rpl22* (proteína ribossomal L22), *ndhH* (NADH-Desidrogenase H), *ndhF* (NADH-Desidrogenase F) e *psbA* (codifica a proteína D1 do fotossistema II presente no tilacóide). Para isso, contou-se o número de bases nitrogenadas entre a intersecção do DNA cloroplastidial e o códon de iniciação ou terminação do gene presente próximo dela. A comparação da posição dos genes nos plastomas de cana-de-açúcar, milho, sorgo, arroz e trigo encontra-se na Figura 3.

Figura 3 - Comparação das relativas posições das intersecções LSC/IR_A, IR_A/SSC, SSC/IR_B, IR_B/LSC e os genes *psbA*, *ndhH*, *ndhF* e *rpl22*, respectivamente, entre os plastomas da cana-de-açúcar, sorgo, milho, arroz e trigo

A Figura 3 apresenta o alinhamento das seqüências de nucleotídeos destacando as posições das intersecções dos plastomas das gramíneas, reforçando a estrutura conservada dos plastomas das espécies de cana-de-açúcar, sorgo e milho, os quais apresentam poucas variações.

As intersecções entre as duas repetições invertidas (IR_A e IR_B) e as duas regiões de cópia única (SSC e LSC) variam muito entre as espécies de plantas, embora as seqüências de nucleotídeos nas regiões IR sejam conservadas (Palmer, 1991; Maier et al., 1995). Uma vez que o conteúdo gênico e o arranjo dos genes nestas regiões dos plastomas estudados sejam correspondentes, as posições das bordas não são idênticas.

Analisando a Figura 3, verifica-se que em todos os plastomas estudados as intersecções entre o IR e LSC foram localizadas dentro da região intergênica entre *rps19* (dentro do IR) e *psbA* ou *rpl22* localizados no LSC, havendo polimorfismo na posição

das intersecções LSC/IR_A e IR_B/LSC. Em milho e sorgo o códon de terminação do gene *psbA* está localizado a 92 pb da intersecção LSC/IR_A, ao passo que nas espécies de cana o códon de terminação deste gene está a 91 pb da intersecção. Em cana-de-açúcar, sorgo e milho o códon de iniciação do gene *ndhH* é desfeito pela intersecção IR_A/SSC, e SSC/IR_B está localizada dentro da região codificadora do gene *ndhF*. Em arroz e trigo a intersecção IR_A/SSC se encontra dentro da região codificadora do gene *ndhH*, ao passo que todo o gene *ndhF* está inserido na região pequena de cópia única (SSC), próximo da intersecção com a região invertida repetida. O gene *rpl22* está inserido na região LSC de todos os plastomas, havendo polimorfismo na posição deste gene em relação à intersecção.

Mudanças nas posições das intersecções entre IR e LSC foram relatadas em várias espécies de angiospermas, demonstrando que esta intersecção não é estática (Kato et al., 2000; Goulding et al., 1996; Perry et al., 2002). Maier et al. (1995) mostraram que todas as posições de intersecções podem variar inclusive entre os plastomas de espécies relacionadas tais como milho e arroz.

Foi sugerido que as características dos plastomas de cana-de-açúcar, sorgo e milho com relação às intersecções entre IR e SSC surgiram devido à recombinação intramolecular (Maier et al., 1995). Estas características estruturais dos plastomas analisados demonstram que o milho, o sorgo e a cana-de-açúcar são mais proximamente relacionados uns aos outros do que com trigo e arroz.

De acordo com Ogihara et al. (2002), algumas alterações estruturais nos genes cloroplastidiais tem sido reconhecidas já entre os plastomas de gramíneas. Estas alterações são o resultado de dois processos: deslizamento na replicação ou recombinação intramolecular mediada por repetições diretas simples, e simples perda de nucleotídeo durante a replicação (Ogihara et al., 1991). Então, a recombinação intramolecular entre as seqüências repetidas poderia ser proposta como uma causa dos diferentes comprimentos entre os plastomas das espécies proximamente relacionadas de cana-de-açúcar e arroz. O deslizamento da DNA-polimerase durante a replicação do plastoma parece ser um mecanismo adicional que causa as mutações em comprimento (Palmer, 1991; Morton & Clegg, 1993).

4.6.2 Análise das regiões divergentes dos plastomas de espécies e híbridos de cana-de-açúcar comparados com outras espécies da família *Poaceae*

Destacando partes dos alinhamentos da região que inclui o gene *ndhF* (Figura 4) e das regiões intergênicas *trnI-trnL* (Figura 5) e *rbcL-petA* (Figura 6), observa-se na Figura 4-A (ênfase para os nucleotídeos presentes no quadro) que as espécies *S. spontaneum*, sorgo, milho e trigo exibem substituição de nucleotídeo na mesma posição havendo mutação do tipo transversão [guanina (G) foi substituída por timina (T)]. Na Figura 4-B (nucleotídeos presentes no quadro), verifica-se que as espécies *S. robustum*, *S. barberi* Saretha e *S. spontaneum* apresentam substituição de nucleotídeo na mesma posição presente em sorgo, milho, arroz e trigo, havendo mutação do tipo transversão, onde uma pirimidina foi substituída por uma purina. Nesta posição, os híbridos SP80-3280, H72-1522, CP72-1210 e POJ2878 e a espécie *S. officinarum* (Badila) apresentam a mesma base citosina (C) ao invés de adenina (A) presente nas outras espécies de cana-de-açúcar.

Na Figura 5-A, verifica-se que o híbrido H72-1522 e a espécie *S. barberi* Saretha apresentam a mesma substituição de três bases nitrogenadas (presentes no quadro), diferindo das outras espécies. Também se observa deleção de bases nitrogenadas nas espécies *S. spontaneum*, sorgo e milho entre as posições dos nucleotídeos 1.002 e 1.007 (presentes no quadro), o que não ocorre nas outras espécies de cana (Figura 5-B).

Na Figura 6-A, nota-se a substituição de bases do tipo transição (ênfase para os nucleotídeos presentes no quadro), sendo que a espécie *S. officinarum* (Badila) e os híbridos SP80-3280, H72-1522, CP72-1210 e POJ2878 apresentam a mesma base guanina (G) ao invés de adenina (A). Já na Figura 6-B, verifica-se a existência de uma maior deleção de bases nitrogenadas na espécie *S. robustum* (Molokai 5099) (ênfase no quadro). O trigo não apresenta deleção nesta posição entre os nucleotídeos 3.322 e 3.328, referente à espécie *S. robustum*. Substituições únicas de nucleotídeos não são marcadores filogenéticos perfeitos (Rokas & Holland, 2000). Os alinhamentos das seqüências completas que incluem o gene *ndhF* e as regiões intergênicas (*trnI-trnL* e *rbcL-petA*) se encontram nos Anexos B, C e D, respectivamente.

		A
<i>S. officinarum</i> (SP80-3280)	AATATTTTAAATGAGAGAAATTT--GAAAAATCCAGAATTCCAGTATTTTGCTTTTTCCTT	218
Híbrido POJ 2878	.A.A...T.....G..A..T--.....CC.G...CC.....GCTTT..CTT	218
Híbrido H72-1522	.A.A...T.....G..A..T--.....CC.G...CC.....GCTTT..CTT	218
Híbrido CP72-1210	.A.A...T.....G..A..T--.....CC.G...CC.....GCTTT..CTT	218
<i>S. officinarum</i> (Badila)	.A.A...T.....G..A..T--.....CC.G...CC.....GCTTT..CTT	218
<i>S. robustum</i> (Molokai 5099)	.A.A...T.....G..A..T--.....CC.G...CC.....GCTTT..CTT	218
<i>S. barberi</i> Saretha (Chunnee)	.A.A...T.....G..A..T--.....CC.G...CC.....GCTTT..CTT	218
<i>S. spontaneum</i> (Krakatau)	.A.A...T..... T ..A..T--.....CC.G...CC..... T C TTT..CTT	217
<i>Sorghum bicolor</i> (cv 822)	.A.A...T.....G..A..T--.....CC.G...CC..... T C TTT..CTT	198
<i>Zea mays</i>	-.A...T.....G..A.. A --..... TC.T ...CC..... T ATTT..CTT	215
<i>Oryza sativa</i>	. T.G ... C A .. T ..TT-..... TA.G ...CT.....-----	200
<i>Triticum aestivum</i>	. T.A ... C T .. A ..TTT..... TA.G ...TC..... T C TTA..CTT	236

		B
<i>S. officinarum</i> (SP80-3280)	TTCTTCCTCTTTTCATATCCCTACCC	TGCTAATGAGTTTCATTTCCTTAGT AGGTACAA 1231
Híbrido POJ 2878	CC.....C.T.C.	C.....G.....A 1231
Híbrido H72-1522	CC.....C.T.C.	C.....G.....A 1231
Híbrido CP72-1210	CC.....C.T.C.	C.....G.....A 1231
<i>S. officinarum</i> (Badila)	CC.....C.T.C.	C.....G.....A 1231
<i>S. robustum</i> (Molokai 5099)	CC.....C.T.A.	C.....G.....A 1231
<i>S. barberi</i> Saretha (Chunnee)	CC.....C.T.A.	C.....G.....A 1231
<i>S. spontaneum</i> (Krakatau)	CC.....C.T.A.	C.....G.....A 1230
<i>Sorghum bicolor</i> (cv 822)	CC.....C.T.A.	C.....G.....A 1211
<i>Zea mays</i>	CC.....C.G.A.	C.....A.....A 1233
<i>Oryza sativa</i>	CC.....T.T.A.	C.....A.....C 1206
<i>Triticum aestivum</i>	TT.....T.T.A.	T.....G.....A 1241

Figura 4 - Destaque de parte do alinhamento da região que inclui o gene *ndhF* representados por A e B. Os pontos alinhados representam as mesmas bases nitrogenadas do híbrido SP80-3280. Os traços representam os *gaps* (deleções de bases nitrogenadas). As mutações são apresentadas pelas bases nitrogenadas em negrito que diferem do híbrido SP80-3280

			A
<i>S. officinarum</i> (SP80-3280)	ACATATCATAGAAAAATGAAATCGAAATATTCGGAGATGGCAAATATTCGGAGATGACT	232	
Híbrido POJ 2878	A.....AAA.....G.....	232	
Híbrido H72-1522	C.....TCG.....G.....	232	
Híbrido CP72-1210	A.....AAA.....G.....	232	
<i>S. officinarum</i> (Badila)	A.....AAA.....G.....	232	
<i>S. robustum</i> (Molokai 5099)	A.....AAA.....G.....	232	
<i>S. barberi</i> Saretha (Chunnee)	A.....TCG.....G.....	232	
<i>S. spontaneum</i> (Krakatau)	A.....AAA.....G.....	232	
<i>Sorghum bicolor</i> (cv 822)	A.....AAA.....G.....	232	
<i>Zea mays</i>	A.....AAA.....G.....	232	
<i>Oryza sativa</i>	A.....AAA.....G.....	240	
<i>Triticum aestivum</i>	A.....AAA.....C.....	240	
			B
<i>S. officinarum</i> (SP80-3280)	ACTTCTAAGTAATAACCCCATAGATCCTATATCTATCTATATAAAGAGGCAATCGTGTCA	1067	
Híbrido POJ 2878	CTTCTA.....	1067	
Híbrido H72-1522	CTTCTA.....	1067	
Híbrido CP72-1210	CTTCTA.....	1067	
<i>S. officinarum</i> (Badila)	CTTCTA.....	1067	
<i>S. robustum</i> (Molokai 5099)	CTTCTA.....	1067	
<i>S. barberi</i> Saretha (Chunnee)	CTTCTA.....	1067	
<i>S. spontaneum</i> (Krakatau)	-----	1061	
<i>Sorghum bicolor</i> (cv 822)	-----	1061	
<i>Zea mays</i>	-----	1061	
<i>Oryza sativa</i>	-----	849	
<i>Triticum aestivum</i>	-----	848	

Figura 5 - Destaque de parte do alinhamento da região intergênica *trnI-trnL* representados por A e B. Os pontos alinhados representam as mesmas bases nitrogenadas do híbrido SP80-3280. Os traços representam os *gaps* (deleções de bases nitrogenadas). As mutações são apresentadas pelas bases nitrogenadas em negrito que diferem do híbrido SP80-3280

A

<i>S. officinarum</i> (SP80-3280)	AAATAGAAAGAGAAAAAA-TAAGTTAAGAAA-TGCAGTAATTCTTCTTATTCTTCTGAT	1553
Híbrido POJ 2878	G.....GA.....-A.....A.....-.....A.....G..	1553
Híbrido H72-1522	G.....GA.....-A.....A.....-.....A.....G..	1553
Híbrido CP72-1210	G.....GA.....-A.....A.....-.....A.....G..	1553
<i>S. officinarum</i> (Badila)	G.....GA.....-A.....A.....-.....A.....G..	1553
<i>S. robustum</i> (Molokai 5099)	G.....GA.....-A.....A.....-.....A..... A ..	1553
<i>S. barberi</i> Saretha (Chunnee)	G.....GA.....-A.....A.....-.....A..... A ..	1553
<i>S. spontaneum</i> (Krakatau)	G.....GA.....-A.....A.....-.....A..... A ..	1553
<i>Sorghum bicolor</i> (cv 822)	G.....GA.....-A.....A.....-.....A..... A ..	1553
<i>Zea mays</i>	G.....GA.....-A.....A.....-.....A..... A ..	1513
<i>Oryza sativa</i>	G..... TC- C C A T A ..	1551
<i>Triticum aestivum</i>	 AGA..... A . A T-..... A A ..	1547

B

<i>S. officinarum</i> (SP80-3280)	TGGCCTATTTCTTGCCTGTACCAATTGAAGTATTTTGAG---TACCAATTGCAATTTT-	3429
Híbrido POJ 2878	...C.....C.TG.....T.....G---TACCA...C.A.TTT.-	3429
Híbrido H72-1522	...C.....C.TG.....T.....G---TACCA...C.A.TTT.-	3429
Híbrido CP72-1210	...C.....C.TG.....T.....G---TACCA...C.A.TTT.-	3429
<i>S. officinarum</i> (Badila)	...C.....C.TG.....T.....G---TACCA...C.A.TTT.-	3429
<i>S. robustum</i> (Molokai 5099)	...C.....C.TG.....T.....-----CA...C.A.TTT.-	3425
<i>S. barberi</i> Saretha (Chunnee)	...C.....C.TG.....T.....G---TACCA...C.A.TTT.-	3429
<i>S. spontaneum</i> (Krakatau)	...C.....C.TG.....T.....G---TACCA...C.A.TTT.-	3427
<i>Sorghum bicolor</i> (cv 822)	...C..... G .TG.....T.....G---TACCA...C.A.TTT.-	3348
<i>Zea mays</i>	...C.....C.TG.....T.....G---TACCA...C.A.TTT.-	3376
<i>Oryza sativa</i>	... TC. CA GG---TACCA... A . T .TTT. G	4192
<i>Triticum aestivum</i>	...C.....C.CG.....T.....GGTATCTTTT... A . C . GAG . T	3343

Figura 6 - Destaque de parte do alinhamento da região intergênica *rbcl-petA* representados por A e B. Os pontos alinhados representam as mesmas bases nitrogenadas do híbrido SP80-3280. Os traços representam os *gaps* (deleções de bases nitrogenadas). As mutações são apresentadas pelas bases nitrogenadas em negrito que diferem do híbrido SP80-3280

Ao observar os alinhamentos da região que inclui o gene *ndhF* e das regiões intergênicas *trnI-trnL* e *rbcL-petA* dos híbridos e espécies de cana-de-açúcar, incluindo outras gramíneas como sorgo, milho, arroz e trigo (Anexos B, C e D), foi possível verificar vários aspectos evolutivos entre as espécies estudadas. Os membros da família *Poaceae* foram especialmente estudados quanto à divergência de seus plastomas e mutações no comprimento, sendo identificadas através da comparação de seqüências de nucleotídeos (Ogihara et al., 1988; Maier et al., 1995).

Geralmente é difícil inferir as relações filogenéticas entre espécies proximamente relacionadas devido à falta de marcadores filogenéticos exibindo suficiente variabilidade nucleotídica neste nível taxonômico. Comparando as espécies e híbridos de cana-de-açúcar analisados quanto às regiões selecionadas do plastoma, observou-se um alto grau de similaridade, exibindo baixo sinal filogenético no nível intraespecífico. Os genomas plastidiais de plantas superiores são geralmente conservados no comprimento, estrutura, e complemento gênico (Clegg et al., 1991). Ao nível de seqüência de DNA, os genes plastidiais apresentam uma reduzida taxa de substituição de nucleotídeos, comparado com os genes nucleares (Wolfe et al., 1987; Clegg et al., 1991). As regiões intergênicas *trnI-trnL* e *rbcL-petA* e a região que inclui o gene *ndhF* apresentaram divergências quanto a composição nucleotídica quando se comparou todas as espécies estudadas.

Em geral, verificou-se a existência de maior identidade entre as regiões alvo dos plastomas de cana-de-açúcar, sorgo e milho. Isto indica que tanto as regiões codificadoras como intergênicas são muito similares entre estas espécies. Segundo Calsa Jr (2001) existe similaridade estrutural significativamente elevada entre os plastomas de milho e cana-de-açúcar.

Comparações das seqüências completas dos plastomas de trigo e milho revelaram alteração estrutural nestes plastomas de gramíneas na região IR entre *trnIle* (CAC) e *trnLeu* (CAA) (Ogihara et al., 2002). Os plastomas de gramíneas são altamente conservados, mas alguns “hotspots” para mutação estrutural no plastoma foram observados (Ogihara et al., 2002).

A similaridade entre as espécies de cana-de-açúcar, sorgo e milho pôde ser verificada na região intergênica entre *trnI* e *trnL*, havendo poucas mutações de nucleotídeos que foram utilizadas nas análises filogenéticas.

Um “hotspot” para mutações em comprimento foi encontrado no gene *ycf2*, o qual se encontra entre os genes *trnI* e *trnL*, apresentando-se conservado nas dicotiledôneas (Shinozaki et al., 1986; Hupfer et al., 2000; Schmitz-Linneweber et al., 2001; Ogihara et al., 2002) como tabaco (Maier et al., 1995). Quando as seqüências de nucleotídeo da região *ycf2* de tabaco e das plantas gramíneas foram alinhadas (Figura 1), pelo menos duas deleções foram notadas: uma deleção ocorreu dentro de *ycf2*, então duas ORFs foram geradas (ORF 46 e ORF 34). Também, o segmento de DNA incluindo a ORF 92 foi deletada dos plastomas das gramíneas, e subsequente uma nova ORF foi produzida (ORF 173 para cana-de-açúcar, sorgo e milho e ORF 249 para arroz e trigo). Após as substituições e/ou rearranjos menores das seqüências, várias ORFs menores foram geradas nos plastomas de cana-de-açúcar, sorgo e milho na posição da ORF maior (*ycf2*). As ORFs remanescentes (ORF 46, ORF 34, ORF 241, ORF 139 e ORF 38 na cana-de-açúcar, sorgo e milho) apresentam homologia com seus homólogos em tabaco. Quando uma comparação de seqüências de nucleotídeos da região *ycf2* dos plastomas de gramíneas foi conduzida, a região contendo a ORF 139, a ORF 38 e o gene *ycf15*, foi encontrada por ter sido eliminada dos plastomas de trigo e arroz (Figura 1). Desde que a região remanescente contendo as ORFs (ORF 28 e ORF 64) em trigo e arroz apresentaram alta similaridade com a ORF241 da cana-de-açúcar, sorgo e milho, é plausível assumir que o rearranjo foi um simples evento de deleção. As porções deletadas dos plastomas de trigo e arroz eram quase idênticas, sugerindo que tais plastomas dividem um progenitor comum após a deleção envolvendo esta região. Ainda não é conhecido se estas ORFs são funcionais nos plastomas das gramíneas.

Na Figura 1, observa-se que o gene *ycf2*, conservado no plastoma de dicotiledôneas como tabaco (Maier et al., 1995), é um “hotspot” para mutações em comprimento nas monocotiledôneas (Ogihara et al., 2002), desde que sofreu um processo truncado durante a evolução das *Poaceae* (Katayama & Ogihara, 1996). Muitas ORFs resultaram deste processo, e a divergência estrutural desta região entre as

gramíneas sugeriu que cana-de-açúcar, sorgo e milho ainda mantêm fragmentos maiores de *ycf2* do que arroz e trigo, que perderam completamente este gene (Figura 1, Maier et al., 1995). A cana-de-açúcar apresenta a região que contém o gene *ycf15* (também denominada de ORF99), presente no milho e sorgo enquanto está ausente em arroz e trigo (Maier et al., 1995). Supõe-se que o produto do *ycf2* apresenta papel essencial no metabolismo das células de plantas dicotiledôneas (Drescher et al., 2000), entretanto investigações adicionais poderiam ser realizadas para saber se *ycf15* é funcionalmente importante nos plastídios, e em que extensão, os genes *ycf2* e *ycf15* são substituídos por produtos de genes codificados pelo genoma nuclear nas espécies onde estão ausentes. Também, a região do gene *ycf15* que está presente em cana-de-açúcar, milho e sorgo e ausente em trigo e arroz (Maier et al., 1995) é um importante “hotspot” destas espécies.

Um outro “hotspot” para mutação em comprimento está localizado na região de cópia única grande entre os genes *rbcL* e *petA* (Figura 2). Uma comparação das seqüências de nucleotídeos com a região correspondente das dicotiledôneas (Shinozaki et al., 1986; Hupfer et al., 2000; Schmitz-Linneweber et al., 2001) revelou dois rearranjos nos plastomas de cana-de-açúcar, milho, sorgo e trigo, havendo deleção do gene *accD* (forma procariótica de acetil-CoA-carboxilase) e translocação não-recíproca do *rpl23* (Ogihara et al., 1988). Entretanto, um remanescente do gene *accD* foi encontrado no arroz (ORF106) (Hiratsuka et al., 1989), sendo que a deleção deste gene parece ter ocorrido várias vezes durante o curso de evolução das espécies da família *Poaceae*. Embora proximamente relacionado ao arroz, o plastoma de trigo parece ter seguido a mesma rota evolutiva do sorgo, milho e cana-de-açúcar considerando este “hotspot” de divergência.

Na região montante (*downstream*) do gene *rbcL*, um “hotspot” para mutações em comprimento foi relatada no complexo do trigo (Ogihara et al., 1991) e na família das gramíneas (Morton & Clegg, 1993).

A translocação não-recíproca do pseudogene *ψrpl23* ocorreu recentemente durante o curso de diferenciação da família *Poaceae* de seu ancestral direto, *Joinvilleaceae* (Katayama & Ogihara, 1996). Após a translocação não-recíproca do

pseudogene *ψrpl23*, deleções envolvendo porções homólogas do gene *accD* ocorreu repetidamente durante a diferenciação das linhagens de trigo e milho.

O pseudogene *ψrpl23*, localizado entre *rbcL* e ORF106 no plastoma de arroz, é mantido na posição homóloga dos plastomas de cana-de-açúcar, milho, sorgo e trigo numa forma menos degradada, em que a redução no tamanho causado pela perda da ORF106 é compensada por alguma extensão (Figura 2). Este pseudogene, presente na região divergente do plastoma das espécies analisadas, não é indicativo de uma transferência gênica para o genoma nuclear ou a perda completa do gene codificado pelo plastoma, pois as cópias funcionais do gene *rpl23* ainda existem nas regiões repetidas invertidas (Maier et al., 1995). Outra deleção envolvendo uma parte do gene *rpl23* translocada ocorreu no plastoma de arroz. Além disso, um número de recombinações ilegítimas ocorreu ao redor da parte translocada do gene *rpl23* nas espécies de trigo, tornando esta região altamente variável com respeito às mutações no comprimento (Ogihara et al., 1991). Em contraste, pouca divergência na sequência ocorreu em milho, não havendo variações na região correspondente (Doebley et al., 1987; Morton & Clegg, 1993).

A região intergênica entre *rbcL* e *petA*, descrita como divergente entre os plastomas já seqüenciados de espécies vegetais superiores (Maier et al., 1995), mostrou-se praticamente idêntica entre as espécies e híbridos de cana-de-açúcar, o cultivar de sorgo e o milho. Dados moleculares do gene *rbcL* foram usados com sucesso para resolver a relação filogenética na família ou níveis taxonômicos superiores (Chase et al., 1993; Zurawski et al., 1984). Em combinação com outras seqüências, o gene *rbcL* foi útil em níveis taxonômicos inferiores (Muasya et al., 2001, 2002).

Metodologias alternativas para análises filogenéticas de genomas completamente seqüenciados foram propostas, por exemplo, baseando-se no rearranjo da ordem dos genes (Sankoff et al., 1992), a presença e ausência de famílias gênicas que codificam proteínas (Fitz-Gibbon & House, 1999), conteúdo gênico e a total similaridade (Tekaia et al., 1999), e a ocorrência de duplicações e ortólogos (Lin & Gerstein, 2000).

Alguns trabalhos apresentam análises de evolução de espécies gramíneas comparando seqüências de nucleotídeos do gene que expressa a enzima

fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC; EC4.1.1.3) (gene nuclear) (Bläsing et al., 2002; Svensson et al., 2003), sugerindo relações filogenéticas com base na distinção de plantas que apresentam fotossíntese do tipo C₃ e tipo C₄.

O ciclo de Calvin (ciclo de fixação do carbono) também é conhecido como a rota C₃ de fixação do carbono, uma vez que o produto formado é um composto de três carbonos (ácido fosfoglicérico). Este ciclo, presente em gramíneas como arroz e trigo, pode ser dividido em quatro fases distintas: fase de carboxilação, fase de redução, fase de regeneração e fase de síntese dos produtos. A fase de carboxilação consiste na reação do CO₂ com a ribulose bisfosfato, catalisada pela enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (Rubisco), seguida por uma clivagem molecular, formando o ácido fosfoglicérico (produto composto por três carbonos). A fase de redução consiste na redução do ácido glicérico, formado na etapa anterior, em trioses fosfato. A fase de regeneração consiste na regeneração da ribulose bisfosfato através de reações de interconversão de açúcares. A fase de síntese de produtos consiste na produção de outros compostos, tais como, polissacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos. A síntese desses compostos é influenciada pelas condições fisiológicas. Entretanto, esta não é a única rota de fixação do CO₂. Na maioria das plantas e gramíneas tropicais, tais como cana-de-açúcar, milho e sorgo, a fixação do CO₂ resulta em compostos de quatro carbonos como o oxaloacetato, o malato ou o aspartato. A fixação ocorre pela carboxilação do fosfoenolpiruvato a oxaloacetato, malato ou aspartato a ser catalisado pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC). Por essa razão, essa rota é chamada de C₄. Este CO₂ é posteriormente liberado pela descarboxilação do oxaloacetato, malato ou aspartato e refixado no ciclo de Calvin pela Rubisco. Nos vegetais que apresentam metabolismo C₄, a fixação do CO₂ ocorre nas células fotossintéticas presentes no mesofilo da folha. O carbono fixado na forma de malato migra para os cloroplastos das células da bainha do feixe vascular onde ocorre então a liberação e refixação do CO₂ através do ciclo de Calvin, praticamente eliminando a fotorrespiração nestas plantas (Hatch, 1976; Edwards & Huber, 1981).

A enzima PEPC faz a reposição dos intermediários do ciclo do ácido cítrico, necessário devido à remoção de metabólitos para a síntese de aminoácidos, heme e

clorofila. Além disso, a PEPC está envolvida na regulação das funções estomatais, assimilação de nitrogênio, manutenção do pH e re-fixação de CO₂ (Latzko & Kelly, 1983).

O milho, o sorgo e a cana-de-açúcar são as espécies mais estudadas com respeito a PEPC e contêm pelo menos três diferentes genes PEPCs. A fotossíntese do tipo C₄ é um mecanismo de concentração de CO₂ envolvendo muitas enzimas específicas e uma anatomia foliar alterada tem desenvolvido muitas vezes e independentemente durante a evolução das angiospermas (Kellogg, 1999). Para entender a evolução das PEPCs em espécies C₄ é importante identificar e investigar as outras isoenzimas das quais elas tem desenvolvido.

De acordo com Svensson et al. (2003), as plantas C₄ apresentam origem polifilética e evoluíram independentemente e diversas vezes durante a evolução das angiospermas. Isso implica que a isoforma da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) originou-se de um gene PEPC não fotossintético que já estava presente nas espécies ancestrais C₃. Para encontrar os requerimentos necessários para o caminho fotossintético C₄, o programa de expressão do gene PEPC de plantas C₄ foi mudado para se conseguir uma expressão forte e estável nas células do mesofilo foliar. Em adição, a alterada concentração de metabólitos em torno da PEPC de plantas C₄ no citoplasma do mesofilo necessitou de mudanças na cinética enzimática e nas propriedades metabólicas.

A relação filogenética das PEPCs envolvidas na fotossíntese C₄ agrupou *Sorghum bicolor* e *Saccharum officinarum* num único ramo, indicando que tais espécies apresentam um ancestral comum. A espécie *Zea mays* é grupo irmão de sorgo e cana-de-açúcar no que se refere à filogenia das PEPCs (Bläsing et al., 2002).

No presente trabalho, verificou-se que a região que inclui o gene *ndhF* apresenta consideráveis taxas de substituição de nucleotídeos entre as gramíneas C₃ e C₄, sugerindo uma evolução comum entre plastomas de gramíneas C₄, gerando novos elementos para estudar este tipo de fotossíntese e metabolismo.

Embora algumas divergências tenham sido encontradas até entre cana-de-açúcar, sorgo e milho (gramíneas C₄), a similaridade estrutural entre seus plastomas é significativa. O DNA plastidial de arroz e trigo (gramíneas C₃) não dividem este alto

nível de similaridade. Sugere-se uma relação filogenética próxima entre os plastomas das espécies de cana-de-açúcar estudadas e as plantas gramíneas de milho e sorgo. Por outro lado existe diversidade filogenética quando se compara com os plastomas de arroz e trigo.

4.6.3 Análise filogenética das espécies *Poaceae* estudadas

Para posicionar filogeneticamente as espécies e híbridos de cana-de-açúcar com relação a outras espécies gramíneas de sorgo, milho, arroz e trigo, foram utilizadas as seqüências de nucleotídeos do cloroplasto selecionadas que foram concatenadas para cada espécie e salvas em formato FASTA. Então, realizou-se o alinhamento de tais seqüências concatenadas utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (2004).

A matriz obtida foi exportada como arquivo NEXUS para então ser executado no programa *PAUP*4.0b10* (2004). Os *GAPS* foram codificados como dados faltantes. A matriz resultante foi analisada utilizando a opção de pesquisa heurística do programa *PAUP*. A matriz alinhada das regiões do ptDNA concatenadas apresentou: 19.001 pb; 17.438 caracteres constantes; 1.563 caracteres variáveis; 1.119 caracteres não informativos para parcimônia; 444 caracteres potencialmente informativos para parcimônia. A Figura 7 apresenta o consenso de 7 árvores filogenéticas geradas.

O trigo (*Triticum aestivum*) foi selecionado como grupo externo para todas as análises, pois é a espécie evolutivamente mais antiga. Robert J. Braidwood (1948) descobriu sementes de trigo que datam de 6.700 anos A. C. Bem antes de qualquer evidência histórica, o arroz foi, provavelmente, o principal alimento e a primeira planta cultivada na Ásia. As mais antigas referências ao arroz são encontradas na literatura chinesa, há cerca de 5.000 anos (EMBRAPA Arroz e Feijão, 2004). O milho é uma das culturas mais antigas do mundo, havendo provas, através de escavações arqueológicas e geológicas, e através de medições por desintegração radioativa, de que é cultivado há pelo menos 5.000 anos A. C. (EMBRAPA Milho e Sorgo, 2004). A domesticação do

sorgo, segundo registros arqueológicos, deve ter acontecido por volta de 3.000 anos A. C., ao tempo em que a prática da domesticação e cultivo de outros cereais era introduzida no Egito Antigo a partir da Etiópia (EMBRAPA Milho e Sorgo, 2004). Desconhecida no Ocidente, a cana-de-açúcar foi observada por alguns generais de Alexandre, o Grande, em 327 anos A. C. e mais tarde, no século XI, durante as Cruzadas (TONEIS E CIA, 2004).

Figura 7 - Relação filogenética entre espécies e híbridos de cana-de-açúcar e outras espécies gramíneas como trigo, arroz, milho e sorgo. Esta é uma árvore de parcimônia considerando todas as regiões do ptDNA selecionadas. Os números são valores de *Bootstrap* com porcentagens acima de 50%

A reunião de todas as regiões alvo estudadas produziu a árvore filogenética presente na Figura 7. Tal figura engloba todos os caracteres potencialmente informativos para parcimônia. Analisando esta árvore, verifica-se que o híbrido H72-1522 e a espécie *S. barberi* Saretha (Chunnee) apresentam um ancestral comum, ao passo que os híbridos POJ 2878, CP72-1210 e SP80-3280 e a variedade Badila formam uma politomia,

existindo um ancestral comum a eles. Entretanto, não é possível reconstruir a hipótese filogenética das espécies e híbridos de cana-de-açúcar selecionados se baseando apenas nas regiões alvo do ptDNA estudadas neste trabalho, pois a árvore obtida pela análise individual de espécies e híbridos de cana-de-açúcar resultou na mesma topologia da árvore apresentada na Figura 7 (dado não mostrado), sendo que o valor mais alto de *bootstrap* foi 76 %, o que demonstra que a matriz não contém divergência suficiente e dados robustos para estabelecer relações filogenéticas seguras entre as variedades estudadas

Em seguida foram realizadas análises filogenéticas de cada região alvo das espécies estudadas neste trabalho. As regiões que incluem os genes *16S rDNA*, *ndhH*, *psbA* e *rpl22* apresentam poucas ou nenhuma mutação e foram removidas das análises.

A região que inclui o gene *ndhF* e as duas regiões intergênicas (*rbcL-petA* e *trnI-trnL*) apresentam algumas mutações pontuais de nucleotídeo entre algumas espécies de cana-de-açúcar e também entre as gramíneas selecionadas para realizar a análise filogenética, existindo mutações do tipo transversões, transições e *indel* de nucleotídeo (evento que envolveu deleção ou inserção nucleotídica, verificado através da comparação de cadeias nucleotídicas homólogas com comprimentos diferentes). Isto já foi observado em análises do ptDNA que contribuíram para o conhecimento da evolução das gramíneas se baseando na variação da sequência de nucleotídeos em um único gene como *rbcL* (Doebley et al., 1990; Soltis et al., 1999; Soltis & Soltis, 2000) e *ndhF* (Clark et al., 1995). Maier et al. (1995) e Ogihara et al. (2002) já verificaram a presença de regiões localizadas de divergência como a região entre os genes *trnI* e *trnL* e a região intergênica entre *rbcL* e *petA*, quando realizou análises comparativas entre os plastomas de espécies como tabaco, milho, arroz e trigo. Em contraste aos amplos estudos realizados com enfoque baseado em um único gene, apenas poucos estudos enfocaram a evolução das gramíneas se baseando em múltiplas sequências de genes cloroplastidiais (Wolfe et al., 1987; Wolfe et al., 1989; Gaut et al., 1993).

Então, optou-se por realizar análises filogenéticas de cada região que apresenta divergência entre as espécies e híbridos de cana-de-açúcar. A Figura 8 apresenta o consenso de apenas uma árvore filogenética gerada pela matriz do alinhamento da região

do ptDNA que inclui o gene *ndhF*. O método utilizado também foi o da máxima parcimônia e o resultado da pesquisa heurística foi: 3.078 pb de caracteres totais; 2.571 caracteres constantes; 507 caracteres variáveis; 402 caracteres não informativos para parcimônia; 105 caracteres potencialmente informativos para parcimônia. Também o trigo foi selecionado como grupo externo para as análises, pelo mesmo motivo descrito anteriormente.

Figura 8 - Relação filogenética entre espécies e híbridos de cana-de-açúcar e outras espécies gramíneas como trigo, arroz, milho e sorgo. Esta é uma árvore de parcimônia considerando a região do ptDNA que inclui somente o gene *ndhF*. Os números são valores de *Bootstrap* com porcentagens acima de 50%

A Figura 9 apresenta o consenso de 4 árvores filogenéticas geradas pela matriz do alinhamento da região intergênica *trnI-trnL*. O método utilizado também foi o da máxima parcimônia e o resultado da pesquisa heurística foi: 3.911 pb de caracteres totais; 3.859 caracteres constantes; 52 caracteres variáveis; 15 caracteres não informativos para parcimônia; 37 caracteres potencialmente informativos para parcimônia.

Figura 9 - Relação filogenética entre espécies e híbridos de cana-de-açúcar e outras espécies gramíneas como trigo, arroz, milho e sorgo. Esta é uma árvore de parcimônia considerando a região intergênica *trnI-trnL*. Os números são valores de *Bootstrap* com porcentagens acima de 50%

A Figura 10 apresenta o consenso de apenas uma árvore filogenética gerada pela matriz do alinhamento da região intergênica *rbcl-petA*. O método utilizado também foi o da máxima parcimônia e o resultado da pesquisa heurística foi: 6.672 pb de caracteres totais; 5.972 caracteres constantes; 700 caracteres variáveis; 538 caracteres não informativos para parcimônia; 162 caracteres potencialmente informativos para parcimônia.

Figura 10 - Relação filogenética entre espécies e híbridos de cana-de-açúcar e outras espécies gramíneas como trigo, arroz, milho e sorgo. Esta é uma árvore de parcimônia considerando a região intergênica *rbcL-petA*. Os números são valores de *Bootstrap* com porcentagens acima de 50%

As Figuras 8, 9 e 10 indicam que a filogenia molecular das espécies gramíneas, baseando-se nas seqüências de nucleotídeos da região que inclui o gene *ndhF* e das regiões intergênicas *trnI-trnL* e *rbcL-petA* produzem, respectivamente, árvores filogenéticas distintas. Quando se considera a região que inclui o gene *ndhF* na análise de filogenia, observa-se que as espécies *S. robustum* e *S. barberi* Saretha dividem um ancestral comum e também sugere que os híbridos H72-1522, CP72-1210 e POJ 2878, SP80-3280 e a espécie *S. officinarum* (Badila) formam uma politomia e não apresentam polimorfismo nesta região do ptDNA (Figura 8), sendo que o valor mais baixo de *bootstrap* é 55 %. A herança maternal do cloroplasto de cana-de-açúcar é verificada pela presença desta politomia que agrupa num único ramo os híbridos analisados e a variedade *S. officinarum* (Badila), afirmando que os híbridos realmente apresentam o mesmo plastoma herdado da planta materna *S. officinarum*.

Ao realizar a análise filogenética se baseando apenas na região intergênica *trnL-trnL*, verifica-se que o híbrido H72-1522 e a espécie *S. barberi* Sareth (Chunnee) apresentam um ancestral comum e a consistência deste ramo é dada pelo valor de *bootstrap* de 98 %. Provavelmente a espécie *S. barberi* Sareth está presente na genealogia do híbrido H72-1522, sendo um dos integrantes desconhecidos dos cruzamentos que o originaram. As outras espécies e híbridos de cana-de-açúcar estudados formam uma politomia não resolvida (Figura 9).

Já a árvore obtida com as seqüências de nucleotídeos da região *rbcL-petA* sugere que os híbridos H72-1522, CP72-1210 e POJ 2878, SP80-3280 e a espécie *S. officinarum* (Badila) apresentam o mesmo ancestral comum, mostrando que as seqüências de nucleotídeos são muito similares nesta região do ptDNA (Figura 10). Isto reafirma que os híbridos realmente apresentam o mesmo plastoma herdado da planta materna *S. officinarum* e os híbridos comerciais cultivados atualmente apresentam diversidade citoplasmática muito pequena.

A variação genética observada nas regiões alvo dos plastomas de espécies e híbridos do gênero *Saccharum* (região que inclui o gene *ndhF* e regiões intergênicas *trnL-trnL* e *rbcL-petA*) é representada por um baixo acúmulo de mutações ou reduzida taxa de substituição de nucleotídeos, sugerindo que as espécies do gênero *Saccharum* apresentam baixo grau de polimorfismo, sendo incapazes em fornecer dados substanciais para estabelecer relações filogenéticas seguras entre os materiais estudados. Isto já foi observado nos trabalhos de Sobral et al. (1994) e Al-Janabi et al. (1994). Os primeiros autores analisaram filogeneticamente mutações nos sítios de restrição enzimática do genoma cloroplastidial na subtribo *Saccharinae*, mostrando que o gênero *Saccharum* foi separado em dois clados por um único sítio de mutação: um contendo *S. spontaneum*, e o outro contendo todas as outras espécies de *Saccharum* e oito híbridos comerciais de várias regiões do mundo. Al-Janabi et al. (1994), analisando filogeneticamente as seqüências de DNA de cloroplasto e mitocôndria, verificaram a ausência de variação entre as variedades comerciais de cana-de-açúcar analisadas (híbridos de *Saccharum*), sugerindo a existência de uma monocultura citoplasmática mundial, apesar de *S. spontaneum* ser a mais variável das espécies *Saccharum*.

Com o interesse de pesquisar marcadores moleculares filogenéticos em cana-de-açúcar, Bacci Junior et al. (2001) analisaram 17 marcadores, incluindo marcadores nucleares, cloroplastidiais e mitocondriais, em várias espécies do gênero *Saccharum* e verificaram que os valores de *bootstrap* e a quantidade de caracteres informativos para parcimônia eram suportados por poucas mutações e a topologia da árvore poderia ser altamente influenciada por homoplasia (caráter compartilhado por dois táxons, mas que não foi herdado do ancestral comum mais recente de ambos). Eles observaram que os genes cloroplastidiais *rbcL*, *atpA* e *rpoA* proporcionaram baixa porcentagem de caracteres informativos para parcimônia, apresentada pelo alinhamento destes genes de várias espécies de cana-de-açúcar. Por outro lado os genes *rpl16* e *rpoC2* apresentaram taxas evolutivas maiores, desde que seus alinhamentos contaram com 49 % e 59 % de caracteres informativos para parcimônia, respectivamente.

No presente trabalho, a região intergênica entre *rbcL* e *petA* mostrou-se variável, apresentando divergências típicas entre os plastomas estudados. Já a comparação do modelo de deleção no gene *ycf2* e as posições das intersecções entre IR e SSC claramente mostraram que o milho, o sorgo e a cana-de-açúcar estão mais relacionados uns aos outros do que com o trigo e o arroz. Está relação filogenética é suportada pelos trabalhos de Ogihara et al., 1991, Chase et al., 1993, Ohnishi et al., 1999.

4.7 Análise Comparativa de Edição do mRNA de Sorgo

Os produtos amplificados a partir do DNA total e cDNA total de sorgo, utilizando os *primers* desenhados para análise de edição de mRNA (ver Tabela 4, item 3.8), apresentaram os tamanhos esperados em pares de base (Tabela 7).

Tabela 7. Tamanho dos fragmentos amplificados a partir do DNA e cDNA total de sorgo

<i>Genes</i>	<i>Tamanho do fragmento amplificado (pb)</i>	
	<i>Molde DNA total</i>	<i>Molde cDNA total</i>
<i>atpA</i>	355	355
<i>ndhA</i>	2.122	1.100
<i>ndhB</i>	1.816	1.117
<i>ndhD</i>	319	319
<i>ndhF</i>	303	303
<i>petB</i>	315	315
<i>rpl2</i>	335	335
<i>rpl20</i>	319	319
<i>rpoB</i>	423	423
<i>rpoC2</i>	315	315
<i>rps14</i>	288	288
<i>rps8</i>	324	324
<i>ycf3</i> (ORF 170)	1.043	284

Para verificar a possível presença de DNA plastômico contaminante, *primers* foram desenhados para amplificação da região editada em transcritos dos genes *ndhA*, *ndhB* e ORF 170 (*ycf3*), que possuem íntron, sendo que cada *primer* se localiza em um éxon diferente, permitindo a distinção por tamanho dos produtos amplificados a partir do cDNA (sem íntron) e a partir do DNA contaminante (com íntron).

Figura 11 – RT-PCR para análise de edição de transcritos de sorgo. (A) Bandas correspondentes às regiões editadas dos genes *ycf3* (1), *ndhB* (2), *rpoC2* (3), *ndhD* (4), *rpl2* (5), *rpoB* (6), *rps14* (7), *ndhF* (8), *rpl20* (9) amplificadas a partir do cDNA obtido de RNA não tratado com DNase I. (B) Bandas correspondentes às regiões amplificadas do DNA total das regiões dos genes *ycf3* (1), *ndhB* (2), *ndhA* (3) e a partir do cDNA obtido de RNA tratado com DNase I das regiões editadas dos genes *ndhB* (4), *ndhA* (5), *petB* (6), *ndhD* (7), *rpl2* (8), *atpA* (9), *rps8* (10). L = 1 kb DNA ladder plus (Invitrogen Life Technologies)

A Figura 11 apresenta dois géis de agarose 1 % (TAE 1x, 3 V.cm⁻¹). Analisando a Figura 11-A, verifica-se que a amostra 1 (região do gene *ycf3*) apresentou bandas amplificadas a partir do DNA plasmídico contaminante (1.043 pb - tamanho inclui o

íntron do gene *ycf3*) e do cDNA (284 pb), havendo necessidade de tratar o RNA total de sorgo com DNase I para eliminar o DNA contaminante. Na amostra 2 (região do gene *ndhB*) não foi evidente a presença da banda amplificada a partir do DNA contaminante (1.816 pb - tamanho inclui o íntron do gene *ndhB*). As outras amostras presentes na Figura 11-A possivelmente contêm bandas amplificadas a partir do DNA plastômico e do cDNA, entretanto estes fragmentos amplificados apresentam o mesmo tamanho, pois são regiões sem íntron. Na Figura 11-B estão presentes algumas das amplificações realizadas a partir do DNA total de sorgo e do cDNA obtido de RNA total de sorgo tratado com DNase I. Nesta figura observa-se que houve amplificação de bandas de tamanho esperado (ver Tabela 5). Um exemplo são as amostra 2 e 4 (região que inclui o gene *ndhB*) que foram amplificadas, respectivamente, a partir do DNA total de sorgo (1.816 pb - inclui o íntron) e a partir do cDNA obtido de RNA tratado com DNase I (1.117 pb – sem íntron). Outro exemplo são as amostra 3 e 5 (região que inclui o gene *ndhA*) que foram amplificadas a partir do DNA total de sorgo (amostra 3: tamanho banda de 2122 pb – inclui o íntron) e a partir do cDNA obtido de RNA tratado com DNase I (amostra 5: tamanho banda de 1.100 pb – sem íntron).

As seqüências de nucleotídeos dos DNAs e cDNAs relativas às regiões dos genes *atpA*, *ndhA*, *ndhB*, *ndhD*, *ndhF*, *petB*, *rpl2*, *rpl20*, *rpoB*, *rpoC2*, *rps14*, *rps8* e *ycf3* de sorgo foram analisadas e confirmadas quanto à qualidade dos cromatogramas gerados (programa *Vector NTI Suite* 6.0 e programa acessório *ClustalW* no *BioEdit*). O Anexo E apresenta os alinhamentos que incluem as seqüências de nucleotídeos dos genes amplificados a partir do DNA total de sorgo (controles) comparadas com as seqüências de nucleotídeos amplificados dos respectivos cDNAs obtidos a partir do RNA tratado com DNase I. Também foram incluídas nestes alinhamentos as seqüências de nucleotídeos destes genes dos plastomas de milho (Nº de acesso do plastoma de *Zea mays* no *NCBI*: X86563) e de cana-de-açúcar (*homepage* do plastoma de *S. officinarum*, SP80-3280: <http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/sc-chloroplasto>), além da seqüências de nucleotídeos dos cDNAs de milho (Maier et al., 1995) e cana-de-açúcar (Calsa Junior, 2001).

A Tabela 8 apresenta os sítios de edição do mRNA detectados no plastoma de sorgo (*Sorghum bicolor*) comparados aos sítios presentes em cana-de-açúcar (Calsa Junior, 2001) e milho (Maier et al., 1995). Ao analisar os alinhamentos das seqüências destes genes para verificar a edição em sorgo, observou-se que entre as 25 posições já descritas para tais genes no plastoma de milho (*Zea mays*), 24 apresentam transição de C por U. Dos 2 sítios de edição já detectados para o gene *ycf3* (ORF 170), o códon presente na posição 15 do plastoma de milho não apresenta edição nos plastomas de sorgo e cana-de-açúcar (Tabela 8). O cloroplasto de cana-de-açúcar, estudado por Calsa Jr. (2001), apresenta 23 posições de transição de C por U dos 25 sítios de edição analisados. As transições mais freqüentes (uCa para uUa; cCa para cUa) são observadas em milho, mantendo a tendência para a alteração na segunda posição no códon. As análises mostram que milho, sorgo e cana-de-açúcar seguem o mesmo modelo de edição de RNA no plastoma, exceto para *rpoB* (posição 206 do códon no plastoma de milho não apresenta edição no plastoma de cana-de-açúcar) e *ycf3* (posição 15 do códon no plastoma de milho não apresenta edição nos plastomas de sorgo e cana-de-açúcar), e a hipótese seria de que praticamente as mesmas necessidades de edição do RNA existentes nos cloroplastos de milho são observadas nestas organelas de sorgo e cana-de-açúcar (Tabela 8).

Analisando a Tabela 8, verifica-se que nos sítios em que ocorrem as edições todos os códons apresentam mudança de aminoácidos, sendo que a mais comum é a alteração do aminoácido serina pelo aminoácido leucina. A edição do mRNA, um processo de modificação pós-transcricional, representa uma forma de controle genético regulatório nas células eucarióticas. A edição freqüentemente restabelece os resíduos de aminoácidos conservados nas proteínas correspondentes e assim representam uma função importante, eliminando os erros nas seqüências ao nível de mRNA.

Tabela 8. Sítios de edição do mRNA detectados no plastoma de sorgo (*Sorghum bicolor*) e comparados aos sítios presentes em cana-de-açúcar (Calsa Junior, 2001) e milho (Maier et al., 1995)

Gene	Posição do códon no ptDNA de milho	Códon editado	Mudança no aminoácido	Espécies ^a		
				<i>Sorghum bicolor</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	<i>Zea mays</i>
<i>atpA</i>	383	uCa	S → L	+	+	+
<i>ndhA</i>	17	uCg	S → L	+	+	+
	158	uCa	S → L	+	+	+
	188	uCa	S → L	+	+	+
	357	uCc	S → F	+	+	+
<i>ndhB</i>	156	cCa	P → L	+	+	+
	196	Cau	H → Y	+	+	+
	204	uCa	S → L	+	+	+
	246	cCa	P → L	+	+	+
	277	uCa	S → L	+	+	+
	494	cCa	P → L	+	+	+
<i>ndhD</i>	293	uCa	S → L	+	+	+
<i>ndhF</i>	21	uCa	S → L	+	+	+
<i>petB</i>	204	cCa	P → L	+	+	+
<i>rpl2</i>	1	aCg	T → M	+	+	+
<i>rpl20</i>	103	uCa	S → L	+	+	+
<i>rpoB</i>	156	uCg	S → L	+	+	+
	182	uCa	S → L	+	+	+
	187	uCg	S → L	+	+	+
	206	cCg	P → L	+	-	+
<i>rpoC2</i>	925	uCg	S → L	+	+	+
<i>rps14</i>	27	uCa	S → L	+	+	+
<i>rps8</i>	61	uCa	S → L	+	+	+
<i>ycf3</i>	15	uCc	S → F	-	-	+
	62	aCg	T → M	+	+	+

^a Abreviações: +, edição; -, não editado.

Como apresentado, além da significativa similaridade estrutural entre os plastomas das espécies de cana-de-açúcar, milho e sorgo, uma possível identidade entre os mecanismos de regulação da expressão gênica plastidial, especialmente em relação ao mecanismo de edição de mRNA.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir:

- A variabilidade genética entre os genomas cloroplastidiais de espécies e híbridos do gênero *Saccharum* (*S. officinarum* variedade Badila, *S. barberi* Saretha variedade Chunnee, *S. robustum* variedade Molokai 5099, *S. spontaneum* variedade Krakatau e híbridos SP80-3280, POJ 2878, CP72-1210 e H72-1522) nas regiões estudadas (região *16S rDNA*, regiões intergênicas *trnI-trnL* e *rbcL-petA*, genes *psbA*, *ndhH*, *ndhF* e *rpl22* que se encontram nas intersecções do plastoma ou próximos delas) apresentou baixo grau de polimorfismo.
- A espécie *S. spontaneum* (Krakatau) apresentou maior taxa de mutação ao nível de nucleotídeo nas regiões intergênicas *trnI-trnL* e *rbcL-petA*, e na região que inclui o gene *ndhF*.
- A comparação do modelo de deleção do gene *ycf2*, localizado entre os genes *trnI* e *trnL*, e as posições das intersecções entre IR e SSC do plastoma mostraram que as espécies de cana-de-açúcar, milho e sorgo estão mais relacionadas umas as outras do que com as espécies de trigo e arroz.
- A região intergênica *rbcL-petA* mostrou-se variável ao nível de nucleotídeos, apresentando divergências típicas entre os plastomas das espécies *Poaceae* estudadas.

- Existe maior identidade entre os plastomas de cana-de-açúcar, sorgo e milho tanto nas regiões codificadoras como intergênicas, o que sugere uma evolução comum entre eles, além de uma possível identidade entre os mecanismos de regulação da expressão gênica plastidial, especialmente em relação ao mecanismo de edição do mRNA. A maior divergência ao nível de nucleotídeo ocorreu nos plastomas de arroz e trigo que não dividem este alto nível de similaridade.
- A região que inclui o gene *ndhF* e as regiões intergênicas *trnI-trnL* e *rbcL-petA* podem se tornar marcadores preferenciais para estudar a posição sistemática de cultivares de cana-de-açúcar de interesse em relação às espécies da família *Poaceae*.
- Pela análise das seqüências de nucleotídeos das regiões selecionadas do plastoma foi possível concluir que não existe diversidade genética citoplasmática entre as espécies e híbridos de cana-de-açúcar estudados.

ANEXOS

**ANEXO A – Genealogias dos híbridos selecionados para o estudo
(SP80-3280, POJ2878, CP72-1210 e H72-1522).**

GENEALOGIA: HÍBRIDO SP80-3280

Híbrido SP80-3280 está circulado por linha contínua. (Fonte: Copersucar)

GENEALOGIA: HÍBRIDO H72-1522

Híbrido H72-1522 está circulado por linha contínua. (Fonte: Copersucar)

ANEXO B – Alinhamentos da região que inclui o gene *ndhF*. Os códons de iniciação e terminação de cada gene estão marcados em cinza. O nome do gene está próximo dos códons de iniciação e terminação. As linhas contínuas que estão ao redor das bases nitrogenadas delimitam o gene do início ao fim. Os pontos alinhados representam as mesmas bases nitrogenadas do híbrido SP80-3280. Os traços representam os *gaps* (deleções de bases nitrogenadas). As mutações são apresentadas pelas bases nitrogenadas em negrito que diferem do híbrido SP80-3280.

PSP80-3280	AATATTTTAATGAGGAATTT-GAAAAATCCAGAAATTCACGATTTTTTGGCTTTCTCT	218
POJ2878		218
H72-1522		218
CF72-1210		218
BADILIA		218
MOLOKAI		218
CHUNNEE		218
KERAKTAU	T T	217
SORGO		198
MILHO		215
ARRAZOZ	- T G C A T T T A	200
TRIGO	T C T T T T A	236

PF80-3280	TGTCAATGGGATTTGGACTTTTCTTTATTTCCACACACAAAAATCTTCTGTCGATAT	451
PFJZ878		451
472-1222		451
PF72-1210		451
SADILA		451
MOLOKAI		451
HUNNEE		451
GRAKATAU		450
SORGO		431
ILILHO	 T	453
ARBOZ	 G	426
ARBOZ	 G	461

SP80-3280	GGGCTTTTCCTAGTATTTTACTCTTTAGTATAGCTATGATTTCTCACTTCACCTGCTA	511
POJ2878		511
H72-1522		511
CP72-1210		511
BADILA		511
MOLOKAI		511
CHUNNEE		511
KRAKATAU		510
SORGO		491
MILHO		513
ARROZ		486
TRIGO		521
SP80-3280	TTGACAAATTAAGGAGCTTCTATCTATCAATATCTATGCTTGGACCACTCATATG	571
POJ2878		571
H72-1522		571
CP72-1210		571
BADILA		571
MOLOKAI		571
CHUNNEE		571
KRAKATAU		570
SORGO		551
MILHO		573
ARROZ		546
TRIGO		581
SP80-3280	ATTTTCTCTAGAACTTGGAACTTGTGTCGACCCCTTACTGCTATTTATTAATCAAA	631
POJ2878		631
H72-1522		631
CP72-1210		631
BADILA		631
MOLOKAI		631
CHUNNEE		631
KRAKATAU		630
SORGO		611
MILHO		633
ARROZ		606
TRIGO		641
SP80-3280	TTACTACTGTAGGAATCTTAGTCTCTTATTTATATAGTACGATTATATGCTCAGATGAAG	691
POJ2878		691
H72-1522		691
CP72-1210		691
BADILA		691
MOLOKAI		691
CHUNNEE		691
KRAKATAU		690
SORGO		671
MILHO		683
ARROZ		666
TRIGO		701
SP80-3280	CATATTTGAGATTTTGTGTTATATATAGCTTTTATTAATCTTCCATGTTGGATGGTTAA	751
POJ2878		751
H72-1522		751
CP72-1210		751
BADILA		751
MOLOKAI		751
CHUNNEE		751
KRAKATAU		750
SORGO		731
MILHO		753
ARROZ		726
TRIGO		761
SP80-3280	CTAGTCCATTTGATGATCAAAATTTATTTTTTTGGGAATCTGCGGATGTTCCATAT	811
POJ2878		811
H72-1522		811
CP72-1210		811
BADILA		811
MOLOKAI		811
CHUNNEE		811
KRAKATAU		810
SORGO		791
MILHO		813
ARROZ		786
TRIGO		821
SP80-3280	TATGTATAGCTTTTGTGTTTACGGGCAATGTCAGAGTGTCTGTCAAAAAGCTTTTG	871
POJ2878		871
H72-1522		871
CP72-1210		871
BADILA		871
MOLOKAI		871
CHUNNEE		871
KRAKATAU		870
SORGO		851
MILHO		873
ARROZ		846
TRIGO		881
SP80-3280	TAACTAATCGTGTAGGGATTTTGTCTGTCTATTAGCAATTTTAGTTTTTTTTTCGATAA	931
POJ2878		931
H72-1522		931
CP72-1210		931
BADILA		931
MOLOKAI		931
CHUNNEE		931
KRAKATAU		930
SORGO		911
MILHO		933
ARROZ		906
TRIGO		941

SP80-3280	CCGATCCGTTATTCATCATGGAACCTCTTTGGGATTTACACAGATANAAGTCA	1471	SP80-3280	GATTAAGTCAATTTATATGTTCCGATATATTTACTTTTGAAGGCTATTTGGG	1711
POJ2878		1471	POJ2878		1711
H72-1522		1471	H72-1522		1711
CP72-1210		1471	CP72-1210		1711
BADILA		1471	BADILA		1711
MOLOKAI		1471	MOLOKAI		1711
CHUNNEE		1471	CHUNNEE		1711
KRAKATAU		1470	KRAKATAU		1710
SORGO		1451	SORGO		1691
MILHO		1473	MILHO		1713
ARROZ		1446	ARROZ		1686
TRIGO		1481	TRIGO		1721
SP80-3280	ATATGCTCTTATGGGCTTTAAGAAATAGCTTCCATTAAGAACTACTTTTTAT	1531	SP80-3280	TTCTTTTCAAAATACAGTAGTAGTAAGAGGCTGGTGTATTCATATCCTTTAGG	1771
POJ2878		1531	POJ2878		1771
H72-1522		1531	H72-1522		1771
CP72-1210		1531	CP72-1210		1771
BADILA		1531	BADILA		1771
MOLOKAI		1531	MOLOKAI		1771
CHUNNEE		1531	CHUNNEE		1771
KRAKATAU		1530	KRAKATAU		1770
SORGO		1511	SORGO		1751
MILHO		1533	MILHO		1773
ARROZ		1506	ARROZ		1746
TRIGO		1541	TRIGO		1781
SP80-3280	GTGGTACACTTCTCTTTGGTATTCACACTCTGTGCTGTCTGTGCTCAAGATGA	1591	SP80-3280	GAAGAAGTATATCCAAAGAGCTCAATAGGATTTGTTTATCAACAATGAAGTGGAG	1831
POJ2878		1591	POJ2878		1831
H72-1522		1591	H72-1522		1831
CP72-1210		1591	CP72-1210		1831
BADILA		1591	BADILA		1830
MOLOKAI		1591	MOLOKAI		1831
CHUNNEE		1591	CHUNNEE		1831
KRAKATAU		1590	KRAKATAU		1830
SORGO		1571	SORGO		1811
MILHO		1593	MILHO		1833
ARROZ		1566	ARROZ		1806
TRIGO		1601	TRIGO		1841
SP80-3280	TACTTAGTATATAGTGGTGTATTCACCTTTTGGGATATATAGCTCTTTTACTG	1651	SP80-3280	TTTCTTTTTTTCACAAA-TATACCCAAAATTCCTGCTATATACAGAAATAGTAGGA	1890
POJ2878		1651	POJ2878		1890
H72-1522		1651	H72-1522		1890
CP72-1210		1651	CP72-1210		1890
BADILA		1651	BADILA		1889
MOLOKAI		1651	MOLOKAI		1890
CHUNNEE		1651	CHUNNEE		1889
KRAKATAU		1650	KRAKATAU		1889
SORGO		1631	SORGO		1870
MILHO		1653	MILHO		1892
ARROZ		1626	ARROZ		1865
TRIGO		1661	TRIGO		1900

SP80-3280 TAAGACTACTAT-AAGACTACTATAATAATAAGACT-ACTATAATAATAAGAAAAA- 2660
 POJ2878 2660
 H72-1522 2660
 CP72-1210 2660
 BADILA 2658
 MOLOKAI 2660
 CHUNNEE 2658
 KRAKATAU 2658
 SORGO 2622
 MILHO 2644
 ARROZ 2840
 TRIGO ..GG.TTC..A..C..T..ACATCCTC.CC..CG..G.A..G..-C..C-..G..C.C 2768

SP80-3280 --TTCGACGATTAA---TTACTTCOCGAATATCCAACTGACTGATTAATTTCTTA 2714
 POJ2878 2714
 H72-1522 2714
 CP72-1210 2714
 BADILA 2712
 MOLOKAI 2714
 CHUNNEE 2712
 KRAKATAU 2712
 SORGO 2676
 MILHO ---GA.....CG....T..... 2698
 ARROZ -A.....G.....CG....T..... 2895
 TRIGO CA.G.-----G.TGGGTG.TGAGGG..AT..TGA.T.TCAUGA..CT-.....G 2822

SP80-3280 TAA---CGTACTC-TATTTTCTTTGCC-AAATAAG-----CCAGCAAACGTTGACGTT 2763
 POJ2878 2763
 H72-1522 2763
 CP72-1210 2763
 BADILA 2761
 MOLOKAI 2763
 CHUNNEE 2761
 KRAKATAU 2761
 SORGO 2725
 MILHO 2747
 ARROZ 2944
 TRIGO ...GCGGTAG...A...-CC.T.C.T..TT...TCATTATT...TG...ATGGATT- 2879

SP80-3280 TTCCCAAAAGCTCTCGTAG--ACCTCTTTC--GATGAAA 2800
 POJ2878 2800
 H72-1522 2800
 CP72-1210 2800
 BADILA 2798
 MOLOKAI 2801
 CHUNNEE 2798
 KRAKATAU 2798
 SORGO 2762
 MILHO 2784
 ARROZ 2981
 TRIGOATG..T..C..AA..CG.GGCTCA..AAA..... 2919

ANEXO C – Alinhamentos da região intergênica entre *trnI* e *trnL*. Os códonos de iniciação e terminação de cada gene estão marcados em cinza. O nome de cada gene está próximo dos códonos de iniciação e terminação. As linhas contínuas que estão ao redor das bases nitrogenadas delimitam cada gene do início ao fim. Os pontos alinhados representam as mesmas bases nitrogenadas do híbrido SP80-3280. Os traços representam os *gaps* (deleções de bases nitrogenadas). As mutações são apresentadas pelas bases nitrogenadas em negrito que diferem do híbrido SP80-3280.

SP80-3280	GAGATTCCATGATAGAGAGCAGTTCCTCCATAGAC-----CGTCCCGTTCCGCGGCG	52
POJ2878		52
H72-1522	G.....	52
CP72-1210		52
BADILA		52
MOLOKAI		52
CHUNNEE		52
KRAKATAU		52
SORGO		52
MILHO	A.....	52
ARROZ	T.....	60
TRIGO	T.....	60

SP80-3280	ATCCAGCAGGAATTGAACCGCAATTACCAATTGAGTTGGGCGCTTTACCATCTCA	112
POJ2878		112
H72-1522		112
CP72-1210		112
BADILA		112
MOLOKAI		112
CHUNNEE		112
KRAKATAU		112
SORGO		112
MILHO		112
ARROZ		120
TRIGO		120

SP80-3280	CCCATGGGATTTTAAACAGGATCATCGTACATCGTAATATACCAATTTTCATATAGAG	172
POJ2878		172
H72-1522		172
CP72-1210		172
BADILA		172
MOLOKAI		172
CHUNNEE		172
KRAKATAU		172
SORGO		172
MILHO		172
ARROZ		180
TRIGO		180

SP80-3280	ACATATCATAGAAAATGGAATCGGAATATTCGGAGTGGCAATATTCGGAGATGACT	232
POJ2878		232
H72-1522	TCG.....	232
CP72-1210		232
BADILA		232
MOLOKAI		232
CHUNNEE	TCG.....	232
KRAKATAU		232
SORGO		232
MILHO		232
ARROZ		240
TRIGO	C.....	240

SP80-3280	ATGAAAAACCTCTCCGGATCTCTGAAATTGAAAGAGAGATTGAGAGGATCAGAAATCTCT	292
POJ2878		292
H72-1522		292
CP72-1210		292
BADILA		292
MOLOKAI		292
CHUNNEE		292
KRAKATAU		292
SORGO	T.....	292
MILHO	C.....	292
ARROZ	T.....	300
TRIGO	C.....	299

SP80-3280	AATCTCGCTATTGGAGTGGATCCAAATTTCTATGAGTCTGACCCATGATGATCTTCT	352
POJ2878		352
H72-1522		352
CP72-1210		352
BADILA		352
MOLOKAI		352
CHUNNEE		352
KRAKATAU		352
SORGO		352
MILHO	T.....	360
ARROZ	T.....	359
TRIGO		359

SP80-3280	CTTTACAAAGNAGACCTTGTTATCAAGGATTGACCAAGTGGACCAACCGAGATCTTACTAT	412
POJ2878		412
H72-1522		412
CP72-1210		412
BADILA		412
MOLOKAI		412
CHUNNEE		412
KRAKATAU		412
SORGO		412
MILHO		412
ARROZ	G.....	420
TRIGO	G.....	419

SP80-3280	GATACCTAGTTGACATTGCTAACCAAGATCTTAATGAATTAAGATTAAATAGATCTCTCT	472
POJ2878		472
H72-1522		472
CP72-1210		472
BADILA		472
MOLOKAI		472
CHUNNEE		472
KRAKATAU		472
SORGO		472
MILHO	A.....	480
ARROZ	A.....	479
TRIGO		479

GTGGGGCTAATCGTTTTTCATTTACATCTCATCGGACACCTTTTCGTTCCGCTTAGCC	592
POZ878	592
H72-1522	592
CF72-1210	592
BADILIA	592
MOMOLOKAI	592
CHUNNEE	592
KEAKATAU	592
SORGO	592
MILHO	592
PARROZ	589
TRIGO	588

SP80-3280	TATCGGTATTTTATCGTAGAGTCTCTATAGACTGACGATCCATTTTGGTCAATAC	652
POJ2878		652
HT7-1522		652
CF72-1210		652
BADILIA		652
MOLOKAI		652
CHUNNEE		652
KRAKATAU		652
SORGO		652
MILHO		652
PARROZ		649
TRIGO		648

SF80-3280	TACGAAATTCCTATTTCCTTCCATTAAGCTACGAGCGCCTCTCTATTCCACAGAAC	712
POJ2878		712
H72-1522		712
CFP72-1210		712
BADILIA		712
MOLOKAI		712
CHUNNEE		712
KRAKATAU		712
SORGO		712
MILHO		712
PAROZ	A	709
TRIGO	A	708

SP80-3280	GTTCCTACTAAGAGTTCGGGTCCATACACGAGTTCGACCTAGATCTTGAC	827
POJ2876		827
H72-1522		827
CF72-1210		827
BAD11A		827
MOLOKAI		827
CHUNNEE		827
KRAKATAU		827
SORGO		827
MILHO		827
PARROZ		827
TRIGO		828

SEP80-3280	ACTTTGACGAGGGCGCTATCCATTAGTATTCGACATWAGAAATCCATTATAGAAACTTA	887
POJ2878		887
H72-1522		887
PF72-1210		887
BADILA		887
MOLOKAI		887
CHUNNEE		887
KAKAKATAU		887
SORGO		887
MILHO		887
ARRIZO	-----	849
URIGO	-----	848

[illegible]

SP80-3280 TCGGATCATGGACCCCTTTCTTATCAGATAGAGGGGATCTTGTACAAATAGACTTCT 1007
 POJ2878 1007
 H72-1522 1007
 CP72-1210 1007
 BADILA 1007
 MOLOKAI 1007
 CHUNNEE 1007
 KRAKATAU 1007
 SORGO 1007
 MILHO 1007
 ARROZ 849
 TRIGO 848

SP80-3280 ACTTCTAAGTAATAACCCATAGATCTATATCTATATATAAAGAGGCAATCGTGCTCA 1067
 POJ2878 1067
 H72-1522 1067
 CP72-1210 1067
 BADILA 1067
 MOLOKAI 1067
 CHUNNEE 1067
 KRAKATAU 1061
 SORGO 1061
 MILHO 849
 ARROZ 848
 TRIGO 848

SP80-3280 GGAGGGGCTTTTCTTTGGCCAAAG-----TCGAACTTGGACGAGCATGAGAGATT 1122
 POJ2878 1122
 H72-1522 1122
 CP72-1210 1122
 BADILA 1122
 MOLOKAI 1122
 CHUNNEE 1122
 KRAKATAU 1116
 SORGO 1121
 MILHO 1121
 ARROZ 849
 TRIGO 848

SP80-3280 AACGAGACTTCTTCTTTTGTAGTTTCTGGGGACGGTCGGCAAGACTTTGGTC 1182
 POJ2878 1182
 H72-1522 1182
 CP72-1210 1182
 BADILA 1182
 MOLOKAI 1182
 CHUNNEE 1182
 KRAKATAU 1176
 SORGO 1181
 MILHO 1181
 ARROZ 849
 TRIGO 848

ORE241 (milho)

SP80-3280 TTCCCCCGAACCCGATGCTAAGTGGGTCCCTCTTATGGACTCGCTCAGATGATCTTT 1242
 POJ2878 1242
 H72-1522 1242
 CP72-1210 1242
 BADILA 1242
 MOLOKAI 1242
 CHUNNEE 1242
 KRAKATAU 1236
 SORGO 1241
 MILHO 1240
 ARROZ 849
 TRIGO 848

ORE241 (canas e sorgo)

SP80-3280 CTCTATCTATATTTCATGGCCTATTAGAGTAGAGGTGCTCTGTGCAATCCCTTACGA 1302
 POJ2878 1302
 H72-1522 1302
 CP72-1210 1302
 BADILA 1302
 MOLOKAI 1302
 CHUNNEE 1302
 KRAKATAU 1296
 SORGO 1301
 MILHO 1300
 ARROZ 849
 TRIGO 848

SP80-3280 CAGAAAAGATTGCAGTCGGGTGATAATATCGAGTGCCATTACTTCGTGCGTCCGAAC 1362
 POJ2878 1362
 H72-1522 1362
 CP72-1210 1362
 BADILA 1362
 MOLOKAI 1362
 CHUNNEE 1362
 KRAKATAU 1356
 SORGO 1361
 MILHO 1360
 ARROZ 849
 TRIGO 848

SP80-3280 CAGGATCCGTTAGAAATGTTTGAATGATATTGTCTCTCTTGTATTGGATGCT 1422
 POJ2878 1422
 H72-1522 1422
 CP72-1210 1422
 BADILA 1422
 MOLOKAI 1422
 CHUNNEE 1422
 KRAKATAU 1416
 SORGO 1421
 MILHO 1420
 ARROZ 849
 TRIGO 848

ORF139 (canas, sorgo e milho)	
SP80-3280	ATATGAAAGAGTGGAGTTTGAAAAAGGGAACGGAAATGGTCAACCGGAACCTCTAGAG 1482
POJ2878	 1482
H72-1522	 1482
CP72-1210	 1482
BADILA	 1482
MOLOKAI	 1482
CHUNNEE	 1482
KRAKATAU	 1476
SORGO	 1481
MILHO	 1480
ARROZ	 849
TRIGO	----- 848
SP80-3280	GAACGAATTTCAATAGCATACACTTGGCTCTCTAGATATGGGGCCCTTGGGCAATCTA 1542
POJ2878	 1542
H72-1522	 1542
CP72-1210	 1542
BADILA	 1542
MOLOKAI	 1542
CHUNNEE	 1542
KRAKATAU	 1536
SORGO	 1541
MILHO	 1540
ARROZ	 849
TRIGO	----- 848
SP80-3280	TTTGATGCAGGACAGGTACCTCGAATATGACTGGGATTTCTTATGGGTATTTGAGC 1602
POJ2878	 1602
H72-1522	 1602
CP72-1210	 1602
BADILA	 1602
MOLOKAI	 1602
CHUNNEE	 1602
KRAKATAU	 1596
SORGO	 1601
MILHO	 1600
ARROZ	 849
TRIGO	----- 848
SP80-3280	GGGTCCACGACATTAAGAGGATGCTCTCAGAGACTGCTATTATTTCGATTTATTC 1662
POJ2878	 1662
H72-1522	 1662
CP72-1210	 1662
BADILA	 1662
MOLOKAI	 1662
CHUNNEE	 1662
KRAKATAU	 1656
SORGO	 1661
MILHO	 1660
ARROZ	 849
TRIGO	----- 848
ORF139 (canas, sorgo e milho)	
SP80-3280	TGGTATATTATCAATAAAGGGGGAGTGCAGAGACTGATTCGGACTTCTTCAGACT 1722
POJ2878	 1722
H72-1522	 1722
CP72-1210	 1722
BADILA	 1722
MOLOKAI	 1722
CHUNNEE	 1722
KRAKATAU	 1716
SORGO	 1721
MILHO	 1720
ARROZ	 849
TRIGO	----- 848
SP80-3280	GGAAATGCTACCAACAGACAGATATATCTTCAAGAAGAGCGCTTTTTCGATA 1782
POJ2878	 1782
H72-1522	 1782
CP72-1210	 1782
BADILA	 1782
MOLOKAI	 1782
CHUNNEE	 1782
KRAKATAU	 1776
SORGO	 1781
MILHO	 1780
ARROZ	 849
TRIGO	----- 848
SP80-3280	AGCCAAATGATTTGGACCTTGGATCCATCTTTTCTTATCAAGTACAGCCCTTG 1842
POJ2878	 1842
H72-1522	 1842
CP72-1210	 1842
BADILA	 1842
MOLOKAI	 1842
CHUNNEE	 1842
KRAKATAU	 1836
SORGO	 1841
MILHO	 1839
ARROZ	 849
TRIGO	----- 848
ORF139 (canas, sorgo e milho)	
SP80-3280	TCTCTGTGTTTTCACGTCGAGATCTTTTCAGATCGAATGATGAAGAGATGCGAAGGGC 1902
POJ2878	 1902
H72-1522	 1902
CP72-1210	 1902
BADILA	 1902
MOLOKAI	 1902
CHUNNEE	 1902
KRAKATAU	 1896
SORGO	 1901
MILHO	 1899
ARROZ	 849
TRIGO	----- 848

SP80-3280 TTAGTACCAAGTACCTGGAGAAAAGAGCTCTTAACATATGGTACCACTGGTTCCAC 1962
POJ2878 1962
H72-1522 1962
CP72-1210 1962
BADILA 1962
MOLOKAI 1962
CHUNNEE 1962
KRAKATAU 1956
SORGO T. 1961
MILHO 1959
ARROZ 849
TRIGO 848

ORF 38 (canap, sorgo e milho)

SP80-3280 GGAGTAGCGCAAGGCAAGGCAAGGCTACCAATAGTATGATTTAGTAATGGGATGGGCTA 2022
POJ2878 2022
H72-1522 2022
CP72-1210 2022
BADILA 2022
MOLOKAI 2022
CHUNNEE 2022
KRAKATAU 2016
SORGO 2021
MILHO T. 2019
ARROZ 849
TRIGO 848

SP80-3280 GAACCTGGGTTCTTCCTTATATATTAATGATGGTCTTTTCATTTCTATATCTATCCGAGA 2082
POJ2878 2082
H72-1522 2082
CP72-1210 2082
BADILA 2082
MOLOKAI 2082
CHUNNEE 2082
KRAKATAU 2076
SORGO 2081
MILHO 2079
ARROZ 849
TRIGO 848

SP80-3280 GTTCTCAGTATTAGCAAGCTGTTCCTATCTATCTAACGGAAGCTCTCGGATCAATGACAA 2142
POJ2878 2142
H72-1522 2142
CP72-1210 2142
BADILA 2142
MOLOKAI 2142
CHUNNEE 2142
KRAKATAU 2136
SORGO 2141
MILHO 2139
ARROZ 849
TRIGO 848

SP80-3280 AGACATTGTTTGTGGAGAAAAGAGTGGCTTTTCCGGATGAAATGAAACATTTCATTGT 2202
POJ2878 2202
H72-1522 2202
CP72-1210 2202
BADILA 2202
MOLOKAI 2202
CHUNNEE 2202
KRAKATAU 2196
SORGO 2201
MILHO 2199
ARROZ 849
TRIGO 848

SP80-3280 GTAACAGAGAAAGATTTCCTCCTTAGCCGTAAAGATATGTGCCATGAAAAGGGA 2262
POJ2878 2262
H72-1522 2262
CP72-1210 2262
BADILA 2262
MOLOKAI 2262
CHUNNEE 2262
KRAKATAU 2256
SORGO 2261
MILHO 2259
ARROZ 849
TRIGO 848

SP80-3280 GGGGATTCACTGGAACAGGATTGGCCGGCGGTAGTCTGTTGGAACACTGTGTGATCC 2322
POJ2878 2322
H72-1522 2322
CP72-1210 2322
BADILA 2322
MOLOKAI 2322
CHUNNEE 2322
KRAKATAU 2316
SORGO 2321
MILHO 2319
ARROZ 849
TRIGO 848

SP80-3280 TATTTTGGACCTTAGCTCCATGGAACAATATGCTACTCGGAACATGGAAGAATTGCAA 2382
POJ2878 2382
H72-1522 2382
CP72-1210 2382
BADILA 2382
MOLOKAI 2382
CHUNNEE 2382
KRAKATAU 2376
SORGO 2381
MILHO 2379
ARROZ 849
TRIGO 848

SP80-3280	TCTTAGATCAAAACACTATGTATGGGAGATATGAACTGCCCTAAATAAGAAATCTTGACG	2442
POJ2878		2442
H72-1522		2442
CF72-1210		2442
BADILA		2442
MOLOKAI		2442
CHUNNEE		2442
KRAKATAU		2436
SORGO		2441
MIHO		2439
ARROZ		849
TRIGO		848

SP80-3280	GTCGAATTAACCTGAGTACTACTACTACATCAACAATTTGCATTAATGAACCTGTGTAATC	2502
POJ2878		2502
H72-1522		2502
CF72-1210		2502
RADILA		2502
MOLOKAI		2502
CHUNNEE		2502
KRANKATAU		2496
SORGO		2501
MTLHO		2499
PAROZ		849
TRIGO		848

SP80-3280	CACCGGTAATCAAAAATFACGACATGTCGATGAATGGTGTGCTATCTGTTCCATAA	2562
POJ2878		2562
HT2-1522		2562
CF72-1210		2562
BRADIIA		2562
MOLOKAI		2562
CHUNNEE		2562
KGARATAU		2562
SORGO		2561
MILHO		2559
PAROZ		849
TRIGO		848

CGAATCCTTGTTTAACTGATATAGTAATGAGAAATGGCCCTTTCTCTTCGTCACATC	2622
.....	2622
POJ2878	2622
HT2-1522	2622
CF72-1210	2622
BRADIA	2622
.....	2622
VOLOKAI	2622
.....	2622
CHUNNEE	2622
.....	2616
KAKATAU	2621
.....	2621
SORGO	2619
.....	2619
MTLHO	849
BARROZ	848
.....	848
TRIGO	848

SP80-3280	GATGATCTTCGATTTGGAAGATCTCCCATATGGATTAATACACATTCGATTCACCGAG	3682
POJ2878		3682
H72-1522		3682
CF72-1210		3682
RADIIA		3682
CHOLKAI		3682
CHUNNEE		3682
KAKAKAU		3676
SORGO		3681
MILHO		3679
PARROZ		349
TRIGO		348

yvcf15 (canas, sorgo e milho)

CCU	ATGCTAATGTTTTTCTCCGAGCAAAAGATATCCGCGGAGCGGCTTCGTTCTGTCCTCC	2742
SSP80-3280		2742
POJ2878		2742
H72-1522		2742
CF72-1210		2742
BRADILIA		2742
MOLOKAI		2742
CHUNNEE		2742
KKAKATAU		2736
SORGO		2741
MILHO		2739
PARROZ		849
TRIGO		848

3280	TATTCTGATATTCAGGACCAAGAGGTCTCTGCGATTCCTTCCTGGATAGGCCCCCTGAAAGGAG	2802
POJ2878		2802
H72-1522		2802
CP72-1210		2802
GRADILIA		2802
VOLOKAI		2802
CHUNNEE		2802
KKAKATAU		2796
SORGO		2801
MILHO		2799
BARROZ		849
TRIGO		848

PF80-3280	AGAGAGCTGAATCCAGAGGACTCTGCTCTATCTCTAAATCCACGGATCCGATAGT	2862
POJ2878		2862
H72-1522		2862
PF72-1210		2862
RAD1A		2862
VOLOKAI		2862
CHURNEE		2862
KRAKATAU		2856
SORGO		2861
MILHO		2859
PARROZ	-----	849
TRIGO	-----	848

SP80-3280 ACCGGTTTGGAGCCTCCAGTCCGACCAAGTCACTCAATGGGTGAGTCAACCAATCC 2922
 FOJ2878 2922
 H72-1522 2922
 CP72-1210 2922
 BADILA 2922
 MOLOKAI 2922
 CHUNNEE 2922
 KRAKATAU 2916
 SORGO 2921
 MILHO 2919
 ARROZ 849
 TRIGO 848

SP80-3280 CTTTGCAATCGGGTGTCAATATAGATATCATATCTATATATATAGAAATATCATAGA 2982
 FOJ2878 2982
 H72-1522 2982
 CP72-1210 2982
 BADILA 2982
 MOLOKAI 2982
 CHUNNEE 2982
 KRAKATAU 2976
 SORGO 2981
 MILHO 2979
 ARROZ 851
 TRIGO 850

ycf15 (canas, sorgo e milho)

SP80-3280 ATGACATATAGAAATTTTGGTGGGAATTCGAATGATCATGATGAGTGAAGAGCA 3042
 FOJ2878 3042
 H72-1522 3042
 CP72-1210 3042
 BADILA 3042
 MOLOKAI 3042
 CHUNNEE 3042
 KRAKATAU 3036
 SORGO 3041
 MILHO 3039
 ARROZ 911
 TRIGO 910

ORF173 (canas, sorgo e milho)

SP80-3280 AAGAGCAAAAGAGACTACTAGTCTCTACCTCTGCTGGGTTCCTCGGTTCTAT 3102
 FOJ2878 3102
 H72-1522 3102
 CP72-1210 3102
 BADILA 3102
 MOLOKAI 3102
 CHUNNEE 3102
 KRAKATAU 3096
 SORGO 3101
 MILHO 3099
 ARROZ 971
 TRIGO 970

ORF249 (arroz e trigo)

SP80-3280 TTTCTTTATGCGGATCTTGCTTTTCATGCTTCATCTCTGCAATCTCGGATTTCCGCA 3162
 FOJ2878 3162
 H72-1522 3162
 CP72-1210 3162
 BADILA 3162
 MOLOKAI 3162
 CHUNNEE 3162
 KRAKATAU 3156
 SORGO 3161
 MILHO 3159
 ARROZ 1031
 TRIGO 1030

SP80-3280 GAGAACCAATCCAAATCTAGTTGGTGAAGATCATGATTTGGGCTGGCATAGTATTACCTT 3222
 FOJ2878 3222
 H72-1522 3222
 CP72-1210 3222
 BADILA 3222
 MOLOKAI 3222
 CHUNNEE 3222
 KRAKATAU 3216
 SORGO 3221
 MILHO 3219
 ARROZ 1091
 TRIGO 1090

SP80-3280 TGCAATGGGGTTGCAATCTATCCGATCTTATCTTTTGTCAAGACGAATAAACC 3282
 FOJ2878 3282
 H72-1522 3282
 CP72-1210 3282
 BADILA 3282
 MOLOKAI 3282
 CHUNNEE 3282
 KRAKATAU 3276
 SORGO 3281
 MILHO 3279
 ARROZ 1151
 TRIGO 1150

SP80-3280 CTTTGTGTAGGCCCTTTATGATAAGCTTCCTCGATCTGGGAAGTTTCTCTTCAGGTA 3342
 FOJ2878 3342
 H72-1522 3342
 CP72-1210 3342
 BADILA 3342
 MOLOKAI 3342
 CHUNNEE 3342
 KRAKATAU 3336
 SORGO 3341
 MILHO 3339
 ARROZ 1211
 TRIGO 1210

SP80-3280 TTGGATCGTTTGTATCGATTCCTTGTATCGCTACTATGGCGTGCCTCAAAGGATACA 3402
POJ2878 3402
H72-1522 3402
CF72-1210 3402
BADILA 3402
MOLOKAI 3402
CHUNNEE 3402
KRAKATAU 3396
SORGO 3401
MILHO 3399
ARROZ 1271
TRIGO 1270

SP80-3280 AACAGGGATCGCAACAAAGAGGGGATTCGTATGCTACCTTTTCTGCTGCGTAAGAAA 3462
POJ2878 3462
H72-1522 3462
CF72-1210 3462
BADILA 3462
MOLOKAI 3462
CHUNNEE 3462
KRAKATAU 3456
SORGO 3461
MILHO 3459
ARROZ 1331
TRIGO 1330

SP80-3280 AAGCTTTACGGAGAGCAATAGAGGTGGGATACATCTATCTCTCTGAGCACTCTT 3522
POJ2878 3522
H72-1522 3522
CF72-1210 3522
BADILA 3522
MOLOKAI 3522
CHUNNEE 3522
KRAKATAU 3516
SORGO 3521
MILHO 3519
ARROZ 1391
TRIGO 1390

ORF173 (canas, sorgo e milho)

SP80-3280 TTGGATCTTAAAGCAACCCCTTGCATGATGATACCGTCTCTTATGCTTCTATTATTA 3580
POJ2878 3580
H72-1522 3580
CF72-1210 3580
BADILA 3580
MOLOKAI 3580
CHUNNEE 3580
KRAKATAU 3574
SORGO 3579
MILHO 3577
ARROZ TAT 1451
TRIGO TAT 1450

SP80-3280 ---CTCCTTCGAGGGGTTTTTAGGATCATTACAGGCTATATTAGTCTATTTTGGCTTTTA 3637
POJ2878 3637
H72-1522 3637
CF72-1210 3637
BADILA 3637
MOLOKAI 3637
CHUNNEE 3637
KRAKATAU 3631
SORGO 3636
MILHO 3634
ARROZ TAT G 1511
TRIGO TAT A G 1510

SP80-3280 CTGCTACTTTTTCAGGGAGATGGTTAAGGACCTCAGAGATAGAGAGCGCCAGGC 3697
POJ2878 3697
H72-1522 3697
CF72-1210 3697
BADILA 3697
MOLOKAI 3697
CHUNNEE 3697
KRAKATAU 3691
SORGO 3696
MILHO 3694
ARROZ C AG 1571
TRIGO C AG 1570

ORF174

SP80-3280 SCAGATTCCGGAATACTTCTACGGGAATGCTCATTCATAGACATTCCTCGTATTG 3757
POJ2878 3757
H72-1522 3757
CF72-1210 3757
BADILA 3757
MOLOKAI 3757
CHUNNEE 3757
KRAKATAU 3751
SORGO 3756
MILHO 3754
ARROZ CG G C 1631
TRIGO CG G C 1630

SP80-3280 CTTTGAAGAGGACTCGAACCTCCACGCTCTTTAGCAGGATTTTGAATTCGATCTCGGAGTCT 3817
POJ2878 3817
H72-1522 3817
CF72-1210 3817
BADILA 3817
MOLOKAI 3817
CHUNNEE 3817
KRAKATAU 3811
SORGO 3816
MILHO 3814
ARROZ 1691
TRIGO 1690

ORF249 (arroz e trigo)

	SP80-3280	ACCAATTCACCATCAGGCTCTTGAAGTGAATCGTATTCATGATATGATATCTATC	3877
POJ2878			3877
H72-1522			3877
CP72-1210			3877
BADILA			3877
MOLOKAI			3877
CHUNNEE			3877
KRAKATAU			3871
SORGO			3876
MILHO			3874
ARROZ		A.....	1751
TRIGO		A.....	1750

	SP80-3280	GATGTGATAT	3888
POJ2878			3888
H72-1522			3888
CP72-1210			3888
BADILA			3888
MOLOKAI			3888
CHUNNEE			3888
KRAKATAU			3882
SORGO			3887
MILHO			3885
ARROZ	T.....		1762
TRIGO	T.....		1761

ANEXO D – Alinhamentos da região intergênica entre *rbcL* e *petA*. Os códons de iniciação e terminação de cada gene estão marcados em cinza. O nome de cada gene está próximo dos códons de iniciação e terminação. As linhas contínuas que estão ao redor das bases nitrogenadas delimitam cada gene do início ao fim. Os pontos alinhados representam as mesmas bases nitrogenadas do híbrido SP80-3280. Os traços representam os *gaps* (deleções de bases nitrogenadas). As mutações são apresentadas pelas bases nitrogenadas em negrito que diferem do híbrido SP80-3280.

SP80-3280	AGGACTTATGTCACCAACAGAACTAAAGCAGTGTGGATTAAAGCTGGTGTGA	60
POJ2878		60
H72-1522		60
CP72-1210		60
BADILA		60
MOLOKAI		60
CHUNNEE		60
KRAKATAU		60
SORGO		60
MILHO		60
ARROZ		60
TRIGO		60
SP80-3280	AGGATTATAAATGACTTACTACACCCCGAGTACAAACCAAGGATCTATCTTGG	120
POJ2878		120
H72-1522		120
CP72-1210		120
BADILA		120
MOLOKAI		120
CHUNNEE		120
KRAKATAU		120
SORGO		120
MILHO		120
ARROZ		120
TRIGO		120
SP80-3280	CAGATTCGAGTAACCTCCTCAGCTCGGGTTCGCTGGAAGCAGGAGCTGCAGTAG	180
POJ2878		180
H72-1522		180
CP72-1210		180
BADILA		180
MOLOKAI		180
CHUNNEE		180
KRAKATAU		180
SORGO		180
MILHO		180
ARROZ		180
TRIGO		180
SP80-3280	CTGGGATCTTCTACTGTGTACATGGACACTGTGTTGGACTGATGGACTTACAGTCTTG	240
POJ2878		240
H72-1522		240
CP72-1210		240
BADILA		240
MOLOKAI		240
CHUNNEE		240
KRAKATAU		240
SORGO		240
MILHO		240
ARROZ		240
TRIGO		240
SP80-3280	ATCGTTACAAAGGACGATGCTATACATCGAGCCCGTTCCTGGGGACCCAGATCAATATA	300
POJ2878		300
H72-1522		300
CP72-1210		300
BADILA		300
MOLOKAI		300
CHUNNEE		300
KRAKATAU		300
SORGO		300
MILHO		300
ARROZ		300
TRIGO		300
SP80-3280	TCCTTATGTAGCTTATCCATTAGACCTATTTCGAAGGGTTCTGTACTTAACATGTATA	360
POJ2878		360
H72-1522		360
CP72-1210		360
BADILA		360
MOLOKAI		360
CHUNNEE		360
KRAKATAU		360
SORGO		360
MILHO		360
ARROZ		360
TRIGO		360
SP80-3280	CTTCCATTGTGGTAACGTATTGTGTTTCAAGCCTTACGGCTCTAGCTTTGAGATC	420
POJ2878		420
H72-1522		420
CP72-1210		420
BADILA		420
MOLOKAI		420
CHUNNEE		420
KRAKATAU		420
SORGO		420
MILHO		420
ARROZ		420
TRIGO		420
SP80-3280	TACGAATCCCTCCTTATGTATGTAATAAATTTCCAGGTCCGCTCAGCTATCCAGTGTG	480
POJ2878		480
H72-1522		480
CP72-1210		480
BADILA		480
MOLOKAI		480
CHUNNEE		480
KRAKATAU		480
SORGO		480
MILHO		480
ARROZ		480
TRIGO		480

rbcl

rbcl

SP80-3280	AAAGGCTAAGTTCGACAAAGTACGGTCTGCTCTTTATTGGCATGTACTATTATTAACCAAAAT	540	SP80-3280	ATTACTTGAATGGAGCTCGAGCTACATGCGAAGAAATGATTAAAGAGAGCTGTAATTGCAA	780
POJ2878		540	POJ2878		780
H72-1522		540	H72-1522		780
CP72-1210		540	CP72-1210		780
BADILA		540	BADILA		780
MOLOKAI		540	MOLOKAI		780
CHUNNEE		540	CHUNNEE		780
KRAKATAU		540	KRAKATAU		780
SORGO		540	SORGO		780
MILHO		540	MILHO		780
ARROZ		540	ARROZ		780
TRIGO		540	TRIGO		780
	A.....T.....			G.....T.....	
SP80-3280	TGGATTTATCCGCAAAAATTTACGGTAGAGCGTGTATTAGTGCTACCGGTGGACTTG	600	SP80-3280	AGGANTTAGGGTTCTCTATTGTATGTCATGCTACTTATACAGGAGGATTCACCGCAATA	840
POJ2878		600	POJ2878		840
H72-1522		600	H72-1522		840
CP72-1210		600	CP72-1210		840
BADILA		600	BADILA		840
MOLOKAI		600	MOLOKAI		840
CHUNNEE		600	CHUNNEE		840
KRAKATAU		600	KRAKATAU		840
SORGO		600	SORGO		840
MILHO		600	MILHO		840
ARROZ		600	ARROZ		840
TRIGO		600	TRIGO		840
	T.....T.....T.....			C.....G.....T.....	
	T.....T.....			T.....G.....	
SP80-3280	ATTTTACCAAGATGATGAACGTAACCTCAACCACTTATGCTGCTGGAGAGCGGT	660	SP80-3280	CTACTTGTCTCANTATTGSCCGGACAAAGCGGCTACTTCTTTCACATTCACCGAGCAATGC	900
POJ2878		660	POJ2878		900
H72-1522		660	H72-1522		900
CP72-1210		660	CP72-1210		900
BADILA		660	BADILA		900
MOLOKAI		660	MOLOKAI		900
CHUNNEE		660	CHUNNEE		900
KRAKATAU		660	KRAKATAU		900
SORGO		660	SORGO		900
MILHO		660	MILHO		900
ARROZ		660	ARROZ		900
TRIGO		660	TRIGO		900
	T.....T.....G.....			G.....T.....	
SP80-3280	TTGTCTTTTGGCGGAAGCAATTATTAAGCAAGCGGAAACCGGTGAATCAAGGGGC	720	SP80-3280	ATGCAGTTATTGATAGACAGACAGAAAATCATGTTATGCAATTCCTGTTATTAGCTAAACGAT	960
POJ2878		720	POJ2878		960
H72-1522		720	H72-1522		960
CP72-1210		720	CP72-1210		960
BADILA		720	BADILA		960
MOLOKAI		720	MOLOKAI		960
CHUNNEE		720	CHUNNEE		960
KRAKATAU		720	KRAKATAU		960
SORGO		720	SORGO		960
MILHO		720	MILHO		960
ARROZ		720	ARROZ		960
TRIGO		720	TRIGO		960
	C.....T.....T.....G.....			G.....T.....	

SP80-3280	1020	TGGGTATGTCGGGGGAGATCATATCCACTCCGGTACAGTAGTAGTATGAGAGGGG	1020	CCGTATTACATTTGGTGGAGGACTTAGACATTCCTTGGGGAATGCACTGTGTGCG	1260
POJ2878	1020		1020		1260
H72-1522	1020		1020		1260
CP72-1210	1020		1020		1260
BADILA	1020		1020		1260
MOLOKAI	1020		1020		1260
CHUNNEE	1020		1020		1260
KRAKATAU	1020		1020		1260
SORGO	1020		1020		1260
MILHO	1020		1020		1260
ARROZ	1020		1020		1260
TRIGO	1020		1020		1260
SP80-3280	1080		1080		1320
POJ2878	1080		1080		1320
H72-1522	1080		1080		1320
CP72-1210	1080		1080		1320
BADILA	1080		1080		1320
MOLOKAI	1080		1080		1320
CHUNNEE	1080		1080		1320
KRAKATAU	1080		1080		1320
SORGO	1080		1080		1320
MILHO	1080		1080		1320
ARROZ	1080		1080		1320
TRIGO	1080		1080		1320
SP80-3280	1140		1140		1380
POJ2878	1140		1140		1380
H72-1522	1140		1140		1380
CP72-1210	1140		1140		1380
BADILA	1140		1140		1380
MOLOKAI	1140		1140		1380
CHUNNEE	1140		1140		1380
KRAKATAU	1140		1140		1380
SORGO	1140		1140		1380
MILHO	1140		1140		1380
ARROZ	1140		1140		1380
TRIGO	1140		1140		1380
SP80-3280	1200		1200		1438
POJ2878	1200		1200		1438
H72-1522	1200		1200		1438
CP72-1210	1200		1200		1438
BADILA	1200		1200		1438
MOLOKAI	1200		1200		1438
CHUNNEE	1200		1200		1438
KRAKATAU	1200		1200		1438
SORGO	1200		1200		1438
MILHO	1200		1200		1438
ARROZ	1200		1200		1438
TRIGO	1200		1200		1438

SP80-3280	AATAGATCTTGATACATCATGACGACTTGACAAATCGAGATCTTCTTATCTATATCT	1669
POJ2878		1669
H72-1522		1669
CF72-1210		1669
BAD11A		1669
MOLOKAI		1669
CHUNNEE		1669
KERAKATAU		1669
SORGO		1669
MILHO		1633
PARROZ		1633
TRIGO		1661
		1665

SP80-3280	-----	1793
POJ2878	-----	1793
HT2-1522	-----	1793
CF72-1210	-----	1793
ADILLA	-----	1793
MOLOKAI	-----	1793
CHUNNEE	-----	1793
KRAKATAU	-----	1793
SORGO	-----	1793
MILHO	-----	1757
PARAFROZ	-----	1883
TRIGO	-----	1800
GPFAFCTATTCCACCTTGTAGAGAAAACCTAT	GPAGAACTGATGAAAAGAC	

GTATACTCTATTCCACTTCTAGATAGAGAAAAACATAA

[illegible]

SP80-3280	TGGGAAAGAAAAATTCATATTTTATTTAATGAGTTCGCCCTTTTATTTAGTCCCTTTT	2160
FOJ2878		2160
H72-1522		2160
CF72-1210		2160
BADILA		2160
MOLOKAI		2160
CHUNNEE		2160
KEAKATAU		2160
	T AC	2160
SORGO		2160
MILHO	 AA . A	2124
ARROZ	C CA . A . C	G
TRIGO	TTT . C . GGT . A . G . G . C	CA . GA . T G . AC . G
		C

SP80-3280	TGCAATTTCTATTTTCAATTCATTCATTTTATAGATACTTTT	---ATTC	2216
FOJ2878			2216
HT2-1522			2216
CF72-1210			2216
BADILA			2216
MOMOKAI			2216
CHUNNEE			2216
KGAKATAU			2216
SONGO	-----		2177
MILHO	A.....	A.....	2180
PARROZ	ATT.ATA.A---C..G..T.	G.AT.CTT.	TAGA..A.2954
ATTA	T.AAAGA.GC-----	C..T..C..AA.	2194

SPB80-3280	TATA-TCTATATAAAAAAATAGTATTCCTATATAAAATCTTTATTTTGTAAACCTCAAAATA	2275
FOJ2878		2275
HT2-1522		2275
CF72-1210		2275
BADTIIA		2275
MOLOKAI		2275
CHUNNEE		2275
GGAKATAU		2275
SONGO	-----A-----	2192
MILHO	-----A-----	2220
PARROZ	A.G.A.TCT.....C-----	3013
TRIGO	A.....-.....AAATC-----	2214

CP80-3280	CAATAGTCAATATATCCCTTATAA-TAGATATACTTAATATATATCATATAGAAATCTTTAAGATA	2334
POJ2878		2334
H72-1522		2334
CP72-1210		2334
BRADILIA		2334
NOLOKAI		2334
CHUNNEE		2334
KARAKATAU		2334
SORGO		2251
MILHO		2279
PAROZ		3073
FRIGO		2273

SP80-3280	TATT-----CGAATGATAGAAATAGTAAATTCGAAATGACACATATT	2380
POJ2878		2380
H72-1522		2380
CF72-1210		2380
RA211A		2380
MOLOKAI		2380
CHUNNEE		2380
KEAKATAU		2380
SORGO		2297
MILO		2325
APROZ	T...TGAATGATCAAAAT	3133
TRIGO	T...TGAATGATCAAAAT	2319

psat	psat	psat
SP80-3280	CTAAGCAGACACTTAACTTACCCCTCTATTTTCGTACCTTTAGTAGCTTAGTATTTCCGG	2440
FOJ2878		2440
H72-1522		2440
CF72-1210		2440
BRADILIA		2440
MOLOKAI		2440
CHUNNEE		2440
KGAKATAU		2440
SORGO		2357
MTLHO		2385
BARRO2	T.....G.....G.....	3193
ITRIGO	G.T.A.....T.....G.....	3379
	psat	

CHATTGCATGACGCTTCCTTATTTCTTGTCGAGAAATAATAGATTGTCTG		AAAGC	3500
POJ2878			2500
H72-1522			2500
CF72-1210			2500
BRADTLA			2500
MOLKAI			2500
CHONNEE			2500
KAKARAU			2500
SORGO			2417
MIHO			2445
G. T. PARROZ	C.		3253
T. PARROZ	T.		4432
A.	A.		4432

GGGGCCAAATTTCTC	AATGTAATTCCA-----	GGAATCAATAACAGATAATTTTTTGTGT	2556
.....			2556
PONJ2878	HT2-1522		2556
.....	CFP72-1210		2556
.....	RADTLA		2556
.....	VOLOKAI		2556
CHUNNEE			2556
KAKAPATAU			2556
SORGO			2473
MILHO			2501
FARROZ	CACA.....	G.C.G.A.....	3313
TRIGO		A.....	2445

SP80-3280	AACTAGTATATATGATAGGTGATGTAGCTTCTTCACACAAATGAAAAAC	-----	2609
FOJ2878			2609
H72-1522			2609
CF72-1210			2609
BADILA			2609
MOLOKAI			2609
CHUNNEE			2609
KRAKATAU			2609
SORGO			2525
MILHO		-	2554
ALHOZ			3373
TRIGO			2505

SP80-3280	-----GTCATGATGCAGATATTAAGTACGACATTAATGATGCATATCGCTAGCCG	2663
FOJ2878		2663
H72-1522		2663
CP72-1210		2663
BADILA		2663
MOLOKAI		2663
CHUNNEE		2663
KEAKATAU		2663
SONGO		2579
MILHO		2609
GATGGG.AT	...G...G	3433
PARROZ		G.A...
AAAAC.CT	...G...G	A...A
TRIGO		A.2565

SP80-3280	ACTATAGCGAGTTTTTTT-----TTAAGTGATCCCAATTATTTT-GRATAGA	2715
FOJ2878		2715
H72-1522		2715
CF72-1210		2715
BRADILA		2715
MOLOKAI		2715
CHUNNEE		2715
KGAKATAU		2713
GORGO	ATT	2634
MILHO	ATT	2661
APAROZ	--	3482
TRIGO	A..ATTATT..T..A..A..G..A..T..	2625

SP80-3280	AGTCAATGTA	TCTAACCAAT	TATTTTCACAGGAGTA	CTAGCTACT	GAAGGCTATTTCAGA	2774
POJ2878						2774
HT2-1522						2774
CP72-1210						2774
BRADIIA						2774
MOLOKAI						2774
CHUNNEE						2774
KEAKATAU						2772
SONGO						2693
MILHO						2723
PARROZ						3542
FRIGO						2684

ATCAAAAAAGTAAGT-CAAAATCAATAGCTTATTCCTCAATTTCAATTGACCGCTA	2830
PO2878	2833
H72-1522	2833
CF72-1210	2833
BADIIA	2833
MOLOKAI	2833
CHUNNEE	2833
KRAKATAU	2831
A. SORGO	2752
GA. MILHO	2780
ARROZ	3601
TRIGO	2743

<i>Ycf4</i>	
CTGGATTGATATATCTAA	2893
SP80-3280	2893
PGJ2878	2893
H72-1522	2893
CP72-1210	2893
BRADIIA	2893
MOLOKAI	2893
CHUNNEE	2893
KEKATAU	2891
SONGO	2812
MITHO	2840
APROZ	3655
TRIGO	2803
-----G-----	2803
ATGAATTGGCGTCAGACACATATGGATAGAACTTCTAA	2893

SP80-3280	AAAGTTCTCGAAGAGAGCTAATTTTTTCGGGCGCTGTATTCTTTTCTAGGTTCAATAG	3953
POJ2878		3953
HT2-1522		3953
CP72-1210		3953
BRADILA		3953
MOLOKAI		3953
CHONNEE		3953
KKAKATAU		3951
SORGO		2872
MTLHO		2900
BARROZ	c.....	3715
UTRIGO	g.....c.....	2863

GATCTTAGCGGTGGGCGTCCAGTTACTCTTGTAAGAATATGATATCTGTACTTCAT	3013
POJ2878	3013
H72-1522	3013
PF7-1210	3013
RADIALA	3013
XOLOKAI	3013
CHUNNEE	3013
KRAKATAU	3011
SORGO	2932
MILHO	2960
PARROZ	3775
FRIGO	2923
T.....AT.....T.....A.....	2923

SP80-3280	CTCACAAATCTTTTTCACACAGGGGGTCGTCATGCTTTCTACGGAATCGCGGGCC	3073
POJ2878		3073
H72-1522		3073
CP72-1210		3073
BADILA		3073
MOLOKAI		3073
CHUNNEE		3073
KRAKATAU		3071
SORGO		2992
MILHO		3020
ARROZ	A.....	3835
TRIGO	G.....A.....	2983
SP80-3280	TATTCATTAGCTCTTATTTGTGTGTCACATATTTATGGAATGTAGGAGTGTATGACC	3133
POJ2878		3133
H72-1522		3133
CP72-1210		3133
BADILA		3133
MOLOKAI		3133
CHUNNEE		3133
KRAKATAU		3131
SORGO		3052
MILHO		3080
ARROZ	G.T.C.....G.....T.....	3895
TRIGO	T.....C.....T.....	3043
SP80-3280	GATTCGATAGAAAGAGGAATAGTGTGCAATTTTCGTGGGAATCCCTGGGAATAAAC	3193
POJ2878		3193
H72-1522		3193
CP72-1210		3193
BADILA		3193
MOLOKAI		3193
CHUNNEE		3193
KRAKATAU		3191
SORGO		3112
MILHO		3140
ARROZ	G.....	3955
TRIGO		3103
SP80-3280	GTCCGATCTCTTCAATTCCTTGTGGGGATATCCATCAATTAGATTAGGTTAAAG	3253
POJ2878		3253
H72-1522		3253
CP72-1210		3253
BADILA		3253
MOLOKAI		3253
CHUNNEE		3253
KRAKATAU		3251
SORGO		3172
MILHO		3192
ARROZ	G...T...G.....A.....	4015
TRIGO	G.....G.....A.....	3163
SP80-3280	AGGCTTTTATTCCTTCGTCGTATCCCTTTATATGGAATCCGGGCGGATTCATCCCT	3313
POJ2878		3313
H72-1522		3313
CP72-1210		3313
BADILA		3313
MOLOKAI		3313
CHUNNEE		3313
KRAKATAU		3311
SORGO		3232
MILHO		3260
ARROZ	A.....T.....C.....	4075
TRIGO	T.....A.....	3223
SP80-3280	TGACTGCTACTGATGAGAGTTTTCTTACTCCAGAGAAATGTGACAAAAGTCGCCGAT	3373
POJ2878		3373
H72-1522		3373
CP72-1210		3373
BADILA		3373
MOLOKAI		3373
CHUNNEE		3373
KRAKATAU		3371
SORGO		3292
MILHO		3320
ARROZ	T.A.....	4135
TRIGO		3283
SP80-3280	TGGCCTATTTCTTCGCTGTACCAATGAGTATTTGGG---TACCATTCGAATTTT---	3429
POJ2878		3429
H72-1522		3429
CP72-1210		3429
BADILA		3429
MOLOKAI		3425
CHUNNEE		3429
KRAKATAU		3427
SORGO	G.....	3348
MILHO	T.....CA.....G.....	3376
ARROZ	T.....C.....A.T....G 4192	3376
TRIGO	GTA CTTT...A.C.GAG.T 3343	3343
SP80-3280	-----	3429
POJ2878	-----	3429
H72-1522	-----	3429
CP72-1210	-----	3429
BADILA	-----	3429
MOLOKAI	-----	3425
CHUNNEE	-----	3429
KRAKATAU	-----	3427
SORGO	-----	3348
MILHO	-----	3376
ARROZ	-----	3376
TRIGO	-----	4252
	GAATGAA--GA--AAGAGAGAATTCGAGAGAGAAAGTTTCTCAACACG--GGAGGAG	3396

SP80-3280 -----TGCA--ATTGTAGGGGATTTT-GAGTATTATTCTTAAG----- 3465
 POJ2878 3465
 H72-1522 3465
 CP72-1210 3465
 BADILA 3465
 MOLOKAI 3461
 CHUNNEE 3465
 KRAKATAU 3463
 SORGO C 3385
 MILHO C TAAAG 3418
 ARROZ TT 4302
 TRIGO TCCTTCGAAT TT TA 3453
 TCCTTCGAATTTGA TTGTT

SP80-3280 GAAGGACAAACGAGGATAGAGAAATTCGTAATTGTTT-TGCCAAGTGAGATA 3524
 POJ2878 3524
 H72-1522 3524
 CP72-1210 3524
 BADILA 3524
 MOLOKAI 3520
 CHUNNEE 3524
 KRAKATAU 3522
 SORGO A 3444
 MILHO A 3477
 ARROZ T G 4356
 TRIGO TT T TA 3513

SP80-3280 TATGGCATACTATCTTCATTTTATAGAAAGCCCTTTTTT-----ATTCTCTA 3578
 POJ2878 3578
 H72-1522 3578
 CP72-1210 3578
 BADILA 3578
 MOLOKAI 3574
 CHUNNEE 3578
 KRAKATAU 3576
 SORGO A 3498
 MILHO C 3530
 ARROZ C CC A T C 4409
 TRIGO C T C CC G TATTCT A 3573

SP80-3280 TTCCACTCATTAGATCTAAGAGAACCCCAATCAATGAATTCAGTA----- 3632
 POJ2878 3632
 H72-1522 3632
 CP72-1210 3632
 BADILA 3632
 MOLOKAI 3628
 CHUNNEE 3632
 KRAKATAU 3630
 SORGO C 3552
 MILHO C 3584
 ARROZ C T G CT 4463
 TRIGO T T C G C C A ACTAAT 3633

SP80-3280 -TACAAAAA-GAGAAATAGATACAAATACAGGTCTCAACCTTGTTATAGATTTTGC 3690
 POJ2878 3690
 H72-1522 3690
 CP72-1210 3690
 BADILA 3690
 MOLOKAI 3686
 CHUNNEE 3690
 KRAKATAU 3688
 SORGO C 3610
 MILHO C 3642
 ARROZ G A G - C 4515
 TRIGO A A AG - G A G 3693

SP80-3280 TTCAAGAAAA-GAAATATCAT-----ATATATTACGAAATGAAA 3730
 POJ2878 3730
 H72-1522 3730
 CP72-1210 3730
 BADILA 3730
 MOLOKAI 3726
 CHUNNEE 3730
 KRAKATAU 3728
 SORGO 3650
 MILHO A G G 3674
 ARROZ TA GAATAGAAATTCATCAT G G G 4548
 TRIGO 3743

SP80-3280 TAGAGTCGGCAATGAAGCGGATTCATTACAACTCAATTACAGATCAAAATGAAAA 3790
 POJ2878 3790
 H72-1522 3790
 CP72-1210 3790
 BADILA 3790
 MOLOKAI 3786
 CHUNNEE 3790
 KRAKATAU 3788
 SORGO A 3710
 MILHO - 3695
 ARROZ A A C 4598
 TRIGO A AT C 3803

SP80-3280 AAAGAAAGCATTCCTTCTTCTTATATCTTGTATTATGCTACTTTGCCCTGGGAGT 3850
 POJ2878 3850
 H72-1522 3850
 CP72-1210 3850
 BADILA 3850
 MOLOKAI 3846
 CHUNNEE 3850
 KRAKATAU 3848
 SORGO 3770
 MILHO C 3755
 ARROZ AC T G 4658
 TRIGO 3863

cema

TTATCATCTCAATVAGGAGACGATAT	ACTCATCTCATTTGATTTC	-----TAATATTAAT	4504
.....			4504
POJ2878			4504
H72-1522			4504
CF72-1210			4504
BADILIA			4504
.....			4500
MOLOKAI			4504
CHUNNEE			4502
KKAKATAU			4424
SORGO			4409
MILHO			4409
ARROZ			5308
TRIGO			4519

SP80-3280	CAAA-TTAGCATATTTCTCTCCTTT-----AGAAAGAACCCCTTT-CCT-TTT	4550
POJ2878		4550
H72-1522		4550
CF72-1210		4550
BAD11A		4550
MOLOKAI		4546
CHUNNEE		4550
GGAKATAU		4548
SORGO		4470
MLIHO	TTC CCTTAGAAT	4466
PAROZ	A...CC.T...T...A...	5356
TRIGO	AGCA.TT...A...A...	4565

[illegible][illegible]

petA

SP80-3280	ATGGAAATAGAAAAACTTTTCTTGCTTAAAGGAACAGATGATTCGATTCGATTCCTGTA	4763
POJ2878		4763
H72-1522		4763
PF72-1210		4763
BRADILIA		4763
MOLOKAI		4759
CHUNNEE		4763
GRANATIAU		4761
GORGO		4705
MILHO		4679
BARROZ	T. G. C.	5574
FRIGO	T. G. A. C.	4779

SP80-3280	TCGATCATGATATACGTATATACTGCACATCTATTTCAAAGCATATCCCAATTTTGGC	4823	AAGGAGGCTTGAATGTGGGTCTCTTCTTTATTTGGCCGAGGATTCGAATTAGCGCG	5063
POJ2878		4823		5063
H72-1522		4823		5063
CP72-1210		4823		5063
BADILA		4823		5063
MOLOKAI		4819		5059
CHUNNEE		4823		5063
KRAKATAU		4821		5061
SORGO		4765		5005
MILHO		4739		4979
ARROZ		5634		5874
TRIGO		4839		5079
SP80-3280	GACGAGGTTATGAAACCCGCGGAGCACTGGAGCATTTGATGTGCCATTTGCCAT	4883	CCCGACCGTATTTCTCTCTGAGTTGAAAGAAAGATAGGAATCTCTCTTTTCAGATAT	5123
POJ2878		4883		5123
H72-1522		4883		5123
CP72-1210		4883		5123
BADILA		4883		5123
MOLOKAI		4879		5119
CHUNNEE		4883		5123
KRAKATAU		4881		5121
SORGO		4825		5065
MILHO		4799		5039
ARROZ		5694		5934
TRIGO		4899		5139
SP80-3280	TTAGCTATATAGCTGTAGATATTGAAGTTCCCAAGCACTGCTTCTCTGATAGTATTT	4943	CGTCCCAATAAAAAAATATTCTTGATAGGCCAGTCCCGTAGAATAATATAGTAA	5183
POJ2878		4943		5183
H72-1522		4943		5183
CP72-1210		4943		5183
BADILA		4943		5183
MOLOKAI		4939		5179
CHUNNEE		4943		5183
KRAKATAU		4941		5181
SORGO		4885		5125
MILHO		4859		5099
ARROZ		5754		5994
TRIGO		4959		5199
SP80-3280	GAAGCAGTTCTTGAAATTCCTTATGATATGCTGCTGAAACAGTTCTTGTAATGTAAA	5003	ATTGTCTTTCCCATTTCTTTCCCGATCCCGCTACAAAAAGAGCTTCATTCTTAAA	5243
POJ2878		5003		5243
H72-1522		5003		5243
CP72-1210		5003		5243
BADILA		5003		5243
MOLOKAI		4999		5239
CHUNNEE		5003		5243
KRAKATAU		5001		5241
SORGO		4945		5185
MILHO		4919		5159
ARROZ		5814		6054
TRIGO		5019		5259

peta

peta

SP80-3280	TATCCCATATGTAGGGGAAACCGAGGAGGACAGATCTATCTGTGTTACCAAG	5303
POJ2878		5303
H72-1522		5303
CF72-1210		5303
BADILA		5303
MOLOKAI		5299
CHUNNEE		5303
KRAKATAU		5301
SORGO	G.....	5245
MILHO	C.....G.....	5219
ARROZ	G.....	6114
TRIGO	A.....G.....	5319
SP80-3280	AGTAACATACGGTCTATATGCTACGTACACAGGTATGTAAAAAATACTACGTAA	5363
POJ2878		5363
H72-1522		5363
CF72-1210		5363
BADILA		5363
MOLOKAI		5359
CHUNNEE		5363
KRAKATAU		5361
SORGO		5305
MILHO		5279
ARROZ	A.....G.....G.....	6174
TRIGO	A.....G.....G.....	5379
SP80-3280	GAAGAGGGGGATGAAATATCCATAGTGTGATGCTCGGATGACGCCAATGATGAT	5423
POJ2878		5423
H72-1522		5423
CF72-1210		5423
BADILA		5423
MOLOKAI		5419
CHUNNEE		5423
KRAKATAU		5421
SORGO		5365
MILHO	A.....G.....	5339
ARROZ	C.....A.....	6234
TRIGO	A.....G.....T.....A.....A.....	5439
SP80-3280	ATTAATCTCCGGCCAGACACTCTCTTTTCAGAGGGGATCATACAGCTGTATCA	5483
POJ2878		5483
H72-1522		5483
CF72-1210		5483
BADILA		5483
MOLOKAI		5479
CHUNNEE		5483
KRAKATAU		5481
SORGO		5425
MILHO	T.....G.....	5399
ARROZ	T.....G.....	6294
TRIGO	A.....C.....	5499
SP80-3280	CCATTAACACATCTTAATGTAGGAGGTTTGGTCAGGGGATCGAATAATAGTCTTT	5543
POJ2878		5543
H72-1522		5543
CF72-1210		5543
BADILA		5543
MOLOKAI		5539
CHUNNEE		5543
KRAKATAU		5541
SORGO		5485
MILHO		5459
ARROZ	T.....G.....	6354
TRIGO	G.....T.....C.....	5559
SP80-3280	CAGATCCATTCGGCTCCAGGCGCTTTTCTTCTTCGTCGACCTGTATTTTGGCACAA	5603
POJ2878		5603
H72-1522		5603
CF72-1210		5603
BADILA		5603
MOLOKAI		5599
CHUNNEE		5603
KRAKATAU		5601
SORGO		5545
MILHO	T.....	5519
ARROZ	A.....T.....	6414
TRIGO	A.....T.....AA.G.C.A..C.....	5619
SP80-3280	GTTTTTTGGTCTCAAAA-GAACAAGTTTCAAAAGGTTCAATTCTACGAATGAATTT	5662
POJ2878		5662
H72-1522		5662
CF72-1210		5662
BADILA		5662
MOLOKAI		5658
CHUNNEE		5662
KRAKATAU		5660
SORGO		5604
MILHO		5578
ARROZ	TC..C.....	6473
TRIGO	TC..C.....	5678
SP80-3280	CTAGATCCCTGGG	5674
POJ2878		5674
H72-1522		5674
CF72-1210		5674
BADILA		5674
MOLOKAI		5670
CHUNNEE		5674
KRAKATAU		5672
SORGO		5616
MILHO		5582
ARROZ		6485
TRIGO		5690

peta

peta

ANEXO E - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do DNA e do cDNA de sorgo, amplificadas com os *primers* desenhados nas regiões dos genes para análise de edição, comparadas com as mesmas seqüências de milho (Maier et al., 1995) e de cana-de-açúcar (Calsa Junior, 2001). As bases nitrogenadas sublinhadas indicam a posição do sítio de edição nos plastomas. A região do cDNA que não contém sítio de edição está circulada. Dados: cDNA: obtido de RNA total tratado com DNase I; * Posição do códon de edição no plastoma de milho.

- atpA:

383*

Milho (DNA) ...GGCAAATTCAAAATTGGAAGTAGCTCAATTCGCAGAATTACAAGCCTTTGCACAATTCGCC 1200...

Milho (cDNA) ...GGCAAATTTAAAATTGGAAGTAGCTCAATTCGCAGAATTACAAGCCTTTGCACAATTCGCC 162...

Cana (DNA) ...GGCAAATTCAAAATTGGAAGTAGCTCAATTCGCAGAATTACAAGCCTTTGCACAATTCGCC 162...

Cana (cDNA) ...GGCAAATTTAAAATTGGAAGTAGCTCAATTCGCAGAATTACAAGCCTTTGCACAATTCGCC 162...

Sorgo (DNA) ...GGCAAATTCAAAATTGGAAGTAGCTCAATTCGCAGAATTACAAGCCTTTGCACAATTCGCC 168...

Sorgo (cDNA) ...GGCAAATTTAAAATTGGAAGTAGCTCAATTCGCAGAATTACAAGCCTTTGCACAATTCGCC 168...

- ndhA:

17*

Milho (DNA) ...ATGATAATAGATAGGGTAGAGGTAGAACTATCAATTCTTTTTTCGAAATCGGAATTATTT 60...

Milho (cDNA) ...-----GGGTAGAGGTAGAACTATCAATTCTTTTTTTGAAATCGGAATTATTT 47...

Cana (DNA) ...-----GGGTAGAGGTAGAACTATCAATTCTTTTTTCGAAATCGGAATTATTA 47...

Cana (cDNA) ...-----CTTTTTTTGAAATCGGAATTATTA 21...

Sorgo (DNA) ...-----ATTCTTTTTGCGAAATTGGAATTATTA 26...

Sorgo (cDNA) ...-----ATTCTTTTTGTGAAATTGGAATTATTA 26...

158*

Milho (DNA) ...CCTATTGGTCTTCTCATGGCAGGATATAGCTCAAATAATAAATATTCTTTTTTCAGGCGGT 480...

Milho (cDNA) ...CCTATTGGTCTTCTCATGGCAGGATATAGCTCAAATAATAAATATTCTTTTTTTAGGCGGT 467...

Cana (DNA) ...CCTATTGGTCTTCTCATGGCAGGATATAGCTCAAATAATAAATATTCTTTTTTCAGGCGGT 467...

Cana (cDNA) ...CCTATTGGTCTTCTCATGGCAGGATATAGCTCAAATAATAAATATTCTTTTTTTAGGCGGT 441...

Sorgo (DNA) ...CCTATTGGTCTTCTCATGGCAGGATATAGCTCAAATAATAAATATTCTTTTTTCAGGCGGT 447...

Sorgo (cDNA) ...CCTATTGGTCTTCTCATGGCAGGATATAGCTCAAATAATAAATATTCTTTTTTTAGGCGGT 447...

188*

Milho (DNA) ...-----TATCTAATAGTTTCAAGTACAGTTGATATAGTTGAAGCACAGTCCAAATATGGTT 604...

Milho (cDNA) ...CATCGA---CTATGATTTTCAAGTACAGTTGATATAGTTGAAGCACAGTCCAAATATGGTT 1604...

Cana (DNA) ...CATCGA---CTATGATTTTCAAGTACAGTTGATATAGTTGAAGCACAGTCCAAATATGGTT 1603...

Cana (cDNA) ...TATGATTATCTAATAGTTTCAAGTACAGTTGATATAGTTGAAGCACAGTCAAAATATGGTT 1349...

Sorgo (DNA) ...-----TATCTAATAGTTTCAAGTACAGTTGATATAGTTGAAGCACAGTCAAAATATGGTT 571...

Sorgo (cDNA) ...-----TATCTAATAGTTTCAAGTACAGTTGATATAGTTGAAGCACAGTCAAAATATGGTT 571...

357*

Milho (DNA) ...TTCTTTTACCTATTTCTCTGGGCAATCTCTTATTAACAACCTTCTTCCCAACTAGTTTCAC 1084...

Milho (cDNA) ...TTCTTTTACCTATTTCTCTGGGCAATCTCTTATTAACAACCTTCTTCCCAACTAGTTTCAC 2084...

Cana (DNA) ...TTCTTTTACCTATTTCTCTGGGCAATCTCTTATTAACAACCTTCTTCCCAACTAGTTTCAC 2083...

Cana (cDNA) ...TTCTTTTACCTATTTCTCTGGGCAATCTCTTATTAACAACCTTCTTCCCAACTAGTTTCAC 617...

Sorgo (DNA) ...TTCTTTTACCAATTTTCTCTGGGCAATCTCTTATTAACAACCTTCTTCCCAACTAGTTTCAC 870...

Sorgo (cDNA) ...TTCTTTTACCAATTTTCTCTGGGCAATCTCTTATTAACAACCTTCTTCCCAACTAGTTTCAC 870...

- *ndhB*:

156*

Milho (DNA) ...ATGTTTTTATGTGGTGCTAACGATTTAATAACTATCTTTGTAGCTCCAGAATGTTTCAGT 480...

Milho (cDNA) ...-----GTGGTGCTAACGATTTAATAACTATCTTTGTAGCTCTAGAATGTTTCAGT 50...

Cana (DNA) ...-----GTGGTGCTAACGATTTAATAACTATCTTTGTAGCTCCAGAATGTTTCAGT 50...

Cana (cDNA) ...-----TCTTTGTAGCTCTAGAATGTTTCAGT 26...

Sorgo (DNA) ...-----TCTTTGTAGCTCCAGAATGTTTCAGT 30...

Sorgo (cDNA) ...-----TCTTTGTAGCTCTAGAATGTTTCAGT 30...

196*

Milho (DNA) ...ATGAAATATTTACTCATGGGTGGGGCAAGCTCTTCTATTCTGGTTCATGGTTTCTCTTGG 600...

Milho (cDNA) ...ATGAAATATTTACTCATGGGTGGGGCAAGCTCTTCTATTCTGGTTTATGGTTTCTCTTGG 170...

Cana (DNA) ...ATGAAATATTTACTCATGGGTGGGGCAAGCTCTTCTATTCTGGTTCATGGTTTCTCTTGG 170...

Cana (cDNA) ...ATGAAATATTTACTCATGGGTGGGGCAAGCTCTTCTATTCTGGTTTATGGTTTCTCTTGG 146...

Sorgo (DNA) ...ATGAAATATTTACTCATGGGTGGGGCAAGCTCTTCTATTCTGGTTCATGGTTTCTCTTGG 151...

Sorgo (cDNA) ...ATGAAATATTTACTCATGGGTGGGGCAAGCTCTTCTATTCTGGTTTATGGTTTCTCTTGG 151...

204*

Milho (DNA) ...CTATATGGTTCATCTGGGGGGGAGATCGAGCTTCAAGAAATTGTGAATGGTCTTATCAAT 660...

Milho (cDNA) ...CTATATGGTTTATCTGGGGGGGAGATCGAGCTTCAAGAAATTGTGAATGGTCTTATCAAT 230...

Cana (DNA) ...CTATATGGTTCATCTGGGGGGGAGATCGAGCTTCAAGAAATTGTGAATGGTCTTATCAAT 230...

Cana (cDNA) ...CTATATGGTTTATCTGGGGGGGAGATCGAGCTTCAAGAAATTGTGAATGGTCTTATCAAT 206...

Sorgo (DNA) ...CTATATGGTTCATCTGGGGGGGAGATCGAGCTTCAAGAAATTGTGAATGGTCTTATCAAT 211...

Sorgo (cDNA) ...CTATATGGTTTATCTGGGGGGGAGATCGAGCTTCAAGAAATTGTGAATGGTCTTATCAAT 211...

246*

Milho (DNA) ...GGGTTCAAGCTTTCCCCAGCCCCCTTTTCATCAATGGACTCCTGACGTCTACGAAGGA--- 777...

Milho (cDNA) ...GGGTTCAAGCTTTCCCTAGCCCCCTTTTCATCAATGGACTCCTGACGTCTACGAAGGAGTG 350...

Cana (DNA) ...GGGTTCAAGCTTTCCCCAGCCCCCTTTTCATCAATGGACTCCTGACGTCTACGAAGGAGTG 350...

Cana (cDNA) ...GGGTTCAAGCTTTCCCTAGCCCCCTTTTCATCAATGGACTCCTGACGTCTACGAAGGAGTG 326...

Sorgo (DNA) ...GGGTTCAAGCTTTCCCCAGCCCCCTTTTCATCAATGGACTCCTGACGTCTACGAAGGA--- 328...

Sorgo (cDNA) ...GGGTTCAAGCTTTCCCTAGCCCCCTTTTCATCAATGGACTCCTGACGTCTACGAAGGA--- 328...

277*

Milho (DNA) ...TGCTTTTCTTTCTGTTACTTCGAAAGTAGCTGCTTCAGCTTTAGCCACGCGAATTCTCGA 854...

Milho (cDNA) ...TGCTTTTCTTTCTGTTACTTCGAAAGTAGCTGCTTTAGCTTTAGCCACGCGAATTCTCGA 1128...

Cana (DNA) ...TGCTTTTCTTTCTGTTACTTCGAAAGTAGCTGCTTCAGCTTTAGCCACGCGAATTCTCGA 1127...

Cana (cDNA) ...TGCTTTTCTTTCTGTTACTTCGAAAGTAGCTGCTTTAGCTTTAGCCACGCGAATTCTCGA 965...

Sorgo (DNA) ...TGCTTTTCTTTCTGTTACTTCGAAAGTAGCTGCTTCAGCTTTAGCCACGCGAATTCTCGA 405...

Sorgo (cDNA) ...TGCTTTTCTTTCTGTTACTTCGAAAGTAGCTGCTTTAGCTTTAGCCACGCGAATTCTCGA 405...

494*

Milho (DNA) ...TGTATGTGTGATAGCATCTACTATACCAGGAATATCAATGAACCCCATTTCTTGCAATTGC 1515...

Milho (cDNA) ...TGTATGTGTGATAGCATCTACTATACTAGGAATATCAATGAACCCCATTTCTTGCAATTGC 1789...

Cana (DNA) ...TGTATGTGTGATAGCATCTACTATACCAGGAATATCAATGAACCCCATTTCTTGCAATTGC 1788...

Cana (cDNA) ...TGTATGTGTGATAGCATCTACTATACTAGGAATATCAATGAACCCCATTTCTTGCAATTGC 1759...

Sorgo (DNA) ...TGTATGTGTGATAGCATCTACTATACCAGGAATATCAATGAACCCCATTTCTTGCAATTGC 852...

Sorgo (cDNA) ...TGTATGTGTGATAGCATCTACTATACTAGGAATATCAATGAACCCCATTTCTTGCAATTGC 852...

- ndhD:

293*

Milho (DNA) ...GTAATAATAGGAGCGGTGCAAATAATCTATGCAGCTTCAACTTCTCTTGGTCAACGAAAT 900...

Milho (cDNA) ...GTAATAATAGGAGCGGTGCAAATAATCTATGCAGCTTTAACTTCTCTTGGTCAACGAAAT 186...

Cana (DNA) ...GTAATAATAGGAGCGGTGCAAATAATCTATGCAGCTTCAACTTCTCTTGGTCAACGAAAT 186...

Cana (cDNA) ...GTAATAATAGGAGCGGTGCAAATAATCTATGCAGCTTTAACTTCTCTTGGTCAACGAAAT 152...

Sorgo (DNA) ...GTAATAATAGGAGCGGTGCAAATAATCTATGCAGCTTCAACTTCTCTTGGTCAACGAAAT 187...

Sorgo (cDNA) ...GTAATAATAGGAGCGGTGCAAATAATCTATGCAGCTTTAACTTCTCTTGGTCAACGAAAT 187...

- ndhF:

21*

Milho (DNA) ... TCAATGGGATTTGGACTTTTTCTTATTCCTACAGCAACAAAAATCTTCGTCGGATAT 121...

Milho (cDNA) ... TTAATGGGATTTGGACTTTTTCTTATTCCTACAGCAACAAAAATCTTCGTCGGATAT 113...

Cana (DNA) ... TCAATGGGATTTGGACTTTTTCTTATTCCTACAGCAACAAAAATCTTCGTCGCATAT 113...

Cana (cDNA) ... TTAATGGGATTTGGACTTTTTCTTATTCCTACAGCAACAAAAATCTTCGTCGCATAT 89...

Sorgo (DNA) ... TCAATGGGATTTGGACTTTTTCTTATTCCTACAGCAACAAAAATCTTCGTCGCATAT 116...

Sorgo (cDNA) ... TTAATGGGATTTGGACTTTTTCTTATTCCTACAGCAACAAAAATCTTCGTCGCATAT 116...

- petB:

204*

Milho (DNA) ... CCAATGATACGTAAGCAAGGTATTTTCGGGTCC-TTTATAG 639...

Milho (cDNA) ... CTAATGATACGTAAGCAAGGTATTTTCGGGTCC-TTTATAGGG 296...

Cana (DNA) ... CCAATGATACGTAAGCAAGGTATTTTCGGGTCC-TTTATAGGG 296...

Cana (cDNA) ... CTAATGATACGTAAGCAAGGTATTTTCGGGTCCGTTATAGGG 317...

Sorgo (DNA) ... CCAATGATACGTAAGCAAGGTATTTTCGGGTCCGTTATAGG 351...

Sorgo (cDNA) ... CTAATGATACGTAAGCAAGGTATTTTCGGGTCCGTTATAGG 351...

- rp12:

1*

Milho (DNA) ...-----ACGGCGAAACATTTA 15...

Milho (cDNA) ... CCACTTCTAGATAGAGAAACGAAGTAAAGGAGAATACTTAATAATATGGCGAAACATTTA 60...

Cana (DNA) ... CCACTTCTAGATAGAGAAACGAAGTAAAGGAGAATACTTAATAATACGGCGAAACATTTA 60...

Cana (cDNA) ...-----ACTAAAGGAGAATACTTAATAATATGGCGAAACATTTA 38...

Sorgo (DNA) ...-----GAAACGAAGTAAAGGAGAATACTTAATAATACGGCGAAACATTTA 45...

Sorgo (cDNA) ...-----GAAACGAAGTAAAGGAGAATACTTAATAATATGGCGAAACATTTA 45...

- rp120:

103*

Milho (DNA) ... GCTGTATCAAATCCAAATAATCTTTACACGATTTCCAATAAAATAAGGATCATCAATTAA 360...

Milho (cDNA) ... GCTGTATTTAAATCCAAATAATCTTTACACGATTTCCAATAAAATAAGGATCATCAATTAA 317...

Cana (DNA) ... GCTGTATCAAATCCAAATAATCTTTACACGATTTCCAATAAAATAAGGATCATCAATTAA 317...

Cana (cDNA) ... GCTGTATTTAAATCCAAATAATCTTTACACGATTTCCAATAAAATAAGGATCATCAATTAA 289...

Sorgo (cDNA) ... GCTGTATCAAATCCAAATAATCTTTACACGATTTCCAATAAAATAAGGATCATCAATTAA 293...

Sorgo (DNA) ... GCTGTATTTAAATCCAAATAATCTTTACACGATTTCCAATAAAATAAGGATCATCAATTAA 293...

- *rpoB*:

156*

Milho (DNA) ... ATTTCTATATATACCGGGACTATAATATCAGATTGGGGAGGAAGGTTCGGAATTAGCAATT 480...

Milho (cDNA) ... ATTTCTATATATACCGGGACTATAATATCAGATTGGGGAGGAAGGTTTGGAATTAGCAATT 133...

Cana (DNA) ... ATTTCTATATGCACCGGTACTATAATATCAGATTGGGGAGGAAGGTTCGGAATTAGCAATT 133...

Cana (cDNA) ... ATTTCTATATACACCGGTACTATAATATCAGATTGGGGAGGAAGGTTTGGAATTAGCAATT 133...

Sorgo (DNA) ... ATTTCTATATACACCGGTACTATAATATCAGATTGGGGAGGAAGGTTCGGAATTAGCAATT 135...

Sorgo (cDNA) ... ATTTCTATATACACCGGTACTATAATATCAGATTGGGGAGGAAGGTTTGGAATTAGCAATT 135...

182* 187*

Milho (DNA) ... CTATTCATCAGCTATGGGTTCGAATCTAAGAGAAATTTAGATAATGTTTCCTACCCCGAA 600...

Milho (cDNA) ... CTATTTATCAGCTATGGGTTTGAATCTAAGAGAAATTTAGATAATGTTTCCTACCCCGAA 253...

Cana (DNA) ... CTATTCATCAGCTATGGGTTCGAATCTAAGAGAAATTTAGATAATGTTTCCTACCCCGAA 253...

Cana (cDNA) ... CTATTTATCAGCTATGGGTTTGAATCTAAGAGAAATTTAGATAATGTTTCCTACCCCGAA 253...

Sorgo (DNA) ... CTATTCATCAGCTATGGGTTCGAATCTAAGAGAAATTTAGATAATGTTTCCTACCCCGAA 255...

Sorgo (cDNA) ... CTATTTATCAGCTATGGGTTTGAATCTAAGAGAAATTTAGATAATGTTTCCTACCCCGAA 255...

206*

Milho (DNA) ... ATTTTCTTGTCTTTCCGAATGCTAAGGAGAAGAAGAGGATTGAGTCAAAAGAAAAAGCT 660...

Milho (cDNA) ... ATTTTCTTGTCTTTCCTGAATGCTAAGGAGAAGAAGAGGATTGAGTCAAAAGAAAAAGCT 313...

Cana (DNA) ... ATTTTCTTGTCTTTCCGAATGCTAAGGAGAAGAAGAGGATTGAGTCAAAAGAAAAAGCT 313...

Cana (cDNA) ... ATTTTCTTGTCTTTCCGAATGCTAAGGAGAAGAAGAGGATTGAGTCAAAAGAAAAAGCT 313...

Sorgo (DNA) ... ATTTTCTTGTCTTTCCGAATGCTAAGGAGAAGAAGAGGATTGAGTCAAAAGAAAAAGCT 315...

Sorgo (cDNA) ... ATTTTCTTGTCTTTCCTGAATGCTAAGGAGAAGAAGAGGATTGAGTCAAAAGAAAAAGCT 315...

- *rpoC2*:

925*

Milho (DNA) ... AAGTATTTTGTTTTCGGTTTCGACCTGCAGTCGCATATGAAATGGACGAAGGGATAAATTTA 2820...

Milho (cDNA) ... AAGTATTTTGTTTTTGGTTTCGACCTGCAGTCGCATATGAAATGGACGAAGGGATAAATTTA 201...

Cana (DNA) ... AAGTATTTTGTTTTCGGTTTCGACCTGCAGTCGCATATGAAATGGACGAAGGGAGAAATTTA 204...

Cana (cDNA) ... AAGTATTTTGTTTTTGGTTTCGACCTGCAGTCTCATATGAAATGGACGAAGGGAGAAATTTA 204...

Sorgo (DNA) ... AAGTATTTTGTTTTCGGTTTCGACCTGCAGTCTCATATGAAATGGACGAAGGGAGAAATTTA 209...

Sorgo (cDNA) ... AAGTATTTTGTTTTTGGTTTCGACCTGCAGTCTCATATGAAATGGACGAAGGGAGAAATTTA 209...

- *rps14*:

27*

Milho (DNA) ...CATTTGATTTCGTCGATCCTCAAAAAAAAAAGATAAGAAGCAAAGTTTCCCTTTGAGTTTG 120...

Milho (cDNA) ...CATTTGATTTCGTCGATCCTTTAAAAAAAAAAGATAAGAAGCAAAGTTTCCCTTTGAGTTTG 110...

Cana (DNA) ...CATTTGATTTCGTCGATCCTCAAAAAAAAAAGATAAGAAGCAAAGTTTCCCTTTGAGTTTG 110...

Cana (cDNA) ...CATTTGATTTCGTCGATCCTTTAAAAAAAAAAGATAAGAAGCAAAGTTTCCCTTTGAGTTTG 113...

Sorgo (DNA) ...CATTTGATTTCGTCGATCCTCAAAAAAAAAAGATAAGAAGCAAAGTTTCCCTTTGAGTTTG 113...

Sorgo (cDNA) ...CATTTGATTTCGTCGATCCTTTAAAAAAAAAAGATAAGAAGCAAAGTTTCCCTTTGAGTTTG 113...

- *rps8*:

61*

Milho (DNA) ...TCAACTTTGCGACATCAAAGGAGAAAGACTAGAAAGGGAATATATAGAACTAGAACCTTT 240...

Milho (cDNA) ...TTAACTTTGCGACATCAAAGGAGAAAGACTAGAAAGGGAATATATAGAACTAGAACCTTT 174...

Cana (DNA) ...TCAACTTTGCGACATCAAAGGAGAAAGACTAGAAAGGGAATATATAGAACTAGAACCTTT 174...

Cana (cDNA) ...TTAACTTTGCGACATCAAAGGAGAAAGACTAGAAAGGGAATATATAGAACTAGAACCTTT 144...

Sorgo (DNA) ...TCAACTTTGCGACATCAAAGGAGAAAGACTAGAAAGGGAATATATAGAACTAGAACCTTT 165...

Sorgo (cDNA) ...TTAACTTTGCGACATCAAAGGAGAAAGACTAGAAAGGGAATATATAGAACTAGAACCTTT 198...

- *ycf3*:

15*

Milho (DNA) ...ATGCCTAGATCCCGTATAAATGGAAATTTTCATTGATAAGACCTTCTCGATTGTAGCCAAT 60...

Milho (cDNA) ...-----TCATTGATAAGACCTTTTCGATTGTAGCCAAT 32...

Cana (DNA) ...-----TCATTGATAAGACCTTCTCGATTGTAGCCAAT 32...

Cana (cDNA) ...-----TCATTGATAAGACCTTCTCGATCGTAGCCAAT 32...

Sorgo (DNA) ...-----TCATTGATAAGACCTTCTCGATCGTAGCCAAT 32...

Sorgo (cDNA) ...-----TCATTGATAAGACCTTCTCGATCGTAGCCAAT 32...

62*

Milho (DNA) ...AATCCGAAGGAAATTATGCGGAAGCTTTGCAGAATTATTATGAAGCTACGCGACTAGAAA 196...

Milho (cDNA) ...AATCCGAAGGAAATTATGCGGAAGCTTTGCAGAATTATTATGAAGCTATGCGACTAGAAA 904...

Cana (DNA) ...AATCCGAAGGAAATTATGCGGAAGCTTTGCAGAATTATTATGAAGCTACGCGACTAGAAA 900...

Cana (cDNA) ...AATCCGAAGGAAATTATGCGGAAGCTTTGCAGAATTATTATGAAGCTATGCGACTAGAAA 911...

Sorgo (DNA) ...AATCCGAAGGAAATTATGCGGAAGCTTTGCAGAATTATTATGAAGCTACGCGTCTAGAAA 191...

Sorgo (cDNA) ...AATCCGAAGGAAATTATGCGGAAGCTTTGCAGAATTATTATGAAGCTATGCGTCTAGAAA 191...

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, J.; WADDELL, P.J.; MARTIN, W.; HASEGAWA, M. Plastid genome phylogeny and a model of amino acid substitution for proteins encoded by chloroplast DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v.50, p.348-358, 2000.
- AL-JANABI, S.M.; McCLELLAND, M.; PETERSEN, C.; SOBRAL, B.W.S. Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the *Andropogoneae*: *Saccharinae*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.933-944, 1994.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic Local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.
- BACCI JUNIOR, M.; MIRANDA, V.F.O.; MARTINS, V.G. et al. A search for markers of sugarcane evolution. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.169-174, 2001.
- BAGINSKY, S.; GRUISSEM, W. Chloroplast proteomics: potentials and challenges. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1213-1220, 2004.
- BAKER, W.J.; HEDDERSON, T.A.; DRANSFIELD, J. Molecular phylogenetics and subfamily *Calamoideae* (*Palmae*) based on nrDNA ITS and cpDNA *rps16* intron sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.14, n.2, p.195-217, 2000.
- BERDING, N.; ROACH, B.T. Germplasm collection, maintenance, and use. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**: Developments in crop science. Amsterdam: Elsevier, 1987. v. 11, p.143-210.
- BIOLOGICAL SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR FOR WIN95/98/NT/2K/XP (BIOEDIT SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR). <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. (15 Apr. 2004).
- BIRBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v.7, n.6, p.1513-1523, 1979.

- BIRKY, C.W. Evolution and variation in plant chloroplast and mitochondrial genomes. In: GOTTLIEB, L.D.; JAIN, S.K. (Ed.). **Plant Evolutionary Biology**. London: Chapman and Hall, 1988. p.23-53.
- BIRKY, C.W.; MARUYAMA, T.; FUERST, P. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondrial and chloroplasts, and some results. **Genetics**, v.103, p.513-527, 1983.
- BLÄSING, O.E.; ERNST, K.; STREUBEL, E.M.; WESTHOFF, P.; SVENSSON, P. The non-photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylases of the C₄ dicot *Flaveria trinervia* – implications for the evolution of C₄ photosynthesis. **Planta**, v.215, p.448–456, 2002.
- BOXSHADE 3.21 - PRETTY PRINTING AND SHADING OF MULTIPLE-ALIGNMENT FILES. http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html. (15 Apr. 2004).
- BOWMAN, C.M.; BARKER, R.F.; DYER, T.A. In wheat ctDNA, segments of ribosomal proteins genes are dispersed repeats, probably conserved by nonreciprocal recombination. **Current Genetics**, v.14, p.127-136, 1988.
- BOCK, R. Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. **Biochimie**, v.82, p.549-557, 2000.
- BRAIDWOOD, R.J. **Prehistoric Men**. 6.ed. Chicago: Natural History Museum Press, 1948. 189p.
- BRANDES, E.W.; SARTORIS, G.B.; GRASSL, C.O. Assembling and evaluating wild forms of sugarcane and closely related plants. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGY CONGRESS, 22., Colombia, 1939. **Proceedings**. Colombia: Technicana, 1939. p.128-154.
- BRENNICKE, A.; MARCHFELDER, A.; BINDER, S. RNA editing. **FEMS Microbiology Review**, v.23, p.297-316, 1999.
- BURNQUIST, W.B. Development and application of restriction fragment length polymorphism technology in sugarcane (*Saccharum* spp.) breeding. Ithaca N.Y., 1991. 81p. Thesis (Ph.D) – Cornell University.
- CALSA JUNIOR, T. Sequenciamento e análise do genoma cloroplastidial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Piracicaba, 2001. 76p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- CATALAN, M.P.; KELLOGG, E.A.; OLMSTEAD, R.G. Phylogeny of *Poaceae* subfamily *Pooideae* based on chloroplast *ndhF* gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.8, p.150–166, 1997.
- CELARIER, R.P. Cytotaxonomy of the *Andropogoneae*. I. Subtribes *Dimeriinae* and *Saccharinae*. **Cytologia**, v.21, p.272-291, 1956.
- CHANDRASEKHARAN, U.M.; SANKER, S.; GLYNIAS, M.J. et al. Angiotensin II-forming activity in a reconstructed ancestral chymase. **Science**, v.271, p.502–505, 1996.
- CHASE, M.W.; SOLTIS, D.E.; OLMSTEAD, R.G. et al. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. **Annual Missouri Botanical Garden**, v.80, p.528–580, 1993.
- CHU, K.H.; QI, J.; YU, Z.G.; ANH, V. Origin and phylogeny of chloroplasts revealed by a simple correlation analysis of complete genomes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.1, p.200-206, 2003.
- CIPRIANI, G.; TESTOLIN, R.; MORGANTE, M. Paternal inheritance of plastids in interspecific hybrids of the genus *Actinidia* revealed by PCR-amplification of chloroplast DNA fragments. **Molecular Genetics and Genomics**, v.247, p.693-697, 1995.
- CLARK, L.G.; ZHANG, W.; WENDEL, J.F. A phylogeny of the grass family (*Poaceae*) based on *ndhF* sequence data. **Systematics of Botany**, v.20, p.436-460, 1995.
- CLAYTON, W.D.; RENVOIZE, S.A. **Genera Graminum: grasses of the world**. London: Her Majesty's Stationary Office, 1986. 897p. (Kew Bulletin Additional Series, 13.).
- CLEGG, M. T.; LEARN, G. H.; GOLENBERG, E. M. Molecular evolution of chloroplast DNA. In: SELANDER, R.K.; CLARK, A. G.; WHITTAM, T. S. (Ed.). **Evolution at the molecular level**. Sunderland, Mass.: Sinauer, 1991. p.135-149.
- CLEGG, M.T.; GAUT, B.S.; LEARN, G.H.; MORTON, B.R. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.91, p.6795-6801, 1994.
- CORNEILLE, S.; LUTZ, K.; MALIGA, P. Conservation of RNA editing between rice and maize plastids: are most editing events dispensable? **Molecular and General Genetics**, v.264, p.419-424, 2000.

- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, **Nucleic Acids Research**, v.16, n.22, p.10881-10890, 1988.
- CRANE, P.R.; FRIIS, E.M.; PEDERSEN, K.R. The origin and early diversification of angiosperms. **Nature**, v.374, p.27-33, 1995.
- CUMMINGS, M.P.; KING, L.M.; KELLOGG, E.A. Slipped-strand mispairing in a plastid gene: *rpoC2* in grasses (*Poaceae*). **Molecular Biology and Evolution**, v.11, p.1-8, 1994.
- DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD, H.T.; YEO, P.F. **The families of the monocotyledons: Structure, evolution and taxonomy**. Berlin: Springer-Verlag, 1985. 48p.
- DANIELS, J., ROACH, B.T. Taxonomy and evolution in sugarcane. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane Improvement Through Breeding**. Amsterdam: Elsevier Press, 1987. v.11, p.7-84.
- DE LAS RIVAS, J., LOZANO, J.J.; ORTIZ, A.R. Comparative analysis of chloroplast genomes: Functional annotation, genome-based phylogeny, and deduced evolutionary patterns. **Genome Research**, v.12, p.567-583, 2002.
- DELWICHE, C. F. Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. **American Naturalist**, v.154, p.S164-S177, 1999.
- DEMESURE, B.; SOZI, 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.
- DOEBLEY, J.; RENFROE, W.; BLANTON, A. Restriction site variation in the *Zea* chloroplast genome. **Genetics**, v.117, p.139-147, 1987.
- DOEBLEY, J.; DURBIN, M.; GOLENBERG, E.M.; CLEGG, M.T.; MA, D.P. Evolutionary analysis of the large subunit of carboxylase (*rbcL*) nucleotide sequence among the grasses (Gramineae). **Evolution**, v.44, p.1097-1108, 1990.
- DOWNIE, S.R.; PALMER, J.D. Use of chloroplast DNA rearrangements in reconstructing plant phylogeny. In: SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular systematics of plants**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.14-35.
- DOWNIE, S.R.; KATZ-DOWNIE, D.S. Phylogenetic analysis of chloroplast *rps16* intron sequences reveals relationships within the woody southern african *Apiaceae* subfamily *Apioidae*. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.1120-1135, 1999.

- DOYLE, K.; DOYLE, J. Plant DNA miniprep. **Focus**, v.12, p.1, 1990.
- DRESCHER, A.; RUF, S.; CALSA JUNIOR, T.; CARRER, H.; BOCK, R. The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. **Plant Journal**, v.22, p.97-104, 2000.
- DUMOLIN-LAPEGUE, S.; PEMONGE, M.H.; PETIT, R.J. An enlarged set of consensus *primers* for the study for the organelle DNA in plants. **Molecular Ecology**, v.6, p.393-397, 1997.
- ECK, R.V.; DAYHOFF, M.O. **Atlas of protein sequence and structure**. Silver Springs, MD: Natl. Biomed. Res. Found, 1966. 1v.
- EDWARDS, G.E.; HUBER, S.C. The C₄ pathway. In: HATCH, M.D.; BOARDMAN, N.K. (Ed.). **The biochemistry of plants: photosynthesis**. New York: Academic Press, 1981. v.8, p.238-281.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA MILHO E SORGO (EMBRAPA MILHO E SORGO). <http://www.cnpms.embrapa.br/>. (15 abr. 2004).
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA ARROZ E FEIJÃO (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO). <http://www.cnpaf.embrapa.br/>. (15 abr. 2004).
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA TRIGO (EMBRAPA TRIGO). <http://www.cnpt.embrapa.br/>. (15 abr. 2004).
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.
- FITCH, W.M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematics of Zoology**, v.20, p.406-416, 1971.
- FITZ-GIBBON, S. T.; HOUSE, C.H. Whole genome-based phylogenetic analysis of free-living microorganisms. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.4218-4222, 1999.
- GAUT, B.S.; CLEGG, M.T. Molecular evolution of the *AdhI* locus in the genus *Zea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.90, p.5095-5099, 1993.

- GLASZMANN, J.C.; NOYER, J.L.; FAUTRET, A. et al. Biochemical genetic markers in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.537-543, 1989.
- GLASZMANN, J.C.; LU, Y.H.; LANAUD, C. Variation of nuclear ribosomal DNA in sugarcane. **Journal of Genetic Breeding**, v.44, p.191-198, 1990.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-2002, 1998.
- GOULDING, S.E.; OLMSTEAD, R.G.; MORDON, C.W.; WOLFE, K.H. Ebb and flow of the chloroplast inverted repeat. **Molecular and General Genetics**, v.252, p.195-206, 1996.
- GRAY, M.W. The origin and evolution of plastid genomes and genes. In: BOGORAD, L.; VASIL, I.K. (Ed.). **The Molecular Biology of Plastids**. Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego, CA: Academic Press, 1991. v.7, cap.11, p.5-53.
- GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion of Plant Biology**, v.2, p.122-127, 2002.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.
- HARTLEY, W. Studies on the origin, evolution, and distribution of the *Gramineae*. I. The tribe *Andropogoneae*. **Australian Journal of Botany**, v.6, p.116-128, 1958.
- HATCH, M.D. **Photosynthesis: The Path of Carbon**. New York: Academic, 1976. p.191-844.
- HEINZ, D.J. **Sugarcane improvement through breeding: Developments in crop science**. Amsterdam: Elsevier, 1987. v. 11, p.578-582.
- HERRMANN, R.G. Eukaryotism, towards a new interpretation. In: HEA, S.; HERRMANN, R.G.; JEON, K.W.; SCHWEMMLER, W. (Ed.). **Eukaryotism and Symbiosis**. Heidelberg, Germany: Springer, 1997. p. 73-118.
- HILU, K.W.; ALICE, L.A. Evolutionary implications of *matK* indels in *Poaceae*. **American Journal of Botany**, v.86, p.1735-1741, 1999.
- HIRATSUKA, J.; SHIMADA, H.; WHITTIER, R. et al. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. **Molecular and General Genetics**, v.217, p.185-194, 1989.

- HOCH, B.; MAIER, R.M.; APPEL, K. et al. Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. **Nature**, v.353, p.178-180, 1991.
- HONG, Y.P.; HIPKINS, V.D.; STRAUSS, S.H. Chloroplast DNA diversity among trees, populations and species in the California closed-cone pines (*Pinus radiata*, *Pinus muricata* and *Pinus attenuata*). **Genetics**, v.135, p.1187-1196, 1993.
- HOWE, C.J.; BARKER, R.F.; BOWMAN, C.M.; DYER, T.A. Common features of three inversions in wheat chloroplast DNA. **Current Genetics**, v.13, n.4, p.343-349, 1988.
- HUPFER, H.; SWIATEK, M.; HORNUNG, S. et al. Complete nucleotide sequence of the *Oenothera elata* plastid chromosome, representing plastoma I of the five distinguishable *Euoenothera* plastomes. **Molecular Genetics and Genomics**, v.263, p.581-585, 2000.
- IGLOI, G.L.; MEINKE, A.; DORY, I.; KOSSEL, H. Nucleotide sequence of the maize chloroplast *rpoB/C1/C2* operon: comparison between the derived protein primary structures from various organisms with respect to functional domains. **Molecular Genetics and Genomics**, v.221, p.379-394, 1990.
- INGVARSSON, P.K.; RIBSTEIN, S.; TAYLOR, D.R. Molecular evolution of insertions and deletions in the chloroplast genome of *Silene*. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, p.1737-1740, 2003.
- JERMANN, R.M.; OPITZ, J.G.; STACKHOUSE, J.; BENNER, S.A. Reconstructing the evolutionary history of the artiodactyl ribonuclease superfamily. **Nature**, v.374, p.57-59, 1995.
- JOHNSON, L.A.; SOLTIS, D.E. *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in *Saxifragaceae*. **Systematics of Botanic**, v.19, p.143-156, 1994.
- KANEKO, T.; SATO, S.; KOTANI, H. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. **DNA Research**, v.3, p.109-136, 1996.
- KATAYAMA, H.; OGIHARA, Y. Phylogenetic affinities of the grasses to other monocots as revealed by molecular analysis of chloroplast DNA. **Current Genetics**, v.29, n.6, p.572-581, 1996.
- KATO, T.; KANEKO, T.; SATO, S. et al. Complete structure of the chloroplast genome of a legume, *Lotus japonicus*. **DNA Research**, v.7, n.6, p.323-330, 2000.

- KELCHNER, S.A. The evolution of noncoding chloroplast DNA and its application in plant systematics. **Annual Missouri Botanical Garden**, v.87, p.482-498, 2000.
- KELCHNER, S. A.; WENDEL, J.F. Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. **Current of Genetics**, v.30, p.259-262, 1996.
- KELLOGG, E.A. Relationships of cereal crops and other grasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.95, p.2005-2010, 1998.
- KELLOGG, E.A. Phylogenetic aspects of the evolution of C₄ photosynthesis. In: SAGE, R.F., MONSON, R.K. (Ed.). **Phylogenetic aspects of the evolution of C₄ photosynthesis**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 411–444.
- KELLOGG, E.A.; WATSON, L. Phylogenetic studies of a large data set. I. *Bambusoideae*, *Andropogonodae*, and *Pooidae* (*Gramineae*). **Botanical Review**, v.59, p.273-343, 1993.
- KIM, K.-J.; JANSEN, R.K. *ndhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.92, p.10379–10383, 1995.
- KOCHERT, G.; HALWARD, T.; BRANCH, W.D.; SIMPSON, C.E. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.81, p.565-570, 1991.
- LATZKO, E.; KELLY, J. The multi-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. **Physiology of Vegetables**, v.21, p.805– 815, 1983.
- 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, n.3, p.1-10, 2004.
- LEECH, R.M.; THOMSON, W.W.; PLATT-ALOIA, K.A. Observations of the mechanism of chloroplast division in higher plants. **New Phytologist**, v.87, p.1-9, 1981.
- LEISTER, D. Chloroplast research in the genomic age. **Trends in Genetics**, v.19, p.47-56, 2003.
- LEMIEUX, C.; OTIS, O.; TURMEL, M. Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. **Nature**, v.403, p.649-652, 2000.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.203-221, 1987.

- LIN, J.; GERSTEIN, M. Whole-genome trees based on the occurrence of folds and orthologs, implications for comparing genomes at different levels. **Genome Research**, v.10, p.808-818, 2000.
- LISTON, A.; ROBINSON, W.A.; OLIPHANT, J.M.; ALVAREZ-BUYLLA, E.R. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of non-flowering seed plants. **Systematics of Botany**, v.21, p.109-120, 1996.
- LU, Y.H.; D'HONT, A.; PAULET, F. et al. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. **Euphytica**, v.78, p.217-226, 1994.
- MAIER, R.M.; DÖRY, I.; IGLOI, G.L.; KÖSSEL, H. The *ndhH* genes of gramineam plastomes are linked with the junctions between small single copy and inverted repeat regions. **Current Genetics**, v.18, n.3, p.245-250, 1990.
- MAIER, R.M.; HOCH, B.; ZELTZ, P.; KÖSSEL, H. Internal editing of the maize *ndhA* transcript restores codons for conserved amino acids. **Plant Cell**, v.4, n.5, p.609-616, 1992.
- MAIER, R.M.; NECKERMAN, K.; IGLOI, G.L.; KÖSSEL, H. Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene contents, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. **Journal of Molecular Biology**, v.251, p.614-628, 1995.
- MARIAC, C.; TROUSLOT, P.; POTEAU, C. et al. Chloroplast DNA extraction from herbaceous and woody plants for direct restriction fragment length polymorphism analysis. **Biotechniques**, v.28, p.110-113, 2000.
- MARTIN, W.; STOEBE, B.; GOREMYKIN, V. et al. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. **Nature**, v.393, p.162-165, 1998.
- MARTIN, W.; RUJAN, T.; RICHLY, E.; et al. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.99, p.12246-12251, 2002.
- MASON-GAMER, R.J.; WEIL, C.F.; KELLOGG, E.A. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p.1658-1673, 1998.
- MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2001. 202p.

- MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.F.; CALHEIROS, G.G. Hibridação em cana-de-açúcar. In: BOREM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p.221-254.
- MATSUOKA, Y.; YAMAZAKI, Y.; OGIHARA, Y.; TSUNEWAKI, K. Whole chloroplast genome comparison of rice, maize, and wheat: implications for chloroplast gene diversification and phylogeny of cereals. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p.2084-2091, 2002.
- McCAULEY, D. E. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. **Trends of Ecology and Evolution**, v.10, p.190-202, 1995.
- McFADDEN, G. I. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. **Journal of Phycology**, v.37, p.951-959, 2001a.
- McFADDEN, G. I. Chloroplast origin and integration. **Plant Physiology**, v.125, p.50-53, 2001b.
- MONDE, R.A.; SCHUSTER, G.; STEM, D.B. Processing and degradation of chloroplast mRNA. **Biochimie**, v.82, p.573-582, 2000.
- MORTON, B.R.; CLEGG, M.T. A chloroplast DNA mutational hotspot and gene conversion in a noncoding region near *rbcL* in the grass family (*Poaceae*). **Current Genetics**, v.4, p.357-365, 1993.
- MUASYA, A.M.; SIMPSON, D.A.; CHASE, M.W. Phylogenetic relationships in *Cyperus* L. s.l. (*Cyperaceae*) inferred from plastid DNA sequence data. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.138, p.145-153, 2002.
- MUASYA, A.M.; SIMPSON, D.A.; CHASE, M.W.; CULHAM, A. A phylogeny of *Isolepis* (*Cyperaceae*) inferred using plastid *rbcL* and *trnL-F* sequence data. **Systematics of Botany**, v.26, p.342-353, 2001.
- MUKHERJEE, S.K. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette**, v.119, p.55-61, 1957.
- MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT BY FLORENCE CORPET.
<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>. (15 Apr. 2004).
- NADOT, S.; BAJON, R.; LEJEUNE, B. The chloroplast gene *rps4* as a tool for the study of *Poaceae* phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v.191, p.27-38, 1994.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (15 Apr. 2004).

- NEALE, D.B.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; ALLARD, R.W. et al. Chloroplast DNA diversity in populations of wild and cultivated barley. **Genetics**, v.120, p.1105-1110, 1986.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia Univ. Press, 1987. 512p.
- ODINTSOVA, M.S.; YURINA, N.P. RNA editing in chloroplast and plant mitochondria. **Genetika**, v.37, p.307-320, 2000.
- ODINTSOVA, M.S.; YURINA, N.P. Plastid genomes of higher plants and algae: structure and functions. **Molecular Biology**, v.37, p.649-662, 2003.
- OGIHARA, Y.; TERACHI, T., SASAKUMA, T. Intramolecular recombination of chloroplast genome mediated by a short direct-repeat sequence in wheat species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.85, p.8574-8577, 1988.
- OGIHARA, Y., TERACHI, T.; SASAKUMA, T. Molecular analysis of the hot spot region related to length mutations in wheat chloroplast DNAs. I. Nucleotide divergence of genes and intergenic spacer regions located in the hot spot region. **Genetics**, v.129, p.873-884, 1991.
- OGIHARA, Y., TERACHI, T.; SASAKUMA, T. Structural analysis of length mutation in a hot-spot region of wheat chloroplast DNAs. **Current Genetics**, v.22, p.251-258, 1992.
- OGIHARA, Y.; ISONO, K.; KOJIMA, T. et al. Structural features of a wheat plastomes as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. **Molecular Genetics and Genomics**, v.266, p.740-746, 2002.
- OHNISHI, Y.; TAJIRI, H.; MATSUOKA, Y.; TSUNEWAKI, K. Molecular analysis of a 21.1-kbp fragment of wheat chloroplast DNA bearing RNA polymerase subunit (*rpo*) genes. **Genome**, v.42, p.1042-1049, 1999.
- OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, Y. Soluções para geração de eletricidade. **Pesquisa FAPESP**, v.65, p.66-69, 2001.
- OLMSTEAD, R.G.; PALMER, J.D. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. **American Journal of Botany**, v.81, p.1205-1224, 1994.
- OLMSTEAD, R.G.; SWEERE, J.A. Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the *Solanaceae*. **Systematics of Botanic**, v.43, p.467-481, 1994.

- OLMSTEAD, R.G.; REEVES, P.A. Evidence for the polyphyly of the *Scrophulariaceae* based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. **Annual Missouri Botanical Garden**, v.82, p.176–193, 1995.
- PAGE, R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v.12, p.357–358, 1996.
- PALMER, J.D. Plastid chromosomes: structure and evolution. In: VASIL, I.K.; BOGORAD, L., (Ed.). **The Molecular Biology of Plastids**. Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego, CA: Academic Press, 1991. v.7, p.5–53.
- PALMER, J.D. Cell organelles. In: HERRMANN, R.G. (Ed.). **Plant gene research**. Vienna: Springer-Verlag, 1992. p.99–122.
- PALMER, J.D.; STEIN, D.B. Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. **Current Genetics**, v.10, p.823–833, 1986.
- PALMER, J. D.; DELWICHE, C.F. The origin and evolution of plastids and their genomes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular Systematics of Plants II DNA Sequencing**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 345–409.
- PALMER, J.D.; JANSEN, R.K.; MICAELS, H.J. et al. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. **Annual Missouri Botanical Garden**, v.75, p.1180–1206, 1988.
- PANJE, R.R.; BABU, C.N. Studies in *Saccharum spontaneum* distribution and geographical association of chromosome numbers. **Cytologia**, v.25, p.152–172, 1960.
- PHYLOGENETIC ANALYSIS USING PARSIMONY AND OTHER METHODS - PAUP*4.0b10. <http://paup.csit.fsu.edu/>. (15 Apr. 2004).
- PERRY, A.S.; BRENNAN, S.; MURPHY, D.J. et al. Evolutionary Re-organization of a Large Operon in Adzuki Bean Chloroplast DNA caused by Inverted Repeat Movement. **DNA Research**, v.9, p.157–162, 2002.
- PIRES, C.E.L.S. Diversidade genética de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas no Brasil. Piracicaba, 1993. 120p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RENNO, J.F.; MARIAC, C.; POTEAUX, C. et al. Haplotype variation of cpDNA in the agamic grass complex *Pennisetum* section *Brevivalvula* (*Poaceae*). **Heredity**, v.86, p.537–544, 2001.

- ROACH, B.T.; DANIELS, J. A review of the origin and improvement of sugarcane. In: COPERSUCAR INT SUGARCANE BREED WORKSHOP. Piracicaba: Copersucar, 1987. p.1-32.
- ROCHAIX, J.D. Posttranscriptional control of chloroplast gene expression. From RNA to photosynthetic complex. **Plant Physiology**, v.125, p.142-144, 2001.
- ROKAS, A.; HOLLAND, P.W.H. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. **Tree**, v.15, p.454-459, 2000.
- SANKOFF, D.; LEADUC, G.; ANTOINE, N. et al. Gene order comparisons for phylogenetic inference: Evolution of the mitochondrial genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.89, p.6575-6579, 1992.
- SATO, S.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T. et al. Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. **DNA Research**, v.6, n.5, p.283-290, 1999.
- SCHMITZ-LINNEWEBER, C.; MAIER, R.M.; ALCARAZ, J.P. et al. The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. **Plant Molecular Biology**, v.45, p.307-315, 2001.
- SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. Ribeirão Preto: Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 114p.
- SCOTT, S.E.; WILKINSON, M.J. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. **Nature Biotechnology**, v.17, n.4, p.390-392, 1999.
- SETOGUCHI, H.; ONO, M.; DOI, Y.; KOYAMA, H.; TSUDA, M. Molecular phylogeny of *Nothofagus* (*Nothofagaceae*) based on the *atpB-rbcL* intergenic spacer of the chloroplast DNA. **Journal of Plant Research**, v.110, p.469-484, 1997.
- SHIMADA, H.; FUKUTA, M.; ISHIKAWA, M.; SUGIURA, M. Rice chloroplast RNA polymerase genes: the absence of an intron in *rpoC1* and the presence of an extra sequence in *rpoC2*. **Molecular and General Genetics**, v.221, p.395-402, 1990.
- SHINOZAKI, K.; OHME, M.; TANAKA, M.; et. al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. **The EMBO Journal**, v.5, n.9, p.2043-2049, 1986.
- SOBRAL, B.W.S.; BRAGA, D.P.V.; LAHOOD, E.S.; KEIM, P. Phylogenetic analysis of chloroplast restriction enzyme site mutations in the *Saccharinae* Griseb. subtribe of the *Andropogoneae* Dumort. tribe. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.843-853, 1994.

- SOLTIS, E.D.; SOLTIS, P.M. Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. **Plant Molecular Biology**, v.4, p. 45-75, 2000.
- SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; CHASE, M.K. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. **Nature**, v.402, p.402-404, 1999.
- SPANGLER, R.E.; ZAITCHIK, B.; RUSSO, E.; KELLOGG, E. *Andropogoneae* evolution and genetic limits in *Sorghum* (*Poaceae*) using *ndhF* sequences. **Sistematics of Botanic**, v.24, p.267-281, 1999.
- STAEHELIN, L.A.; NEWCOMB, E.H. Membrane structure and membranous organelles. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: Society of Plant Physiologists, 2000. p.358-410.
- STEBBINS, G.L. Coevolution of grasses and herbivores. **Annual Missouri Botanical Garden**, v.68, p.75-86, 1981.
- STEELE, K.P.; VILGALYS, R. Phylogenetic analyses of *Polemoniaceae* using nucleotide sequences of the plastid gene *matK*. **Systematics of Botanic**, v.19, p.126-142, 1994.
- SUGAR CANE CHLOROPLAST GENOME PROJECT.
<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/sc-chloroplast>. (15 Apr. 2004).
- SVENSSON, P.; BLASING, O.E.; WESTHOFF, P. Evolution of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.2, p.180-188, 2003.
- SWOFFORD, D.L. **PAUP***: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2003. 1v.
- 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.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 315p.
- TAKAHATA, N. Allelic genealogy and human evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p.2-22, 1993.
- TAXONOMY AND SYSTEMATICS AT GLASGOW – TREEVIEW.
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>. (15 Apr. 2004).

- TEKAIA, F.; LAZCANO, A.; DUJON, B. The genomic tree as revealed from whole proteome comparisons. **Genome Research**, v.9, p.550-557, 1999.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.33, p.4673-4680, 1994.
- TONÉIS & CIA. <http://www.toneis.com.br/modules.php?name=News&file=article&sid=55>. (15 abr. 2004).
- TURMEL, M.; OTIS, C.; LEMIEUX, C. The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: Insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.96, p.10248-10253, 1999.
- TURMEL, M.; OTIS, C.; LEMIEUX, C. The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: Insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineage that led to land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.99, p.11275-11280, 2002.
- UNIÃO DA AGRICULTURA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO (ÚNICA). <http://www.portalunica.com.br/referencia/estatisticas.jsp>. (15 abr. 2004).
- WAKASUGI, T.; TSUDZUKI, T.; SUGIURA, M. The genomics of land plant chloroplasts: gene content and alteration of genomic information by RNA editing. **Photosynthesis Research**, v.70, p.107-118, 2001.
- WAKASUGI, T.; SUGITA, M.; TSUDZUKI, T.; SUGIURA, M. Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology Report**, v.16, p.231-241, 1998.
- WHITCHER, I.N.; WEN, J. Phylogeny and biogeography of *Corylus* (*Betulaceae*): inference from ITS sequences. **Systematics of Botanic**, v.26, p.283-298, 2001.
- WILSON, C.A. Phylogenetic relationships in *Iris* series *Californicae* based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. **Systematics of Botany**, v.28, p.39-46, 2003.
- WILSON, A.C.; CARLSON, S.S.; WHITE, T.J. Biochemical evolution. **Annual Review of Biochemistry**, v.46, p.573-639, 1977.
- WOLFE, K.H.; LI, W.H.; SHARP, P.M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.84, p.9054-9058, 1987.

- WOLFE, K.H.; ELISENS, W.L.; WATSON, L.E.; DEPAMPHILIS, C.W. Using restriction-site variation of PCR-amplified cpDNA genes for phylogenetic analysis of tribe *Cheloneae* (*Scrophulariaceae*). **American Journal of Botany**, v.84, p.555-564, 1997.
- WOLFE, K.H.; GOUY, M.; YANG, Y.W.; SHARP, P.M.; LI, W.J. Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.86, p.6201-6205, 1989.
- ZHANG, W. Phylogeny of the grass family (*Poaceae*) from *rpl16* intron sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.15, p.135-146, 2000.
- ZURAWSKI, G.; CLEGG, M.T.; BROWN, A.D.H. The nature of nucleotide sequence divergence between barley and maize chloroplast DNA. **Genetics**, v.106, p.735-749, 1984.