**SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DE FRAGMENTOS CLOROPLASTIDIAIS DE
TOMATE PARA CONSTRUÇÃO DE VETORES DE TRANSFORMAÇÃO DE
CLOROPLASTOS VIA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA**

IRVING JOSEPH BERGER

Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Prof.^a 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

Setembro - 2000

BERGER, I.J. Seqüenciamento e Análise de Fragmentos Cloroplastidiais de Tomate para Construção de Vetores de Transformação de Cloroplastos via Recombinação Homóloga / Irving Joseph Berger. - - Piracicaba, 2000. 118p.

ERRATA

pág.	linha	onde se lê...	leia-se...
iv	12	herdabilidade	herança
32	20	...Figuras 17, 18, 19, 20 e 21 ...	... Figuras 11, 12, 13, 14 e 15 ...
35	09	... seqüência comum...	... seqüência sobreposta ...
44	20	... homologia de 99,2%...	... identidade de 99,2% ...
44	20	... mutações ...	... divergências ...
72	02	... Figuras 22 e 23.	... Figuras 16 e 17.
75	07	... Figuras 22 e 23 ...	... Figuras 16 e 17 ....
78	02	... tomate (Tom) e tabaco (Tab)...	... tomate (LE) e tabaco (NT)...
79	08	... Figuras 28 e 29 ...	... Figuras 22 e 23 ...
79	11	... Figuras 28 e 29 ...	... Figuras 22 e 23 ...
82	04	... sendo o padrão genético...	... sugerindo que a estrutura genética ...

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Berger, Irving Joseph

Sequenciamento e análise de fragmentos cloroplastidiais de tomate para construção de vetores de transformação de cloroplastos via recombinação homóloga / Irving Joseph Berger. - - Piracicaba, 2000.

118 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Cloroplasto 2. Recombinação genética 3. Tomate 4. Transformação genética I.
Título

CDD 635.642

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

**À toda minha família
e em especial minha
esposa Roberta e nossa
pequena Pietra,**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Helaine Carrer pela orientação, por todas as oportunidades e constante incentivo na continuidade de minha formação acadêmica;

Ao Prof. Dr. Ralph Bock (Universidade de Freiburg) pela co-orientação e valiosa contribuição em minha formação;

À Dra. Dirce Maria Carraro pela orientação no seqüenciamento, montagem das seqüências e freqüentes sugestões;

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e Universidade de São Paulo que me acolheram desde a graduação;

Ao Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) e ao Departamento de Ciências Biológicas pela oportunidade e conhecimentos concebidos;

Ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela oportunidade à erudição;

Ao CNPq, CAPES e DAAD pelo apoio financeiro;

A todos os amigos do CEBTEC que de alguma forma contribuíram para alcançar este objetivo: Prof. Dr. Murilo, Prof. Dr. Gallo, Prof. Dr. Otto, Fátima, Enio, Romeu, Amaral, Solizete, Clara, Matheus, Adriano, Reimar, Adriano Malosso, Rosana, Daniela, Telma, Fábio e Felipe. Em especial ao amigo Tercílio que muito contribuiu nas discussões e construção da seqüência alvo utilizada na construção dos vetores de transformação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	iii
RESUMO.....	iv
SUMMARY.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 Cloroplasto: Estrutura e Aspectos Relevantes.....	04
2.2 Transformação de Cloroplastos.....	08
2.3 Aspectos Biotecnológicos da Transformação de Cloroplastos.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Material vegetal.....	19
3.2 Isolamento de cloroplastos e ptDNA.....	19
3.3 Clonagem e sequenciamento de fragmentos de ptDNA.....	19
3.3.1 Sequenciamento do fragmento cloroplastidial clonado no plasmídio pIJB1 (8,6 kb) através de subclonagens por enzimas de restrição.....	20
3.3.2 Sequenciamento do fragmento cloroplastidial clonado no plasmídio pIJB2 (6,4 kb) através de minibibliotecas <i>shotgun</i>	22
3.4 Análise de homologia.....	23
3.5 Obtenção da sequência flanqueadora de ptDNA para construção de vetores de transformação.....	24
3.6 Construção do gene marcador seletivo.....	26
3.7 Construção final de vetores de transformação de cloroplasto de tomate via recombinação homóloga.....	30
3.7.1 Vetor de transformação pIJB18 com 12 sítios de restrição.....	30
3.7.2. Vetor de transformação pIJB20 com 14 sítios de restrição.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Clonagem e sequenciamento de fragmentos de ptDNA.....	32

4.1.1 Sequenciamento do fragmento cloroplastidial clonado no plasmídio pIJB1 (8,6 kb) através de subclonagens por enzimas de restrição.....	32
4.1.2 Sequenciamento do fragmento cloroplastidial clonado no plasmídio pIJB2 (6,4 kb) através de minibibliotecas shotgun.....	39
4.2 Análise de homologia nas regiões codificadoras e nos espaços intergênicos.....	44
4.3 Identificação de sítios únicos de restrição para construção de vetores de transformação via recombinação homóloga.....	75
4.4 Construção do gene marcador seletivo.....	76
4.5 Construção de vetores de transformação de cloroplasto de tomate via recombinação homóloga.....	79
5 CONCLUSÕES.....	82
ANEXO A.....	83
ANEXO B.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Nucleotídeos:

A	Adenina
T	Timina
C	Citosina
G	Guanina

Aminoácidos:

A	Alanina
R	Arginina
N	Asparagina
D	Ácido Aspartico
B	Asparagina ou Ácido Aspartico
C	Cisteína
Q	Glutamina
E	Ácido Glutâmico
Z	Glutamina ou Ácido Glutâmico
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Leucina
K	Lisina
M	Metionina
F	Fenilalanina
P	Prolina
S	Serina
T	Treonina
W	Triptofano
Y	Tirosina
V	Valina

Outros:

pb	pares de bases
Kb	quilobases (1000 pares de bases)
Primer	oligonucleotídeo sintetizado

**SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DE FRAGMENTOS CLOROPLASTIDIAIS DE TOMATE
PARA CONSTRUÇÃO DE VETORES DE TRANSFORMAÇÃO DE CLOROPLASTOS VIA
RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA**

Autor: IRVING JOSEPH BERGER

Orientadora: Profa. HELAINE CARRER

RESUMO

A coordenação de células vegetais requer a participação de três sistemas genéticos distintos, porém interdependentes durante seu desenvolvimento. Além da informação genética alojada no núcleo, células vegetais contêm DNA em seus cloroplastos e mitocôndrias, as quais são organelas semi-autônomas possuidoras de sua própria maquinaria necessária à transcrição gênica, síntese proteica e parte da replicação. O estudo de novas alternativas tecnológicas levou ao desenvolvimento da tecnologia de transformação do genoma cloroplastidial (plastoma) de plantas superiores, gerando otimistas expectativas no melhoramento de plantas. Plantas possuindo genoma cloroplastidial transformado (transplastômicas) possuem algumas vantagens quando comparadas aos transformantes nucleares, pois possibilitam transformação dirigida, garantem segurança ambiental na dispersão de genes via pólen, uma vez que a característica de herdabilidade maternal dos cloroplastos ocorre na maioria das espécies cultivadas, e apresentam extraordinários níveis de expressão do gene introduzido. O sistema de transformação de cloroplastos de plantas superiores foi desenvolvido inicialmente em tabaco e mais recentemente em *Arabidopsis thaliana* e batata (*Solanum tuberosum*). As semelhanças genéticas entre tabaco e tomate (ambos pertencentes à família *Solanaceae*) apontam essa

importante espécie como forte candidata ao sucesso na expressão de transgenes, disponibilizando ao melhorista de plantas uma ferramenta altamente eficiente e vantajosa. Visando o desenvolvimento da tecnologia de transformação de cloroplastos de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) fragmentos cloroplastidiais de tomate IAC-Santa Clara foram clonados e analisados para a construção de vetores de transformação via recombinação homóloga. Isolamento e clonagem de fragmentos *Pst*I/*Sac*I de cloroplastos de tomate deram origem aos plasmídios pIJB1 e pIJB2, contendo fragmentos de 8.660 pb e 6.366 pb respectivamente. Seqüenciamento e análise dos fragmentos revelaram que as seqüências são altamente homólogas aos respectivos fragmentos em tabaco, especialmente nas regiões codificadoras, e o mapeamento gênico mostrou que o posicionamento relativo das regiões codificadoras é também conservado entre as duas espécies. Espaços intergênicos mostraram-se menos conservados, sugerindo que divergências evolutivas ocorram principalmente em áreas não diretamente envolvidas na expressão gênica. Uma diferença bastante marcante encontrada está em um fragmento de 437 pb presente em tabaco entre as regiões codificadoras dos genes *trnE* e *trnT* e ausente no DNA cloroplastidial de tomate. Análise do padrão de restrição das seqüências cloroplastidiais apontou a seqüência *Sma*I/*Xho*I (2404 pb) contendo o sítio único de restrição *Stu*I entre os genes *petN* e *psbM* como opção ideal para a construção de vetores de transformação de cloroplastos de tomate. Foi construído um cassete plástidio-específico *atpI-aadA-rps14*, que confere resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina, o qual foi inserido no sítio *Stu*I na seqüência alvo *Sma*I/*Xho*I. Assim, permitiu a construção de dois vetores para transformação de cloroplastos de tomate, pIJB18 e pIJB20 disponíveis para a inserção de novos genes de interesse agrônômico nesta espécie. Transformação de cloroplastos poderá facilitar o estudo da regulação gênica cloroplastidial e auxiliar o melhoramento genético de espécies cultivadas. O recente sucesso na expressão de toxinas conferindo resistência a insetos, resistência ao herbicida glifosato e especialmente de hormônio do crescimento humano em cloroplastos de tabaco, levam a acreditar que a tecnologia promete revolucionar o conceito e a aplicabilidade das plantas transgênicas no melhoramento genético.

**SEQUENCING AND ANALYSES OF TOMATO CHLOROPLAST DNA FRAGMENTS FOR
CONSTRUCTION OF CHLOROPLAST TRANSFORMATION VECTORS VIA HOMOLOGOUS
RECOMBINATION**

Author: IRVING JOSEPH BERGER

Adviser: Prof. HELAINE CARRER

SUMMARY

Plant cell coordination involves three different genetic systems, which are interdependents during its development. Besides the genetic information localized in the nucleus, plant cells contain DNA in chloroplasts and mitochondria, which are semi-autonomous organelles with its own necessary machinery for transcription, protein synthesis and part of replication. Studies for new alternative technologies made possible the development of the chloroplast genome (plastome) transformation technology, generating optimistic expectations in plant biotechnology. Chloroplast genome transformed plants (transplastomic plants) have some advantages when compared to nuclear transformants, they facilitate driven transformation, they guarantee environmental safety concerning gene dispersion and they present extraordinary expression levels of the introduced gene. Chloroplast transformation technology for higher plants was first developed in tobacco and more recently in *Arabidopsis thaliana* and potato (*Solanum tuberosum*). The genetic similarity between tobacco and tomato chloroplast genomes (both belonging to the *Solanaceae* family) point these important species as strong candidate to the success in transgene expression, making available a highly efficient and advantageous tool to plant breeders. Seeking the

development of the tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) chloroplast transformation technology, chloroplast DNA fragments of IAC-Santa Clara tomato were cloned and analyzed for transformation vectors construction. Isolation and cloning of *Pst*I/*Sa*I tomato chloroplast fragments generated the pIJB1 and the pIJB2 plasmids, with fragments of 8,660 bp and 6,366 bp respectively. Sequencing and analysis of both fragments revealed that the sequences are highly homologous to the respective fragments in tobacco, specially concerning coding regions. Gene mapping showed that the relative positioning of the coding regions is also conserved between the two species. Intergenic spaces was shown less conserved, indicating that evolutionary divergences occurs mainly in regions that are probably not directly involved in gene expression. The biggest difference found is a 437 pb fragment present in tobacco between the coding regions of the *trnE* and *trnT* genes but absent in the tomato chloroplast DNA. Restriction pattern analysis of the chloroplast sequences pointed the *Sma*I/*Xho*I (2404 pb) sequence with a single *Stu*I restriction site between the *petN* and *psbM* genes as ideal option for vector construction and consequent tomato chloroplast transformation. Plastid-specific cassette *atpI-aadA-rps14*, conferring resistance against spectinomycin and streptomycin, was constructed and inserted into the *Sma*I/*Xho*I targetting sequence at the *Stu*I site, allowing the construction of two vectors for tomato chloroplast transformation, pIJB18 and pIJB20. Both are available for insertion of new genes and their expression in this species. It is clear that the ability to transform chloroplasts will facilitate the study of plastid gene regulation and the application of the genetic engineering in the improvement of crop species. Recent successes on expression of exogenous genes: toxins conferring resistance to insects, resistance to glyphosate and especially human growth hormone synthesis in tobacco chloroplasts, suggest that the technology promises to revolutionize the concept and the application of the transgenic plants in the genetic breeding.

1. INTRODUÇÃO

Programas de melhoramento normalmente requerem longo tempo para a transferência de genes de interesse entre espécies vegetais e estão muitas vezes limitados pela freqüente incompatibilidade sexual entre espécies cultivadas ou ainda por diversos outros fatores. Em busca de alternativas, melhoristas e estudiosos de plantas têm utilizado intensivamente técnicas de biologia molecular e de cultivo de células e tecidos no desenvolvimento de tecnologia agrícola.

A cultura de tecidos vegetais tem possibilitado, por exemplo, a limpeza de vírus, a propagação de matrizes de alto potencial produtivo e a produção de metabólitos secundários através do cultivo de células vegetais *in vitro*. Recentemente, com o desenvolvimento da engenharia genética tem-se tomado possível a manipulação das características genéticas através da introdução e expressão de genes de interesse agrônômico em espécies cultivadas, tais como resistência a herbicidas e insetos, aumento de valor nutritivo e conservação pós-colheita.

Hoje já é indiscutível o potencial e a aplicabilidade da biologia molecular no setor agrícola, no entanto também crescentes são as tentativas de se mostrar a existência de riscos e a necessidade de regulação rigorosa no desenvolvimento de plantas transgênicas. Tal fato ocorre principalmente em função da introdução de genes no material genético nuclear ser uma prática comum em experimentos de engenharia genética, gerando discussões bastante polêmicas, como o potencial risco de fluxo gênico via pólen em cruzamentos entre espécies relacionadas, significando por exemplo o risco de transferência de resistência à herbicidas a determinadas plantas invasoras.

Em células vegetais o DNA pode ser encontrado em três compartimentos distintos, porém interdependentes na coordenação celular: no núcleo, nos cloroplastos e nas mitocôndrias. Em vista disso, estudos em tecnologias de transformação de organelas têm

sido uma área de grande interesse nos últimos anos, principalmente porque estas apresentam herança maternal na maioria das espécies vegetais cultivadas, tornando-se um valioso método de melhoramento de plantas com controle ambiental. Uma vez que o pólen não carrega organelas na maioria das espécies cultivadas comercialmente, a possibilidade de fluxo gênico indesejado torna-se impossibilitado através de cruzamento.

Por outro lado, estando os cloroplastos diretamente associados a diversos processos fisiológicos, bioquímicos e genéticos do crescimento e desenvolvimento das plantas, o estabelecimento de uma tecnologia de transformação desta organela mostra-se de grande importância também como ferramenta de estudo dos diversos aspectos da expressão gênica cloroplastidial *in vivo*. Diversos estudos fisiológicos e bioquímicos passaram a ser possíveis com a manipulação do genoma cloroplastidial, especial atenção dada ao estudo do funcionamento dos diferentes genes relacionados à fotossíntese.

Os cloroplastos também estão envolvidos no processo de maturação de frutos. Em frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), o desenvolvimento de cromoplastos a partir de cloroplastos envolve processos degradativos e sintetizadores, incluindo a quebra do sistema de membranas dos tilacóides com a concomitante degradação de clorofila, a conversão de reservas de amido em açúcares e a síntese em larga escala do pigmento vermelho licopeno envolvido na síntese de vitamina A. O entendimento do controle da expressão gênica em cloroplastos durante esse processo de desenvolvimento seria importante tanto como um sistema modelo para o desenvolvimento de plastídios, como também para a proposição e estudo dos mecanismos envolvidos no amadurecimento de frutos, por exemplo do próprio tomate (Phillips, 1985a).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento da tecnologia de transformação de cloroplastos de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) pela construção de vetores de transformação via recombinação homóloga, possibilitando futura introdução de novas características desejadas na espécie, seja a nível agrônomo ou nutricional. Para tanto, são objetivos parciais a construção de um gene marcador seletivo, o isolamento, o seqüenciamento e análise de fragmentos do DNA de cloroplasto (ptDNA) de tomate para obtenção de uma região apropriada para inserção do gene marcador e/ou possíveis genes de interesse.

Desta forma, este trabalho tem por meta produzir resultados para o estabelecimento de protocolo eficiente de transformação e expressão de genes com aplicação biotecnológica em plantas de tomate, cultura que apresenta grande importância agrícola em nosso país e no mundo como um todo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cloroplasto: Estrutura e Aspectos Relevantes

Os cloroplastos são as organelas mais abundantes de uma família de organelas de dupla membrana denominadas genericamente plastídios e de comum ocorrência em células vegetais. Os plastídios são originados de proplastídios, pequenos corpos vesiculares produzidos na divisão celular. Plastídios sem pigmentação são denominados leucoplastos, entretanto freqüentemente são sítios de acúmulo de amido, passando a ser chamados de amiloplastos. Os cloroplastos contém os pigmentos fotossintéticos, sendo responsáveis pela fotossíntese e pela predominante coloração verde das folhas. Leucoplastos de folhas (etioplastos) e cloroplastos são frequentemente interconvertíveis, dependendo do estágio fisiológico da célula e das condições de luminosidade. Elaioplastos armazenam óleos e lipídios. Cromoplastos contém outros pigmentos que não a clorofila e por exemplo a cor característica de frutos de tomate e cenoura é devido à presença de cromoplastos contendo carotenóides. Os pigmentos em cromoplastos são usualmente tão concentrados que apresentam-se na forma de depósitos cristalinos (Hopkins, 1995).

Além de responsáveis pelo processo de fotossíntese, plastídios também participam na biossíntese de aminoácidos, nucleotídios, lipídios e amido (Sugiura, 1992), e estão diretamente envolvidos em uma gama de processos degradativos e sintetizadores no climatério de frutos, incluindo a degradação de clorofila na membrana dos tilacóides, a conversão de amido em reservas de açúcares e a síntese de pigmentos carotenóides (Phillips, 1985b). Isso se deve ao fato de a coordenação de células vegetais ser dependente de três distintos, porém interdependentes sistemas genéticos durante seu desenvolvimento. Além do núcleo, cloroplastos e mitocôndrias possuem seu próprio genoma (DNA) e tais DNAs

organelares possuem sua própria maquinaria de transcrição e tradução, possibilitando inclusive parte do controle de sua auto-replicação (Schuler, 1989).

O genoma típico de cloroplastos (plastoma) é circular, possui de 120 a 180 kb em plantas superiores, é idêntico em todos os tipos de plastídios e possui uma região duplicada com orientação invertida de aproximadamente 25 kb (Palmer, 1985; Maliga, 1993). Sequências completas de genomas cloroplastidiais permitem concluir que esse DNA (ptDNA) contém cerca de 120-130 genes, incluindo codificadores de rRNAs, tRNAs, peptídeos não identificados e regiões de provável codificação de polipeptídios (ORFs ou "quadros de leitura aberta") (Lindhölm, 1992; Sugiura, 1992).

O número de cloroplastos e cópias do genoma por célula é dependente do tipo de célula. Uma célula meristemática de tabaco possui de 10 a 15 proplastídios, cada um contendo aproximadamente 50 cópias do genoma, enquanto uma célula foliar possui em torno de 100 cloroplastos contendo até 100 cópias do genoma (Maliga, 1993). Uma grande diferença nesses números já foi demonstrada para diferentes espécies. Bendich (1987) relata variação entre 1.900 a 50.000 cópias do genoma em células foliares de diferentes plantas (Tabela 1). No entanto, segundo Maliga et al. (1993), as plantas devem possuir um sistema de reparo bastante eficiente, eliminando a maioria das mutações e alterações do genoma, visto que a uniformidade das cópias é mantida dentro da espécie.

TABELA 1. Número de cópias do genoma plastidial em plantas superiores.

Planta	% do Total de DNA	Genomas/Célula	Genomas/Plastídio
Ervilha	12	10.000	270
Soja	17	13.000	*
Espinafre	23	13.000	200
Beterraba	11	1.900	100
Batata	8	3.000	22
Trigo	17	50.000	900
Tabaco*	-	10.000	100

Fonte: Bendich (1987); Carrer & Maliga (1995).

* Dado desconhecido.

Esse enorme número de cópias do genoma é provavelmente reflexo de um aumento da atividade metabólica, diretamente ligada à taxa fotossintética do tecido. Propõe-se que esse elevado número de cópias reflete um aumento na necessidade de ribossomos organelares que pode somente ser satisfeita também pelo aumento do número de genes codificadores de RNA ribossomal (rRNA), resultando em multiplicação do genoma (Bendich, 1987). Obviamente todos os genes são multiplicados e seus transcritos também serão mais abundantes, uma vez que a regulação da expressão gênica cloroplastidial ocorre preferencialmente em nível pós-transcricional e a taxa de transcrição não varia significativamente para os diversos genes (Mayfield & Bruick, 1999).

As diversas cópias do genoma presentes em cada cloroplasto não se apresentam uniformemente distribuídas na organela e são tampouco encontradas isoladas, mas em associações com proteínas formando discretas estruturas referidas como nucleóides (Kuroiwa et al., 1981 e Dyer, 1984 citados por Lidholm, 1992). Por sua vez, dado o número total já mencionado de cópias do genoma, o número de nucleóides por plastídio, assim como sua distribuição e composição, podem variar consideravelmente entre espécies, tecidos, tipos de plastídios e durante a diferenciação plastidial. O número de genomas por nucleóide é variável (de 1 a mais de 12 cópias), resultando em diferentes graus de ploidia (Herrmann et al., 1992). Diante dessa característica os cloroplastos são tidos como um sistema genético altamente poliplóide (Maliga et al., 1994)

É certo que tal organização do genoma em nucleóides trata-se de característica remanescente daquela encontrada em bactérias (Watson et al., 1987 citado por Lidholm, 1992). Diversos relatos científicos, tais como a origem procariótica do mecanismo de divisão de cloroplastos (Osteryoung et al., 1998), a constituição molecular dos genes plastidiais, especialmente os promotores (Sugiura, 1992), a organização dos genes, a ocorrência de recombinação homóloga e os processos relacionados tal como a conversão gênica (Maliga et al., 1994), vêm comprovando a teoria de que os cloroplastos teriam sido originados de uma ou mais interações endossimbióticas entre algas unicelulares não fotossintetizantes e uma eubactéria fotossintetizante, uma cianobactéria (Gray, 1991). Como consequência, a mais marcante característica organizacional de cromossomos plastidiais, com reflexo direto sobre a expressão gênica, é que a grande maioria de seus genes é tipicamente organizada em unidades de transcrição policistrônicas, como em procariotos, lembrando fielmente a organização em "operons" de seus ancestrais bacterianos (Herrmann et al., 1992). A similaridade mostra-se suficientemente grande

para que os cloroplastos sejam tidos como estruturas caracteristicamente procarióticas (Sugiura, 1992; Lidholm, 1992; Schuler, 1989), embora apresentem alguns mecanismos de regulação da expressão além daqueles comuns aos procariotos (Mayfield & Bruick, 1999) e alguns de seus genes também apresentem pequenos íntrons, regiões não traduzidas típicas de genomas eucarióticos.

Importante mecanismo de regulação da expressão gênica cloroplastidial a se considerar, similar ao que ocorre também em mitocôndrias, é o editamento de RNA, um dos vários mecanismos envolvidos na modificação e maturação pós-transcricional de mRNAs plastidiais, sem no entanto estar evolutivamente relacionado a outros diversos processos de editamento de transcritos caracterizados em outros sistemas genéticos (Bock, 1998b). A ocorrência do fenômeno de editamento, descoberta em cloroplastos por Benne e colaboradores em 1986 e relatada pela primeira vez em cloroplastos de milho (Hoch et al., 1991), alterou a idéia clássica do fluxo da informação genética do DNA para proteínas via RNA (Bock, 1998b). Entendido como um mecanismo adicional do controle da síntese de produtos gênicos funcionais em plastídios, o editamento pode ser definido como qualquer evento pós-transcricional que altera a sequência de nucleotídeos da molécula de RNA com relação à molécula de DNA molde da qual esse RNA se originou (Lidholm, 1992). Conseqüentemente, o editamento de RNA pode cancelar ou corrigir aparentes desvios do código genético universal, uma vez que a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo traduzido via transcrito editado não é necessariamente idêntica àquela predita na respectiva sequência do gene (Lidholm, 1992). Em cloroplastos de plantas superiores o editamento de RNA é caracterizado por simples conversões de resíduos de citosina a uracila (pirimidina-pirimidina; C → U) (Hoch et al., 1991; Kudla et al., 1992 citados por Bock, 1998b), embora conversões do tipo U → C tenham sido recentemente relatadas em transcritos do musgo *Anthoceros formosae* (Yoshinaga et al., 1996), caracterizando um processo de "editamento reverso" aparentemente ausente em plantas superiores.

O editamento de RNA em cloroplastos parece ser um dos primeiros processos pós-transcricionais e pré-traducionais, representando assim um passo adicional ao mecanismo de processamento "tradicional" operante em transcritos plastidiais: maturação das extremidades 3' e 5', processamento de mRNAs policistrônicos em monocistrônicos e "splicing" quando na existência de íntrons. A frequência de eventos de editamento em cloroplastos é relativamente baixa e foi estimada em aproximadamente 25 sítios para genomas plastidiais completos (Maier et al., 1995), embora atualmente já existam 31 sítios particularmente caracterizados no plastoma de

tabaco (Hirose et al., 1999). Como exemplo, o gene *rp120* de tabaco apresenta apenas um sítio de editamento (uCa → uUa), enquanto os genes *rpoB* e *ndhB* apresentam respectivamente 6 e 9 sítios (Hirose et al., 1999). Curiosamente, esses dados contranham com os mais de 1000 sítios de editamento encontrados em mitocôndrias de plantas superiores, onde o sistema de editamento mostra-se bastante similar ao que ocorre em cloroplastos (Maier et al., 1996, Hanson et al., 1996 e Mulligan & Maliga, 1998 citados por Bock, 1998b).

Uma questão central no que se refere ao editamento de RNA em cloroplastos é como explicar a extraordinária alta especificidade na seleção de resíduos individuais de citosina para modificação (Bock, 1998b). Diversos estudos *in vivo* demonstraram que seqüências do mRNA flanqueando o sítio de editamento estão diretamente envolvidas no reconhecimento molecular de sítios de editamento em plastídios (Chaudhuri et al., 1995; Bock et al., 1996; Chaudhuri & Maliga, 1996), no entanto não podem ser identificadas quaisquer seqüências ou estruturas consenso (elementos *cis*-acting consenso), seja a nível primário ou secundário, que possam estar envolvidas nesse reconhecimento (Bock, 1998b; Hirose et al., 1999). Diversos indicativos também levam a acreditar que fatores *trans*-acting sítio-específicos (proteínas) de origem nuclear (extraplastídica) participem na seleção e reconhecimento de sítios de editamento (Ralph & Koop, 1997), entretanto a natureza molecular da especificidade de tais fatores-acting para o editamento de RNA permanece desconhecida (Bock, 1998b). Uma atrativa enzima candidata a compor a subunidade catalítica de um hipotético editossoma ("editosome") é uma citosina desaminase, enzima capaz de atuar diretamente sobre polinucleotídeos (Bock, 1998b).

2.2. Transformação de Cloroplastos

A transformação de organelas *in vivo*, como alternativa à transformação nuclear, passou a ser realidade após o desenvolvimento do sistema de biolística, Klein et al. (1987). A primeira transformação de cloroplastos foi em *Chlamydomonas reinhardtii*, uma alga unicelular que apresenta somente um cloroplasto, em 1988, pelo grupo do Dr. John Boyton (Boyton et al., 1988). Em plantas superiores, a transformação de cloroplastos foi estabelecida dois anos depois, em tabaco (*Nicotiana tabacum*), pelo grupo do Dr. Pal Maliga (Svab et al., 1990), sendo extensivamente explorada desde então (Svab & Maliga, 1993; Staub & Maliga, 1993; Bock et al. 1994; Carrer &

Maliga, 1995; Serino & Maliga, 1998; Kota et al., 1999). O genoma mitocondrial, por sua vez, também tem sido objetivo de estudo em vários laboratórios de pesquisa do mundo, mas nenhum resultado positivo em plantas foi obtido até o momento, desde que a mitocôndria da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Johnston et al., 1988) e da alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Randolph-Anderson et al., 1993) foram transformadas com sucesso, levando-nos portanto a acreditar que a transformação do genoma mitocondrial de plantas deverá ser conseguida num futuro próximo.

Com base nos diversos estudos desenvolvidos em tabaco, transformação estável do genoma plastidial tem sido realizada por meio das etapas que seguem: (i) introdução do DNA transformante codificando resistência à antibiótico por meio de biobalística ou via tratamento com PEG (polietilenoglicol), (ii) integração estável do DNA transformante por dois eventos de recombinação homóloga, de tal forma que o funcionamento normal do genoma plastidial não seja alterado e (iii) eliminação seletiva de cópias originais do genoma plastidial e acúmulo do transplastoma durante sucessivas divisões celulares em meio seletivo (Svab & Maliga, 1993; Staub & Maliga, 1993; Bock et al. 1994; Carrer & Maliga, 1995; Serina & Maliga, 1998; Kota et al., 1999; Bock & Hagemann, 1999 e muitos outros).

Dessa maneira, o sistema de transformação de organelas está primariamente ancorado na introdução de material genético no interior de células e mais especificamente no ambiente cloroplastidial. O desenvolvimento do sistema de biobalística, ou bombardeamento de partículas (Klein et al, 1987), tomou possível bombardear ácidos nucleicos em qualquer tecido ou célula alvo, assim como praticamente todos os compartimentos subcelulares de uma célula eucariótica (Sanford et al, 1987; Sanford et al., 1991) . Partículas de tungstênio ou ouro cobertas com o plasmídeo vetor (DNA transformante), lançadas sob pressão de gás hélio, são capazes de transpor a membrana dupla que envolve as organelas, a principal barreira na introdução de genes nesses compartimentos celulares (Bock & Hagemann, 1999) (Figura 1.A, B).

Como metodologia alternativa para transformação de cloroplastos de tabaco, protocolos de transformação química baseada em polietilenoglicol foram desenvolvidos e têm sido também utilizados com sucesso (Spörlein et al, 1991; Koop et al., 1992; Golds et al., 1993; O'Neill et al., 1993; Koop et al., 1996). Segundo Koop et al. (1996) a obtenção de transformantes plastômicos mediada por polietileno glicol (PEG), em protoplastos, trata-se de uma alternativa simples, de alta reprodutibilidade e baixo custo ao processo de biolística. Por si só a transformação baseada em PEG não representaria uma limitação à maiores taxas de obtenção de transformantes regenerados, como demonstrado para tabaco, no entanto sua aplicação fica bastante limitada pelo

menor desenvolvimento da cultura de protoplastos e regeneração de plantas nas diversas espécies vegetais (Koop et al., 1996). Neste aspecto, o processo de biobalística não representa uma restrição, uma vez que, tratando-se de um método de introdução de DNA puramente físico, não se trata de um sistema espécie específico.

Uma vez inserido o DNA transformante, a obtenção de transformantes estáveis (referidos como plantas transplastômicas) depende da integração estável desse DNA exógeno no genoma cloroplastidial. Tratando-se de um compartimento celular tipicamente procariótico, a integração do DNA transformante, como quaisquer eventos de recombinação em cloroplastos parecem ocorrer unicamente por recombinação homóloga (seqüências homólogas ao DNA endógeno são integradas a este por transposição da seqüência original). Conseqüentemente, a seqüência de DNA a ser introduzida no genoma cloroplastidial deve ser flanqueada por regiões de homologia com seqüência de DNA do próprio cloroplasto (Figura 2). Vetores de transformação para expressão de genes de resistência à antibióticos como espectinomicina (*aadA*) e kanamicina (*nptII*) no genoma plastídico de tabaco foram construídos utilizando-se da seqüência codificadora do gene de resistência flanqueado com seqüências homólogas do DNA de genoma plastídico (Svab & Maliga, 1993; Carrer et al., 1993). Esta seqüência homóloga do DNA plastídico é chamada seqüência "alvo", uma vez que dirige a introdução do DNA transformante no genoma plastídico. A recombinação homóloga parece ser um sistema altamente eficiente em plastídios de plantas superiores. Evidências diretas têm sido mostradas por experimentos de cotransformação que revelam uma alta freqüência de integração simultânea de dois marcadores fisicamente não ligados (Carrer & Maliga, 1995). Em adição, demonstrando a alta eficiência do processo de recombinação, Kavanagh et al. (1999) realizaram a transformação de cloroplastos de tabaco utilizando seqüência alvo de cloroplastos de *Solanum nigrum*, mostrando que taxas equivalentes de transformação de cloroplastos de tabaco podem ser obtidas pelo flanqueamento do gene de interesse por seqüências cloroplastidiais parcialmente homólogas (homeólogas). Da mesma forma, Sidorov et al. (1999) realizaram a transformação estável de cloroplastos de batata através de vetores plastídio-específicos para tabaco, promovendo a expressão de GFP ("green fluorescent protein") nas plantas transformadas.

No entanto, conforme discutido anteriormente, o sistema genético cloroplastidial é altamente poliplóide e o sistema de transformação, buscando transformantes estáveis, requer que cada uma das cópias do genoma seja alterada uniformemente. Para isso tornam-se necessárias de 15 a 20 divisões celulares (Bock & Hagemann, 1999). A transformação é iniciada pela integração

de um segmento de DNA em uma ou algumas cópias do genoma, de tal forma que o transformante primário é normalmente heteroplásmico, contendo cópias de genomas transformados e não transformados. Após vários repetidos ciclos de regeneração do transformante primário em meio sintético (Fig. 1D, E e F), sob forte pressão de seleção (meio de cultura contendo altas concentrações de antibiótico), eventualmente obtém-se plantas homoplásticas (quando todas as cópias do genoma plastídico estão alteradas uniformemente). A manutenção de alta pressão de seleção favorece a também alta expressão das moléculas de DNA transformadas, de tal modo que há um acúmulo do transplastoma (genoma transformado) e eliminação dos genomas originais (Maliga, 1993; Bock & Hagemann, 1999).

Dessa forma, o sucesso no sistema de transformação torna-se dependente da eficiência da marca genética seletiva utilizada para identificar e seletivamente ampliar o transgenoma. O gene introduzido deve ter um fenótipo possível de ser utilizado para seleção dos transgenes ou estar ligado a um gene marcador seletivo como *aadA*, *npII*, *aacC1* e outros, dependendo da cultura em estudo (Bock & Hagemann, 1999). O gene *gus*, por exemplo, codificando a enzima β -glucuronidase, foi ligado ao gene mutante *16S rRNA* que confere resistência ao antibiótico espectinomicina como um gene passageiro, demonstrando expressão da enzima em genoma plastídico (Staub & Maliga, 1992). No entanto, os mais eficientes marcadores seletivos disponíveis para a transformação de cloroplastos de plantas superiores são os construídos com o gene quimérico dominante *aadA*, utilizado primariamente na transformação nuclear de tabaco via *Agrobacterium* por Svab *et al.* (1990). O *aadA* é um gene originalmente bacteriano que codifica a enzima aminoglicoside 3"-adenililtransferase, conferindo resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina. Quando expresso no cloroplasto o gene *aadA* permite o crescimento e regeneração de células vegetais em meio sintético contendo os antibióticos (Bock & Hagemann, 1999). Mais recentemente, o desenvolvimento do sistema FLARE-S ("fluorescent antibiotic resistance enzyme, spectinomycin and streptomycin"), pela fusão das seqüências codificadoras de GFP e AAD, oferece concomitante resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina e a expressão de fluorescência sob luz ultra-violeta (Khan & Maliga, 1999), prometendo facilitar a obtenção de transformantes cloroplastidiais homoplásmicos pela facilidade do acompanhamento visual. Em adição, uma provável importante consequência do sistema marcador FLARE-S será a potencial viabilização da extensão da tecnologia de transformação de cloroplastos para plastídios não-verdes em células embriogênicas de espécies cereais (Khan & Maliga, 1999). Por fim, para facilitar a expressão do gene marcador em cloroplastos, a região

codificadora deve ser fundida a sinais de expressão plastídio-específicos: (i) uma região 5' não traduzida contendo um promotor plastidial, assim como uma sequência de iniciação de tradução e (ii) uma região 3' não traduzida típica do sistema genético plastidial, conferindo estabilidade ao transcrito, sem no entanto finalizar a transcrição (Stem and Gruissem, 1987).

Diante dessa linha de pensamento, não só a eficiência do marcador é fundamental para o sucesso da transformação, mas também um sistema eficiente de regeneração de plantas *in vitro* por meio de explantes foliares. Todo processo de seleção está baseado em sucessivos e repetidos ciclos de regeneração sob pressão de seleção (meio sintético contendo antibiótico) para o favorecimento do acúmulo do transplastoma, de forma que um protocolo eficiente de regeneração torna-se um pré-requisito incontestável, podendo realmente representar um fator limitante para o sucesso do melhoramento genético de plantas baseado em manipulações ao nível molecular. O estabelecimento da cultura de tecidos e células *in vitro* com alta taxa de regeneração de plantas férteis é altamente dependente de fatores endógenos à própria espécie ou mesmo grandes diferenças entre variedades de uma mesma espécie são encontradas. No entanto, a técnica já se mostra muito bem estabelecida para tabaco e algumas outras culturas, de modo que não existem perspectivas pessimistas quanto às possibilidades de viabilização do cultivo *in vitro* de um grande número de espécies de interesse agrônômico. Por exemplo, a cultura de células e tecidos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), utilizando como explantes segmentos de hipocótilo ou folhas de plântulas, possibilita altas taxas de formação de calos e regeneração de plantas (Faria & Illg, 1996; Gill et al., 1995), de tal forma que o sistema de transformação de plantas de tomate via *Agrobacterium tumefaciens* (McCormick et al., 1986) tem apresentado resultados significantes no melhoramento desta cultura, permitindo a introdução de novas características de interesse, tais como a resistência ao herbicida glifosato (Fillati et al., 1987) e estudos de RNA antisense retardando senescência de frutos, através da redução de expressão da enzima ACC sintase (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase) da biossíntese de etileno (Nakatsuka et al., 1997; Nakatsuka et al., 1998; Liu et al., 1998) ou mesmo inibição da expressão gênica da pectina esterase (Hall et al., 1993).

Figura 1. Tecnologia de Transformação de Cloroplastos de Plantas Superiores. Adaptado de Bock & Hagemann (1999)

Figura 2. Integração do DNA transformante por dois eventos de Recombinação Homóloga. Adaptado de Bock & Hagemann (1999).

2.3. Aspectos Biotecnológicos da Transformação de Cloroplastos

A tecnologia de transformação de cloroplastos, embora ainda pouco reconhecida por biotecnologistas, uma vez que até o momento somente tabaco, *Arabidopsis* e batata tiveram o genoma cloroplastidial transformado entre as plantas superiores, promete revolucionar a engenharia genética e o melhoramento de plantas (Bock & Hagemann,

1999). Muito já foi estudado em termos de expressão gênica e funcionamento da maquinaria cloroplastidial, levando a acreditar que plantas transplastômicas representam uma provável solução para os diversos aspectos de risco associados às plantas transgênicas nucleares.

Características inerentes ao sistema genético predominantemente procariótico e poliplóide dos cloroplastos já comprovaram a potencialidade de geração de plantas transgênicas mais eficientes e ecologicamente seguras. Nesse contexto, a primeira aplicação biotecnológica da transformação de cloroplastos veio com a geração de plantas de tabaco transplastômicas expressando em seus plastídios extraordinários altos níveis da toxina cristal de *Bacillus thuringiensis* (gene Cry1A), conferindo praticamente total resistência a diversos insetos (McBride et al., 1995). Da mesma forma, plantas transplastômicas de tabaco expressando protoxinas Cry2Aa2 também de *Bacillus thuringiensis* resultaram em níveis 20 a 30 vezes maiores do que aqueles expressos por plantas transgênicas nucleares comerciais, garantindo resistência total a diversos lepidópteros (Kota et al., 1999). Essas primeiras aplicações biotecnológicas já resultam no interesse público e industrial pelas numerosas vantagens atrativas oferecidas por plantas engenheiradas em seu genoma cloroplastidial (Bock & Hagemann, 1999). As principais vantagens de plantas transplastômicas sobre plantas transgênicas nucleares são:

(a) Segurança ambiental: Na grande maioria das plantas cultivadas cloroplastos e mitocôndrias são maternalmente herdados (Gilham et al., 1991). Conseqüentemente, o pólen dessas plantas não carrega organelas, de tal forma que a possibilidade de fluxo gênico indesejado com a dispersão de transgenes, resultando por exemplo em biótipos resistentes de plantas daninhas, é impossibilitada, minimizando uma série de riscos ecológicos muitas vezes associados às plantas transgênicas nucleares (Maliga, 1993; Bock & Hagemann, 1999).

(b) Alto nível de acúmulo de transcritos: Uma aplicação bastante vantajosa em se transformar genoma de cloroplastos refere-se ao alto nível de acúmulo da proteína de interesse em plantas transplastômicas, provavelmente em função do grande número de cópias do genoma em cloroplastos e de sua eficiente maquinaria policistônica de tradução

de mRNAs. Plantas de tabaco transplastômicas apresentaram acúmulo de 2,5 a 3% de β -glucuronidase (GUS), determinado por Staub & Maliga (1993); 1% de neomicina fosfotransferase (nptII), Carrer *et al.* (1993), 3 a 5% da toxina *Bt* (Cry1A), McBride *et al.* (1995) e 8 a 18% da proteína sintética FLARE-S (GFP fundido a AAD), Khan & Maliga (1999), da proteína solúvel total, vindo a demonstrar as expectativas já geradas em 1993 quando acreditava-se que estudos de otimização da expressão gênica poderiam levar a um significativo aumento na concentração da proteína de interesse em plantas transplastômicas (Maliga, 1993).

(c) Inserção dirigida: A integração do DNA transformante via recombinação homóloga através do flanqueamento do gene de interesse por seqüências endógenas do ptDNA (seqüências "alvo") possibilita a introdução dirigida e programada desse DNA no genoma plastídico (Maliga, 1993). Essa precisão no ponto de inserção, resultante da recombinação homóloga, evita incontrollados "efeitos de posição" de ocorrência comum em transformantes nucleares (com conseqüente silenciamento gênico, por exemplo) e torna possível a inativação ou modificação de genes plastidiais de forma previsível (Koop *et al.*, 1996) de tal forma a garantir que o funcionamento normal do genoma cloroplastidial não seja alterado (Maliga, 1993).

(d) Ausência de efeitos epigenéticos: Efeitos epigenéticos, decorrentes de interações entre dois ou mais genes (Strickberger, 1985), produzindo fenótipos diferenciados e indesejados são de freqüente ocorrência em experimentos de transformação nuclear (Bock & Hagemann, 1999). No entanto, efeitos epigenéticos não são conhecidos em plastídios, sendo provavelmente ausentes em organelas celulares, fazendo com que experimentos de transformação de cloroplastos sejam mais previsíveis e confiáveis quando comparados a transformantes nucleares (Bock & Hagemann, 1999).

(e) Eliminação do gene marcador de resistência a antibiótico: Outra principal preocupação pública a respeito de plantas transgênicas é a massiva liberação de genes de resistência à antibióticos que são usualmente utilizados como genes marcadores

seletivos em transformação de plantas. Remoção desse gene marcador após a geração da planta transgênica, portanto, é altamente desejável. A posse de tais técnicas de eliminação do marcador é também importante por uma segunda razão: o número de genes marcadores seletivos disponíveis para transformação é limitado. Cada introdução adicional de gene endógeno à planta transgênica iria requerer um novo marcador seletivo conferindo uma resistência diferente daquela(s) previamente utilizada(s), a menos que fosse permitida uma reciclagem e o mesmo gene marcador pudesse ser reutilizado (Bock & Hagemann, 1999). Duas diferentes estratégias estão disponíveis para reciclagem de marcadores em transformação de cloroplastos (Fischer et al., 1996): (i) recombinação homóloga entre duas repetições diretas flanqueando o gene marcador seletivo e (ii) cotransformação de um vetor contendo o gene desejado e um segundo vetor "auxiliar" contendo um gene marcador seletivo, rompendo um ORF ("open reading frame" ou quadro de leitura aberto) essencial ao cloroplasto e consequentemente prevenindo que plantas transformadas tornem-se homoplásmicas para o gene de resistência. Quando homoplasmia é verificada para o gene de interesse, o gene heteroplásmico de resistência poderá ser prontamente eliminado sob pressão de seleção.

(f) Expressão de rotas biossintéticas como "operons": A possibilidade de introduzir diversos transgenes em uma planta por meio de um mesmo vetor construído trata-se de uma característica particularmente atrativa da tecnologia de transformação de cloroplastos (Bock & Hagemann, 1999). Em oposição ao que ocorre no compartimento núcleo-citoplasma, mRNAs policistrônicos podem ser eficientemente traduzidos em plastídios (Staub & Maliga, 1995), dessa forma permitindo a expressão simultânea de diversos transgenes sob controle de um único promotor e estabilizados por uma também única região 3' não traduzida (Staub & Maliga, 1995). Isto, associado à natureza procariótica do sistema genético de expressão cloroplastidial, trazem à tona a atrativa possibilidade de expressar "operons" bacterianos completos (por exemplo, codificando rotas biossintéticas) em plastídios sem a necessidade excessiva de engenheiramento de sinais de expressão ou de regiões codificadoras (Bock & Hagemann, 1999).

As óbvias vantagens de plantas transplastômicas enumeradas fazem da tecnologia de transformação de cloroplastos uma ferramenta extremamente valiosa que realmente promete eliminar muitos dos problemas e possíveis riscos associados às tecnologias clássicas de obtenção de transgênicos. As duas citadas aplicações biotecnológicas da transformação de cloroplastos na tecnologia *Bt*, assim como a geração de plantas de tabaco transplastômicas altamente resistentes ao glifosato (Daniell et al., 1998) e mais recentemente expressando altos níveis (> 7% das proteínas solúveis totais) do hormônio humano somatotropina (Staub et al., 2000), provavelmente representem apenas o início de uma nova era em biotecnologia de plantas. Outros trabalhos já demonstraram a possibilidade de extensão da transformação de cloroplastos para *Arabidopsis thaliana* (Sikdar et al., 1998) e batata (Sidorov et al., 1999), abrindo as portas para o uso da tecnologia em espécies cultivadas. O manejo de resistências, a exploração do potencial aumento do conteúdo nutritivo de plantas cultivadas, assim como da resistência a doenças ou mesmo da produção de enzimas e fármacos em plantas, parecem ser oportunidades altamente viabilizadas pelo uso da tecnologia de transformação de cloroplastos (Bock & Hagemann, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) variedade IAC-Santa Clara foram cultivadas em casa-de-vegetação a partir de sementes doadas pelo Departamento de Produção Vegetal, Setor de Horticultura, ESALQ/USP. Para o isolamento de cloroplastos e DNA cloroplastidial (ptDNA) foram utilizadas folhas jovens.

3.2. Isolamento de cloroplastos e ptDNA

Cloroplastos intactos de tomate foram isolados através de gradiente de Percoll para posterior isolamento de DNA (ptDNA) conforme metodologia descrita por Bock (1998). O ptDNA isolado foi purificado em gradiente de Cloreto de Césio em ultracentrífuga segundo Romano(1998).

3.3. Clonagem e seqüenciamento de fragmentos de ptDNA

Uma vez que a seqüência de nucleotídeos do genoma cloroplastidial de tomate ainda não foi determinada, tomou-se como referência o mapa de restrição (Figura 3) do genoma cloroplastidial de tomate publicado por Phillips (1985b). Foram utilizadas as enzimas de restrição *SalI* e *PstI* para digestão do ptDNA de tomate e potencial clonagem de fragmentos de aproximadamente 6,4, 6,5, 8,3, 8,6 e 8,7 kb (Phillips, 1985b). Dois fragmentos *SalI/PstI*, de aproximadamente 8,6 kb e 6,4 kb, foram clonados via *shotgun* em vetores plasmidiais pBlueScript [pBS KS (-)] resultando os plasmídios pIJB1 e pIJB2 respectivamente. Os fragmentos de DNA cloroplastidial foram sequenciados com Big Dye Terminators em sequenciador automático de DNA ABI Prism 377 (PerkinElmer) conforme protocolos do fabricante (*Applied Biosystems*) otimizados para as condições do

Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC/ESALQ/USP), seguindo as estratégias:

- Subclonagem através de digestões enzimáticas;
- Preparação de minibiblioteca *shotgun* com fragmentos entre 0,8 a 2,0 kb.

baseados nos resultados de seqüenciamento de suas respectivas extremidades. As seqüências dos primers utilizados estão apresentadas na Tabela 2. A análise e montagem da seqüência completa do fragmento cloroplastidial foram realizadas através do software Sequencher 3.1 (*Genes Codes Corporation*) utilizando-se da seqüência completa de cada um dos sub-fragmentos. Os sub-fragmentos de pIJB6 e pIJB8 foram montados em seqüência única, devido a seqüência de pIJB8 estar inclusa em pIJB6, ver Figura 4.

Figura 4. Fragmento cloroplastidial de tomate referente ao plasmídeo pIJB1 com representação dos subfragmentos flanqueados pelas enzimas de restrição utilizadas para a subclonagem.

Tabela 2. Primers utilizados para o sequenciamento completo dos subfragmentos cloroplastidiais de tomate referentes aos plasmídios pIJB3, pIJB4, pIJB5, pIJB6 e pIJB8.

Plasmídio	Primer: seqüência
pIJB3	IB3-5': 5' GAA ATG TAA CAA ACG 3'
	IB3-3': 5' ATC AAT ATT CGA TCG A 3'
	IB3-1 : 5' CAT GAG GCT GAT C 3'
	IB3-2 : 5' CCA GAG AAT GCG A C 3'
pIJB4	IB4-5': 5' TAG GAA GTA TAG GAG 3'
	IB4-3': 5' CCG CAG CTT CCG CCT 3'
	IB4-1 : 5' GCC ATC ATA CTA TG 3'
	IB4-2 : 5' CAT TAC ATG CAT C 3'
pIJB5	IB5-3': 5' ATG CTA TGT CAA TC 3'
pIJB6	IB6-5': 5' CCG CAG TAA CAT C 3'
	IB6-2 : 5' GAT AAT TCT ATA TCG 3'
pIJB8	IB8-5': 5' GAA TGC ATG AAT G 3'
	IB8-3': 5' GTG ATT CAT ACA CAG 3'

3.3.2. Sequenciamento do fragmento cloroplastidial clonado no plasmídio pIJB2 (6,4 kb) através de minibibliotecas *shotgun*:

A estratégia utilizada para o sequenciamento completo do fragmento cloroplastidial de 6,4 kb (pIJB2) foi através da preparação de minibibliotecas *shotgun*. Foram utilizados 20 µg do plasmídio pIJB2 (vetor mais fragmento) preparado através de *MaxiPrep/QLAGEN* (Cat. # 12162), o qual foi submetido à nebulização (5X/8 segundos a 1,5 kgf/cm², gás hélio). As extremidades dos fragmentos foram reparadas por reação catalizada pelas enzimas T4 DNA polimerase e Klenow polimerase para obtenção de extremidades abruptas (blunt ends) conforme protocolo descrito por PROMEGA (1996). Fragmentos de 0,8 a 2,0 kb foram isolados por eletroforese em gel de agarose ('Low Melting Point') por excisão da

banda correspondente. A purificação foi realizada via extração fenol/éter. Para a obtenção da biblioteca, os sub-fragmentos purificados foram ligados ao vetor plasmidial pUC18/*Sma*I (*Sure Clone/Amersham-Pharmacia*) e inseridos via transformação em *E. coli* linhagem DH5 α . Das colônias obtidas foram realizadas minipreparações de plasmídios, os quais tiveram as extremidades dos respectivos fragmentos seqüenciadas utilizando primers universais reverse (R) e forward (F) (já descritos).

Como alternativa, para reduzir o número de reações de seqüenciamento das regiões referentes ao vetor, uma nova minibiblioteca foi obtida utilizando-se somente a seqüência *Sa*I/*Pst*I de 6,4 kb amplificada *in vitro* via PCR em reação catalisada pela enzima elongase (DNA polimerase, *GIBCO* cat.#10481-018). O fragmento amplificado de 6,4 kb foi fragmentado via nebulização (TX/8 segundos a 1,5 kgf/cm², gás hélio) e os sub-fragmentos obtidos foram reparados segundo protocolo descrito anteriormente. Para a montagem da seqüência completa do fragmento cloroplastidial (6,4 kb) foram utilizados os resultados obtidos do seqüenciamento das extremidades dos subclones resultantes das duas estratégias citadas acima, utilizando o *software* Sequencher 3.1 (*Genes Codes Corporation*).

3.4. Análise de homologia

Análises de homologia com genomas de cloroplastos de plantas já seqüenciados, tais como tabaco, arroz e milho foram realizadas via BLAST Search (NCBI - National Center for Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A identificação e localização de regiões codificadoras e espaços intergênicos nos fragmentos foi realizada com base na seqüência do genoma cloroplastidial de tabaco (Sugiura et al., 1998) através de alinhamentos via BLAST Search e DIALIGN 2.1 (Morgenstern, 1999 - Universität Bielefeld - <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>). Em função da maior homologia entre regiões codificadoras de genomas cloroplastidiais (Shimada & Sugiura, 1991) procedeu-se ao alinhamento e análise de homologia (nucleotídeos e aminoácidos) entre as regiões codificadoras *rpoB* (incompleta), *trnC*, *petN* (*yg6*), *psbM*, *trnD*, *trnY*, *trnE*, *trnT*, *psbD*, *psbC* (derivadas do plasmídio pIJB1), *rpL20*, 5' *rps12*, *clpP*, *psbB*, *psbT* e *psbN* (derivadas do plasmídio pIJB2) de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) com os genomas de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Pinus thunbergii* e *Marchantia polymorpha* (Bock,

2000, doação de arquivo de alinhamentos, trabalho não publicado). Em adição foram analisados conteúdo de GC (G+C em %), ocorrência de duplicações, deleções, substituições e inserções com relação ao genoma de tabaco, assim como o padrão de restrição para os fragmentos cloroplastidiais de tomate clonados em pIJB1 e pIJB2. Com base em Hirose et al. (1999) foi analisada a ocorrência de sítios de editamento de mRNA já relatados para os plastomas de tabaco e milho.

3.5. Obtenção da sequência flanqueadora de ptDNA para construção de vetores de transformação

O seqüenciamento completo dos fragmentos de cloroplasto de tomate dos plasmídios pIJB1 e pIJB2 permitiu a construção de mapas de restrição detalhados das respectivas sequências. Análise da sequência e mapa de restrição do plasmídio pIJB1 (8.660 pb) permitiu a identificação de um sítio único de restrição para a enzima *Sma*I contido no espaço intergênico entre os genes *psbM* e *petN* (*ygf6*). Com base no mapa de restrição do fragmento cloroplastidial de pIJB1 a sequência *Sma*I/*Xho*I de 2404 pb (Figura 5) foi isolada por digestão enzimática e clonada em pBS KS(-) nos sítios *Ecl*136II/*Xho*I. Restrição com *Sma*I (presente no fragmento) e *Ecl*136II (presente no vetor pBS) resultam em extremidades abruptas as quais puderam ser ligadas resultando na perda do sítio *Sma*I e *Ecl*136II, o que era desejável (Figura 6a). Outros sítios de restrição originalmente presentes no vetor (*Xho*I, *Eco*O109I, *Dna*II, *Apa*I e *Kpn*I) foram eliminados por digestão *Xho*I/*Kpn*I seguida por tratamento pela exonuclease *Mung Bean*. O plasmídio resultante pTCTJ2 contendo a sequência alvo está representado na Figura 6b.

Figura 5. Mapa de restrição referente ao fragmento cloroplastidial de tomate (8.660 pb) - plasmídeo pIJB1. Sítios *SmaI/XhoI* flanqueiam a região de 2.404 pb contendo o sítio único de restrição para *StuI*. Setas em cor cinza representam o sentido da transcrição da respectiva região codificadora.

Figura 6. Estratégia de eliminação dos sítios de restrição adjacentes à sequência de ptDNA para construção do plasmídeo pTCJT2 contendo a sequência alvo de cloroplasto de tomate para construção de vetores de transformação via recombinação homóloga.

3.6. Construção do gene marcador seletivo

A região do promotor do gene *atpI* e a região terminalizadora do gene *rps14* de cloroplasto de tomate (IAC-Santa Clara) foram amplificados via PCR para construção do gene marcador quimérico *aadA*. Os primers utilizados para a amplificação encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 3. Primers sintetizados para a amplificação via PCR das seqüências promotora do gene *atpI* e terminalizadora do gene *rps14* de cloroplasto de tomate IAC-Santa Clara. A introdução de novos sítios de restrição nas seqüências encontra-se indicada.

Promotor <i>atpI</i>	
PatpI-5'	<u>EcoRI</u> <u>SacI</u>
	5' TT GAATTCGAGCTC TAGCTATATAAGAAATCCT 3'
PatpI-3'	<u>NcoI</u>
	5' TTTT TCCATGGT GCCTTGCCCTCTGAAAAA 3'
Terminalizador <i>rps14</i>	
Trps14-5'	<u>SphI</u>
	5' TTTT TGCATGC ACGCTTCATTCTATTTCTA 3'
Trps14-3'	<u>Sall</u>
	5' TTTT TGTCGAC TAATAGATAAACAAGGA 3'

Sucessivas subclonagens foram realizadas para a troca do promotor 16S de *Nicotiana tabacum* e terminalizador *rbcL* de *Chlamydomonas reinhardtii* pelas seqüências de tomate (promotor *PatpI*/terminalizador *Trps14*) na construção pUC-16S-*aadA* gentilmente cedida por Ulrich-Hans Koop/Universidade de Munique, Alemanha. A partir do plasmídio pUC-16S-*aadA* que contém a região codificadora do gene *aadA* (conferindo resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina) foi realizada a troca do região promotora do gene 16S (Figura 7a) pela região promotora do gene *atpI* (*PatpI*) de tomate via restrição com as enzimas *EcoRI*/*NcoI*, originando o plasmídio pIJB10 (Figura 7b). O cassete flanqueado pelas enzimas de restrição *EcoRI*/*SacI* (Figura 7b) foi isolado e inserido em vetor pBS KS (-) para eliminar os sítios *PstI*, *SphI* e *HindIII*, oriundos do vetor original no plasmídio pIJB10,

uma vez que outros sítios para as mesmas enzimas estão presentes entre a região codificadora do gene *aadA* e o terminalizador do gene *rbcL*. Assim obteve-se o plasmídeo pIJB11, que contém sítios únicos para *Pst*I, *Sph*I e *Hind*III (Figura 7c) desejáveis para as futuras clonagens. A partir do plasmídeo pIJB11 foi realizada troca da região terminalizadora do gene *rbcL* pela região terminalizadora do gene *rps14* (*Trps14*) de tomate, originando o plasmídeo pIJB12 (Figura 7d) utilizando-se dos sítios *Sph*I/*Sal*I. O isolamento do cassete *atpI-aadA-rps14* via sítios *Sac*I/*Hinc*II e clonagem em vetor pBC¹ nos sítios *Sac*I/*Not*I-*Klenow* resultaram no plasmídeo pIJB13 (Figura 7e). Obteve-se assim um cassete de expressão do gene *aadA* (aminoglicosídeo 3"-adenililtransferase), conferindo resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina, sob controle da expressão pelas seqüências 5' *Patp*I e 3' *Trps14* de cloroplasto de tomate contendo diversos sítios de restrição únicos necessários para novas construções.

---

¹ O plasmídeo vetor pBC é plasmídeo derivado de pUC19 contendo resistência ao antibiótico cloranfenicol (*GIBCO BRL*)

Figura 7. Estratégia utilizada para construção do gene marcador (cassete *atpI-aadA-rps14*). a) construção inicial pUC-16S-*aadA*; b) substituição da região promotora P16S pela região promotora *PatpI* de cloroplasto de tomate; c) Clonagem do cassete de expressão em vetor pBS para eliminação dos sítios de restrição *PstI*, *SphI* e *HindIII*; d) Substituição da região terminalizadora *TrbcL* pela região terminalizadora *Trps14* de cloroplasto de tomate; e) construção final contendo o cassete de expressão plastídio-específico.

3.7. Construção final de vetores de transformação de cloroplasto de tomate via recombinação homóloga

3.7.1. Vetor de transformação pIJB18 com 12 sítios de restrição

Para a construção do vetor de transformação pIJB18, ou seja, o gene marcador seletivo flanqueado por seqüências homólogas de DNA cloroplastidial, o cassette *atpI-aadA-rps14*, contendo uma seqüência 3' (polylinker) com 12 sítios de restrição (*XbaI*, *SpeI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *ClaI*, *SalI*, *HincII*, *XhoI*) foi isolado do plasmídio pIJB13 por digestão *SacI*/*Eco0109I* (Figura 8), onde a seqüência teve as extremidades reparadas com a enzima polimerase Klenow (Large fragment of DNA Polymerase I, *E. coli*) para obtenção de extremidades abruptas e construção do vetor. O plasmídio pTCJT2 (Figura 6b) foi clivado no sítio *StuI* para a inserção do cassette de *aadA*. A seleção dos plasmídios recombinantes se deu por plaqueamento em meio de cultura LB (Ausubel et al., 2000) semi-sólido contendo espectinomicina na concentração de 100µg/mL. Confirmação complementar da inserção do cassette de *aadA* foi obtida por análise de restrição com as enzimas *EcoRV*, *SalI* (presentes no polylinker junto ao cassette de *aadA* e ausentes no ptDNA), *XbaI* (com sítios tanto no polylinker, junto ao cassette de *aadA*, como no ptDNA), e *StuI* (presente no ptDNA original, eliminado com a inserção do cassette).

Figura 8. Cassete *aadA* e polylinker. Excisão de pIJB13 pelas enzimas *SacI*/*Eco0109I*.

3.7.2. Vetor de transformação pIJB20 com 14 sítios de restrição

Com o objetivo de gerar um vetor com os sítios *Eco*O109I e *Kpn*I foi obtido o vetor pIJB20. O cassette *atpI-aadA-rps14*, contendo uma sequência 3' com 14 sítios de restrição (*Xba*I, *Spe*I, *Bam*HI, *Sma*I, *Pst*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Cla*I, *Sa*I, *Hinc*II, *Xho*I, *Eco*O109I e *Kpn*I) foi isolado do plasmídio pIJB13 por digestão com *Ecl*136II (Isosquizômero para *Sac*I)/*Aac*65I (Isosquizômero para *Kpn*I) (Figura 9), onde a extremidade gerada pela enzima *Aac*65I foi reparada com a enzima polimerase Klenow (Large fragment of DNA Polymerase I, *E. coli*) para obtenção de extremidade abrupta, recomposição do sítio de *Kpn*I (quando ligado com *Stu*I) e construção do vetor. O plasmídio pTCJT2 (Figura 6b) foi também clivado no sítio *Stu*I para a inserção do cassette de *aadA*. Da mesma forma a seleção dos plasmídios recombinantes se deu por plaqueamento em meio de cultura LB (Ausubel et al., 2000) semi-sólido contendo espectinomicina na concentração de 100µg/mL. Confirmação da inserção do cassette de *aadA* foi obtida por análise de restrição com as enzimas *Eco*RV, *Sa*I (presentes no polylinker junto ao cassette de *aadA* e ausentes no ptDNA), *Xba*I (com sítios tanto no polylinker, junto ao cassette de *aadA*, como no ptDNA), *Stu*I (presente no ptDNA original, eliminado com a inserção do cassette) e também *Kpn*I (ausente na construção final de pIJB18, no entanto reconstituído na construção do vetor pIJB20)

Figura 9. Cassete *aadA* e polylinker. Excisão de pIJB13 pelas enzimas *Ecl*136II/*Aac*65I, respectivamente isoesquizômeros das enzimas *Sac*I/*Kpn*I; *Ecl*136II gera extremidades abruptas ("blunt ends"), a qual recupera o sítio *Kpn*I quando ligada à extremidade gerada pela enzima *Stu*I.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Clonagem e seqüenciamento de fragmentos de ptDNA.

Com base no mapa de restrição publicado em Phillips (1985b), dois fragmentos de DNA cloroplastidial de tomate IAC-Santa Clara de 8.660 pb e 6.366 pb foram clonados em vetor pBS KS(-), através de digestão pelas enzimas *Pst*I e *Sac*I, resultando nos plasmídios pIJB1 e pIJB2 respectivamente. Seqüenciamento das extremidades do inserto em pIJB1 revelou que a seqüência corresponde à região compreendida entre os genes *psbC* e *rpob* em tabaco (Shinozaki *et al.*, 1986). Da mesma forma, seqüenciamento das extremidades do inserto em pIJB2 revelou que a seqüência é correspondente àquela compreendida entre os genes *rp20* e *psbN* em tabaco (Shinozaki *et al.*, 1986). Os fragmentos correspondentes em tabaco apresentam respectivamente 9127 pb e 6375 pb.

4.1.1. Seqüenciamento do fragmento cloroplastidial clonado no plasmídio pIJB1 (8,6 kb) através de subclonagens por enzimas de restrição.

Como primeira etapa da estratégia de seqüenciamento do fragmento cloroplastidial de tomate em pIJB1, foi estabelecido o mapa de restrição inicial para a seqüência por digestões mediadas pelas enzimas *Pst*I, *Sac*I, *Cla*I, *Xba*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Xho*I, *Kpn*I, *Hind*III e *Sal*I como mostrado na Figura 10.

Com base no mapa de restrição estabelecido, o fragmento foi subclonado resultando em cinco sub-fragmentos (Figura 10) em vetores pBS (-). Os sub-fragmentos deram origem aos plasmídios pIJB3, pIJB4, pIJB5, pIJB6 e pIJB8 conforme as Figuras 17, 18, 19, 20 e 21 respectivamente.

Figura 10. Subclonagem do fragmento cloroplastidial de tomate (pIJB1). Geração de 5 sub-fragmentos clonados em pBS (-) resultando nos subclones pIJB3, pIJB4, pIJB5, pIJB6 e pIJB8.

Figura 11. Subclone pIJB3 de pIJB1. Subfragmento *SmaI/ClaI* clonado em pBS SK (-).

Figura 12. Subclone pIJB4 de pIJB1. Subfragmento *Clal/SmaI* clonado em pBS SK (-).

Figura 13. Subclone pIJB5 de pIJB1. Subfragmento *SmaI/BamHI* clonado em pBS KS (-).

Figura 14. Subclone pIJB6 de pIJB1. Subfragmento *BamHI/SaI* clonado em pBS SK (-).

Figura 15. Subclone pIJB8 de pIJB1. Subfragmento *XhoI/SalI* clonado em pBS KS (-).

Sequenciamento completo dos subfragmentos e montagem do fragmento íntegro de 8.660 pb gerou a sequência apresentada no Quadro 1, orientada no sentido *PstI*→*SalI*. Para sequenciamento completo dos sub-fragmentos, garantindo alta qualidade, foram necessárias 31 reações de sequenciamento com cerca de 400 a 600 bases cada.

Quadro 1. Sequência completa do fragmento de DNA cloroplastidial de tomate de 8.660 pb clonado no plasmídeo pIJB1. Sequências codificadoras respectivamente dos genes *psbC* (incompleta), *psbD*, *trnI*, *trnE*, *trnY*, *trnD*, *psbM*, *pepN* (*ycf6*), *trnC* e *rpoB* (incompleta) estão representadas em negrito. Os genes *psbC* e *psbD* possuem uma sequência comum que está destacada por letras sublinhadas (17pb).

Sequência Completa: Fragmento de 8.660 pb		
<i>PstI</i>		
0001	CTGCAGAAGAAATTAAATGAAGTACTCCAGATACAAAGTATGGAAAGGTA	0050
0051	TCTATAACTTCTCCCCAGGGCCTACCCCCAACCTAGAGTAGCTAGGTG	0100
0101	GGGAAGTAAATCAATCCTTGTTTCATACATAGGCTTCTCGGGTACGAAAT	0150
0151	GGGCCACTTCAAATAGGTTCAATTGCTCCGGCCCAGAAATACGATTAATCCA	0200
0201	GCATGGGCTACATGAGCCCCTAGTAGTTTACCGGATAGATTGATAAGTCG	0250
0251	GGCATTCCCGGCCACCAAGCGAAACCTGTGGTTTCTTGGTCACGACCAG	0300
0301	CTAAGGCTAAAGTTCCATTAAAGAGCGTTTCCACGTTGGTAGAACCTCCTC	0350
0351	AGGGAATATAAGGTTTTTCATGAGGCTGATCTTGAGCCGCCATCCAAGCGC	0400
0401	GAATACCTTCGTTTAAGAGAATATTTTGGTGTAGAAAGTCTCAAAATCA	0450
0451	GGATCTTCCGCTGCGCGAATTTCTTGAGAAACGAAGTCATAGGCACGTAG	0500
0501	GTTTCAGAGCTAGACCGACTACTCCAAGAGCACTCATCCATAAACCGGTCA	0550
0551	CTGGTACAAATAACATAAAGAAATGTAACCAACGTTTATTGGAAAAAGCA	0600
0601	ACCCCAAAGATTTGGGACCAAAGCGGTTAGCGGTGACCATTGAATAAGT	0650
0651	TTCTTCGGCTTGAGTTGGGTAAAAGCACGGAATGTATTTGCACCATCAC	0700
0701	CGTCTTCAAATAAAGTATTTTCTACGGTAGCACCATGAATGGCGCATAGC	0750
0751	AAAGCAGCCCCCAATACACCGGCAACTCCCATCATATGAAAGGGGTTCAA	0800
0801	GGTCCAATTATGAAACCTTGAAAAAATAGGATGAATCGAAATATAGCTG	0850
0851	CTACACCAAACCTAGGTGCAAAGAACCAACCAGACTGACCTAGTGGATAA	0900

0901	ATCAGAAA TACAGAAACAAAAACAGCAATTGGACCAGAGAATGCGATTGC	0950
0951	ATTATAAGGTCTCAATTGAACAGATCGAGCAAGCTCGAATTGACGTAACA	1000
1001	TGAAACCTATTAGGCCAAAAGCTCCATGGAGAGCAACAAAAGTCCACAGA	1050
1051	CCCCCAATTGACACCAACGAGTAAAATCTCCTTGTGCTTCAGGACCCCA	1100
1101	TAGTAACAACAACGAATGTGCTAAACTATTAGCAGGAGTAGAAACCGCGG	1150
1151	CAGTTAAGAAATTGCAGCCTTCCAAA TAAGAACTGGCCAATCCATGGGTA	1200
1201	TACCATGAAGTTACAAAGGTTGTACCTGTGAACCAACCCCTACAGCGAA	1250
1251	ATAGGCACAAGGAAAGAGCAATAGACCGGACCAGCCTACAAAACGAAAC	1300
1301	GGTCCCTCCGTAACCAGTCATCCATAATATCAAATAAATCATT TTTCGTCT	1350
1351	TTGGTAAACTTACCAATGGCTATAGTCATAGTGATCCTCCTATTCAACTA	1400
1401	CTTCGACCATTTCCGAGCACCTCATATCTTTTTTCGGGGCGTCCCAAGATC	1450
1451	CGATCATTTTTTGTCTGATTTCTCTTGCACTGCCCTTCCCAATGGGTTTCG	1500
1501	AAGATAAAAATCCTTTTATTGATTAGCCCATAACTGACCTAGGTAAATCC	1550
1551	ATGAAGTCCATTGGATTATTCCTTCTGACTAAGCATATGAACCATGAATT	1600
1601	GTCTTAATAAGATAATTCAATCAATCCCTTGTTTTGAAAGAACTCTTCAA	1650
1651	GGACCAAACGGTCCCTTTCCTTCATACTTCATATAAATAAATCGAAAACC	1700
1701	CCAGAGTATATCTTTCCCGGATCGAAGGAAAAAGACAGTTCGATCGAA	1750
1751	TATTGATTTTTAGATTCTTTTATCTGTTAGAAAAAGAGATAATCTACTAT	1800
1801	TTTTCTTTT	1850
1851	TGAAAGTCTCTTTCTCGGGATCTATTCTTCATCACACTGGTGGAACAAAA	1900
1901	CAAAAATACCGGATGCAACGATATTGAAATATTTGGTACATGAAGCCATG	1950
1951	ATCTGATAGATATACATCGAAATCAATCTACAATCTACTTAATATAATTA	2000
2001	ATATATAATATAGATGAAATTAATCTTTGATCTAGAATCAAGAAAAATA	2050
2051	ATAAATGGCTCTTATGGTGTGCCTTGGAAGAAAGGTTCTCTGTAGAGGA	2100
2101	AAGGAATAACAAATTATTCGATAATTTTTCTTATAGAAAATCTAGTAAC	2150
2151	AAGAAGATTTAATCGGAAATATCGACAAATTCTTGTGGAGTCCAAAACAA	2200
2201	AAAAATGAAATAAAAAAAATCAACTGCTCCAATTTTCATCTCTATCGAATT	2250
2251	TTAATATCAGAATAGCGGATATAGTCATGATTCAATAGGTCAGGTCCACT	2300
2301	TACTTTTTTACTTTTTCTTTTGTTGATTTCTAACCTTTCGAATCGATTTGG	2350
2351	TTGGTATAATGGAAAATAGGAATATTCGGTGATTCAAGAAGTGACTTTTC	2400
2401	ATTATTCTTAAATTCATACTAATGAAAATTGACTAAACAAATGTTCAACT	2450
2451	TTATAACTAAGTATAATGATAATGTATTATCCAGTTAGTTACTTTTTTTTA	2500
2501	TTACAAATAAAAAGAAAATTCTCCCATCAAATATGAATACTAGATTGGGG	2550
2551	TTTTACAAAGCCCCCTTATCGGATTGAACCGATGACTTACGCCTTACCAT	2600
2601	GGCGTTACTCTACCACTGAGTTAAAGGGC TTTTTTATTTAATTCGGGA	2650
2651	ATTATTCACTATGTGGATTAAATATCTATATGTACTTATATTATAACAT	2700
2701	AAGTATATATGCATTAAGTACGTGCAGTAGATACATAGTGTCTAGTGGCT	2750
2751	CATTGTTGAATAATAAAATGGATTACCTAGGAAGTATAGGAGAAAATGC	2800
2801	AATGAATTGTTTCAAGACCGACTCGAATAGAAAATAAATTCAATTGAAATA	2850
2851	ATTAAAAAAATACTACTACTAGATTTCTAATGTCGATTCTAATGAATAA	2900
2901	TTCGTCAATGACGAATAAAAAACAATTCTATGCAATTCTGAAGGGGGGAA	2950
2951	AGATCCCTCGGCTAGAATCATTTGATTATATTGACAATTTTAAAAAACGG	3000
3001	ATCATACTATCATCATAGTATGATGGCCGTTGGTCAAGCGGGCCCCATC	3050
3051	GTCTAGTGGTTTAGGACATCTCTCTTTCAAGGAGGCAGCGGGGATT CGAA	3100
3101	TTCCCC TGGGGGTAGGGTACTACGAAAGGAAATTGATCATGGATTACCAA	3150
3151	TAAGTTGAAAATTGATTCTTCTCGGGTCGATGCCCGAGCGGTTAATGGGG	3200
3201	ACGGACTGTAAATTCGTTGGCAATATGTCTACGCTGGTTCAAATCCAGCT	3250
3251	CGGCCCAATAATTCGCCAATCCGCCATGAGATGATATAACTCCCTTTGTA	3300
3301	CTTCAGAAATACCCGATCCGGAGATAAAAAAGAATCAAATTTTCTGCTAG	3350

3351 ATCCCGTATTTCCCTGGGATTGTAGTTCAATTGGTCAGAGCACCGCCCTG 3400
 3401 **TCAAGGCGGAAGCTGCGGGTTCGAGCCCCGTCAGTCCCGACGGATCCAAT** 3450
 3451 AAATATATCAAAAAATCTCTCCCTTTTTCTGAAGGGGACCGGGGGAAGAA 3500
 3501 TTCCATTGTCAAAGCAAAGGGGAAATCCTTATTTCTTTTTCTTTTCCTTT 3550
 3551 TGGTAGGAGAAAGACATATGCGGTTGGATTAGTACAATTATTGGTAGCAT 3600
 3601 TATAGTCAGTATTTCCAAGAAATGCTGGCTTTTTTCGATTGCCCCCGATGCA 3650
 3651 TGTAATGGAATCGAGTACTATACTTTTTTGGAGGCGGCATACACAAAAGG 3700
 3701 AATTCCTTTGTTGTCCAATACAAAATTGAATATAAGAAAAATACTTTCCAG 3750
 3751 **AAAAACAAAAA** 3800
 3801 TGAACCTGACTTACTAGTTTGAAGTTGCAAAATAGATTTTCATGCAAAAT 3850
 3851 GCACACTGAGCTTTTTGGTATAGGTGTCCCGGGGGCTAATAATCGACGAAG 3900
 3901 AAAGGAGGGGGAAGGACAGATCAACCAAAGATCCTACTCCTCTTAGAAAG 3950
 3951 GCGAATGAATCATTTTTCTTATTTTTTCATTTTGTTTTAAGGCCCCATCGA 4000
 4001 CGACCGAACAAATCGGAAAATAGTCAATTTGATGAATATTCATTTTATAC 4050
 4051 GGTCTCATCTTTATCACACTTCTTTGTCTTCCAAGTCAAAAATAGTTTCG 4100
 4101 TTCTAAACTCCTTTCTTTTCCATTTAGCTTTTATTGTTGTTTGGGTTT 4150
 4151 GTAACATGTGACCACTGGAAGTGAAGAGCTATTTGATGAGACTTCATC 4200
 4201 AGATGATTGTACAAGAAGGAAGTAGATAGATTAGAGAGAAAAAAGAACA 4250
 4251 GATAATAAAAAATGATAAATAAATAAAGGAATTTTGGGTAGGTGAGCAA 4300
 4301 TCCGAGTTTGGGGCGGTATGGATAAAAGAACTTCTATGTTATACTATTC 4350
 4351 AATTCCTCGACGACGAATTTATTTGATAGTTTCAATATTTGTTATTCATGAT 4400
 4401 ATTGATCTGATTCAAGATCATCGAGAGTAATATTCATTCATTGAATTTA 4450
 4451 CAGGCCAAAGATTTATCATCTCTATGGGATTAAATCCCGAGTTATTGCGA 4500
 4501 AGTAAAAAACCGATGAGATTATGGAAGTAAATATTCTTGCAATTTATTGCT 4550
 4551 **ACTGCACATTTATTCTAGTTCCCTACCGCTTTTCTACTTATCATTTATGT** 4600
 4601 **AAAAACAGTCAGTCAAAACGATTAAAT**TATTAATAATTTGAATGAACTT 4650
 4651 GACTTCTGAGTTCTTAGCCAAAATTGACGAAATAAAATGAAAAAGATTCC 4700
 4701 AATTTTCATGTCCTTAAATGAAATGAGTGGACTAGAATCGGCAGTATTCTAA 4750
 4751 TAGATAGATAGTATGGTAGAAAGATTCATCTATTTCTTTCTACCATACTA 4800
 4801 TTTATTAGTTAGATTCTTGTTATAAAGCTGCCCCCTGGAATAAAATAAAG 4850
 4851 ATAGAGGCTGCATTTGATATGGATCTATATATCAATCTACAATATTATCT 4900
 4901 TGATATATGTGAATATCAATTCATATATGGGATTGACATAGCATCCAAT 4950
 4951 TCCATTTATTTGCTATATCTATTTGTTCTGATCAATCTGAATTACTCCTA 5000
 5001 TGTCTTATAGTTTGAATTACTATATTTTGGATTCCAATATGAATCTCAG 5050
 5051 TATCTATTGAGAGAATCAAATCAATGAAGCAAAGCGATAGATATAGGCA 5100
 5101 TATTCAAAAAATCACGTAGTAATCTTTTTTTTTTTAACATTCTTAAGAAG 5150
 5151 TAAACCATTGACAGTAGTTCCACGGGCATCGAAAAGGAAGAGTAAACCTC 5200
 5201 ACTGATTTTAAAGGCCTGAACCATGATATGAAATAAGTCGATAAAGTCTA 5250
 5251 AATCCAATTTCCAAAATTCGAAAGGTAAATGCGCAATATGTGACTCACCT 5300
 5301 GACGATCTTATTCTAAATAGTATCTCGTTAGACAACCACTATGTTTATAT 5350
 5351 CCTTTCTTTCTCATACAAAGTGCTTATACACTTAACAAAACCACTTTTTTC 5400
 5401 TTTGAACAGTAAAGAGAGAACCAAATAAAAAACGGGTCCGGCCCTCCTCA 5450
 5451 GTATCACCTAGGAAGAGGCCATTGATTGGAATAGAAAATTTAGTAAGAAT 5500
 5501 TAGGTTTCAATAAATTTCCCTGGGATCCTTTTTCTTTTCGAACTACAAACAT 5550
 5551 GGGAAATCGTTGAAATAGTTCTTTGATTGAAAGAGGCTGATTCTTATAATA 5600
 5601 CATTACTCCAGTCGAGTCCAATGGAATTTCAAAATGAAGATATTTTATT 5650
 5651 TTGTTCCAAACGTGTTGCAGAACCATCTAGAAAGCAATTGATAATGATAC 5700
 5701 AGTTTGCTTCCTTAACTCAATTAGCAGAACCCTTAGAGTCCACTCCTTCC 5750
 5751 **CCACACTACGAGTGAAAGGGAAAAAGTAAAGACTACCATTAAAGCAGCCC** 5800

5801 **AAGCAAGACTTACTATATCCATATGAATTATGTCCCCTATCTCTATAAAT** 5850
 5851 **ATAAAGGAATTGTTCCATTATTCTCTACTAATAATAGTAGAATCAATGGC** 5900
 5901 **GCAGAGTCAAAAAGAACGAAGACTATTAATAAACCAATCCAATAAATTCG** 5950
 5951 **CTCATTTTATAAGAAATTTCTATATGATTTATAATCGGGAAAGATTAAAC** 6000
 6001 **CCAAGCAAAATCCGCAGTAACATCTCAAGGGAATGTTACTAATGGAACAT** 6050
 6051 **GTAGGAATAATAGGTCCATTCTTTTTTTTGTGACCCTCATTTGAATTGA** 6100
 6101 **TTGGATGCTTGAGCACTGAGATATTTTCGTGAGTTCCTCGTATATAATAA** 6150
 6151 **AGTATCTTCCGCCCCCTTCCACAACATTTTCGATTTCTATCGGGCTCTC** 6200
 6201 **CAAGGTCAGTCATTATACAATGGATTAATAATAGAAAATTTTGATTTGT** 6250
 6251 **AGTAGAAGGTAATTGCGAAGTCTTGATAGCCCCCTCGAGCATTCGAATATT** 6300
 6301 **TACTTGAAAGCTAAGCCTAAATATGCAATGCAAGGATATTTACAATTTTT** 6350
 6351 **TCTAAAAACACCCAGACCACCAACAGTATCAACAGTCTGCTTTCTCTGCT** 6400
 6401 **TCTGCTGGCGAATCATTCGGCGGGTTATATCAACAGAAGAAAAAAGAGA** 6450
 6451 **TTTCCAGTTTTTTTGTGATCAGGCGACACCCGGATTTGAACTGGGGAAA** 6500
 6501 **AAGGATTTGCACTCCTCTGCCTTACCCTCGGCCATGTGCCCCAAAATGCT** 6550
 6551 **ACAAATACAAAATAGATGAAAACCTTCCCGGATTACTGAACTGCTTTTTT** 6600
 6601 **ATTGTACTTGACCTTGAGTTCTGTTTTCTTAATTTTTCTTAAAGTCA** 6650
 6651 **AAGAAATCCTAATCCTTCTTCCCTTTTGATTGGGTTTGATTCATCCTTTC** 6700
 6701 **AATTTTCGATTGAGTCTATCTCCAAATTCATAATGTTCAAAACTTTCTCTT** 6750
 6751 **ACCTTTCATTGAAAAATCAAATGTGGATTTTCATTTCGCAAAATACAAA** 6800
 6801 **TTCAACTTTCAGAAAAATAGGACCCAGTAACATTTGCCTTAGAATGCATGA** 6850
 6851 **ATGATTCTTGGATTTGAATCTCCCAATTTTGGTTTCCTAATGACATAAGA** 6900
 6901 **AAATACAACCTTGATATATGATATATAACCAATCAGTTCAGTATGGATTTT** 6950
 6951 **TGCAATCAAAAAATCCTTCTCAATTTTCATTATTAATAATAATTATAACA** 7000
 7001 **ACAATTATCAGTATATGTAAACCCCCCAAAGATAAATTGTTAGACGGAT** 7050
 7051 **ATATATTATTTATATATGTTCCCGATATAGAATTATCAGATATCAGAAAA** 7100
 7101 **GTATCATACTTCAATTTGAATTTGAATTGAATAGAAAATTGAAATTATG** 7150
 7151 **TTTTTCGGAGAGCACAACTGTGTGCCCCGAATAGAACATAAAACGACAA** 7200
 7201 **TAAACAATAAAAGAGAAGAAAGACAGATATTATAGATATCTCCACACGT** 7250
 7251 **GTTTAAGCCATACAAACCTTCTTTTCTTATCCACTTCACAATCGTATTCT** 7300
 7301 **ACTCAAAAATCCGTAAACAAAATATCTCTCTTCTCTGCGAATCATTTTTT** 7350
 7351 **GAACAATTGAAATCCATAACATAAGGGGGGTTAAATGCTAAAAAACCAGT** 7400
 7401 **TCTAATTCTATATATTCTTTCTGATTTTTTTATGCCTTTATCTCAGCCGAA** 7450
 7451 **AAGATCAAATGTCCCAATCCAATTTATTTTTTCTGGGTATTCAAGCAGGT** 7500
 7501 **TGGAATATGTATTATCATAATAATGGTAGAAATGGAATCATTTTTCTTTT** 7550
 7551 **TATATTCTATACAAAATCCTATAACTTCATTAATAAGTCTAAGTAGCAGA** 7600
 7601 **AGTAGGTTTCTAGGGATGTTTTATCAATTTCTTTCCATTTGTATCTGTTG** 7650
 7651 **AAAATTCCAATTCAATTCAATTTAAAATTTAAGTAGAAAATTCCTCTTCT** 7700
 7701 **TCCTCCGTTTATACGTATTTTATACATTCCAGATATGGAGTTGGGTAAAA** 7750
 7751 **TTTCATGTGATTTCGGTAAACAAAATAGAAATGCCATCATTGCTAGATCAT** 7800
 7801 **TTATCTAATCTATCTAATTAGATACAGAATGAACCAATAGTGGGATTTTT** 7850
 7851 **TGCTAAATGGGAAATTTAAAATGCTCGGGGATGGAAATGAGGGGAATATCT** 7900
 7901 **ACAATACCTGGATTTAATCAGATACAATTTGAAGGATTTTGAGGTTTCAT** 7950
 7951 **TGATCAAGGTTTGACGGAAGAACTTTATAAGTTTCCAAAAATTGAAGATA** 8000
 8001 **CAGATCAAGAAATTTGAATTTCAATTATTTGTGGAAACATATCAATTGGTC** 8050
 8051 **GAACCTTTGATAAAGGAAAGAGATGCTGTGTATGAATCACTCACATATTC** 8100
 8101 **TTCTGAATTATATGTATCCGCGGGATTAAATTTGGAAAAACAGTAGGGATA** 8150
 8151 **TGCAAGAACAACAATTTTTATCGGAAACATTCCTCTAATGAATTCCCTG** 8200
 8201 **GGAACCTCTATAGTCAATGGAATATATAGAATTGTGATCAATCAAATATT** 8250

8251	GCAAAGTCCCGGTATTTATTACCGATCAGAATTGGACCATAACGGAATTT	8300
8301	CGGTCTATACCGGCACCATAATATCAGATTGGGGAGGAAGATCAGAATTA	8350
8351	GAAATTGATAGAAAAGCAAGGATATGGGCTCGTGTAAGTAGGAAACAAA	8400
8401	AATATCTATTCTAGTTCTATCATCAGCTATGGGTTTGAATCTAAGAGAAA	8450
8451	TTCTAGAGAATGTTTGCTATCCTGAAATTTTTTGTCTTTTCTGAATGAT	8500
8501	AAGGAGAGAAAAAAATTGGGTCAAAAGAAAATTCATTTTGGAGTTTTA	8550
8551	TCAACAATTTGCTTGTGTAGGTGGCGATCCGGTATTTTCTGAATCCTTAT	8600
8601	GTAAGGAATTACAAAAGAAATTCCTTCAACAAGATGTGAATTAGGAAGG	8650
8651	ATTGGTTCGAC	8600

Sall

4.1.2. Seqüenciamento do fragmento cloroplastidial clonado no plasmídio pIJB2 (6,4 kb) através de minibibliotecas *shotgun*.

O plasmídio pIJB2 foi totalmente seqüenciado através da construção de minibibliotecas onde fragmentos aleatórios foram gerados por quebra física das fitas do DNA por nebulização. Cerca de 100 clones derivados da biblioteca de plasmídio foram seqüenciados via primers universais R e F ('reverse' e 'forward'), no entanto apenas cerca de 15% continham fragmentos derivados de DNA cloroplastidial de tomate (ptDNA). Como metodologia alternativa, 96 clones gerados da biblioteca de fragmento isolado (amplificado via PCR/Elongase) foram seqüenciados utilizando o primer universal F. A montagem através do programa Sequencher 3.1 da seqüência completa do fragmento cloroplastidial de 6.366 pb clonado em pIJB2 (mostrado na íntegra no Quadro 2). Para a obtenção da seqüência completa do fragmento foram utilizadas as seqüências geradas por ambas as bibliotecas (total de 124 seqüências). Tal metodologia gerou naturalmente (devido a aleatoriedade dos subfragmentos clonados) um maior número de repetições por base seqüenciada, garantindo alta qualidade e confiabilidade do seqüenciamento; cada base foi seqüenciada de 5 a 10 vezes através desta metodologia. No seqüenciamento do fragmento cloroplastidial do plasmídio pIJB1 cada seqüência foi repetida em média duas vezes, gerando da mesma forma uma seqüência de alta confiabilidade, no entanto com um número menor de reações de seqüenciamento (31). Por outro lado, houve dificuldade em se obter subclones com tamanhos adequados para o seqüenciamento completo do subfragmento, uma vez que para a subclonagem existe dependência por sítios únicos de restrição para as respectivas subclonagens mediadas por enzimas de restrição. Para o seqüenciamento

completo dos sub-fragmentos houve a necessidade do uso de primers sintéticos, com conseqüente aumento do custo e tempo para obtenção das seqüências.

Quadro 2. Seqüência completa do fragmento de DNA cloroplastidial de tomate de 6.366 pb clonado no plasmídio pIJB2. Seqüências codificadoras respectivamente dos genes *psbN*, *psbI*, *psbB*, *cpP*(exons 1, 2 e 3), 5'*ps12* e *ps20* estão apresentadas em negrito.

Seqüência Completa: Fragmento de 6.366 pb		
<i>Pst</i> I		
0001	CTGCAGTTCGTCTTGGACCAGATCTAGAACTGTTCTCAACAGTTTGTGTA	0050
0051	GCCATAAATCCTATTGTATTCATTGAGATCTGTTGACTTTGTATACCAT	0100
0101	CCGTTGTAAATAAACGATCCTATCATAGATCCATTAGAGGATCCCCAATT	0150
0151	ATATAAATATGATAAGAATGGAAACAGCAACCCTAGTCGCCATCTTTATA	0200
0201	TCTGGTTTACTTGTAAAGTTTACTGGGTACGCCTTATATACCGCTTTTGG	0250
0251	GCAACCTTCTCAACAAC TAAGAGATCCATTTCGAGGAACATGGAGACTAGT	0300
0301	TGAAGTACTGAGCCTCCCGATATCGGGAGGCTCAGTACTTCAACTGAGAT	0350
0351	AATGAAAAAAATTATTTACCCCTTTTAGTTCTTTTTTAGTTCGAATTGT	0400
0401	AGGCGGTTCTCGAAAAA GATAGCGAAAAAATTATCCCTAGAGTCGAGA	0450
0451	CTAAGAGGAATGTATAAACCAATGCTTCCATAAATTCGATCGTGGTTTAC	0500
0501	AATTATAGCTTTCATACCTGTTTGTCTCTTTTTATTTCTTTTTTTTATC	0550
0551	ATCTTCCAGATAAAGAACGAACAAGAGTAAAAACGAAGTTGATTCAAATA	0600
0601	AAGATTTCTCGGGTACCCTATGTCAATAAAAGTAAAAGAAAGAAAATAAG	0650
0651	GGCGAAAGAAAGATACCAAAGCAATGTTGTATTCAGGCTGCCTGTCTTTT	0700
0701	TGTAGTTGGATCTCCAAGTTTTTGGAAATGCTCCAAATTCGACTTGAGCAT	0750
0751	CTAAATCTGGGTCAATACCAGCAAAAACATCTCTGAACAAGGTTCTAGCA	0800
0801	CCATGCCAAATGTGTCCGAAGAAGAGCAAAGCAAACGAAGCATGCCC	0850
0851	AAAAGTAAACCAACCCCTTGGACTGCTACGAAAAACACCATCGGATTTCA	0900
0901	AAGTAGCACGATCTAATTCGAAAAATTCACCCAATTGAGCTCGTCGAGCA	0950
0951	TATTTTTTTCACAGTAGCAGGATCACTATAACTGACGCCGTTGAGTTCACC	1000
1001	GCCGTAGAACTCAACAGTTACACCTACTTGTTCACACTATACTTCGATT	1050
1051	CTGCCCTTCTAAAAGGAACATCGGCTCTAACAATCCCATCGCCGCTACC	1100
1101	AAAACGACCGGAAATGTTTCAAAAAAAGTAGGCATACGAGGTACAAAAAG	1150
1151	TTACGCCCTTCCTTATCTCTAAAGATAGGGTGTCTAACCATCCAACCG	1200
1201	CTATTCCATCCCCGTTATCCATTGAACCTGCTCTGAATAATCCTCCTTTT	1250

1251 GCCGGATTATTGCCGATGTAATCATAAAAAGCTAATTTTTTCAGGAATTTT 1300
 1301 AGACCAGGCTTCTGATAAACTTTGATTTTCTGCTAGCCCAGCACTAACTC 1350
 1351 TTCGATATATTTCTTGCTGGAAGTACCCCTGATCCCATTGATAACGAGTG 1400
 1401 GGCCCAAATAATTCAATCGGGGTAGTTGCCGAACCATAACCACATAGTTCC 1450
 1451 GGCAACAACAAAAGCTGCAAAAAGACAGCAGCGATACTACTGGAAAGGA 1500
 1501 CGGTTTCAATATTTCCCATACGCAATCCTTTGTATAGACGTTGTGGCGGA 1550
 1551 CGGACGCTAAGATGGAATAGGCCCGCTAATATGCCCAATGTTCCCTGCTGC 1600
 1601 AATATGATGAGAGGCTATTCTCCTGGAACAAAAGGATCAAAACCTTCCA 1650
 1651 CGCCCCACGCTGGATTACAGGTTGTACTTTTCCCGTTAGTCCATAAGGA 1700
 1701 TCGGACACCCATATTCCGGGACCATAACAAGCCTGTTACATGAAATGCACC 1750
 1751 AAAACCAAACAAGCCACCCCTGAGAGAAATAAATGAATTCCAAAGATCT 1800
 1801 TTGGCAAATCCAAAGAGGGTTTTCTGTACGTTTCATCACAAAATATTTCT 1850
 1851 AGATCCCAATACACCCAATGCCAGATAGCTGCCAAAAGCATAAGCCAGA 1900
 1901 AAACACAATATGTGCTCCCGCTACACCTTCGTAACCTCAAATACCTGGAT 1950
 1951 TCGTTACAGTCCCCCTGTGATACTCCAACCGCCCCATGAATTGGTTATT 2000
 2001 CCTAAACGAGTCATGAAGGGTATAACGAACATACCCTGTCTCCACATTGG 2050
 2051 ATCAAGAACAGGATCAGAAGGATCAAAAACCGCTAATTCATACAGAGCCA 2100
 2101 TCGAACCGGCCCAACCAGCAACCAGAGCTGTATGCATTATATGAACAGAA 2150
 2151 AGCAACCGACCGGGATCATTCAATACAACGGTATGAACACGATACCAAGG 2200
 2201 CAAACCCATGGAAATACCCCTTATATCAAAGATAAATGAACACTACGTAA 2250
 2251 CTTTATTGCATTGGAAAAGACTATAATATGACTATCCTATGGACCACTCT 2300
 2301 TGTTGAGTCAATTATTTCCGAACAAGGGTTTCTATTCTGTTGGTAATAAT 2350
 2351 GGAACAATTCTGTTCTGTAGGAACAAAGAGAAGCAGATTTATTCTATACTC 2400
 2401 GATAAGTACCAATACGCAATGGGGGAGTTGATCCCATTTTCTATGAGCGA 2450
 2451 ATGAGTCCATACTTATTTATCATTAGAAAGACCTATTCGTAATAATTTGA 2500
 2501 GTTTATTCAATTCTGTCTTTCTTTATGAATTTTGAGAATCTATGGATAAAA 2550
 2551 GAAATACGATAAAAACCAATATTCATATTATAAAGACAATAAAAAAATT 2600
 2601 GTTACGTTTCCACCTCAAAGTGAAATATAGTATTTAATTCGTTCTTTTCAT 2650
 2651 TTAATGCCTATTGGTGTTCCAAGAGTTGTATTCCGAAATCCTGGAGATCC 2700
 2701 AATTTTCATCTTGGGTTGACATATAGTGCGACTTGTCAGATATATTGGGTC 2750
 2751 ATATGGTATTTCCCCGTTCTCTCCCCGATCGAGATATCCCCCGTTTCGC 2800
 2801 CCAAGAAAGATAAATTGAATCATCAAAAATTTGGAGCGTGAAGTGCAATT 2850
 2851 AGATCCATTTTTGAGGGGATTCATATTACTATTATCAATTAGAATAATTT 2900

2901 ATGGTTGGCTTGGTTGGACTAAATAAATGAAGTATCCAGGCTCCGTTTAG 2950
 2951 AAAAAACCCAATTGGATTGGTAAGATATCTATGTAAGATATCTATGATTG 3000
 3001 CTATTCATATTTTTTCTTTGTAAAGAGATCCTAATTGTCAAGCAAAGTTA 3050
 3051 TCTCAACTCTAATAAATACTTGTATAAAATGAATTGAAAAAAAAAAAAA 3100
 3101 AAATACAAAAAGAAATGGTAATGGGAGCATTTGTCCTATATGTACAAATC 3150
 3151 CAAATCGGGCGGATCTTTACCCGGAGTAGAGCATAAACCTAAAAAGATGA 3200
 3201 AACAGACCCATTCAGGAACAAGAAAATACCATCGCGGTTTGGATTAAATC 3250
 3251 TCGATGAAAGAATACATCAATGAGAAGTTAATTCGATAAGTTTAAATGACC 3300
 3301 CTTTCTTATAACTTCGAATTTTATAATAGAAAATATCAAAAAGGAGTAAA 3350
 3351 AACTCGTCTTTATTGAAAAATCGAAGAAAAGCCCTTTCGTTAGAAGTAAG 3400
 3401 AAAGAACCCTTGTAGAAAAAAGAAAGAGGACTGGAATCTCTACATTGAT 3450
 3451 TCACAATTTTTTTGAACCGTATGCATCAAAGGCGCATGTACGGTTCCTA 3500
 3501 AGGGATACAATTTTACCCTAAT**CAACCGACTTTATCGAGAAAGATTACTT** 3550
 3551 **TTTTTAGGCCAAGGGATTGGTACCGAGCTTTCGAATCAACTTATTGGTCT** 3600
 3601 **TATGTTGTATCTCAGTATGGAGGATGAGAACAAGACCTGTATTTGTTTG** 3650
 3651 **TAAACTCTCCTGGGGGCTGGGTAATACCTGGGATCGCCATTTATGATACT** 3700
 3701 **ATGCAATTTGTGCGACCAGATATCCATACAATATGCCTAGGATTAGCTGC** 3750
 3751 **TTCAATGGGATCTTTTATCCTGGCCGGAGGACAACCTACCAAACGTATAG** 3800
 3801 **CATTCCCTCACGCTTGGCGCCAATGAGGTTTTTATTTGAGAAAAAAAGA** 3850
 3851 AGACTATGCCTTCGCCATATGAATACTAAGTAATAATAGCATGGCACTTC 3900
 3901 GAATTCGATATGAGAAATTTTGTATTGTTTTTTTTTTTCAAACATTAG 3950
 3951 ATTCTGTATCGAGAGAGTAGTATGAGATAAGGGGTATTTCCGATTTTCTA 4000
 4001 TTATATATCGGGAGTTCAGTTCAGCGTCACAACTTTTTGTTTTCATGCC 4050
 4051 GGAGAGTTCTTAACAATATTTATGTTATGAAAGAGTACGAAAAAAAAAATA 4100
 4101 ATTTTTCCTTATTTGATCGGATTAAAAAGAACTTTGGGATTGCTGAATC 4150
 4151 ACAGACAAAAAAAGAAAAATAAACATATAAAGCAACGGAGCCATCATA 4200
 4201 GTATTTTTGAATTCCTCCGAAAGGAAGGATGGCAATTTGATTATTTACCC 4250
 4251 ATCTGAGTCTGATAGATTCTATTTTTCTCTTTCTTCAATGGGGGTCAATT 4300
 4301 TTCTTGTAGAGCCGTATGCACAAAAGATGCCTGTACGGTTGTTCAATTCT 4350
 4351 ATCTTTTTTCTATTCTTTATCTTTCTTTTTCTTTGCTTTATCATGCGAG 4400
 4401 ATAGGGGAAGCTTTTATTTGTTATATCAT**CAGGGTAATGATACATGAAC** 4450
 4451 **CTTATAGTGGTTTTTATATGGCACAAGTAGGCGAATTTGTCCTGGAAGCG** 4500
 4501 **ATAGAAATGGCGAACTGCGTGAAACCCTCACAAGGGTTTATGCAGAAAA** 4550

4551 **AACGGGCCAACCCGTGTGGGTTATACACGAAGATATGGAAAGAGATATTT** 4600
 4601 **TTATGTCAGCAACAGAAGCCCAAGCTTATGGAATTGTTGATTTTGTAGCG** 4650
 4651 **GTTCAAGGAAAAGAACATGGATTTACGCAGATCTATGATTTGAGATTTT** 4700
 4701 ATCTTCGAATTGAATATTCTATTAAATAGAAGTAATTCACCATCATTCGG 4750
 4751 TTAGGATCAATCTAAACCAACCCATCATATTATGTATACGATTCAAC**ATG** 4800
 4801 **CCAAC TATTAAACAAC TATTAGAAATACAAGACAGCCAATCAGAAATGT** 4850
 4851 **CACGAAATCCCCCGCTCTTCGGGGGTGCCCTCAGCGTCGAGGAACATGTA** 4900
 4901 **CTAGGGTGTATGTGCGACTCGTTTAGATCATGAGCTGGCACAAAAAGCAA** 4950
 4951 GAAAACTACTTTTACAGTATCAATGATCAGTACCGGTGAATGGGATAGGA 5000
 5001 TGGAAAAAGGAACTCCATCCATTATAAAAAAAAAAACTCTACCATATCCCC 5050
 5051 CTCTATTGTGTATGAAGTTTATGGTTTCCGTTGGTGTAATCCAATCACC 5100
 5101 TGAATTTAAGATGATAAGAAATTCTCCATTGGTAACAAATGGTTATCCAT 5150
 5151 TAAGCGGAGGAAATCTTATTTAAAAGCATAAAACATAAAGATTAGGTAG 5200
 5201 GCTCCCAATCTGGCAAGAACGGACTAAGAGGGTCAGCTACCCAGCAAAC**T** 5250
 5251 TTCATAATTAAATACCGTTACTGTATAGGTAGATCTGATTGTGAAAGACC 5300
 5301 TATTACTGGACAATTCATGGGTAGAGCCAAAGCGTGTGAACTATACAAGT 5350
 5351 TCCCAATAACATCAATTAGTTGATTAAATATTAAAAATTAAAGTATAAAG 5400
 5401 TAAAGGCTCCGGTGTATAGAGAAGACCTCACCGTTTAAGAAGTAACCATA 5450
 5451 GAAACGAAGGAACCCACTATTTCTTTTTTTATTTCTTTTATTACTATAT 5500
 5501 TTTTGATACCTAGGAAAATACAATTTCTTAGTTCTGTCTTATTTCGCAGT 5550
 5551 GAAATACCTAAAAAAAAAATCGTGGTCGGGAAGGTTAGAGTAGCCAAAGCC 5600
 5601 ATTGGAATTTTGATTTTATACATTGGAAAAATCCGTTTTGTTATTAATAG 5650
 5651 ACTAGGAAGGGGGAAAAGAATAACTGAAAGAAAGGCAATCAATTAGTTAT 5700
 5701 TCGTCAAAGTTTCATTTATTCAATG**ACCAGAAATTAAACGGGGATATATAG** 5750
 5751 **CTCGGAGACGTAGAACA AAAATTCGTTTATTTGCATCAAGCTTTCGAGGG** 5800
 5801 **GCTCATTCAAGGCTTACTAGAACTATTACTCAACAGAAAATAAGAGCTTT** 5850
 5851 **AGTTTCGGCTCATCGGGATAGGGATAGGAAAAGAGAGATTTTCGTCGTT** 5900
 5901 **TGTGGATCACTAGGATAAACGCAGTAATTCGCGAAAGGGGAGTATCCTAT** 5950
 5951 **AGTTATAGTAGATTAATACACGATCTGTACAAGAGACAGTTGCTTCTTAA** 6000
 6001 **CCGTAAAATACTTGCACAAATAGCTATATCAAATAGGAATTGTCTTTATA** 6050
 6051 **TGATTTCGAACGAAATCATAAAGGAAGTAGATTGGAAAGAATCCACCAGA** 6100
 6101 **ATAATTTAAATGGAGTTACCCGGAGAATGAACTCCGGGAAGGTAGAGTAG** 6150
 6151 AAATTAGTATGAGAAAATATACTAAAGTAGTCAAATGAATGAACACGTT 6200

```

6201 CAATTCAATAAAAACAGATTTCTTTTTTTCCGATTCATTTTTTTCTTAGG 6250
6251 ACACGATACTCAAATCTAGATTCACCTCAAATCTAGATTCTTGTAATTATG 6300
6301 ATTCAAGTGAAGAAAAAGTAAGCCTATTTATTTTCGGGCTTTAAAACCAAGT 6350
6351 AGTTCTAGCGGTCGAC 6365

```

SaII

4.2. Análise de homologia nas regiões codificadoras e nos espaços intergênicos

As análises comparativas de homologia de regiões codificadoras e espaços intergênicos (espaçadores) entre as seqüências cloroplastidiais de tomate e tabaco encontram-se listadas nas Tabelas 4 e 5. Para o fragmento cloroplastidial contido no plasmídio pIJB1 (8.660 pb) as seqüências apresentam de 93 a 100% de identidade. As regiões codificadoras dos genes *trnC*, *petN* (*ycf6*), *psbM*, *trnD*, *trnY*, *trnE*, *trnT* e *psbD* presentes no fragmento são altamente conservadas, apresentando 100% de identidade às de tabaco, exceção ao *psbM* e ao *psbD* que apresentam 99,0% e 99,2% de identidade respectivamente. A região codificadora do gene *psbM* possui uma substituição do nucleotídeo C (em tabaco) por T (em tomate) na posição +78, sem no entanto alterar o códon para o aminoácido isoleucina (TAC → TAT). É interessante salientar que o códon encontrado em tomate é aquele também encontrado nos genes correspondentes em *Zea mays* (GenBank/EMBL/DDBJ accession number - # X86563), *Oryza sativa* (# X15901) e *Marchantia polymorpha* (# X04465), como apresentado no Quadro 3, podendo sugerir que uma mutação teria ocorrido em tabaco. Por sua vez, embora apresente homologia de 99,2% em nucleotídeos, a região codificadora do gene *psbD* não apresenta qualquer modificação com relação à seqüência de aminoácidos codificados, mostrando-se idêntica à proteína encontrada em tabaco. Para o fragmento cloroplastidial contido no plasmídio pIJB2 (6.366 pb), as seqüências apresentam 97 a 100% de identidade. No entanto, observou-se que o gene *clpP*, que apresenta um grande acúmulo de mutações, especialmente em dois de seus três exons, apresentou menor homologia com relação à seqüência correspondente em

tabaco, apresentando apenas 78,9 e 81,7% de identidade para os exons 1 e 3 respectivamente (Tabela 4).

Em função da alta homologia encontrada para as regiões codificadoras entre diferentes genomas cloroplastidiais (Shimada & Sugiura, 1991; Maier et al., 1995), o Quadro 3 apresenta o alinhamento e a homologia das regiões codificadoras de *Lycopersicon esculentum* (LE) *trnC*, *petN* (*ycf6*), *psbM*, *trnD*, *trnY*, *trnE*, *trnT* e *psbD* (derivadas do plasmídio pIJB1), *rpL20*, *5' rps12*, *clpP*, *psbB*, *psbT* e *psbN* (derivadas do plasmídio pIJB2) analisadas em relação aos plastomas de *Zea mays* (ZM), *Oryza sativa* (OS), *Nicotiana tabacum* (NT - GenBank # Z00044), *Pinus thunbergii* (PT - GenBank # D17510), *Marchantia polymorpha* (MP), Bock (2000)². O Quadro 3 mostra claramente que o gene *clpP* trata-se de um gene menos conservado nas espécies vegetais consideradas; é observado que os resultados obtidos em tomate corrobora os resultados encontrados em outras espécies (alinhamentos cedidos por Bock, 2000¹). O Quadro 3 apresenta também os respectivos alinhamentos de aminoácidos codificados pelos genes sequenciados, reforçando mais uma vez a alta homologia entre regiões codificadoras cloroplastidiais e seus respectivos produtos finais (proteínas ou tRNAs) nos diversos plastomas. Nesse aspecto, vale ressaltar os resultados encontrados para a região codificadora do gene *psbB* de tomate, embora esta apresente 11 substituições de bases quando comparada à sequência codificadora de tabaco (Shimada & Sugiura, 1991; Bock, 2000), a sequência de tomate gera uma proteína idêntica à de tabaco, uma vez que todas as substituições ocorrem na terceira base dos respectivos códons não ocorrendo alteração do mesmos (Quadro 3). A análise completa de homologia entre as diversas regiões codificadoras, aminoácidos codificados e espécies consideradas podem ser visualizados diretamente no Quadro 3, onde encontram-se destacadas as respectivas substituições de nucleotídeos e conseqüentes reflexos na sequência de aminoácidos.

Análise da ocorrência de sítios de editamento de RNA nas sequências cloroplastidiais clonadas em pIJB1 e pIJB2 com base em Hirose et al. (1999), levou à observação da manutenção do padrão encontrado em tabaco na sequência de tomate. No gene *rpL20* mostra-se presente um sítio de editamento no códon correspondente ao aminoácido 103, gerando o códon para Leucina (uUa) por editamento a partir do códon

² BOCK, R. (Freiburg Universität, Alemanha) Comunicação Pessoal, 2000.

para Serina (uCa) presente na sequência do gene. No gene *rpoB* foi confirmada a presença de sítios de editamento nos códons 113 (Serina (uCu) → Fenilalanina (uUu)), 158 (Serina (uCa) → Leucina (uUa)) e 184 (Serina (uCa) → Leucina (uUa)); da mesma forma, os sítios de editamento presentes nos códons 189 e 208 do gene *rpoB* de milho estão ausentes em tabaco e também não ocorrem na sequência de tomate. Os sítios de editamento encontram-se destacados no Quadro 3 com a respectiva identificação.

Em contrapartida ao que ocorre predominantemente na análise de regiões codificadoras, os dados mostram menor homologia nas regiões intergênicas (espaçadores), incluindo substituições, inserções, duplicações, e algumas deleções em tomate, indicando que divergências ocorrem principalmente em regiões provavelmente não funcionais ou não diretamente envolvidas na codificação de proteínas. Todas as divergências encontram-se destacadas nos anexos A e B, contendo as sequências completas dos fragmentos de tomate alinhados com as respectivas sequências de tabaco (Shimada & Sugiura, 1991; GeneBank/EMBL/DDBJ accession number Z00044). A diferença mais marcante está em um fragmento de 437 pb presente na região intergênica de tabaco entre as regiões codificadoras dos genes *trnE* e *trnT*, mas ausente no DNA cloroplastidial de tomate. O alinhamento da região encontra-se no Quadro 4. Embora não hajam dados concretos, análise destas sequências leva a acreditar que em algum momento da evolução do ptDNA de tomate, algum pareamento de sequências parcialmente complementares tenha levado à formação de uma pequena alça ("loop") e sua conseqüente eliminação durante a replicação. Outras divergências podem ser destacadas, as sequências CTTTTTA (*psbD-trnT*), TCAGT, GATATAT (*trnC-rpoB*), TCTAGATTTGAGTGA (*rpl20-rps18*), ATAGATATCTTAC (*clpP(1)-clpP(2)*) e TTTT (*psbT-psbN*) encontram-se duplicadas em tomate, o que não ocorre em tabaco. Em oposição, as sequências AGAA (*psbM-peaN*), CCTCC, TTTT e TTTTTT (*clpP(2)-clpP(3)*) e TTCTAATTGA (*clpP(1)-clpP(2)*) estão duplicadas em tabaco e apresentam-se em cópia única em tomate.

Tabela 4. Regiões codificadoras: comparação do tamanho e análise de homologia entre as seqüências de nucleotídeos dos fragmentos cloroplastidiais de tomate (8.660 pb e 6.366 pb) e as regiões correspondentes do plastoma de tabaco. O plasmídeo pIJB1 corresponde ao fragmento de 8.660 pb e o plasmídeo pIJB2 corresponde ao fragmento de 6.366 pb.

Região	Tamanho (pb)		Identidade
Codificadora	Tomate	Tabaco	(%)
<u>RNAs de transferência</u>			
<i>trnE</i> -UUC (pIJB1)	73	73	100
<i>trnY</i> -GUA (pIJB1)	84	84	100
<i>trnD</i> -GUC (pIJB1)	74	74	100
<i>trnC</i> -GCA (pIJB1)	72	72	100
<i>trnT</i> -GGU (pIJB1)	72	72	100
<u>Fotossintema II</u>			
<i>psbD</i> (pIJB1)	1062	1062	99,2
<i>psbM</i> (pIJB1)	105	105	99,0
<i>psbB</i> (pIJB2)	1527	1527	99,3
<i>psbT</i> (pIJB2)	104	104	97,1
<i>psbN</i> (pIJB2)	132	132	100
<u>Outros genes</u>			
<i>petN</i> (<i>ycf6</i>) (pIJB1)	90	90	100
<i>rpL20</i> (pIJB2)	387	387	99,2
5' <i>rpS12</i> (pIJB2)	114	114	100
<i>clpP</i> (exon 1) (pIJB2)	71	71	81,7
<i>clpP</i> (exon 2) (pIJB2)	292	292	94,2
<i>clpP</i> (exon 3) (pIJB2)	228	228	78,9

Tabela 5. Espaços intergênicos: comparação do tamanho e análise de homologia entre as seqüências de nucleotídeos dos fragmentos cloroplastidiais de tomate (8.660 pb e 6.366 pb) e as regiões correspondentes do plastoma de tabaco. O plasmídio pIJB1 corresponde ao fragmento de 8.660 pb e o plasmídio pIJB2 corresponde ao fragmento de 6.366 pb.

Espaço	Tamanho (pb)		Identidade
Intergênico	Tomate	Tabaco	(%)
pIJB1 (8.660 pb)			
<i>psbD</i> - <i>trnT</i>	1178	1218	96,5
<i>trnT</i> - <i>trnE</i>	411	848	93,4 (44,5* ¹)
<i>trnE</i> - <i>trnY</i>	59	59	93,2
<i>trnY</i> - <i>trnD</i>	108	108	97,2
<i>trnD</i> - <i>psbM</i>	1081	1072	93,3
<i>psbM</i> - <i>petN</i>	1107	1132	95,3
<i>petN</i> - <i>trnC</i>	648	670	94,0
<i>trnC</i> - <i>rpoB</i>	1328	1281	95,6
pIJB2 (6.366 pb)			
<i>psbN</i> - <i>psbT</i>	77	77	94,8
<i>psbT</i> - <i>psbB</i>	201	201	99,0
<i>psbB</i> - <i>clpP</i> (1)	444	449	98,9
<i>clpP</i> (1) - <i>clpP</i> (2)* ²	798	807	94,1
<i>clpP</i> (2) - <i>clpP</i> (3)* ³	617	637	95,6
<i>clpP</i> (3) - 5' <i>rps12</i>	138	138	99,3
5' <i>rps14</i> - <i>rpl20</i>	811	811	95,8

*¹ Homologia desde que considerada a deleção de 437 pb em tomate;

*² Intron 1; *³ Intron 2.

Quadro 3. Alinhamento e homologia entre as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos das regiões codificadoras plastidiais *rpoB*, *trnC*, *petN* (*ycf6*), *psbM*, *trnD*, *trnY*, *trnE*, *trnT*, *psbD*, *psbC* (pIJB1), *rpL20*, *5' rps12*, *clpP*, *psbB*, *psbT* e *psbN* (pIJB2) contidas nos plastomas de *Zea mays* (ZM), *Oryza sativa* (OS), *Nicotiana tabacum* (NT), *Lycopersicon esculentum* (LE), *Pinus thunbergii* (PT), e *Marchantia polymorpha* (MP). Asteriscos (*) indicam identidade total; Pontos (.) indicam que existem somente dois nucleotídeos ou aminoácidos diferentes na respectiva posição; Espaços em branco ( ) indicam que existem mais de dois nucleotídeos ou aminoácidos diferentes na respectiva posição; Em negrito encontram-se destacados os nucleotídeos alvo de substituição, os respectivos códon e aminoácidos codificados em tomate quando em comparação à seqüência de tabaco. Traços (-) representam ausência do nucleotídeo ou aminoácido. Sítios de editamento encontram-se destacados em negrito-italico-sublinhado na seqüência de tomate; número abaixo entre parênteses indica o códon a ser editado tomando-se o códon ATG como número 1.

<i>psbC</i>: Nucleotídeos		
PSBCZM	ATGAAAATCTTATATTCCCTGAGGAGGTTCTACCACGTGGAAACGCTCTTTAATG	55
PSBCOS	ATGAAAATCTTATATTCCCTGAGGAGGTTCTACCACGTGGAAACGCTCTTTAATG	55
PSBCNT	ATGAAAACCTTATATTCCCTGAGGAGGTTCTACCACGTGGAAACGCTCTTTAATG	55
PSBCLE	ATGAAAACCTTATATTCCCTGAGGAGGTTCTACCACGTGGAAACGCTCTTTAATG	55
PSBCPT	ATGAAAACCTTATATTCCCTGAGGAGGTTCTACCCCGTGGAAACGCTCTTTAATG	55
PSBCMP	ATGAAAATCTTGTATTCCAGAGGAGGTTCTACCCCGTGGAAACGCTCTTTAATG	55
	*****.***.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
PSBCZM	GAACCTTTCGTTTGTAGCTGGTCGTGACCAAGAAACCACCGGCTTTCCTTGGTGGGC	110
PSBCOS	GAACCTTTCGTTTGTAGCTGGTCGTGACCAAGAAACCACCGGCTTTCCTTGGTGGGC	110
PSBCNT	GAACCTTTCGTTTGTAGCTGGTCGTGACCAAGAAACCACCGGCTTTCCTTGGTGGGC	110
PSBCLE	GAACCTTTCGTTTGTAGCTGGTCGTGACCAAGAAACCACCGGCTTTCCTTGGTGGGC	110
PSBCPT	GAACCTTTCGTTTGTAGCTGGTCGTGACCAAGAAACCACCGGCTTTCCTTGGTGGGC	110
PSBCMP	GAACCTTTCGTTTGTAGCTGGTCGTGACCAAGAAACCACCGGCTTTCCTTGGTGGGC	110
	*****.*.*.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
PSBCZM	TGGGAATGCCAGACTTATCAATTTGTCCGGTAACTACTTGGAGCTCATGTAGCC	165
PSBCOS	CGGGAATGCCAGACTTATCAATTTGTCCGGTAACTACTTGGAGCTCACGTAGCC	165
PSBCNT	CGGGAATGCCAGACTTATCAATTTGTCCGGTAACTACTAGGGGCTCATGTAGCC	165
PSBCLE	CGGGAATGCCAGACTTATCAATTTGTCCGGTAACTACTAGGGGCTCATGTAGCC	165
PSBCPT	CGGTAATGCCAGACTTATCAATTTGTCCGGTAACTTGGTGGGCTCACGTGGCT	165
PSBCMP	AGGTAATGCTAGACTTATTAATTTATCTGGAAAGTTACTTGGAGCTCATGTAGCT	165
	..*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
PSBCZM	CATGCCGGATTAATCGTATTCTGGGCCGGAGCAATGAACCTATTGAAGTGGCCC	220
PSBCOS	CATGCAGGATTAATCGTATTCTGGGCCGGAGCAATGAACCTATTGAAGTGGCCC	220
PSBCNT	CATGCTGGATTAATCGTATTCTGGGCCGGAGCAATGAACCTATTGAAGTGGCCC	220
PSBCLE	CATGCTGGATTAATCGTATTCTGGGCCGGAGCAATGAACCTATTGAAGTGGCCC	220

PSBCPT	CATGCCGGATTAAATTGTATTCTGGGCCGGAGCAATGAACCTATTGGAAGTGGCTC	220
PSBCMP	CATGCTGGATTAAATTGTTTTTTGGGCTGGAGCAATGAATTGTTTGAAGTGGCTC ***** .**.*.*****.*****.***.***** **.*	220
PSBCZM	ATTTTCGTACCAGAAAAGCCCATGTATGAACAAGGGTTGATTTTACTTCCGCACTT	275
PSBCOS	ATTTTCGTACCAGAAAACCCATGTATGAACAAGGGTTGATTTTACTTCCGCACTT	275
PSBCNT	ATTTTCGTACCAGAGAAGCCTATGTATGAACAAGGATTAATTTTACTTCCCCACCT	275
PSBCLE	ATTTTCGTACCAGAGAAGCCTATGTATGAACAAGGATTGATTTTACTTCCCCACCT	275
PSBCPT	ATTTTCGTACCGGAAAACCTATGTATGAACAAGGATTGATCTGCTTCCCCATCT	275
PSBCMP	ATTTTGTACCAGAAAACCTATGTATGAACAAGGATTAATACTACTTCCCTCATTT ****.*****.***.***.*****.*****.***.***.***** **.*	275
PSBCZM	AGCTACTCTAGGTTGGGGAGTAGGGTTCGGGGGAGAAGTTCTAGATACTTTTCCT	330
PSBCOS	AGCTACTCTAGGTTGGGGAGTAGGGCCCGGGGGAGAAGTTCTAGATACTTTTCCT	330
PSBCNT	AGCTACTCTAGGTTGGGGGAGTAGGCCCTGGGGGAGAAGTTATAGACACCTTTCCA	330
PSBCLE	AGCTACTCTAGGTTGGGGGAGTAGGCCCTGGGGGAGAAGTTATAGATACTTTCCA	330
PSBCPT	AGCTACTCTAGGATGGGGAGTCGGTCTGGTGGGGAATCGTGGACACTTTTCCA	330
PSBCMP	AGCTACTTTAGGTTGGGGAGTAGGACCTGGTGGGGAATGTTGATACTTTTCCA *****.***.*****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***	330
PSBCZM	TACTTTGTATCCGGAGTACTTCACTTAATTTCTTCCGCAG	370
PSBCOS	TACTTTGTATCTGGAGTACTTCACTTAATTTCTTCCGCAG	370
PSBCNT	TACTTTGTATCTGGAGTACTTCACTTAATTTCTTCTGCAG	370
PSBCLE	TACTTTGTATCTGGAGTACTTCACTTAATTTCTTCTGCAG	370
PSBCPT	TATTTTGTATCTGGGAGTACTTCACTTAATTTCTTCTGCAG	370
PSBCMP	TATTTTGTCTGGAGTCTTCACTTAATTTCTTCTGCAG **.*.*****.***.***.*****.*****.***.***.***.***.***.***	370

psbC: aminoácidos

PSBCZM	MKILYSLRRFYHVETLFNGTFVLAGRDQETTGFPWWAGNARLINLSGKLLGAHVA	55
PSBCOS	MKILYSLRRFYHVETLFNGTFVLAGRDQETTGFAWWAGNARLINLSGKLLGAHVA	55
PSBCNT	MKTLYSLRRFYHVETLFNGTLALAGRDQETTGFAWWAGNARLINLSGKLLGAHVA	55
PSBCPT	MKTLYSLRRSYPVETLFNGTIALAGRDQETTGFAWWAGNARLINLSGKLLGAHVA	55
PSBCMP	MKILYSQRRFYPVETLFNGTIALGGRDQETTGFAWWAGNARLINLSGKLLGAHVA **.*.***.***.***.*****.***.*****.*****.*****.*****	55
PSBCZM	HAGLIVFWAGAMNLFVAHFVPEKPMYEQGLIILPHLATLWGVGSGGEVLDTFP	110
PSBCOS	HAGLIVFWAGAMNLFVAHFVPEKPMYEQGLIILPHLATLWGVGPGGEVLDTFP	110
PSBCNT	HAGLIVFWAGAMNLFVAHFVPEKPMYEQGLIILPHLATLWGVGPGGEVIDTFP	110
PSBCPT	HAGLIVFWAGAMNLFVAHFVPEKPMYEQGLIILPHLATLWGVGPGGEIVDTFP	110
PSBCMP	HAGLIVFWAGAMNLFVAHFVPEKPMYEQGLIILPHLATLWGVGPGGEIVDTFP *****.*****.*****.***.***.***	110
PSBCZM	YFVSGVLHLISSAV	123
PSBCOS	YFVSGVLHLISSAV	123
PSBCNT	YFVSGVLHLISSAV	123
PSBCPT	YFVSGVLHLISSAV	123
PSBCMP	YFVSGVLHLISSAV *****	123

psbD: Nucleótidos

PSBDZM	ATGACTATAGCCGTTGGTAGAGTTACTAAAGAAGAAAACGATCTATTCCCCCTTA	55
PSBDOS	ATGACTATAGCCCTTGGTAGAGTTACTAAAGAAGAAAATGATTATTTGATATTA	55
PSBDNT	ATGACTATAGCCCTTGGTAAGTTTACCAAAGACGAAAATGATTATTTGATATTA	55
PSBDLE	ATGACTATAGCCATTGGTAAGTTTACCAAAGACGAAAATGATTATTTGATATTA	55
PSBDPT	ATGACTATAGCCCTTGGAAAGTCTTCTAAAGAAGAAAAACTTTATTTGATACTG	55
PSBDMF	ATGACTATAGCCATTGGAAAGTCTTCCAAAGAACCAAAGGTTATTTGATAGCA *****.*****.***.***.***.***.***.***.***.***.***.***	55

PSBDZM	TCGACGACTGGTTACGAAGGGACCGCTTCGTTTTTGTAGGATGGTCCGGCTTATT	110
PSBDOS	TGGACGACTGGTTACGAAGGGACCGTTTTGTTTTGTAGGATGGTCTGGCCTATT	110
PSBDNT	TGGATGACTGGTTACGGAGGGACCGTTTCGTTTTTGTAGGCTGGTCCGGTCTATT	110
PSBDLE	TGGATGACTGGTTACGGAGGGACCGTTTCGTTTTTGTAGGCTGGTCCGGTCTATT	110
PSBDPT	TGGATGACTGGCTACGCAGAGACCGTTTCGTTTTTGTGGGTGGTCCGGTCTATT	110
PSBDMP	TGGATGACTGGCTAAGGAGAGACCGTTTGTATTGTAGGTTGGTCTGGTCTATT *.**,*****.**, * **,*****.**, **,*****.**, *****.**, ****	110
PSBDZM	GCTCTTTCCTTGTGCTTATTTTCGCTTTAGGGGGTTGGTTTACAGGGACTACTTTT	165
PSBDOS	GCTTTTTTCCTTGTGCTTATTTTCGCTTTAGGAGGTTGGTTTACAGGGACAACTTT	165
PSBDNT	GCTCTTTCCTTGTGCTTATTTTCGCTGTAGGGGGTTGGTTCACAGGTACAACCTTT	165
PSBDLE	GCTCTTTCCTTGTGCTTATTTTCGCTGTAGGGGGTTGGTTCACAGGTACcACCTTT	165
PSBDPT	GCTCTTTCCTTGTGCTTATTTTCGCTTAGGTGGATGGTTCACGGGTACAACCTTT	165
PSBDMP	GCTTTTTTCCTTGTGCTTATTTTCGCTTAGGTGGATGGTTTACAGGTACAACCTTT ***.***** *****.**, **,*****.**, **,*****.**, **, ** *	165
PSBDZM	GTAACCTTCTTGGTATACCCATGGATTGGCTAGTTCCTATTTGGAAGGTTGCAATT	220
PSBDOS	GTAACCTTCTTGGTATACCCATGGATTGGCGAGTTCCTATTTGGAAGGTTGCAATT	220
PSBDNT	GTAACCTTCATGGTATACCCATGGATTGGCCAGTTCCTATTTGGAAGGCTGCAATT	220
PSBDLE	GTAACCTTCATGGTATACCCATGGATTGcCCAGTTCCTATTTGGAAGGCTGCAATT	220
PSBDPT	GTGACTTCATGGTATACTCACGGATTGGCCAGTTCCTATCTGGAAGGTTGTAATT	220
PSBDMP	GTAACCTTCATGGTATACTCATGGATTAGCTAGTTCCTATTTAGGAAGGTTGTAATT **.*****.*****.**,*****.**, * ****.***.**,*****.**,*****	220
PSBDZM	TCCTTAACCGCGCGGTTTCCACACCTGCCAATAGTTTAGCACACTCTTTGTTGCT	275
PSBDOS	TCCTTAACCGCAGCAGTTTCCACCCCTGCCAATAGTTTAGCACACTCTTTGTTGCT	275
PSBDNT	TCCTTAACCGCGCGGTTTCTACTCCTGCTAATAGTTTAGCACATTCGTTGTTGTT	275
PSBDLE	TCCTTAACCGCGCGGTTTCTACTCCTGCTAATAGTTTAGCACATTCGTTGTTGTT	275
PSBDPT	TCCTTAACCGCGCAGTTTCTACTCCTGCTAATAGTTTAGCACATTCCTTGCTGCT	275
PSBDMP	TTTTTAACCGCGCTGTTTCTACCCAGCAAATAGTTTAGCTCATTCTTTACTATT *.*****.**, ** *****.**, **, ** *****.*****.**, **, **, **, *	275
PSBDZM	ACTATGGGGACCGGAAGCACAGGGAGATTTTACTCGTTGGTCTCAATTAGGTGGT	330
PSBDOS	ACTATGGGGCCCCGAAGCACAGGGGATTTTACTCGTTGGTGTCAATTAGGTGGT	330
PSBDNT	ACTATGGGGTCTGAAGCACAGGAGATTTTACTCGTTGGTGTCAATTGGGGGGT	330
PSBDLE	ACTATGGGGTCTGAAGCACAGGAGATTTTACTCGTTGGTGTCAATTGGGGGGT	330
PSBDPT	ATTATGGGGTCCCCAAGCACAGGAGATTTGACTCGTTGGTGTCAATTAGGTGGT	330
PSBDMP	ATTATGGGGACCTGAAGCACAGGTGATTTTACTCGTTGGTGTCAATTAGGCGGT *.****** ** *****.**, *****.*****.*****.**, ** *	330
PSBDZM	CTTTGGACTTTTCTCGCTCTCCATGGAGCTTTTGCCTAATAGGTTTCATGCTAC	385
PSBDOS	CTGTGGACTTTTGTGCTCTCCATGGGGCTTTTGCCTAATAGGTTTCATGTTAC	385
PSBDNT	CTGTGGACTTTTGTGCTCTCCATGGAGCTTTTGGCCTAATAGGTTTCATGTTAC	385
PSBDLE	CTGTGGACTTTTGTGCTCTCCATGGAGCTTTTGGCCTAATAGGTTTCATGTTAC	385
PSBDPT	CTATGGACCTTCGTTGCTCTTCACGGTGCTTTTCGGTCTAATAGGTTTCATGTTAC	385
PSBDMP	TTATGGACTTTTGTAGCTCTTCATGGTGCATTTGGCTTAAATAGGCTTTATGTTAA .* *****.**, *. *****.**, **, **, **, *****.**, **, **, **, *	385
PSBDZM	GTCAATTTGAACCTTGCTCGGCCTGTTCAATTGCGGCCTTATAATGCAATTTTCATT	440
PSBDOS	GTCAATTTGAACCTTGCTCGGTCTGTTCAATTGCGGCCTTATAATGCAATTTTCATT	440
PSBDNT	GTCAATTCGAGCTTGCTCGATCTGTTCAATTGAGACCTTATAATGCAATTCGCAAT	440
PSBDLE	GTCAATTCGAGCTTGCTCGATCTGTTCAATTGAGACCTTATAATGCAATTCGCAAT	440
PSBDPT	GTCAATTTGAACCTTGCTCGATCTGTACAATTGCGACCTTATAATGCAATTCGCAAT	440
PSBDMP	GACAATTTGAACCTTGCTCGATCTGTTCAATTACGTCCTTATAATGCAATTCGCTT *.*****.**, *****.**, *****.**, * *****.*****.**, **, **, *	440
PSBDZM	CTCTGGTCCAATCGCTGTTTTTCTTTCCGTATTTCCTTATTTATCCACTGGGACAA	495
PSBDOS	CTCTGGCCCAATCGCTGTTTTTGTTCCTGATTTCCTGATTATCCACTGGGGCAA	495
PSBDNT	CTCTGGTCCAATGCTGTTTTTGTTCCTGATTTCCTGATTATCCACTGGGTCAG	495
PSBDLE	CTCTGGTCCAATGCTGTTTTTGTTCCTGATTTCCTGATTATCCACTAGGTCAG	495

PSBDPT	CTCTGCTCCAATTGCTGTCTTTGTTTCTGTATTTTGTATCTATCCATTGGGACAG	495
PSBDMP	TTCTGGACCTATTGCTGTTTTGTATCTGTTTTCTTATTATCCTTTAGGACAA *****. **.*.*****.***.*.***.*.***.*.***.*****.***.*.***.	495
PSBDZM	TCTGGTTGGTTCTTCTCGCCGAGTTTTGGCGTAGCAGCTATATTTTCGCTTCATCC	550
PSBDOS	TCCGGTTGGTTCTTTGCGCCGAGTTTTGGCGTAGCAGCTATATTTTCGATTTCATCC	550
PSBDNT	TCTGGTTGGTTCTTTGCGCCGAGTTTTGGCGTAGCAGCTATATTTTCGATTTCATCC	550
PSBDLE	TCTGGTTGGTTCTTTGCGCCGAGTTTTGGCGTAGCAGCTATATTTTCGATTTCATCC	550
PSBDPT	TCCGGTTGGTTTTTTCGCGCCGAGTTTTGGCGTAGCAGCTATTTTCCGTTTTATCC	550
PSBDMP	TCAGGTTGGTTTTTTCGCGCCGAGTTTTGGCGTAGCTGCAATTTTATGATTATTC ** *****.***.*.***.*****.*****.***.*.***.*.***.*.***.	550
PSBDZM	TTTTCTTCCAAGGATTTTCATAATTGGACGTTGAAACCATTTTCATATGATGGGAGT	605
PSBDOS	TCTTCTTCCAAGGATTTTCATAATTGGACGTTGAACCCATTTTCATATGATGGGAGT	605
PSBDNT	TCTTTTTTCAAGGGTTTCATAATTGGACGTTGAACCCATTTTCATATGATGGGAGT	605
PSBDLE	TATTTTTTCAAGGGTTTCATAATTGGACGTTGAACCCCTTTTCATATGATGGGAGT	605
PSBDPT	TCTTCTTCCAAGGTTTTTCATAATTGGACGTTGAATCCATTTTCATATGATGGGAGT	605
PSBDMP	TTTTTTTTCAAGGCTTTTCATAACTGGACTTTAAACCCATTTTCATATGATGGGTGT * **.*.***** *****.***** **.*.*** *****.*****.***.	605
PSBDZM	TGCCGGAGTATTAGGCGCAGTTCTGCTATGCGCTATCCACGGGGCTACCGTAGAA	660
PSBDOS	TGCCGGAGTATTAGGCGCGGCTCTGCTATGCGCTATTCATGGGGCAACCGTGAA	660
PSBDNT	TGCCGGGTGATTTAGGCGCTGCTTTGCTATGCGCCATTCATGGTGCTACCGTAGAA	660
PSBDLE	TGCCGGGTGATTTAGGCGGCTGCTTTGCTATGCGCCATTCATGGTGCTACCGTAGAA	660
PSBDPT	TGCCGGAGTATTGGGTGCTGCTCTTCTATGCGCTATTCATGGTGCTACCGTGAA	660
PSBDMP	CGCTGGAGTTTTAGGGGCTGCTCTTTTATGCGCAATTCACGGTGCTACTGTTGAG .*.***.*.***.*.*** **.*.***.***** **.*.***.*.***.*.***.*.	660
PSBDZM	AACACTCTATTGGAAGATGGCGATGGTGCAAATACCTTCCGTGCTTTTAACCCAA	715
PSBDOS	AACACTCTATTGAGGACGGTGATGGTGCAAATACCTTCCGCGCTTTTAACCCAA	715
PSBDNT	AATACTTTATTGGAAGACGGTGATGGTGCAAATACATTCGGTGCTTTTAACCCAA	715
PSBDLE	AATACTTTATTGGAAGACGGTGATGGTGCAAATACATTCGGTGCTTTTAACCCAA	715
PSBDPT	AATACTTTATTGGAAGATGGTGATGGTGCAAATACGTTCCGTGCTTTTAACCCGA	715
PSBDMP	AATACATTATTGGAAGATGGTGATGGTGCAAACACATTCGGTGCTTTTAATCCAA **.*.***.*.***.*.***.*****.*** *****.*****.***.*.	715
PSBDZM	CTCAAGCTGAAGAACTTATTCAATGGTCACCTGCTAACCGCTTTTGGTCCCAAAT	770
PSBDOS	CTCAAGCTGAAGAACTTATTCAATGGTCACCGCTAATCGCTTTTGGTCCCAAAT	770
PSBDNT	CTCAAGCCGAAGAACTTATTCAATGGTCACCGCTAACCGCTTTTGGTCCCAAAT	770
PSBDLE	CTCAAGCCGAAGAACTTATTCAATGGTCACCGCTAACCGCTTTTGGTCCCAAAT	770
PSBDPT	CTCAAGCCGAAGAGACTTATTCATGGTCACCTGCTAACCGCTTCTGGTCCAGAT	770
PSBDMP	CTCAATCTGAAGAAACATATTCATGGTTACTGCGAATCGTTTTTGGTCTCAAT *****.*.*****.*.***** *****.***.*.***.*.***.*.***.*.	770
PSBDZM	CTTTGGTGTTGCTTTTTCCAATAAACGTTGGTTACATTTCTTTATGCTATTTGTA	825
PSBDOS	CTTTGGTGTTGCTTTTTCCAATAAACGTTGGTTACATTTCTTTATGCTATTTGTA	825
PSBDNT	CTTTGGGGTTGCTTTTTCCAATAAACGTTGGTTACATTTCTTTATGTTATTTGTA	825
PSBDLE	CTTTGGGGTTGCTTTTTCCAATAAACGTTGGTTACATTTCTTTATGTTATTTGTA	825
PSBDPT	TTTTGGGGTTGCTTTTTCCAATAAACGTTGGTTACATTTCTTCATGTTATTTGTG	825
PSBDMP	TTTTGGTGTTGCTTTTTCTAATAAACGTTGGTTACACTTTTTTATGCTATTCGTA .*.*****.*****.*****.*****.***.*.***.*.***.*.***.*.	825
PSBDZM	CCCGTCACCGGTTTATGGATGAGTGCTATTGGCGTAGTTGGTCTGGCTCTGAACC	880
PSBDOS	CCGGTCACCGGTTTATGGATGAGTGCTATTGGCGTAGTCGGCCTGGCTCTGAACC	880
PSBDNT	CCAGTAACCGGTTTATGGATGAGTGCTCTTGGAGTAGTCGGTCTAGCCCTGAACC	880
PSBDLE	CCAGTGACCGGTTTATGGATGAGTGCTCTTGGAGTAGTCGGTCTAGCTCTGAACC	880
PSBDPT	CCAGTGACCGGTTTATGGATGAGTGCCATTGGAGTAGTTGGTCTAGCTCTAACT	880
PSBDMP	CCAGTAACGGATTATGGATGAGTGCTATTGGGGTTGAGGTTTATGCTTTAAAT ** ** **.*.*****.*****.***** **.*.*** **.*.***.*.***.*.	880

PSBDZM	TACGTGCCATGACTTCGTTTCCAGGAAATCCGTGCAGCGGAAGATCCTGAATT	935
PSBDOS	TACGTGCCATGACTTCGTTTCCAGGAAATCCGTGCAGCGGAAGATCCTGAATT	935
PSBDNT	TACGTGCCATGACTTCGTTTCTCAGGAAATTCGCGCAGCGGAAGATCCTGAATT	935
PSBDLE	TACGTGCCATGACTTCGTTTCTCAGGAAATTCGCGCAGCGGAAGATCCTGAATT	935
PSBDPT	TACGTGCCATGATTTTGTTCCTCCAGGAGATCCGTGCAGCAGAAGATCCTGAATC	935
PSBDMP	TACGTGCCATGATTTTGTTCCTCCAGGAAATTCGTGCAGCAGAGGATCCAGAATT	935

*****. **. **. *****. **. **. **. *****. *****. *****

PSBDZM	TGAGACTTTCTACACCAAAAATATTCTTTTAAACGAGGGTATTCGTGCGTGGATG	990
PSBDOS	TGAGACTTTCTACACCAAAAATATTCTTTTAAACGAGGGTATTCGTGCGTGGATG	990
PSBDNT	TGAGACTTTCTACACCAAAAATATTCTTTTAAACGAAGGTATTCGCGCTTGGATG	990
PSBDLE	TGAGACTTTCTACACCAAAAATATTCTTTTAAACGAAGGTATTCGCGCTTGGATG	990
PSBDPT	TGAGACTTTCTACACCAAAAATATTCTCTGAACGAAGGTATTCGTGCTTGGATG	990
PSBDMP	TGAAACTTTTTATACCAAAAATATTTTATTAATGAAGGTATTAGAGCTTGGATG	990

. ** ** ** ***** * *. ** ** ***** * ** *****

PSBDZM	GCAGCTCAGGATCAGCCTCATGAAAATCTTATATTCCTGAGGAGGTTCTACCAC	1045
PSBDOS	GCAGCTCAGGATCAGCCTCATGAAAATCTTATATTCCTGAGGAGGTTCTACCAC	1045
PSBDNT	GCGGCTCAAGATCAGCCTCATGAAAACCTTATATTCCTGAGGAGGTTCTACCAC	1045
PSBDLE	GCGGCTCAAGATCAGCCTCATGAAAACCTTATATTCCTGAGGAGGTTCTACCAC	1045
PSBDPT	GCGGCTCAAGATCAGCCTCATGAAAACCTTATATTCCTGAGGAGGTTCTACCCC	1045
PSBDMP	GCAGCTCAAGATCAGCCTCATGAAAATCTTGTATTCCTGAGGAGGTTCTACCCC	1045

. **. ***** ***** ***** ***** ***** *

PSBDZM	GTGGAAACGCTCTT---	1059
PSBDOS	GTGGAAACGCTCTTTAA	1062
PSBDNT	GTGGAAACGCTCTTTAA	1062
PSBDLE	GTGGAAACGCTCTTTAA	1062
PSBDPT	GTGGAAACGCTCTTTAA	1062
PSBDMP	GTGGAAACGCTCTTTAA	1062

*****. *****. ....

---

psbD: Aminoácidos

PSBDZM	MTIAVGRVTKEENDLFLPLIDDWLRRDRFVFGWSGLLLFPCAYFALGGWFTGTTF	55
PSBDOS	MTIALGRVTKEENDLFDIMDDWLRRDRFVFGWSGLLLFPCAYFALGGWFTGTTF	55
PSBDNT	MTIALGKFTKDENDLFDIMDDWLRRDRFVFGWSGLLLFPCAYFAVGGWFTGTTF	55
PSBDLE	MTIALGKFTKDENDLFDIMDDWLRRDRFVFGWSGLLLFPCAYFAVGGWFTGTTF	55
PSBDPT	MTIALGKSKEEKTLDFTVDDWLRRDRFVFGWSGLLLFPCAYFALGGWFTGTTF	55
PSBDMP	MTIALGKSKEPKGLFDSMDDWLRRDRFVFGWSGLLLFPCAYFALGGWFTGTTF	55

. *. *. .... *. *. **. *****. *****

PSBDZM	VTSWYTHGLASSYLEGCNFLTAAVSTPANS LAHSLLLLWGPEAQGDFTRWSQLGG	110
PSBDOS	VTSWYTHGLASSYLEGCNFLTAAVSTPANS LAHSLLLLWGPEAQGDFTRWSQLGG	110
PSBDNT	VTSWYTHGLASSYLEGCNFLTAAVSTPANS LAHSLLLLWGPEAQGDFTRWSQLGG	110
PSBDLE	VTSWYTHGLASSYLEGCNFLTAAVSTPANS LAHSLLLLWGPEAQGDFTRWSQLGG	110
PSBDPT	VTSWYTHGLASSYLEGCNFLTAAVSTPANS LAHSLLLLWGPEAQGDLTRWSQLGG	110
PSBDMP	VTSWYTHGLASSYLEGCNFLTAAVSTPANS LAHSLLLLWGPEAQGDFTRWSQLGG	110

*****. *****. *****. *****. *****. *****

PSBDZM	LWTFVALHGAFAFLIGFMLRQFELARPVQLRPYN AISFSGPIAVFVSVFLIYPLGQ	165
PSBDOS	LWTFVALHGAFAFLIGFMLRQFELARPVQLRPYN AISFSGPIAVFVSVFLIYPLGQ	165
PSBDNT	LWTFVALHGAFLIGFMLRQFELARPVQLRPYN AISFSGPIAVFVSVFLIYPLGQ	165
PSBDLE	LWTFVALHGAFLIGFMLRQFELARPVQLRPYN AISFSGPIAVFVSVFLIYPLGQ	165
PSBDPT	LWTFVALHGAFLIGFMLRQFELARPVQLRPYN AISFSAPIAVFVSVFLIYPLGQ	165
PSBDMP	LWTFVALHGAFLIGFMLRQFELARPVQLRPYN AISFSGPIAVFVSVFLIYPLGQ	165

. **. *****. *****. *****. *****. *****

PSBDZM	SGWFFSPSPFGVA AIFRFILFFQGFHNWTLKPFHMMGVAGVLGAVLLCAIHGATVE	220

TRNEZM	CGACTTCCCCTGGGGGTA	73
TRNEOS	CGACTTCCCCTGGGGGTA	73
TRNENT	CGAATTCCCCTGGGGGTA	73
TRNELE	CGAATTCCCCTGGGGGTA	73
TRNEPT	CAACTTCCCCTGGGGGTA	73
TRNEMP	CGAATTCCCCTGGGGGTA	73

*. *.*****

***trnY* (GUA) : Nucleotídeos**

TRNYZM	GGGTCGATGCCCCGAGCGGTTAATGGGGACGGACTGTAAATTCGTTGACGATATGT	55
TRNYOS	GGGTCGATGCCCCGAGCGGTTAATGGGGACGGACTGTAAATTCGTTGACAATATGT	55
TRNYNT	GGGTCGATGCCCCGAGCGGTTAATGGGGACGGACTGTAAATTCGTTGGCAATATGT	55
TRNYLE	GGGTCGATGCCCCGAGCGGTTAATGGGGACGGACTGTAAATTCGTTGGCAATATGT	55
TRNYPT	GGGTCGATGCCCCGAGTGGTTAATGAGGACGGACTGTAAATCCGTTGGCAATATGC	55
TRNYMP	GGGTCGATGCTCGAGTGGTTAATGGGGACGGACTGTAAATCCGCTGGCAA--TGC	53

*****.****.*****.*****.*****.***.***.***.***.

TRNYZM	CTACGCTGGTTCAAATCCAGCTCGGCCCA	84
TRNYOS	CTACGCTGGTTCAAATCCAGCTCGGCCCA	84
TRNYNT	CTACGCTGGTTCAAATCCAGCTCGGCCCA	84
TRNYLE	CTACGCTGGTTCAAATCCAGCTCGGCCCA	84
TRNYPT	CTACGCTGGTTCAAATCCAGCTCGACCCA	84
TRNYMP	CTACGCTGGTTCAAATCCAGCTCGACCCA	82

*****.*****.****

***trnD* (GUC) : Nucleotídeos**

TRNDZM	GGGATTGTAGTTCAATTGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGGT	55
TRNDOS	GGGATTGTAGTTCAATTGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGGT	55
TRNDNT	GGGATTGTAGTTCAATTGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGGT	55
TRNDLE	GGGATTGTAGTTCAATTGGTCAGAGCACCGCCCTGTCAAGGCGGAAGCTGCGGGT	55
TRNDPT	GGGATTGTAGTTCAATTGGTTAGAGTACCGCCCTGTCAAGACGGAAGTTGCGGGT	55
TRNDMP	GGGATTGTAGTTCAATTGGTTAGAGTACCGCCCTGTCAAGACGGAAGTTGCGGGT	55

*****.*****.****.*****.*****.*****.*****

TRNDZM	TCGAGCCCCGTCAAGTCCCG	74
TRNDOS	TCGAGCCCCGTCAAGTCCCG	74
TRNDNT	TCGAGCCCCGTCAAGTCCCG	74
TRNDLE	TCGAGCCCCGTCAAGTCCCG	74
TRNDPT	TCGAGTCCCGTCAAGTCCCG	74
TRNDMP	TCGAGCCCCGTCAATCCCG	74

*****.*****.*****

***psbM* : Nucleotídeos**

PSBMZM	ATGGAAGTAAATATTCTCGCATTTATTGCTA--CAGCATGTTCATTCTAGTTCC	53
PSBMOS	ATGGAAGTCAATATTCTCGCATTTATTGCTA--CTGCATTGTTCATTCTAGTTCC	53
PSBMNT	ATGGAAGTAAATATTCTTGCATTTATTGCTA--CTGCACTATTTATTCTAGTTCC	53
PSBMLE	ATGGAAGTAAATATTCTTGCATTTATTGCTA--CTGCACTATTTATTCTAGTTCC	
PSBMPT	ATGGAAGTAAATACCTTGCATTTATTGCTGTTCTAC--TGTTCTTTCAGTTCC	53
PSBMMP	ATGGAAGTTAATATTTTAGCATTTATTGCTA--CGGCTTTGTTATTTAATTCC	53

*****.****.***.*****.***.***.***.***.***.***.***.***

PSBMZM	TACTGCCTTTTTACTTATTATTTATGTAAAAACAGCCAGT-CAA-----AAT	99
PSBMOS	TACTGCCTTTTTACTTATTATTTATGTAAAAACAGTCAGC-CAA-----AAT	99
PSBMNT	TACCGCTTTTCTACTTATCATTTACGTAAAAACAGTCAGT-CAA-----AAC	99
PSBMLE	TACCGCTTTTCTACTTATCATTTATGTAAAAACAGTCAGT-CAA-----AAC	99

TRNCZM	AAATCTGGGTGCCGCCT	71
TRNCOS	AAATCTGGGTGCCGCCT	71
TRNCNT	AAATCCGGGTGTCGCCT	72
TRNCLE	AAATCCGGGTGTCGCCT	72
TRNCPT	GAATCCGGGTGTCGCCT	71
TRNCMP	AAATCTGGGTGTCGCTT	71

.****.*****.***.*

---

rpob : Nucleotideos

RPOBZM	ATGCTCCGGAATGAAATGAGGGAATGTCCACAATACCCGGATTTAGTCAGATCC	55
RPOBOS	ATGCTCCGGAATGAAATGAGGGAATGTCCACAATACCCGGATTTAGTCAGATCC	55
RPOBNT	ATGCTCCGGGATGAAATGAGGGAATATCTACAATACCTGGATTTAATCAGATAC	55
RPOBLE	ATGCTCCGGGATGAAATGAGGGAATATCTACAATACCTGGATTTAATCAGATAC	55
RPOBMP	-----ATGGAGATTTTATACTCCCTGAATTTGGTAAAATAC	37
	.....**.*	
RPOBZM	AATTCGAGGGATTTGTAGATTCATTAATCAAGGCTTGGCGGAAGAACTTGAGAA	110
RPOBOS	AATTCGAGGGATTTGTAGATTCATTAATCAAGGCTTGGCGGAAGAACTTGAGAA	110
RPOBNT	AATTTGAAGGATTTGTAGGTTCAATGATCAAGGTTTGACGGAAGAACTTTATAA	110
RPOBLE	AATTTGAAGGATTTGTAGGTTCAATGATCAAGGTTTGACGGAAGAACTTTATAA	110
RPOBMP	AATTTGAAGGATTTAATCGTTTTATAAATCAAGGTTTGAGTGAAGAACTTAGTAA	92
	****.*.*.*****.*	
RPOBZM	GTTTCCCACAATTAAAGATCCAGATCACGAAATTCATTTCAATTATTTGCGAAA	165
RPOBOS	GTTTCCAACAATTAAAGATCCAGATCACGAAATTCATTTCAATTATTTGCGAAA	165
RPOBNT	GTTTCCAAAAATTGAAGATACAGATCAAGAAATGAATTTCAATTATTTGTGGAA	165
RPOBLE	GTTTCCAAAAATTGAAGATACAGATCAAGAAATGAATTTCAATTATTTGTGGAA	165
RPOBMP	TTTTCCAATAATTGAAGATATAGATCAAGAATTCGAGTTTCAATATTTGGTGAA	147
	.*****.* ****.*****.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*	
RPOBZM	GGATATCAATTGCTAGAACCCTCGATAAAAGAAAGGAATGCTGTGTATGAATCAC	220
RPOBOS	GGATATCAATTGCTAGAACCCTCGATAAAAGAAAGGAATGCTGTGTATGAATCAC	220
RPOBNT	ACATATCAATTGGTCGAACCCTTGATAAAGGAAAGAGATGCTGTGTATGAATCAC	220
RPOBLE	ACATATCAATTGGTCGAACCCTTGATAAAGGAAAGAGATGCTGTGTATGAATCAC	220
RPOBMP	CAATATAAATTAGCAGAACCATTATTAAGAAAGAGATGCCGTCTATCAATCTA	202
	.****.*****.*	
RPOBZM	TCACCTATTCTTCCGAATTATATGTATCCGCGAGATTAATTTT-----TGGTTT	269
RPOBOS	TCACCTATTCTTCCGAATTATACGTATCCGCGGATTAATTTT-----TGGTTT	269
RPOBNT	TCACATATTCTTCTGAATTATATGTATCCGCGGGATTAATTTGGAAAAACAGTAG	275
RPOBLE	TCACATATTCTTCTGAATTATATGTATCCGCGGGATTAATTTGGAAAAACAGTAG	275
RPOBMP	TTACCTATTTCATCCGACGTTTACGTACCAGCTCAATTAACACAAAAAAGG	257
	.	
RPOBZM	CGATGTGCAAAAGGAAACCATTTCATTTGGAACATTCCTATAATGAATTCCTTA	324
RPOBOS	CGATGTGCAAAAGCAAAACCATTTCATTTGGAACATTCCTATAATGAATTCCTTA	324
RPOBNT	GGATATGCAAGAACAACAATTTTTATCGGAAACATTCCTCTAATGAATTCCTTG	330
RPOBLE	GGATATGCAAGAACAACAATTTTTATCGGAAACATTCCTCTAATGAATTCCTTG	330
RPOBMP	AAAAATACAAAAACAATAGTTTTTCTTGAAGTATTCCTTTAATGAATTCCTCA	312
	.*	
RPOBZM	GGAACCTTTATAATAAATGGAATATACCGAATTGTGATCAATCAATATTGCTAA	379
RPOBOS	GGAACCTTTATAATAAATGGAATATACCGAATTGTGATCAATCAATATTGCTAA	379
RPOBNT	GGAACCTCTATAGTCAATGGAATATATAGAATTGTGATCAATCAATATTGCTAA	385
RPOBLE	GGAACCTCTATAGTCAATGGAATATATAGAATTGTGATCAATCAATATTGCTAA	385
RPOBMP	GGTACTTTTGTGTTAATGGAGTAGCTCGAGTTATAATTAATCAATTTTACGAA	367
	***.*	

RPOBOS	MLRNGNEGMSTIPGFSQIQFEGFCRFINQGLAELEKFPKIDPDHEISFQLFAK	55
RPOBNT	MLGDGNEGISTIPGFNQIQFEGFCRFIDQGLTEELYKFPKIEDTDQEIEFQLFVE	55
RPOBLE	MLGDGNEGISTIPGFNQIQFEGFCRFIDQGLTEELYKFPKIEDTDQEIEFQLFVE	55
RPOBPT	MRLDENEGAFTIPEFGKIQFEGFCRFIDQGLMEELHNFPKIEDIDKEIEFRLFGN	55
RPOBMP	MEI-----FILPEFGKIQFEGFNRFINQGLSEELSNFPIIEDIDQEIEFQIFGE * . . . . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	49
RPOBZM	GYQLLEPSIKERNAVYESLTYSSSELYVSARLIF--GFDVQKETISIGNIPIMNSL	108
RPOBOS	GYQLLEPSIKERDAVYESLTYSSSELYVSARLIF--GFDVQKQTISIGNIPIMNSL	108
RPOBNT	TYQLVEPLIKERDAVYESLTYSSSELYVSAGLIWKNSRDMQEQTIFIGNIPLMNSL	110
RPOBLE	TYQLVEPLIKERDAVYESLTYSSSELYVSAGLIWKNSRDMQEQTIFIGNIPLMNSL	110
RPOBPT	EYELAEPFIKERDAVYQSLTYSSSELYVPARSIRNSRKIQKQTVFLGNIPLMNSH	110
RPOBMP	QYKLAEPPLKERDAVYQSITYSSDVYVPAQLTQKKKGKIQKQIVFLGSIPLMNSQ * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	104
RPOBZM	GTFIINGIYRIVINQIILLSPGIYRSELDHKGIS-IYTGTTISDWGGRSELAIK	162
RPOBOS	GTFIINGIYRIVINQIILLSPGIYRSELDHKGIS-IYTGTTISDWGGRSELAIK	162
RPOBNT	GTSIVNGIYRIVINQILQSPGIYRSELDHNGIS-VYTGTTISDWGGRSELEIDR	164
RPOBLE	GTSIVNGIYRIVINQILQSPGIYRSELDHNGIS-VYTGTTISDWGGRSELEIDR	164
RPOBPT	GTFVNGIYRVVNQILISPGIYRSELDHNRINYITGTLISDWGGRSKLEIDV	165
RPOBMP	GTFVNGVARVINQILRSPGIYNSSELDHNGIP-IYTGTLISDWGGRLEIDG ** . . . . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	158
RPOBZM	KERIWARVSRKQKISILVLSSAMGSLNREILDNVSYPEIFLSFPNAKEKKRIE--	215
RPOBOS	KERIWARVSRKQKISILVLSSAMGSLNKEILDNVSYPEIFLSFPNAKEKKRIE--	215
RPOBNT	KARIWARVSRKQKISILVLSSAMGLNREILENVCYPEIFLSFLSDKERKKIG--	217
RPOBLE	KARIWARVSRKQKISILVLSSAMGLNREILENVCYPEIFLSFLNDRKKKIG--	217
RPOBPT	GERIWARVSRKQKISIPVLLSAMGLNLEEILDNTRYPERFLFLKKKGRWEREEY	220
RPOBMP	KTRIWARISKRRKVSILVLLLAMGLNLQNLDSVCYPKIFLEFIKKNTK--KEY . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	210
RPOBZM	--SKEKAILEFYQQFACVGGDLVFSESLCEELQKKFFQKCELGRVGRNMNRRL	268
RPOBOS	--SKEKAILEFYQQFACVGGDLVFSESLCEELQKKFFQKCELGRIGRRNMNRRL	268
RPOBNT	--SKENAILEFYQQFACVGGDPVFSESLCKELQKKFFQORCELGRIGRRNMNRRL	270
RPOBLE	--SKENSILEFYQQFACVGGDPVFSESLCKELQKKFFQORCELGRIGRRNMNRRL	270
RPOBPT	LWSREKAILEFYKKLYCISGDLVFSESLCKELQKKFFRKRCELGKIGRRNLNQKL	275
RPOBMP	PNSTEDAIVELYKHYLCIGGDLFFSESIRKELQKKFFQORCELGKIGRLNLNKKL * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	265

rp120: Nucleotides

RPL20ZM	ATGACCAGAGTTCGCGGAGGATATATAGCTCGGAGACGACGAACAAAAATGCGTT	55
RPL20OS	ATGACCAGAGTTCGCGGAGGATATATAGCTCGGAGACGACGGGCAAAAATGCGTT	55
RPL20NT	ATGACCAGAATTAAACGGGGATATATAGCTCGGAGACGTAGAACAAAAATTCGTT	55
RPL20LE	ATGACCAGAATTAAACGGGGATATATAGCTCGGAGACGTAGAACAAAAATTCGTT	55
RPL20PT	ATGACCAGAGTGAACGTGGATATATAGCTCGAAAACGTGGAACAAAAATTCGTT	55
RPL20MP	ATGACTAGAGTTAAACGTGGTTATGTAGCACGAAAACGGCGTAAAAATATTCCTTA ***** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	55
RPL20ZM	CATTTCGCTCAAACTTTAGGGGGGCTCATTTAAGACTTAATCGAGTGATTACTCA	110
RPL20OS	CATTTCGCTCAAACTTTAGAGGGGCTCATTTAAGACTTAATCGAATGATTACTCA	110
RPL20NT	TATTTGCATCAAGCTTTTCGGGGGGCTCATTTCAAGGCTTACTCGAATATTACTCA	110
RPL20LE	TATTTGCATCAAGCTTTTCGaGGGGGCTCATTTCAAGGCTTACTaGAATATTACTCA	110
RPL20PT	CATTTGTATCAGGCTCTCGAGGGGCCATTCGAAACTTTTTTCGAAGTCTAATCA	110
RPL20MP	CGCTTACATCTGGATTTCAAGGAACCTCATTCGAAACTTTTTTAGAAGTCTAATCA . . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	110
RPL20ZM	ACAAGTAAGAAGAGCTTTTGTTCCTCTCATCGAGATAGAGGCAGGCAAAAGAGG	165
RPL20OS	ACAGGTAAGAAGAGCGTTTGTTCCTCTCATCGAGATAGAGTCAGGCAAAAGAGG	165
RPL20NT	ACAGAAAATAAGAGCTTTAGTTTCGGCTCATCGGGATAGGGATAGGAAAAAGAGA	165

CLPPMP	GTATTATGATGTAC-----CTT-----AATGGAGAAGATGA	412
	. . . . . * . . . . . * . . . . . *	
CLPPZM	AAGAACAGGCAAGCCTTTTGGGTTGTATC--C-GAAGACATGGAAAGGGATGTT	531
CLPPOS	AAGAACAGGCAAGCCTTTTGGGTTGTATC--C-GAAGACATGGAAAGGGATGTT	531
CLPPNT	AAGAACGGGAAACCTTATGGGTTGTATC--C-GAAGATATGGAAAGAGATGTT	531
CLPPLE	AAaAACGGGccAACCCgTgTGGGTTaTA-Ca-C-GAAGATATGGAAAGAGATaTT	531
CLPPPT	AAGAACGGACCAACCCGGAGAGGTAAT-TCAAC-GG-GACCTGAACAGAGATGTT	528
CLPPMP	AAGTAAAGATATGTACTTATATATAAATCTCCTGGTGGTGTCTGTTTAGCTGGA	464
	**..*..* . . . . . * . . . . . * * . . . . *	
CLPPZM	TTTATGTCAGCAGACGAAGCCAAAGCTTATGGACTTGTGATATTGTAGGGGATG	586
CLPPOS	TTTATGTCAGCAGACGAAGCCAAAGCTTATGGACTTGTGATATTGTAGGGGATG	586
CLPPNT	TTTATGTCAGCAACAGAAGCCCAAGCTTATGGAATTGTTGATCTTGTAGCGGTTG	586
CLPPLE	TTTATGTCAGCAACAGAAGCCCAAGCTTATGGAATTGTTGATtTTGTAGCGGTTc	586
CLPPPT	TTTATGTCAGCAACAGAAGCCCAAGCTTATGG-----CATTGTTGATGT-----	572
CLPPMP	ATT---TCTGTTTATGATGC-GATGCAATTTGTTGTACC--TGATGTT-CATACA	512
	. **..*..* . . . . . * . . . . . * . . . . . *	
CLPPZM	AAATGATTGACGAGCACTGCGATACTGATC-CAGTGTGGTTTCCAGAAATGTTTA	641
CLPPOS	AAATGCTTGACGAGCACTGCGATACTGATC-CAGTGTGGTTTCCAGAAATGTTTA	641
CLPPNT	AA-----	588
CLPPLE	-----A	587
CLPPPT	-----CGTAGC-----	578
CLPPMP	ATTTGTATGGGATTAGCTGCTTCAATGGGCTCTTTTATTTAACAG-----	558
	. . . .	
CLPPZM	AGGATTGG---	649
CLPPOS	AGGATTGGTAG	652
CLPPNT	-----TGA	591
CLPPLE	AGGA-----	591
CLPPPT	-GGAAGGTTGA	588
CLPPMP	-----G	559
	. . . .	

clpP: Aminoácidos

CLPPZM	MPIGVPKVPYRIPGDEEATWVDLYNVMYRERTLFLGQEIRCEITNHITGLMVYLS	55
CLPPOS	MPIGVPKVPYRIPGDEEATWVDLYNVMYRERTLFLGQEIRCEVTNHITGLMVYLS	55
CLPPNT	MPIGVPKVPFRSPGEEDASWVDVYNRLYRERLLFLGQEVDSISNQLIGLMVYLS	55
CLPPLE	MPIGVPRVVFRRPGDPISSWVDIYNRLYRERLLFLGQIGTELISNQLIGLMVYLS	55
CLPPPT	MPVGVKVPFRRAPGEDATWVDLYNRLYRERLLFLAQDINHEIANQLMGLMVYLS	55
CLPPMP	MPIGVPKVPFRLPGEEDAVWIDVYNRLYRERLLFLGQQVDDEIANQLIGIMMYLN	55
	**..*..* . . . . . * . . . . . * * . . . . *	
CLPPZM	IEDGNSDIFLFINSLGWLISGMAIFDTMQTVTPDIYITICLGIAASMASFILLGG	110
CLPPOS	IEDGSSDIFLFINSPPGWLISGMAIFDTMQTVTPNIYITICLGIAASMPFILLGG	110
CLPPNT	IEDETKDLYLFINSPPGWWIPGVAIYDTMQFVRPDVHTICMGLAASMGSFILVGG	110
CLPPLE	MEDEKNDLYLFVNSPPGWWIPGIAIYDTMQFVRPDIIHTICLGIAASMGSFILAGG	110
CLPPPT	AEDSNKDIFSFINCPGGSVIPGVGLFDMMQAIVPDVHTICMGVAASMGSFILIGG	110
CLPPMP	GEDESKDLYLINSPPGAVLAGISVYDAMQFVVPDVHTICMGLAASMGSFILTGG	110
	** . * . . . . * . . . . . * . . . . . * * . . . . *	
CLPPZM	FWVVSIEDMERDVFMSADEAKAYGLVDIVGDEMIDEHCDTDPVWFPEMFKDW	216
CLPPOS	FWVVSIEDMERDVFMSADEAKAYGLVDIVGDEMLDEHCDTDPVWFPEMFKDW	216
CLPPNT	LWVVSIEDMERDVFMSATEAQAYGIVDLVA---VE-----	196
CLPPLE	VWVIHEDMERDIFMSATEAQAYGIVDFVA---V-----QG-----	197

CLPPPT	GEVIQRDLNRDVFMSEAEQAYGIVDVVA-----EG-----	196
CLPPMP	LWVISEDMERDVFMSEAEKLYGIVDLVA---IENNSTIKN-----	203
	.*. *.**.* **.*.* *....	
psbB: Nucleotídeos		
PSBBZM	ATGGGTTTGCCTTGGTATCGTGTTCACTGTCGTATTGAATGATCCGGGTCGAT	55
PSBBOS	ATGGGTTTGCCTTGGTATCGTGTTCACTGTCGTATTGAATGATCCGGGTCGAT	55
PSBBNT	ATGGGTTTGCCTTGGTATCGTGTTCACTGTCGTATTGAATGATCCGGGTCGAT	55
PSBBLE	ATGGGTTTGCCTTGGTATCGTGTTCACTGTCGTATTGAATGATCCGGGTCGAT	55
PSBBPT	ATGGGTTTGCCTTGGTATCGTGTTCACTGTCGTATTGAATGATCCGGGTCGAT	55
PSBBMP	ATGGGTTTGCCTTGGTATCGTGTTCACTGTCGTATTGAATGATCCGGGTCGAT	55
	*****.*****.***** **.*.*.***** **.*.*	
PSBBZM	TGCTTTTCGGTGCATATAATGCACACAGCTCTAGTTTCTGGTTGGGCTGGTTCGAT	110
PSBBOS	TGCTTTTCGGTGCATATAATGCACACAGCTCTAGTTTCTGGTTGGGCTGGTTCGAT	110
PSBBNT	TGCTTTTCGGTGCATATAATGCACACAGCTCTAGTTTCTGGTTGGGCTGGTTCGAT	110
PSBBLE	TGCTTTTCGGTGCATATAATGCACACAGCTCTAGTTTCTGGTTGGGCTGGTTCGAT	110
PSBBPT	TAATTTCTGTACATATAATGCACACAGCTCTAGTTTCTGGTTGGGCTGGTTCGAT	110
PSBBMP	TAATCGCTGTTTCAATTAATGCACACAGCTCTAGTTTCTGGTTGGGCTGGTTCGAT	110
	..*.* **.*.*****.*.*.*.*.*.***** **.*.*	
PSBBZM	GGCTTTTATACGAATTAGCGGTTTTTGTATCCCTCTGATCCTGTTCTGGATCCAATG	165
PSBBOS	GGCTTTTATACGAATTAGCGGTTTTTGTATCCCTCTGATCCTGTTCTGGATCCAATG	165
PSBBNT	GGCTCTGTATGAATTAGCGGTTTTTGTATCCCTCTGATCCTGTTCTGGATCCAATG	165
PSBBLE	GGCTCTGTATGAATTAGCGGTTTTTGTATCCCTCTGATCCTGTTCTGGATCCAATG	165
PSBBPT	GACTCTGTACGAATTAGCAGTTTTTGTATCCATCCGATCCTGTTCTGGATCCAATG	165
PSBBMP	GGCTTTTATATGAATTAGCTGTTTTTGTATCCCTCTGATCAGTTCTTGTATCCAATG	165
	..*.*.*.*****.***** **.*.*.*****.*****.*****	
PSBBZM	TGGAGACAAGGTATGTTTCGTATCCCTTCATGACTCGTTTAGGAATAACGAATT	220
PSBBOS	TGGAGACAAGGTATGTTTCGTATCCCTTCATGACTCGTTTAGGAATAACGAATT	220
PSBBNT	TGGAGACAAGGTATGTTTCGTATACCTTCATGACTCGTTTAGGAATAACGAATT	220
PSBBLE	TGGAGACAAGGTATGTTTCGTATACCTTCATGACTCGTTTAGGAATAACGAATT	220
PSBBPT	TGGAGACAAGGTATGTTTCGTATACCTTCATGACTCGTTTAGGAATAACGAATT	220
PSBBMP	TGGAGACAAGGCATGTTTGTATACCTTCATGACTCGTTTAGGAATAACGAATT	220
	*****.*.*.*****.*.*.*.*.*.*****.*****.*.*.*	
PSBBZM	CGTGGGGTGGTTGGAGTATTTAGGAGGAAGTGAACGAATCCGGGTATTTGGAG	275
PSBBOS	CGTGGGGTGGTTGGAGTATTTAGGAGGAAGTGAACGAATCCGGGTATTTGGAG	275
PSBBNT	CATGGGGCGGTTGGAGTATCACAGGGGGGACTGTAACGAATCCGGGTATTTGGAG	275
PSBBLE	CATGGGGCGGTTGGAGTATCACAGGGGGGACTGTAACGAATCCAGGTATTTGGAG	275
PSBBPT	CATGGAGTGGATGGAACATCACCAGAGAACTGTAATTAATCCCGGTATTTGGAG	275
PSBBMP	CCTGGGGGGGTTGGAGTATTACAGGAGAACTGTTACTAACCGAGGTATCTGGAG	275
	* **.*.* **.*	
PSBBZM	TTATGAAGGTGTGGCAGGTGCGCATATTGTGTTTTCTGGCTTGTGTTTCTTGGCA	330
PSBBOS	TTATGAAGGTGTGGCAGGTGCGCATATTGTGTTTTCTGGCTTGTGTTTCTTGGCA	330
PSBBNT	TTACGAAGGTGTAGCTGGAGCACATATTGTGTTTTCTGGCTTATGCTTTTTTGGCA	330
PSBBLE	TTACGAAGGTGTAGCTGGAGCACATATTGTGTTTTCTGGCTTATGCTTTTTTGGCA	330
PSBBPT	TTATGAAGGTGTGGCAGGTGCGCATATTGTGTTTTCTGGCTTGTGTTTCTTGGCA	330
PSBBMP	TTATGAAGGTGTAGCTGGAGCACATATTGTGTTTTCTGGCTTGTGTTTCTTGGCA	330
	.** **.*.* *.*.*****.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*	
PSBBZM	GCTATCTGGCATTGGGTATATTGGGACCTAGAAATATTCTGTGATGAGCGGACGG	385
PSBBOS	GCTATCTGGCATTGGGTATATTGGGACCTAGAAATATTCTGTGATGAGCGGACGG	385
PSBBNT	GCTATCTGGCATTGGGTATATTGGGACCTAGAAATATTCTGTGATGAGCGGACGG	385
PSBBLE	GCTATCTGGCATTGGGTATATTGGGACCTAGAAATATTCTGTGATGAGCGGACGG	385

PSBBZM	GTATGGATCAGCAACTACCCCAATCGAATTATTTGGGCCTACTCGTTATCAGTGG	825
PSBBOS	GTATGGGT CAGCAACTACCCCAATTGAATTGTTTGGGCCTACTCGTTATCAGTGG	825
PSBBNT	GTATGGTTCGGCAACAACCCCGATTGAATTATTTGGGCCCACTCGTTACCAATGG	825
PSBBLE	GTATGGTTCGGCAACTACCCCGATTGAATTATTTGGGCCCACTCGTTATCAATGG	825
PSBBPT	GTATGGTCCGCAACTACTCCGGTCGAATTATTCGGTCCCACTCGTTACCAGTGG	825
PSBBMP	GTACGGTTCG CAGCAACTCCAATTGAATTATTTGGTCCTACTCGTTACCAATGG ***. ** ** *****. *. *. *. *****. *. *. *. *****. *****	825
PSBBZM	GATCAGGGATAC TTTTCAGCAAGAAATATATCGAAGAGTTAGCGATGGGTAGCCG	880
PSBBOS	GATCAGGGATAC TTTTCAGCAAGAAATATATCGAAGAGTTAGTGATGGGTAGCCG	880
PSBBNT	GATCAGGGGTACTTCCAGCAAGAAATATATCGAAGAGTTAGTGCTGGGCTAGCAG	880
PSBBLE	GATCAGGGGTACTTCCAGCAAGAAATATATCGAAGAGTTAGTGCTGGGCTAGCAG	880
PSBBPT	GATCAGGGATACTTCCAACAGAAATAGATCGACGGGTTCGTGCCGGTCTGGCCG	880
PSBBMP	GATCAAGGATTTTTCAGCAAGAAATAGATCGAAGAATTCGCTCTAGTAAAGCAG *****. *. *. *. *****. *****. *. *. *. .... *. *. *. *	880
PSBBZM	AAAATCTTAGTTTATCAGAAGCTTGGTCTAAAATTCCTGAAAAATTAGCCTTTTA	935
PSBBOS	AAAATCTCAGTTTATCAGAAGCTTGGTCTAAAATTCCTGAAAAATTAGCCTTTTA	935
PSBBNT	AAAATCAAAGTTTATCAGAAGCCTGGTCTAAAATTCCTGAAAAATTAGCCTTTTA	935
PSBBLE	AAAATCAAAGTTTATCAGAAGCCTGGTCTAAAATTCCTGAAAAATTAGCCTTTTA	935
PSBBPT	AAAATTTAAGCCTATCAGAAGCTTGGTCCAAAATTCCTGAGAACTCGCTTTTAA	935
PSBBMP	AAAATTTAAGTTTATCAGAAGCTTGGTCTAAAATTCCTGAAAAATTAGCCTTTTA *****. *. *. *. *****. *****. *. *. *. *****	935
PSBBZM	TGATTATATTGGTAATAATCCGGCAAAGGGGGATTATTTCAGAGCAGGCTCAATG	990
PSBBOS	TGATTATATTGGTAATAATCCGGCAAAGGGGGATTATTTCAGAGCAGGCTCAATG	990
PSBBNT	TGATTACATCGGCAATAATCCGGCAAAGGGGGATTATTTCAGAGCAGGCTCAATG	990
PSBBLE	TGATTACATCGGCAATAATCCGGCAAAGGAGGATTATTTCAGAGCAGGCTCAATG	990
PSBBPT	TGATTACATTGGTAATAATCCAGCTAAGGGGGGCTTATTTCAGAGCAGGTGCAATG	990
PSBBMP	TGATTATATTGGTAATAATCCTGCTAAAGGAGGATTATTTCAGAGCTGGAGCGATG *****. *. *. *. *****. *****. *****. *****. *****. *****. *****	990
PSBBZM	GACAATGGGGATGGCATAGCTGTTGGATGGTTAGGACATCCCGTCTTTAGAGATA	1045
PSBBOS	GACAATGGGGATGGAATAGCTGTTGGATGGTTAGGACATCCTATCTTTAGAGATA	1045
PSBBNT	GATAACGGGGATGGAATAGCGGTTGGATGGTTAGGACACCTATCTTTAGAGATA	1045
PSBBLE	GATAACGGGGATGGAATAGCGGTTGGATGGTTAGGACACCTATCTTTAGAGATA	1045
PSBBPT	GACAATGGAGATGGAATAGCTGTTGGTTGGTTAGGACACCTATCTTCAAAGATA	1045
PSBBMP	GATAATGGAGATGGTATAGCAGTTGGTTGGTTAGGCCATGCAGTTTTTAAAGATA **..**..**..***** ***** *****. *****. *****. *****	1045
PSBBZM	AAGAAGGACGCGAGCTTTTTGTACGTCGTATGCCTACTTTTTTTGAAACATTTC	1100
PSBBOS	AAGAAGGGCGCGAACTTTTTGTACGCCGTATGCCTACTTTTTTTGAAACATTTC	1100
PSBBNT	AAGAAGGCCGTGAAC TTTTTGTACGTCGTATGCCTACTTTTTTTGAAACATTTC	1100
PSBBLE	AGGAAGGGCGTGAAC TTTTTGTACGTCGTATGCCTACTTTTTTTGAAACATTTC	1100
PSBBPT	AGGAGGGAAATGAGCTTTTTGTACGTCGTATGCCTACTTTTTTCGAAACATTTC	1100
PSBBMP	AAGAAGGAAATGAGCTTTTCGTTTCGTGTCGTATGCCTACTTTTTTTGAAACATTTC *. *. *. *. *. *. *. *****. *. *. *. *****. *****. *****	1100
PSBBZM	GGTCGTTTTGGTAGATGAAGAGGGAATTGTGAGAGCGGACGTTTCCTTTTAGAAGA	1155
PSBBOS	GGTTGTTTTGGTAGATGAAGAGGGAATTGTGAGAGCGGACGTTTCCTTTTAGAAGA	1155
PSBBNT	GGTCGTTTTGGTAGATGGCGATGGAATTGTGAGAGCCGATGTTTCCTTTTAGAAGG	1155
PSBBLE	GGTCGTTTTGGTAGAGCGGCGATGGGATTGTGAGAGCCGATGTTTCCTTTTAGAAGG	1155
PSBBPT	AGTAGTCTGGTGGACAAAGAAGGAATTGTGAAAGCCGATGTTTCCTTTTAGGAGG	1155
PSBBMP	AGTTGTTTTGGTAGATGAACAAGGAATTGTGAGAGCTGATGTTCCATTTAGAAGA *. ** *. *. *. *. *. *****. *. *. *. *****. *****. *****	1155
PSBBZM	GCAGAATCCAAATATAGTGTGAACAAGTAGGCGTAACGGTGGAGTTCTATGGTG	1210
PSBBOS	GCAGAATCCAAATATAGTGTGAACAAGTAGGCGTAACGGTGGAGTTCTATGGTG	1210
PSBBNT	GCAGAATCGAAGTATAGTGTGAACAAGTAGGTGTAAGTGTGAGTTCTACGGCG	1210
PSBBLE	GCAGAATCGAAGTATAGTGTGAACAAGTAGGTGTAAGTGTGAGTTCTACGGCG	1210

PSBBPT	GCAGAATCAAAGTATAGTGTGAACAAGTAGGTGTAACGTGTTGAGTTCTATGGTG	1210
PSBBMP	GCAGAATCGAAGTATAGTGTGAACAAGTAGGTGTAACGTGTTGAATTTTATGGTG ***** ** .*****.*****.*****.***.***.***.***.***	1210
PSBBZM	GCGAACTTAATGGAGTAAGTTATTCTGATCCTGCTACTGTAAAAAATATGCGCG	1265
PSBBOS	GCGAACTTAATGGAGTAAGTTATTCTGATCCTGCTACTGTAAAAAATATGCGAG	1265
PSBBNT	GTGAACCAACGGCGTCAGTTATAGTGATCCTGCTACTGTGAAAAAATATGCTAG	1265
PSBBLE	GTGAACCAACGGCGTCAGTTATAGTGATCCTGCTACTGTGAAAAAATATGCTcG	1265
PSBBPT	GTGGACTTGACAGGGTCAGTTTGGTGATCCTGCTATAGTTAAAAAATACGCTAG	1265
PSBBMP	GTGAACTTGATGGGGTTAGTTTGTAGTGACCCTGCAACAGTCAAAAAAATATGCTAG *.*.***.*.* ** *****.***.*****.*.* *****.***.*	1265
PSBBZM	GCGTGCTCAATTAGGGGAAATTTTGAATTAGATCGAGCTACTTTGAAATCAGAT	1320
PSBBOS	GCGTTCCCAATTAGGGGAAATTTTGAATTAGATCGGGCTACTTTGAAATCAGAT	1320
PSBBNT	ACGTGCTCAATTGGGTGAAATTTTGAATTAGATCGTGCTACTTTGAAATCCGAT	1320
PSBBLE	ACGaGCTCAATTGGGTGAAATTTTcGAATTAGATCGTGCTACTTTGAAATCCGAT	1320
PSBBPT	ACGTGCTCAATTAGGTGAAATTTTGAATTAGATCGTGCTACTCTAAAATCTGAT	1320
PSBBMP	ACGCGCTCAATTAGGTGAAATTTTGAATTGATCGTGCTACTTTAAAATCGGAT .*.*.***.*.* *****.***.*****.*****.***** *****.*.***** **	1320
PSBBZM	GGTGTTTTTCGCAGCAGTCCAAGGGGTTGGTTCACCTTTGGTCATGCTACCTTTG	1375
PSBBOS	GGTGTTTTTCGCAGCAGTCCAAGGGGTTGGTTCACCTTTGGTCATGCTACCTTTG	1375
PSBBNT	GGTGTTTTTCGTAGCAGTCCAAGGGGTTGGTTACTTTTGGGCATGCTTCGTTTG	1375
PSBBLE	GGTGTTTTTCGTAGCAGTCCAAGGGGTTGGTTACTTTTGGGCATGCTTCGTTTG	1375
PSBBPT	GGTGTTTTTCGTAGTAGTCCAAGGGGTTGGTTACTTTTGGACATGCTACATTTG	1375
PSBBMP	GGTGTTTTTCGAAGTAGTCCAAGGGGTTGGTTACTTTTGGTCATGCTACATTTG ***** ** .*****.*****.*****.***** *****.* **	1375
PSBBZM	CTTTGCTCTTCTTTTTCGGACACATTTGGCATGGCGCTCGAACCTTGTTCCGAGA	1430
PSBBOS	CTTTGCTCTTCTTTTTCGGACACATTTGGCATGGGGCTAGAACCTTGTTCCGAGA	1430
PSBBNT	CTTTGCTCTTCTTCTTTCGGACACATTTGGCATGGTGCTAGAACCTTGTTCCGAGA	1430
PSBBLE	CTTTGCTCTTCTTCTTTCGGACACATTTGGCATGGTGCTAGAACCTTGTTCCGAGA	1430
PSBBPT	CTCTCCTTTTCTTTTCTGGACACATTTGGCATGGTGCTAGGACCTTATTCAGAGA	1430
PSBBMP	CTCTTCTTTTCTTTTCTTGGTCATATTTGGCATGGTGCTAGAACATTTGTTTAGAGA **.* **.*.*.*.*.***.***.***** *****.*.*.***.*.***	1430
PSBBZM	TGTTTTTGCTGGTATTGATCCAGACTTGGATGCTCAAGTGGAATTTGGAACATTC	1485
PSBBOS	TGTTTTTGCTGGTATTGATCCAGACTTAGATGCTCAAGTGGAATTTGGAGCAATC	1485
PSBBNT	TGTTTTTGCTGGTATTGACCCAGATTTAGATGCTCAAGTCGAATTTGGAGCATTC	1485
PSBBLE	TGTTTTTGCTGGTATTGACCCAGATTTAGATGCTCAAGTCGAATTTGGAGCATTC	1485
PSBBPT	TGTTTTTGCTGGTATCGACTCGGATCTGGATGATCGAATAGAATTTGGAGCATTC	1485
PSBBMP	TGTTTTTGCAAGGAATTGATCCTGATTTAGATGCTCAAGTGGAATTTGGAGCGTTT *****.*.*.***.*.* **.*.***.*.*.*** *****.***.*	1485
PSBBZM	CAAAAAGTTGGAGATCCAACCTACAAGGAGACAGGCAGCC---	1524
PSBBOS	CAAAAACGTGGAGATCCAACCTACAGGGAGACAGCCAGTCTGA	1527
PSBBNT	CAAAAACCTGGAGATCCAACCTACAAAAAGACAGGCAGCCTGA	1527
PSBBLE	CAAAAACCTGGAGATCCAACCTACAAAAAGACAGGCAGCCTGA	1527
PSBBPT	CAAAAACCTGGGAGATCCAACCTACTAAAAGACAAGTGGTATGA	1527
PSBBMP	CAGAAATTAGGAGATCCAACAACAAAAAGACAAGTAATATAA **.* **.*.*****.*.*.*.*****.*.....*	1527

---

psbB: Aminoácidos

PSBBZM	MGLPWYRVHTVVLNDPGRLLSVHIMHTALVSGWAGSMALYELAVFDPSPDVLDP	55
PSBBOS	MGLPWYRVHTVVLNDPGRLLSVHIMHTALVSGWAGSMALYELAVFDPSPDVLDP	55
PSBBNT	MGLPWYRVHTVVLNDPGRLLSVHIMHTALVAGWAGSMALYELAVFDPSPDVLDP	55
PSBBLE	MGLPWYRVHTVVLNDPGRLLSVHIMHTALVAGWAGSMALYELAVFDPSPDVLDP	55

PSBBPT	MGLPWYRVHTVVLNDPGR LISVHIMHTALVAGWAGSMTLYELAVFDPSPVLDPM	55
PSBBMP	MGLPWYRVHTVVLNDPGR LIAVHLMHTALVSGWAGSMALYELAVFDPSPVLDPM *****. **.*****.*****.*****.*****.*****.*****	55
PSBBZM	WRQGMFVIPFMTRLGITNSWGGWSISGGTVTNPGIWSYEGVAGAHIVFSGLCFLA	110
PSBBOS	WRQGMFVIPFMTRLGITNSWGGWSISGGTVTNPGIWSYEGVAGAHIVFSGLCFLA	110
PSBBNT	WRQGMFVIPFMTRLGITNSWGGWSITGGTVTNPGIWSYEGVAGAHIVFSGLCFLA	110
PSBBLE	WRQGMFVIPFMTRLGITNSWGGWSITGGTVTNPGIWSYEGVAGAHIVFSGLCFLA	110
PSBBPT	WRQGMFVIPFMTRLGITNSWGGWSITGGTVTNPGIWSYEGVAGAHIVFSGLCFLA	110
PSBBMP	WRQGMFVIPFMTRLGITNSWGGWSITGGTVTNPGIWSYEGVAGAHIVFSGLCFLA *****. **.***.***.***.***.*****.***.***.***	110
PSBBZM	AIWHWVYWDLEIFCDERTGKPSLDLPKIFGIHLFLAGVACFGFGAFHVTGLYGP	165
PSBBOS	AIWHWVYWDLEIFCDERTGKPSLDLPKIFGIHLFLAGVACFGFGAFHVTGLYGP	165
PSBBNT	AIWHWVYWDLEIFCDERTGKPSLDLPKIFGIHLFLAGVACFGFGAFHVTGLYGP	165
PSBBLE	AIWHWVYWDLEIFCDERTGKPSLDLPKIFGIHLFLAGVACFGFGAFHVTGLYGP	165
PSBBPT	AIWHWVYWDLEIFCDERTGKPSLDLPKIFGIHLFLAGVACFGFGAFHVTGLYGP	165
PSBBMP	AIWHWVYWDLEIFCDERTGKPSLDLPKIFGIHLFLAGVACFGFGAFHVTGLYGP *****. **.*****.*****.*****.*****.*****.*****	165
PSBBZM	IWVSDPYGLTGKVPVNPVAPWAGAEFGDFVPVGGIASHHIAAGILGILAGLFHLSVR	220
PSBBOS	IWVSDPYGLTGKVPVNPVAPWAGAEFGDFVPVGGIASHHIAAGILGILAGLFHLSVR	220
PSBBNT	IWVSDPYGLTGKVPVNPVAPWAGAEFGDFVPVGGIASHHIAAGILGILAGLFHLSVR	220
PSBBLE	IWVSDPYGLTGKVPVNPVAPWAGAEFGDFVPVGGIASHHIAAGILGILAGLFHLSVR	220
PSBBPT	IWVSDPYGLTGKVPVNPVAPWAGAEFGDFVPVGGIASHHIAAGILGILAGLFHLSVR	220
PSBBMP	IWVSDPYGLTGKVPVNPVAPWAGAEFGDFVPVGGIASHHIAAGILGILAGLFHLSVR **.*.*****.***.***.*****.*****.*****.*****.*****	220
PSBBZM	PPQRLYKGLRMGNIETVLSSSIAAVFFAAFFVAGTMWYGSATTP IELFGPTRYQW	275
PSBBOS	PPQRLYKGLRMGNIETVLSSSIAAVFFAAFFVAGTMWYGSATTP IELFGPTRYQW	275
PSBBNT	PPQRLYKGLRMGNIETVLSSSIAAVFFAAFFVAGTMWYGSATTP IELFGPTRYQW	275
PSBBLE	PPQRLYKGLRMGNIETVLSSSIAAVFFAAFFVAGTMWYGSATTP IELFGPTRYQW	275
PSBBPT	PPQRLYKGLRMGNIETVLSSSIAAVFFAAFFVAGTMWYGSATTP IELFGPTRYQW	275
PSBBMP	PPQRLYKGLRMGNIETVLSSSIAAVFFAAFFVAGTMWYGSATTP IELFGPTRYQW *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	275
PSBBZM	DQGYFQOEIYRRVSDGLAENLSLSEAWSKIPEKLA FYDYIGNNPAKGGLFRAGSM	330
PSBBOS	DQGYFQOEIYRRVSDGLAENLSLSEAWSKIPEKLA FYDYIGNNPAKGGLFRAGSM	330
PSBBNT	DQGYFQOEIYRRVSDGLAENLSLSEAWSKIPEKLA FYDYIGNNPAKGGLFRAGSM	330
PSBBLE	DQGYFQOEIYRRVSDGLAENLSLSEAWSKIPEKLA FYDYIGNNPAKGGLFRAGSM	330
PSBBPT	DQGYFQOEIYRRVSDGLAENLSLSEAWSKIPEKLA FYDYIGNNPAKGGLFRAGSM	330
PSBBMP	DQGYFQOEIYRRVSDGLAENLSLSEAWSKIPEKLA FYDYIGNNPAKGGLFRAGSM ***.*****.***.***.*****.*****.*****.*****.*****	330
PSBBZM	DNGDGIAGWLGHPVFRDKEGRELFVRRMPTFFETFPVVLVDEEGIVRADVPFRR	385
PSBBOS	DNGDGIAGWLGHPVFRDKEGRELFVRRMPTFFETFPVVLVDEEGIVRADVPFRR	385
PSBBNT	DNGDGIAGWLGHPVFRDKEGRELFVRRMPTFFETFPVVLVDEEGIVRADVPFRR	385
PSBBLE	DNGDGIAGWLGHPVFRDKEGRELFVRRMPTFFETFPVVLVDEEGIVRADVPFRR	385
PSBBPT	DNGDGIAGWLGHPVFRDKEGRELFVRRMPTFFETFPVVLVDEEGIVRADVPFRR	385
PSBBMP	DNGDGIAGWLGHPVFRDKEGRELFVRRMPTFFETFPVVLVDEEGIVRADVPFRR *****.***.***.*****.*****.*****.*****.*****	385
PSBBZM	AESKYSVEQVGTVEFYGGELNGVSYS DPATVKKYARRAQLGEI FELDRATLKSD	440
PSBBOS	AESKYSVEQVGTVEFYGGELNGVSYS DPATVKKYARRAQLGEI FELDRATLKSD	440
PSBBNT	AESKYSVEQVGTVEFYGGELNGVSYS DPATVKKYARRAQLGEI FELDRATLKSD	440
PSBBLE	AESKYSVEQVGTVEFYGGELNGVSYS DPATVKKYARRAQLGEI FELDRATLKSD	440
PSBBPT	AESKYSVEQVGTVEFYGGELNGVSYS DPATVKKYARRAQLGEI FELDRATLKSD	440
PSBBMP	AESKYSVEQVGTVEFYGGELNGVSYS DPATVKKYARRAQLGEI FELDRATLKSD *****.***.***.*****.*****.*****.*****.*****	440

PSBBZM	GVRSSPRGWFTFGHATFALLFFFGHIWHGARTLFRDVFAGIDPDLDQVEFGTF	495
PSBBOS	GVRSSPRGWFTFGHATFALLFFFGHIWHGARTLFRDVFAGIDPDLDQVEFGAI	495
PSBBNT	GVRSSPRGWFTFGHATFALLFFFGHIWHGARTLFRDVFAGIDPDLDQVEFGAF	495
PSBBLE	GVRSSPRGWFTFGHATFALLFFFGHIWHGARTLFRDVFAGIDPDLDQVEFGAF	495
PSBBPT	GVRSSPRGWFTFGHATFALLFFSGHIWHGARTLFRDVFAGIDSDLDRIEFGAF	495
PSBBMP	GVRSSPRGWFTFGHATFALLFFFGHIWHGARTLFRDVFAGIDPDLDQVEFGAF	495
	*****.*****.*****.*****.***...***..	
PSBBZM	QKVGDPPTTRQAA	508
PSBBOS	QKRGDPTTGRQPV	508
PSBBNT	QKLGDPPTTKRQAA	508
PSBBLE	QKLGDPPTTKRQAA	508
PSBBPT	QKLGDPPTTKRQVV	508
PSBBMP	QKLGDPPTTKRQVI	508
	** ***** **	

---

psbT: Nucleótidos

PSBTZM	ATGGAAGCATTTGGTTTATACGTTCCCTTTTAGTTTCGACTTTAGGGATAATTTTTT	55
PSBTOS	ATGGAAGCATTTGGTTTATACGTTCCCTTTTAGTTTCGACTTTAGGGATAATTTTTT	55
PSBTNT	ATGGAAGCATTTGGTTTATACATTCCTCTTAGTCTCGACTCTAGGGATAATTTTTT	55
PSBTLE	ATGGAAGCATTTGGTTTATACATTCCTCTTAGTCTCGACTCTAGGGATAATTTTTT	55
PSBTPT	ATGGAAGCATTTGGTTTATACATTCCTGTTGGTATCGACCCTAGGGATAATCTTTT	55
PSBTMP	ATGGAAGCATTTAGTTTATACATTTTGTGGTAGGTACTTTAGGAATCATTTTTT	55
	*****.*****.***.* **.* ..**..****.***.***.*	
PSBTZM	TCGCTATCTTCTTCCGAGAACCACCTAAGGTTCCGACTAAGAAA-----	99
PSBTOS	TCGCTATCTTCTTCCGAGAACCACCTAAGGTTCCGACTAAAAAGTGAATAA	108
PSBTNT	TCGCTATCTTTTTTCGAGAACCGCCTAAAGTTCCAATAA---GAATAA	104
PSBTLE	TCGCTATCTTTTTTCGAGAACCGCCTAcAaTTcGAATAA---GAATAA	104
PSBTPT	TCGCTATTTTTCTTCCGAGAACCACCAAACTTCCGACTAAAGGGGAAATAA	108
PSBTMP	TTGCTATTTTTTTTAGAGAACCACCTAAAGTACCAAGTAAAGCAAAAAATAA	108
	*.*****.*****.*****.***.*..*.*.*.***... ..	

---

psbT: Aminoácidos

PSBTZM	MEALVYTFLLVSTLGIIFFAIFFREPPKVPTKKVK	35
PSBTOS	MEALVYTFLLVSTLGIIFFAIFFREPPKVPTKKVK	35
PSBTNT	MEALVYTFLLVSTLGIIFFAIFFREPPKVPTKKN-	34
PSBTLE	MEALVYTFLLVSTLGIIFFAIFFREPPITRTKKN-	34
PSBTPT	MEALVYTFLLVSTLGIIFFAIFFREPPKLPTKGGK	35
PSBTMP	MEALVYTFLLVSTLGIIFFAIFFREPPKVPSKGGK	35
	*****.*****.*****.***.*..*.*.*.***... ..	

---

psbN: Nucleótidos

PSBNZM	ATGGAAACAGCAACTTTAGTCGCCATCTCCATATCTGGTTTACTTGTAAGCTTTA	55
PSBNOS	ATGGAAACAGCAACTTTAGTCGCCATCTCCATATCTGGTTTACTTGTAAGCTTTA	55
PSBNNT	ATGGAAACAGCAACCCTAGTCGCCATCTTATATCTGGTTTACTTGTAAGCTTTA	55
PSBNLE	ATGGAAACAGCAACCCTAGTCGCCATCTTATATCTGGTTTACTTGTAAGCTTTA	55
PSBNPT	ATGGAAACTGCAACCTTAGTCACCATCTCCATATCTGTTTACTTGTAAGCTTTA	55
ORF2 7MP	ATG-----TTCTTCAAATGGATC-----TCTAAGTT-----CATTA	31
	.....*.* ..*..*..... ....***.....***	
PSBNZM	CTGGGTATGCCTTATATACCGCGTTTGGGCAACCCTCTCAACAATTAAGAGATCC	110
PSBNOS	CTGGGTATGCCTTATATACCGCGTTTGGGCAACCCTCTCAACAATTAAGAGATCC	110
PSBNNT	CTGGGTACGCCTTATATACCGCGTTTGGGCAACCCTCTCAACAATAAGAGATCC	110
PSBNLE	CTGGGTACGCCTTATATACCGCGTTTGGGCAACCCTCTCAACAATAAGAGATCC	110
PSBNPT	CTGGTTATGCCTTATACACCGCGTTTGGGCAACCCTCTAACAACCTAGGGATCC	110

ORF27MP	GAAGGTTGTCCAAAT-----GCGGTATAAAGAGCAT-----AACC	66
	...*.*. ** **. ** . ** . * . . . . * . * * . . . . * . **	
PSBNZM	ATTCGAAGAACATGGGGAC---	129
PSBNOS	ATTCGAAGAACACGGGGACTAA	132
PSBNNT	ATTCGAGGAACATGGGACTAG	132
PSBNLE	ATTCGAGGAACATGGGACTAG	132
PSBNPT	TTTGAGGATCACGAGGACTAA	132
ORF27MP	A---GTAAAGCTTATAAG-TAA	84
	... * . . . * *	

psbN: Aminoácidos

PSBNZM	METATLVAISISGLLVSTGYALYTAFGQPSQQLRDPFEEHGD	43
PSBNOS	METATLVAISISGLLVSTGYALYTAFGQPSQQLRDPFEEHGD	43
PSBNNT	METATLVAIFISGLLVSTGYALYTAFGQPSQQLRDPFEEHGD	43
PSBNLE	METATLVAIFISGLLVSTGYALYTAFGQPSQQLRDPFEEHGD	43
PSBNPT	METATLVITISISCLLVSTGYALYTAFGQPSQQLRDPFEDHED	43
PSBNMP	METATFVAIFISCLLVSTGYALYTAFGQPSNELRDPFEEHED	43
	*****. *. *. *. *. *. *****. *****. *. *	

Quadro 4. Alinhamento e homologia na região espaçadora entre os genes *trnE-trnI* de tabaco e tomate apresentando uma deleção de 437 pb na sequência de tomate. Asteriscos indicam homologia; letras minúsculas representam ausência de identidade entre os nucleotídeos. Traços (-) representam ausência de nucleotídeos (Morgenstern, 1999).

Espaçador <i>trnE-trnI</i> : alinhamento e homologia entre tomate e tabaco							
NT	1	CtGCTTGACC	AACCGCCATC	ATACTATGAT	CATAGTATGA	TCaGTTTTTTT	50
LE	1	CcGCTTGACC	AACGGCCATC	ATACTATGAT	GATAGTATGA	TCcGTTTTTTT	50
		* *	*****	*****	*****	** *	*****
NT	51	GAAATTGTCA	ATATAATCGA	ATGATTCTAt	CCGAGGGATC	TTTCCCCCTT	100
LE	51	AAAATTGTCA	ATATAATCAA	ATGATTCTAg	CCGAGGGATC	TTTCCCCCTT	100
		*****	*****	*****	*****	*****	
NT	101	TCAGAAATTGC	ATAGAATT--	TTTTTATTTCG	TCATTGATGA	ATTATTTCATT	148
LE	101	TCAGAAATTGC	ATAGAATTgt	TTTTTATTTCG	TCATTGACGA	ATTATTTCATT	149
		*****	*****	*****	*****	*****	
NT	149	AGAATCGcCA	TTAGAAATCT	AGTAGTAGTA	TTTTTTTTtt	tttggAATTA	198
LE	151	AGAATCGaCA	TTAGAAATCT	AGTAGTAGTA	TTTTTTTT--	-----AATTA	193
		*****	** *	*****	*****	*****	

NT	199	TTTCAATTGA	ATTTCTTTCg	attatttttag	tttagattat	ttagtatttta	248
LE	194	TTTCAATTGA	ATTTATTTCT	-----	-----	-----	214
		*****	*****				
NT	249	gaatttttctt	tttttattat	aaataaaaaa	aaaattaata	aatacaaaaa	298
LE	214	-----	-----	-----	-----	-----	214
NT	299	atagaaataa	taaggaagag	taggattttt	gcagggaatg	attggtccgt	348
LE	214	-----	-----	-----	-----	-----	214
NT	349	cagaaaagga	aaaaggtgtg	aaattctatt	tctttcactt	tcatttgatt	398
LE	214	-----	-----	-----	-----	-----	214
NT	399	cattgttaag	acgagatatc	cttatctccc	tcccaccaag	acaggaaatt	448
LE	214	-----	-----	-----	-----	-----	214
NT	449	aacaaacgag	aaatctagta	agcgggatca	agaagaaaat	tcttttttct	498
LE	214	-----	-----	-----	-----	-----	214
NT	499	ccaagaattt	agttcaggag	acaagtagaa	tctcttcatt	ccatgattcg	548
LE	214	-----	-----	-----	-----	-----	214
NT	549	atgaaatatc	ttgaatttta	tggtgaattg	ctaggtgtat	gtacatgtat	
LE	214	-----	-----	-----	-----	-----	214
NT	599	caatcaagtg	aattttgttc	tggtgggatc	aattcaataa	aagaaaaaaa	648
LE	214	-----	-----	-----	-----	-----	214
NT	649	gcaATTCGAG	TCGGTCTTGA	AACAATTCAT	TGCATTTTCT	CCTAgACTTC	698
LE	214	---ATTCGAG	TCGGTCTTGA	AACAATTCAT	TGCATTTTCT	CCTAtACTTC	260
		*****	*****	*****	*****	*****	
NT	699	CTAGGTAAAT	CCATTTTATT	ATTCAACAAT	GAGCCACTAG	ACACTATGTA	748
LE	261	CTAGGTAAAT	CCATTTTATT	ATTCAACAAT	GAGCCACTAG	ACACTATGTA	310
		*****	*****	*****	*****	*****	
NT	749	TCTACTGCAT	GTACTTA-TG	CATATATACT	TATGTTTATA	ATATATGTAC	797
LE	311	TCTACTGCAC	GTACTTAaTG	CATATATACT	TATGTTTATA	ATATAAGTAC	360
		*****	*****	*****	*****	*****	
NT	798	CTATAGATAT	TTtATCCACA	TAGTGAATAA	TTCCGGAATT	AAATCAAAAA	848
LE	361	ATATAGATAT	TTaATCCACA	TAGTGAATAA	TTCCGGAATT	AAATAAAAAA	410
		*****	**	*****	*****	*****	
NT	849	G					
LE	411	G					
		*					

Análise de restrição de ambas as seqüências gerou os mapas de restrição para os fragmentos cloroplastidiais de tomate clonados em pIJB1 e pIJB2 apresentados nas Figuras 22 e 23. Os mapas apresentam predominantemente enzimas de restrição que possuem somente um ou dois sítios de reconhecimento na seqüência.

Figura 16. Mapa de restrição do fragmento cloroplastidial de tomate de 8.660 pb clonado em pIJB1. Setas indicam o sentido de transcrição dos genes.

Figura 17. Mapa de restrição do fragmento cloroplastidial de tomate de 6.366 pb clonado em pIJB2. Setas indicam o sentido de transcrição dos genes.

Em concordância com a alta homologia encontrada, a posição relativa dos genes nos fragmentos sequenciados foi exatamente aquela encontrada na sequência de tabaco (Shinozaki et al., 1986). Mapas gênicos dos fragmentos estudados estão esquematizados nas Figuras 18 e 19, e a posição exata de cada uma das sequências codificadoras pode ser visualizada nos Quadros 1 e 2 em **negrito**. Em adição, o conteúdo de GC nos fragmentos de 8.660 pb e 6.366 pb foram calculados como sendo 35,13% e 36,94% respectivamente. O conteúdo de GC das respectivas sequências no plastoma de tabaco, calculado em 37,9% para o genoma completo, é de 34,75% e 37% (Shimada & Sugiura, 1991). Estes resultados refletem a alta homologia das sequências e indicam, conforme verificado, o mesmo padrão de uso preferencial de códons em tomate e tabaco, contendo A ou U na terceira posição (Shimada & Sugiura, 1991).

Figura 18. Mapa gênico esquemático do fragmento cloroplastial de tomate de 8.660 pb clonado no plasmídio pIJB1.

Figura 19. Mapa gênico esquemático do fragmento cloroplastial de tomate de 6.366 pb clonado no plasmídio pIJB2.

A alta homologia entre tabaco e tomate, o posicionamento conservado de genes, o conteúdo em GC, assim como o elevado grau de conservação dos produtos gênicos entre as espécies sugerem que o padrão genético de cloroplastos de tabaco é altamente conservado em tomate, em concordância com o esperado, uma vez que ambos, tomate e tabaco, pertencem a família das solanáceas, extensa família de dicotiledôneas evolutivamente relacionadas.

4.3. Identificação de sítios únicos de restrição para construção de vetores de transformação via recombinação homóloga

Análise das sequências completas dos fragmentos cloroplastidiais de pIJB1 e pIJB2 permitiu a construção de mapas de restrição detalhados e a determinação de potenciais sítios para introdução de genes de interesse no genoma cloroplastidial de tomate via recombinação homóloga através da construção de vetores de transformação. Os mapas de restrição estão mostrados nas Figuras 22 e 23, apresentando as enzimas com sítio único de reconhecimento na sequência e algumas outras com dois ou três sítios. A análise minuciosa das sequências visando a construção de vetores de transformação de cloroplastos de tomate via recombinação homóloga levou à maior atenção ao fragmento de 8.660 pb, onde as regiões intergênicas se mostram mais extensas e apresentam maior número de sítios únicos de restrição. Três sítios de restrição foram inicialmente apontados como potenciais sítios para futura introdução de genes de interesse: *Xba*I entre os genes *psbD* e *trnT*, *Stu*I entre os genes *psbM* e *petN* (*ycf6*) e *EcoRV* entre os genes *trnC* e *rpoB*.

A introdução de genes exógenos no plastoma não deve afetar o funcionamento normal do sistema genético cloroplastidial (Maliga, 1993; Bock & Hagemann, 1999), e portanto, não deve afetar a expressão de genes individuais. O sítio *Xba*I foi descartado pois encontra-se na região promotora do gene *psbD*, a qual foi caracterizada por apresentar elementos procarióticos promotores "-10" e "-35" a cerca de 900 pb do códon de iniciação da tradução (Christopher et al., 1992). Observou-se que existem dois sítios próximos para *EcoRV* (distanciados entre si por apenas 147 pb) no espaço intergênico entre *trnC* e *rpoB* e o uso da enzima resultaria em potencial perda deste segmento, sem que se saiba se haveria algum prejuízo, adotou-se como sítio alvo o sítio único de restrição para a enzima *Stu*I contido entre os genes *psbM* e *petN* (*ycf6*). Como estes genes em questão são transcritos em sentidos opostos (Figura 18), o sítio *Stu*I encontra-se especificamente na região 3' à região codificadora de ambos os genes e a uma distância superior a cerca de 200 pb, o que pode garantir a integridade dos transcritos originais no caso da clivagem e inserção do gene marcador seletivo na referida localização (Bock, 2000).

Admitido como sítio alvo o sítio de restrição *Stu*I localizado no espaço intergênico entre os genes *psbM* e *petN* (*ycf6*), adotou-se como estratégia o isolamento e subclonagem do

sub-fragmento *SmaI/XhoI* de pIJB1 (Figura 17). Desta forma, obteve-se o plasmídio pTCJT2 no vetor pBS KS(-) contendo um fragmento cloroplastidial de 2404 pb, com sítio único de restrição para a enzima *StuI* entre os genes *psbM* e *petN* (*ycf6*), como esquematizado na Figura 20.

Figura 20. Plasmídio pTCJT2 contendo a sequência alvo de tomate para construção de vetores de transformação de cloroplastos.

4.4. Construção do gene marcador seletivo

A amplificação via PCR do promotor *PatpI* e terminalizador *Trp14* de tomate utilizando primers baseados na sequência de tabaco (Tabela 3) gerou respectivamente as sequências de 281 e 150 pb, as quais incluem a sequência dos primers utilizados, estão mostradas no Quadro 5. A região do promotor *PatpI* foi obtida através de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* (*SacI*)/*NcoI*, obtendo-se um fragmento de 270 pb. A região do terminalizador *Trp14* foi obtida através de digestão com as enzimas de restrição *SphI*/*SacI*, obtendo-se um fragmento de 140 pb. Análise de homologia entre as sequências amplificadas e as sequências originalmente conhecidas em tabaco pode ser visualizada também no Quadro 5. A sequência promotora de tomate difere da de tabaco por apresentar uma duplicação da sequência de 10 bases AGAAATCCCT presente em cópia única em

tabaco. Por sua vez, a sequência terminalizadora de tomate apresenta uma substituição de T (em tabaco) por C (em tomate), como destacado em negrito no Quadro 5.

Uma vez isolados e clonados os sinais de controle de expressão *PatpI* e *Trps14* de tomate, fez-se a substituição dos sinais originalmente presentes na construção pUC-16S-*aad* (cedida por Ulrich-H. Koop / Universidade de Munique, Alemanha) a qual deu origem ao cassete *atpI-aadA-rps14* clonado no plasmídio pIJB13, conforme esquematizado na Figura 21.

Originalmente em tabaco o promotor *PatpI* apresenta dois sítios de iniciação da transcrição, -131 e -208, o primeiro promovido por uma sequência promotora consenso "-35" tipicamente procariótica (-35 consensus-type promoters - CT) responsável pela promoção da expressão em cloroplastos, e o segundo promovido por uma sequência promotora não-consenso (non-consensus type promoter - NCII) responsável pela expressão em plastídios não-verdes (Miyagi et al., 1998). A amplificação em tomate de toda a região intergênica 5' à região codificadora do gene *atpI*, somada à elevada homologia verificada, com a existência dos citados sítios de iniciação da transcrição, permitem supor que a construção de um gene marcador sob controle de tal sequência resultará na expressão do fenótipo marcador em plastídios verdes ou não-verdes. Interessante indicativo da atividade promotora do *PatpI* pôde ser verificada pela expressão de resistência ao antibiótico espectinomicina em *Escherichia coli* contendo o cassete de expressão *PatpI-aadA-Trps14* (dados não mostrados, verificação rotineira no decorrer das clonagens), uma vez que, apresentando um promotor tipicamente procariótico (tipo σ^{70}) sua expressão seria esperada em *E. coli*.

Quadro 5. Sequências e análise de homologia entre as regiões promotoras dos gene *atpI* e terminalizadoras dos gene *tps14* de tomate (Tom) e tabaco (Tab). Em negrito e itálico encontram-se destacados os sítios de restrição inseridos via primers. Letras minúsculas representam os primers utilizados na amplificação. Setas indicam sítios de iniciação da transcrição (transcritos primários).

Sinais de controle da expressão: tomate e tabaco			
<u>Promotor <i>PatpI</i>:</u>			
	<i>EcoRI</i> <i>SacI</i>		
LE	tt gaattC gagctctagctatatataagaaatcctTGATTAATAATAACATAATAAG	55	
NT	GTGAGGGTCAGTTC TAGCT TATATAAGAAATCCTTGATTAATAATAACATAATAAG	55	
	*** ** *****		
	"-35" " -10"		
LE	ATAAATAACTTACTTCAGAAATCCCTAGAAATCCCTTATGGAATCGCTTACTATT	110	
NT	ATAAATAACTTACTTCAGAAATCCCT-----TATGGAATCGCTTACTATT	100	
	*****		
LE	TCTGAATTTCCAAAAATAGATCAAAATAACTGGGGATATTATGTGATTATTAGT	165	
NT	TCTGAATTTCCAAAAATAGATCAAAATAACTGGGGATATTATGTGATTATTAGT	155	
	*****		
	└─ -131		
LE	ATTCTAAATCTTAGTTGGTATTCAAAATATCCGATTCAAGTAGACAAAGAGATGG	220	
NT	ATTCTAAATCTTAGTTGGTATTCAAAATATCCGATTCAAGTAGACAAAGAGATGG	210	
	*****		
LE	TTGAATCAAAAAATTTTGTTTAAAGTTCAAttttttcagagggcaaggc caccatg	275	
NT	TTGAATCAAAAAATTTTGTTTAAAGTTCAATTTTTCAGAGGGCAAGGCAATATG	265	
	***** ***		
LE	gaaaaa 281		NcoI
NT	AATGTT 271		
	**		
<u>Terminalizador <i>Ttps14</i>:</u>			
	<i>SphI</i>		
LE	ttttt gcatgc acgcttcatttctatttctaTTTCTATGGTCGATGATCATAGAA	55	
NT	GGTAAGGATTAA CGCTT CATTTCATTTCATTTCATGGTCGATGATCATAGAA	55	
	* ** *****		
LE	GCCCCTTTACCATTCTGTATAAATGGGCTATTCTATTTGTACAGATAGGGCGGAG	110	
NT	GCCCCTTTACCATTCTGTATAAATGGGCTATTCTATTTGTACAGATAGGGTGGAG	110	
	*****		
LE	GGGCGCATTTAA tcctt gtttatctattag tcgac aaaaa 150		
NT	GGGCGCATTTAA CCTT GTTTATCTATTAGTTTTCAGTTC 150		
	***** **		
	SaI		

Figura 21. Cassete *atpI-aadA-rps14* (gene marcador) clonado no plasmídio pIJB13, construído com sinais plastídio-específicos de tomate para expressão do gene quimérico *aadA* em cloroplastos e plastídios não-verdes.

4.5. Construção de vetores de transformação de cloroplasto de tomate via recombinação homóloga

Para a construção de vetores de transformação, ou seja, o gene marcador flanqueado por seqüências homólogas de DNA cloroplastidial, o cassete *atpI-aadA-rps14* (gene marcador), junto a uma seqüência 3' ('polylinker' ou 'multicloning site') foi isolado do plasmídio pIJB13 (Figura 8), gerando os vetores pIJB18 e pIJB20 para transformação de cloroplastos de tomate via recombinação homóloga. Os vetores para transformação pIJB18 e pIJB20 estão apresentados nas Figuras 28 e 29 respectivamente. A distinção entre os vetores está na existência de dois (2) sítios de restrição adicionais no vetor pIJB20, o que pode ser de grande interesse para futuras clonagens e inserção de genes de interesse no respectivo vetor. Como pode ser visto na Figuras 28 e 29, o vetor pIJB20 apresenta os sítios de restrição *EcoO109I* e *KpnI* além daqueles presentes em pIJB18: *XbaI*, *SpeI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *ClaI*, *SalI*, *HincII* e *XhoI*.

Devido à presença de sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *Xba*I, *Bam*HI, *Hinc*II e *Eco*O109I na sequência flanqueadora do gene marcador *aadA* (pTCTJ2), estes sítios não estão disponíveis para introdução de genes de interesse nos vetores para transformação de cloroplastos.

Figura 22. Vetor final de transformação de cloroplastos de tomate pIJB18 em pBS KS (-).

Figura 23. Vetor final de transformação de cloroplastos de tomate pIJB20 em pBS KS (-).

A tecnologia de transformação de cloroplastos promete ser bastante útil no auxílio a programas de melhoramento genético. A transformação do genoma cloroplastidial torna possível a obtenção de plantas apresentando elevados níveis de expressão de transgenes e acúmulo de proteínas exógenas, garante transformação dirigida, segurança ambiental e ausência de efeitos epigenéticos, assim como permite a expressão de mais de um gene através de um único evento de transformação (como "operons"). Conforme discutido por Bock & Hagemann (1999), por meio da transformação de cloroplastos um grande número de genes metabólicos bacterianos e "operons" completos podem ser potencialmente explorados para melhorar o valor nutricional de espécies cultivadas, para gerar plantas resistentes ao estresse e a doenças ou mesmo para produzir enzimas e farmacêuticos em plantas.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir:

- Às seqüências cloroplastidiais dos fragmentos de tomate estudados (6.366 pb e 8.660 pb) quando comparadas com as correspondentes seqüências em tabaco apresentaram alta homologia, sendo o padrão genético do genoma cloroplastidial de tabaco bastante conservado em tomate;
- A análise de homologia dos espaços intergênicos entre os fragmentos cloroplastidiais de tabaco e tomate é menor quando comparada à homologia entre as regiões codificadoras, de modo que deleções, inserções, duplicações e substituições são freqüentemente encontradas;
- A existência de diversos espaços intergênicos nos fragmentos clonados e seqüenciados, os quais apresentam sítios únicos de restrição, potencializa a introdução de genes de interesse em cloroplastos, disponibilizando o desenvolvimento da tecnologia de transformação de cloroplastos de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.);
- A construção dos vetores de transformação pIJB18 e pIJB20 tornou disponível a possibilidade de estabelecimento da tecnologia de transformação de cloroplastos de tomate.

ANEXO A:

Alinhamento do fragmento cloroplastidial de tomate de 8.660 pb com o respectivo fragmento do genoma cloroplastidial de tabaco

Formato DIALIGN 2.1

*****

Burkhard Morgenstern (1999)

Seqüências Alinhadas: tamanho (bases):

```
=====
1)      LEpIJB1      8660
2)      NT           9127
```

Somente letras maiúsculas devem ser consideradas alinhadas
Asteriscos confirmam identidade

Alinhamento:

```
=====

LEpIJB1      1      GTCGACCAAT CCTTCCTAAT TCACATCTTT GTTGAAAGAA TTTCTTTTGT
NT           26722  GTCGACCAAT CCTTCCTAAT TCACATCTTT GTTGAAAGAA TTTCTTTTGT
                *****

LEpIJB1      51      AATTCCTTAC ATAAGGATTC AGAAAATACC GGATCGCCAC CTACACAAGC
NT           +51    AATTCCTTAC ATAAGGATTC AGAAAATACC GGATCGCCAC CTACACAAGC
                *****

LEpIJB1      101     AAATTGTTGA TAAAAC TCCA AAATGGAATT TTCTTTTGAC CCAATTTTTTT
NT           +101   AAATTGTTGA TAAAAC TCCA AAATGGCATT TTCTTTTGAC CCAATTTTTTT
                *****

LEpIJB1      151     TTCTCTCCTT ATCATTCAGA AAAGACAAAA AAATTTTCAGG ATAGCAAACA
NT           +151   TTCTCTCCTT ATCACTCAGA AAAGACAAAA AAATTTTCAGG ATAGCAAACA
                *****

LEpIJB1      201     TTCTCTAGAA TTTCTCTTAG ATTCAAACCC ATAGCTGATG ATAGAACTAG
NT           +201   TTCTCTAGAA TTTCTCTTAG ATTCAAACCC ATAGCTGATG ATAGAACTAG
                *****

LEpIJB1      251     AATAGATATT TTTTGTTTCC TACTTACACG AGCCCATATC CTTGCTTTTC
NT           +251   AATAGATATT TTTTGTTTCC TACTTACACG AGCCCATATC CTTGCTTTTC
                *****

LEpIJB1      301     TATCAATTTT TAATTCTGAT CTTCTCTCCC AATCTGATAT TATGGTGCCG
NT           +301   TATCAATTTT TAATTCTGAT CTTCTCTCCC AATCTGATAT TATGGTGCCG
                *****
```

LEpIJB1	351	GTATAGACCG	AAATTCCGTT	ATGGTCCAAT	TCTGATCGGT	AATAAATACC
NT	+351	GTATAGACCG	AAATTCCGTT	ATGGTCCAAT	TCTGATCGGT	AATAAATACC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	401	GGGACTTTGC	AATATTTGAT	TGATCACAAT	TCTATATATT	CCATTGACTA
NT	+401	GGGACTTTGC	AATATTTGAT	TGATCACAAT	TCTATATATT	CCATTGACTA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	451	TAGAAGTTCC	CAGGGAATTC	ATTAGAGGAA	TGTTTCCGAT	AAAAATTGTT
NT	+451	TAGAAGTTCC	CAGGGAATTC	ATTAGAGGAA	TGTTTCCGAT	AAAAATTGTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	501	TGTTCTTGCA	TATCCCTACT	GTTTTTCCAA	ATTAATCCCG	CGGATACATA
NT	+501	TGTTCTTGCA	TATCCCTACT	GTTTTTCCAA	ATTAATCCCG	CGGATACATA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	551	TAATTCAGAA	GAATATGTGA	GTGATTCATA	CACAGCATCT	CTTTCCTTTA
NT	+551	TAATTCAGAA	GAATATGTGA	GTGATTCATA	CACAGCATCT	CTTTCCTTTA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	601	TCAAGGGTTC	GACCAATTGA	TATGTTTCCA	CAAATAATTG	AAATTC AATT
NT	+601	TCAAGGGTTC	GACCAATTGA	TATGTTTCCA	CAAATAATTG	AAATTC AATT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	651	TCTTGATCTG	TATCTTCAAT	TTTTGGAAAC	TTATAAAGTT	CTTCCGTCAA
NT	+651	TCTTGATCTG	TATCTTCAAT	TTTTGGAAAC	TTATAAAGTT	CTTCCGTCAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	701	ACCTTGATCA	ATGAACCTAC	AAAATCCTTC	AAATTGTATC	TGATTAAATC
NT	+701	ACCTTGATCA	ATGAACCTAC	AAAATCCTTC	AAATTGTATC	TGATTAAATC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	751	CAGGTATTGT	AGATATTCCC	TCATTTCCAT	CCCCGAGCAT	TTT _a AATTTTC
NT	+751	CAGGTATTGT	AGATATTCCC	TCATTTCCAT	CCCCGAGCAT	TTT _t AATTTTC
		*****	*****	*****	*****	*** *****
LEpIJB1	801	CCATTTAGCA	AAAAATCCCA	CTATTGGTTC	ATTCTgtATC	TAATTAGATA
NT	+801	CCATTTATCA	AAAAATACCA	CTATTGGTTC	ATTCTtcATC	TAATTAGATA
		*****	*****	*****	***** **	*****
LEpIJB1	851	GATTAGATAA	ATGATCTAGC	AATGATGGCA	TTTCTATTTT	GTTTACCGAA
NT	+851	GATTAGATAA	ATGATCTAGC	AATGATGGCA	TTTCTATTTT	GTTTACCGAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	901	TCACATGAAA	TTTTACCCAA	CTCCATATCT	GGAATGTATG	AAATACGTAT
NT	+901	TCACATGAAA	TTTTACCCAA	CTCCATATCT	GGAATGTATG	AAATACGTAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	951	GAACGGAGGA	AGAAGGAGAA	TTTTCTACTT	AAATTttaAA	TTGaatTgaA
NT	+951	GAACGGAGGA	AGAAAGAGAA	TTTTCTACTT	AAATT--gAA	TTGgaaTttA
		*****	*****	*****	***** **	*** * *

LEpIJB1	1001	TTGGAATTTT	CAACAGATAC	AAATGGAAAG	AAATTGATAA	AACATCCCTA
NT	+999	TTGGAATTTT	CAACAGATAC	AAATGGAAAG	AAATTGATAA	AACATCCCTA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	1051	GAAACCTACT	TCTGCTACTT	AGACTTATTA	ATGAAGTTAT	AGGATTTTGT
NT	+1049	GAAACAGACT	TCTGCTACTT	AGACTTATTA	ATTAAGTTAT	AGAAATTTTGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	1101	ATAGAATATA	AAAAGAAAAA	TGATTCCATT	TCTACCATTA	TTATGATAAT
NT	+1099	ATAGAATATC	AAAAcAAAAA	TGATTCCATT	TCTACCATTA	TTATGATAAT
		*****	**** *	*****	*****	*****
LEpIJB1	1151	ACAtATTCCA	ACCTGCTTGA	ATACCcagAA	AAaAtAaatt	ggattggGAC
NT	+1149	ACAcATTCCA	ACCTGCTTGA	ATACCagaAA	AAtAaAtgga	ttc----GAC
		*** *	*****	***** **	** * *	***
LEpIJB1	1201	ATTTGATCTT	TTCgGCTGAG	ATAAAGGCAT	AAAAAatcAG	AAAGAATATA
NT	+1195	ATTTGATCTT	TTC-GCTGAG	ATAAAGGCAT	AAAAAata-AG	AAAGAATATA
		*****	*** *	*****	***** **	*****
LEpIJB1	1251	TAGAATTAGA	ATCGGTTTTT	TAGCATTTAA	-CCCCCCTTA	TGTTATGGAT
NT	+1243	TAGAATTAGA	ATCGGTTTTT	TAGCATTTAA	cCCCCTTTTT	TGTTATGGAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	1300	TTCaAttgTt	cAAAAAATGA	TTCGCAGAGA	AGAGAGATAT	TTTGTTTTACG
NT	+1293	TTcGtTgcTa	-AAAAAATGA	TTTGTAGAGA	AGAGAGAGAT	TTTGTTTTACG
		*** * *	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	1350	GATTTTTTGAG	TAGAATACGA	TTGTGAAGTG	GATAAGAAAA	GAAGGTTTGT
NT	+1342	GATTTTTTGAA	TAGAATACGA	TTGTGAAGTG	TATAAGAAAA	GAAGGTTTGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	1400	ATGGCTTAA	CACGTGTGGA	GATATCTATA	ATATCTGTCT	TTCTTCTCTT
NT	+1392	ATGGCTTAAC	CACGTGTGGA	GATATCTATA	ATATCCGTCT	TTCTTCTCTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	1450	TTATTGTTTT	ATTGTCGTTt	TaTGTTCTAT	TCGGGGCAAC	ACAGGTTGTG
NT	+1442	TTATTGTTTT	ATTGTCGTTc	TcTGTTCTAT	TCGGGGCAAC	CCGGGTTGTG
		*****	*****	* *	*****	*****
LEpIJB1	1500	CTCTccGAAA	ACATAATTTT	AATTTTCTAT	TCAATTCAAA	ATTCAAATTG
NT	+1492	CTCTatGAAA	ACAGAATTTT	AATTTTCTAT	TCAATTCAAA	ATTCAAATTG
		**** *	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	1550	AAGTATGATA	CTTTTCTGAT	ATCTGATAAT	TCTaTATCgG	GAACATATAT
NT	+1542	AAGTATGATA	CTTTTCTGAT	ATCTGATAAT	TCTcTATC-G	GAACATATAT
		*****	*****	*****	*** *	*****
LEpIJB1	1600	AAATAATATA	TAtCCGTCTA	ACAATTTATC	TTttgGGGGG	TTTACATATA
NT	+1591	AAATAATATA	TA-CCGTCTA	ACAATTTCTC	TT---GGGGG	TTTACATATA
		*****	** *	*****	** *	*****

LEpIJB1	1650	CTGATAATTG	TTGTTATAAT	TAttattaat	aatgaAAATT	GAGAAGGATT
NT	+1637	CTCATAATTG	TTGTTATAAT	TA-----	-----AAATT	GAGAAGGATT
		*****	*****	**	*****	*****
LEpIJB1	1700	TTTTGATTGC	AAAAATCCAT	ACTGAactga	TTgGTTatat	atcATATATC
NT	+1674	TTTTGATTGA	AAAAATCCAT	ACTGA-----	TTaGTT-----	---ATATATC
		*****	*****	*****	** **	*****
LEpIJB1	1750	AAGTTGTATT	TTCTTATGTC	ATTAGGAAAC	CAAAATTgGG	AGATTCAAAT
NT	+1712	AAGTTGTATT	TTCTTATGTC	ATTAGGAAAA	CAAAATTtGG	AGATTCAAAT
		*****	*****	*****	***** **	*****
LEpIJB1	1800	CCAAGAATCA	TTCATGCATT	CTAAGgCAAT	AGTTACTGGG	TCCTATTTTC
NT	+1762	CCAAGAATCA	TTCATGCATT	CTAAGtCAAT	AGTTAATGGT	TCCGATTTTC
		*****	*****	***** **	*****	*****
LEpIJB1	1850	TGAAAGTTGA	ATTTTGtATT	TTGCGAATGA	AAATCCACAT	TTGATTTTTTC
NT	+1812	AGAAATTTGA	ATTTTGgATT	TTGCGACTGA	AAATCCACAT	TTGATTTTTTC
		*****	***** **	*****	*****	*****
LEpIJB1	1900	AATAGAAAGG	TAAGAGAAAG	TTTTGAACAT	TATGAATTTG	GAGATagact
NT	+1862	AATAGAAAGG	TAAGAGAAAG	CTTTGAACAT	TATGAATTTG	GAGAT-----
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	1950	caatCGAAAT	TGAAAGGATG	AATCAAACCC	AATCAAAGG	GAAGAAGGAT
NT	+1907	----CGAAAT	TGAAAGGATG	AATCAAACCC	AATCAAAGG	GAAGAAGGAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2000	TAGGATTTCT	TTGACTTTTA	GGAAAAATTA	AGGAAAACAG	AACTCAAGGT
NT	+1953	TAGGATTTCT	TTGACTTTTA	GGAAAAATTA	AGGAAAACAG	AACTCAAGGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2050	GCAAGTACAA	TAAAAAAGCA	GTTCAAGTAAT	CCGGGAAAGT	TTTCATCTAT
NT	+2003	GCAAGTACAA	TAAAAAAGCA	GTTCAAGTAAT	CCTGGAAAGT	TTTCATCTAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2100	TTTGTATTTG	TAGCATTTTG	GCGACATGGC	CGAGTGGTAA	GGCAGAGGAC
NT	2053	TTTGTATTTG	TAGCATTTTG	GCGACATGGC	CGAGTGGTAA	GGCAGAGGAC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2150	TGCAAATCCT	TTTTTCCCCA	GTTCAAATCC	GGGTGTCGCC	TGATCAACAA
NT	2103	TGCAAATCCT	TTTTTCCCCA	GTTCAAATCC	GGGTGTCGCC	TGATCAACAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2200	AAACTGGAA	ATCTCTTTTT	TTC-----TT	CTGTTGATAT	AACCCGCCGA
NT	2153	AAACTCGAA	ATCTCTTCTT	TTcttctgTT	CTGTTGATAT	AACCCGCCGA
		*****	*****	** **	*****	*****
LEpIJB1	2245	ATGATTcGcC	AGCAGAAGCA	GAGAAAGCAG	ACTGTTGATA	CTTGTTT---
NT	2203	ATGATTcC	AGCAGAAGCA	GAGAAAGCAG	ACTGTTGATA	CTTGTTTgat
		***** **	*****	*****	*****	*****

LEpIJB1	2292	-----	TGGTCTGGGT	GTTTTTtagAA	AAAATTGTAA	ATATCCTTGC
NT	2253	tctaaacatc	TGGTCTGGGG	GTTTTTctAA	AAAATTGTAA	ATATCTTTGC
			*****	***** **	*****	*****
LEpIJB1	2332	ATTGCATATT	TAGGCTTagc	tttCAAGTAA	ATATTCGAAT	GCTCGAGGGG
NT	2303	ATTGCATATT	TAGGCTT---	---CAAGGAA	ATATTCGAAT	GCTAGAGGGG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2382	CTATCAAGAC	TTCGCAATTA	CCTTCTACTA	CAAATCAAAA	TTTTCTATTA
NT	2347	CTATCAAGAC	TTCGCAATTA	CCTTCTACTA	CAAATCAAAA	TTTTCTATTA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2432	TTAATCCATT	GTATAATGAC	TGGACCT---	-----TGG	AGAGCCCGAT
NT	2397	TTAATGCATT	GTATAATGAC	TGGACCTtga	attagatTGG	AGAGCCCGAT
		*****	*****	*****	***	*****
LEpIJB1	2472	AGGAAATCGA	AATAGTTGTG	GAAGGGGGCG	GAAGATACTT	TATTATATAC
NT	2447	AGGAAATCTA	AATAGTTGTG	GAAGGGGGCG	GAAGATACTT	TATTATATAC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2522	GAGGAACTCA	CGAAAATaTC	TCAGTGCTCA	AGCATCCAAT	CAATTCAAAT
NT	2497	GAGGAACTCA	CGAAAATcTC	TGAGTGCTCA	AGCATCCAAT	CAATTGAAAT
		*****	***** **	*****	*****	*****
LEpIJB1	2572	GAGGGTCAAC	AAAAAAAGAA	TAGGACCTAT	TATTCCTACA	TGTTCCATTA
NT	2547	GAGGGTCAAC	AAAAAAAGAA	TAGGACCTAT	TATTCCTACA	TGTTCCATTA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2622	GTAACATTCC	CTTGAGATGT	TACTGCGGAT	TTTGCTTGgG	TTTAATCTTT
NT	2597	GTAACATTCC	CTTGAGATGT	TACTGCAGAT	TTTGCTTGtG	TTTAATCTTT
		*****	*****	*****	***** *	*****
LEpIJB1	2672	CCCGATTATA	AATCATATAG	aAATTTCTTA	TAAAATGAGC	GAATTTATTG
NT	2647	CCCGATTAGA	AATCCTATAG	gAATTTCTTA	TAAAATGAGC	GAATTTATTG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2722	GATTGGTTTA	TTAATAGTCT	TCGTTCTTTT	TGACTCTGCG	CCATTGATTC
NT	2697	GATTGGTTTA	TTAATAGTCT	TCGTTCTTTT	TGACTCTGCG	CCATTGATTC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2772	tACTATTATT	AGTGAGGAAT	AATGGAACAA	TTCCTTTATA	TTTATAGAGA
NT	2747	cACTATTATT	AGTGAGGAAT	AACGGAACAA	TTCCTTTATA	TTTATAGAGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2822	TAGGGGACAT	AATTCATATG	GATATAGTAA	GTCTTGCTTG	GGCTGCTTTA
NT	2797	TAGGGGACAT	AATTCATATG	GATATAGTAA	GTCTTGCTTG	GGCTGCTTTA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2872	ATGGTAGTCT	TTACTTTTTTC	CCTTTCACCTC	GTAGTGTGGG	GAAGGAGTGG
NT	2847	ATGGTAGTCT	TTACTTTTTTC	CCTTTCACCTC	GTAGTGTGGG	GAAGAAGTGG
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB1	2922	ACTCTAGGGG	TtCTgCTAAT	TGAGTTAAGG	AAGCAAAGCTG	TATCATTATC
NT	2897	ACTCTAGGGG	TcCTaCTAAT	TGAGTTAAGG	AAGCAAAGCTG	TATCAATATC
		*****	* ** *****	*****	*****	*****
LEpIJB1	2972	AATTGCTTTC	TAGATGGTTC	TGCAACACGT	TTGGAACAAA	ATaAAAAATAT
NT	2947	AATTGCTTTC	GAGATCGTTC	TGCAACACGT	TTTGAACAAA	ATcAAAAATAT
		*****	*****	*****	*****	** *****
LEpIJB1	3022	CTTCATTTTG	AAATTCCATT	GGACTCGACT	GGAGTAATGT	ATTATAGGAA
NT	2997	CTTCATTTTG	AAATTCCATT	GGACTCGACT	GGAGTAATGT	ATTATAGGAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3072	TCAGCCTCTT	TCAATCAAAG	AaCTATTTCA	ACGATTCCCA	TGTTTGTAGT
NT	3047	TCATCCTCTT	TCAATCAAAG	AgCTATTTCA	ACGATTCCCA	TGTTTGTAGT
		*****	*****	* *****	*****	*****
LEpIJB1	3122	TCGAAAGGAA	aAGGATCCCA	GGAAATTTAT	TCGAACCTAA	TTCTTaCtAA
NT	3097	TCGAAAGGAA	gAGGATCCCA	GGAAATTTAT	TCGAACCTAA	TTCTTcCgAA
		*****	*****	*****	*****	***** * **
LEpIJB1	3172	ATTTTCTATT	CCAATCAATG	GCCTCTTcCt	AGGTGATACT	GAGGAGGGCC
NT	3147	ATTTTCTATT	CCAATCAACG	GCCTCTTaC-	AGGTGATACT	GAGGAGGGCC
		*****	*****	***** *	*****	*****
LEpIJB1	3222	GGACCCGTTT	TTTATTTggT	TCTCTCTTTA	CTGTTCAAAG	AAaAaGTGGT
NT	3196	GGACCCGTTT	TTTATTTctT	TCTCTCTTTA	CTGTTCAAAG	AAGAgGTAGT
		*****	***** *	*****	*****	** * *****
LEpIJB1	3272	TTTGTTAAGT	GTATAAGCAC	TTTGTATGAG	AAAGAAAGGA	TATAAACATA
NT	3246	TTTGTTAAGT	GTATACGCAC	TTTGTATGAG	AAAGAAAGGA	TATAAACATA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3322	GTGGTTGTCT	AACGAGATAC	TATttAGAAT	AAGATCGTCA	GGTGAGTCAC
NT	3296	GTGGTTGTCT	AACGAGATAC	TATgcAGAAT	AAGATCTTCA	GATGAGTCAC
		*****	*****	*** *****	*****	*****
LEpIJB1	3372	ATATTGCGCA	TTTAC--CTT	TCGAATTTTG	GAAATTGGAT	TTAGACTTTA
NT	3346	ATATTGCGCA	TTTACcgCTT	TCGAATTTTT	GAAATTGGAT	TTATGCTTTA
		*****	***** **	*****	*****	*****
LEpIJB1	3420	TCGACTTATT	TCATATCATG	GTTcAGGCCT	TAAAAATCAG	TGAGGTTTAC
NT	3396	TCGACTTATT	TCATATCATG	GTTcAGGCCT	TAAAAATCGG	TGAGGTTTAC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3470	TCTTCCTTTT	CGATGCCCGT	GGAACACTG	TCAATGGT--	-----TTAC
NT	3446	TCTTCCTTTT	CGATGCCCGT	GGAACACTG	TCAATGGTtt	actcaaTTAC
		*****	*****	*****	*****	****
LEpIJB1	3512	TTCTTAGGAA	TGTTAAAAAA	AAaaaGATTA	CTACGTGATT	TTTTGAATAT
NT	3496	TTCTTGGGAA	TGTTAAAAAA	AA---GATTA	CTACGTGATT	TTTTGAATCT
		*****	*****	** *****	*****	*****

LEpIJB1	3562	GCCTATATCT	ATCGCTTTTg	CTTCATTGAT	TTGATTCTCT	CAATAGATAC
NT	3543	GCCTATATCT	ATCGCTTTTc	CTTCATTGAT	TTGATTCTTT	CAATAGATAC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3612	TGAGATTCAc	ATTGGAAATC	AAAAATATAG	TAATTCAAAC	TATAAGACAT
NT	3593	CGAGATTCAg	ATTGGAAATC	AAAAATCTAG	TAATTCAAAC	TATAAGACAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3662	AgGAGTAATT	CAGATTGATC	AGAACAAATA	GATATAGCAA	ATAAATGGAA
NT	3643	AaGAGTAATT	TAGATTGATC	AGAACAAATA	GATATAGCAA	ATAAATGGAA
		* *****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3712	TTGGATGCTA	TGTCAATCCC	ATATATGGAA	TTGATATTCA	CATATATCAA
NT	3693	TTGGATGCTA	TGTCAATCCC	ATATATGGAA	TTGATATTCA	CATATATCAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3762	GATAATATTG	TAGATTGATa	Tat-----	-----AGA	TCCATATCAA
NT	3743	GATAATATTG	TAGATTGATc	TATagatcca	tatcaaaAGA	TCCATATCAA
		*****	*****	***	***	*****
LEpIJB1	3798	ATGCAGCCTC	TATCTTTATT	TTATTCCAGG	GGGCAGCTTT	ATAACAAGAA
NT	3793	ATGCAGCCTC	TATCTTTATT	TTATTCCAGG	GGGCAGCTTT	ATAACTACAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3848	TCTAACTAAT	AAATAGTATG	GTAGAAAGAA	ATAGATGAAT	CTTTCT----
NT	3843	TCTAACTAAT	AAATAGTATG	GTAGAAAGAA	ATAGATGAAT	CTTTCTttct
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3894	ACCATACTAT	CTATCTATTA	GAATACTGCC	GATTCTAGTC	CActCA-TTT
NT	3893	ACCATACTAT	CTATCTATTA	GAATACTGCC	GATTCTAGTC	CAtaCAtTTT
		*****	*****	*****	*****	** ** *
LEpIJB1	3943	CATTTAAGAC	ATGAAATTGG	AATCTTTTTTC	ATTTTATTTTC	GTCAATTTTG
NT	3943	CATTTAAGAC	ATGAAATTAG	AATCTTTTTTC	ATTTTATTTTC	GTCAATTTTG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	3993	GCTAAGAACT	CAGAAGTCAA	GTTTCATTCA	AATTAGTTAA	TAATTAATCG
NT	3993	GCTAAGAACT	CAGAAGTCAA	GTTTCATTCA	AATTAGTTAA	TAATTAATCG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4043	TTTTGACTGA	CTGTTTTTAC	ATAAATGATA	AGTAGAAAAG	CGGTAGGAAC
NT	4043	TTTTGACTGA	CTGTTTTTAC	GTAAATGATA	AGTAGAAAAG	CGGTAGGAAC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4093	TAGAATAAAT	AGTGCAGTAG	CAATAAATGC	AAGAATATTT	ACTTCCATAA
NT	4093	TAGAATAAAT	AGTGCAGTAG	CAATAAATGC	AAGAATATTT	ACTTCCATAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4143	TCTCATCGGT	TTTTTACTTC	GCAATAACTC	GGGATTTAAT	CCCATAGAGA
NT	4143	TCTCATCGGT	TTTTTACTTC	GCAATAACTC	GGGATTTAAT	CCCATAGAGA
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB1	4193	TGATAAATCT	TTGGCCTGTA	AATTCAATGA	ATGAATATTA	CCTCTCGATG
NT	4193	TGATAAATCT	TTGGCCTGTA	AATTCAATGA	ATGAATATTA	CCTCTCGATG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4243	ATCTTGAATC	aGATCAATAT	CATGAATAAC	AATATCTGAA	CTATCAAATa
NT	4243	ATCTTGAATC	gGATCAATAT	CATGAATAAC	AATATCTGAA	CTATCAAATc
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4293	AATTCGTCGT	CGAGAATTGA	ATAGTATAAC	ATAGGAAGTT	CTTTTATCCA
NT	4293	AATTCGTCGT	CGAGAATTGA	ATAGTATAAC	ATAGGAAGTT	CTTTTATCCA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4343	TACCGCCCCA	AACTCGGATT	GCTGACCTAA	cCCAAAATTC	CTTTATTTTAT
NT	4343	TACCGCCCCA	AACTTGGATT	CCTGACCCAA	tCCAAAATTC	CTTTATTTTAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4393	TTATCATT--	----TTTTAT	TATCTGTTCT	TTTTTTCTCT	CTAATCTATC
NT	4393	TTATCATTat	cattTTTTCT	CATCTGTTCT	TTTTTTCTCT	CTAATCTATC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4437	TAGTTCCTTC	TTGTACAATC	ATCTGATGAA	GTCTCATCAA	ATAGCTCTTC
NT	4443	TAGTTCCTTC	TTGTACAATC	ATCTGATGAA	GTCTCATCAA	ATAGCTCTTC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4487	CACTTCCAGT	GGT--CACAT	AGTTACAAAC	CCAAACAAAC	AATAAAAGCT
NT	4493	CACTTCCAGT	GGTcaCACAT	AGTTACAAAC	CCAAACAAAC	AATAAAAGCT
		*****	*** *****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4535	AAATGGAAAA	AGAAAGGAGT	TTAGAACGAA	ACTATTTTTTG	ACTTGGAAGA
NT	4543	AAATGGAAAA	AGAAAGGAGT	TTAGAACTAA	ACTATTTTTTG	ACTTGGAAGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4585	CAAAGAAGTG	TGATAAAGAT	GAGACCGTAT	AAAATGAATA	TTCATCAAAT
NT	4593	CAAAGAAGTG	TGATAAAGAT	GAGACCGTAT	AAAATGAATA	TTCATCAAAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4635	TGACTATTTT	CCGATTTGTT	CggTCGTCGA	TGGGGCCTTA	AAACAAAATG
NT	4643	TGACTATTTT	CCGATTTGTT	CttTCGTCGA	TGGGGCCTTA	AAACAAAATG
		*****	*****	* *****	*****	*****
LEpIJB1	4685	AAAAATaGGA	AAAATGATTC	ATTCGCCTTT	CTAAGAGGAG	TAGGATCTTt
NT	4693	AAAAATcGGA	AAAATGATTC	ATTCGCCTTT	CTAAGAGGAG	TAGGATCTT-
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4735	ggttgatctg	TCCTTCCCCC	TCCTTTCTTC	GTCGATTATT	AGcCCCCGGG
NT	4742	-----	TCCTTTCCCC	TCCTTTCTTC	GTCGATTATT	AG-CCCCGGG
			*****	*****	*****	** *****
LEpIJB1	4785	ACACCTATAC	CAAAAGCTCA	GTGTGCAATT	TGCATGAAAT	CTATTTTGCA
NT	4781	ACACCTATAC	CAAAAGCTCA	GTGTGCAATT	TGCATGAAAT	CTATTTTTCa
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB1	4835	ACTTCAAAC	AGTAAGTcAG	GTTCCATAAA	TCCGTAGCCA	GAAAAAGAAA
NT	4831	ACTTCAAAC	AGTAAGTgAG	GTTCCATAAA	TCCGTAGCCA	GAAAAATAAA
		*****	***** **	*****	*****	*****
LEpIJB1	4885	TTGtttttTT	TTTTTTTTTTG	TTTTTTCTGG	AAAGTATTTT	CTTATATTcA
NT	4881	TTG-----TT	TTTTTTTTTTG	TTTTTTCTGG	AAAGTATTTT	CTTATATTaA
		*** **	*****	*****	*****	***** *
LEpIJB1	4935	ATTTTGTATT	GGACAACAAA	GGAATTCCtt	TTGTGTATGC	GCGCCTCAAA
NT	4926	ATTTTGTATT	GGACAAGAAA	GGAATTCCcc	TTGTGTATGC	GCGCCTCAAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	4985	AAAGTATAGT	ACTCGATTCC	ATTACATGCA	TCGGGGGCAA	TCGAAAAAGC
NT	4976	AAGGTATAGT	ACTCGATTCC	ATTACATGCA	TCGGGGGCAA	TCGAAAAAGC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5035	CAGCATTTCT	TGGAATACTG	ACTATAATGC	TACCAATAAT	TGTACTAATC
NT	5026	CAGCATTTCT	TGGAATACTG	ACTATAATGC	TACCAATAAT	CGTACTAATC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5085	CAACCGCATA	TGTCTTTCTC	CTACCAAAG	GAAAGAAAAA	AGAAATAAGG
NT	5076	CAACCGCATA	TGTCTTTCTC	CTACCAAAG	GAAAGAAAAA	AGAAATAAGG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5135	ATTTCCCCTT	TGCTTTGACA	ATGGAATTCT	tCCCCCGGTC	CCCTTCAGAA
NT	5126	ATTTCCCCTT	TGCTTTGACA	ATGAAATTCT	gCCCCCGGTC	CCCTTCATAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5185	AAAGGGAGAG	ATTTTTTTGAT	ATATTTATTG	GATCCGTCGG	GACTGACGGG
NT	5176	AAAGGGAGAG	ATTTATTGAT	ATATTTATTG	GATCCATCGG	GACTGACGGG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5235	GCTCGAACCC	GCAGCTTCCG	CCTTGACAGG	GCGGTGCTCT	GACCAATTGA
NT	5226	GCTCGAACCC	GCAGCTTCCG	CCTTGACAGG	GCGGTGCTCT	GACCAATTGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5285	ACTACAATCC	CAGGGAAATA	CGGGATCTAG	CAGAAAATTT	GATTCTTTTT
NT	5276	ACTACAATCC	CAGGGAAATA	CGGGATCTAG	CAGAAAATTT	GATTCTTTTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5335	TATCTCCGGA	TCGGGTATTT	CTGAAGTACa	AAGGGAGTTA	TATCATCTCA
NT	5326	TATCTCCGGA	TCGGGTATTT	CTGAAGTACg	AAGGGGGTTA	TATCATCTCA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5385	TGGCGGATTG	GCGAATTaTT	GGGCCGAGCT	GGATTTGAAC	CAGCGTAGAC
NT	5376	TGGCGGATTG	GCGAATTtTT	GGGCCGAGCT	GGATTTGAAC	CAGCGTAGAC
		*****	***** **	*****	*****	*****
LEpIJB1	5435	ATATTGCCAA	CGAATTTACA	GTCCGTCCCC	ATTAACCGCT	CGGGCATCGA
NT	5426	ATATTGCCAA	CGAATTTACA	GTCCGTCCCC	ATTAACCGCT	CGGGCATCGA
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB1	5485	CCCAGGAAGA	ATCAATTTTc	aACTTATTGG	TAATCCATGA	TCAATTTCCCT
NT	5476	CCCAAGAAGA	ATCAATTTTta	gACTTATTGG	TAATCCATGA	TCAACTTCCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5535	TTCGTAGTAC	CCTACCCCCA	GGGGAATTCG	AATCCCCGCT	GCCTCCTTGA
NT	5526	TTCGTAGTAC	CCTACCCCCA	GGGGAATTCG	AATCCCCGCT	GCCTCCTTGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5585	AAGAGAGATG	TCCTAAACCA	CTAGACGATG	GGGGCCcGCT	TGACCAACGG
NT	5576	AAGAGAGATG	TCCTAAACCA	CTAGACGATG	GGGGCCtGCT	TGACCAACGG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5635	CCATCATACT	ATGATGATAG	TATGATCcGT	TTTTTAAAT	TGTCAATATA
NT	5626	CCATCATACT	ATGATCATAG	TATGATCaGT	TTTTTGAAAT	TGTCAATATA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5685	ATCAAATGAT	TCTAgCCGAG	GGATCTTTCC	CCCCTTCAGA	ATTGCATAGA
NT	5676	ATCGAATGAT	TCTAtCCGAG	GGATCTTTCC	CCCTTTCAGA	ATTGCATAGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5735	ATTgtTTTTT	ATTCGTCATT	GACGAATTAT	TCATTAGAAT	CGaCATTAGA
NT	5726	ATT--TTTTT	ATTCGTCATT	GATGAATTAT	TCATTAGAAT	CGcCATTAGA
		***	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5785	AATCTAGTAG	TAGTATTTTT	TTT-----	AATTATTTCA	ATTGAATTTA
NT	5774	AATCTAGTAG	TAGTATTTTT	TTTtttttgg	AATTATTTCA	ATTGAATTC
		*****	*****	***	*****	*****
LEpIJB1	5828	TTTCt-----	-----	-----	-----	-----
NT	5824	TTTCgattat	tttagtttag	attatttagt	atttagaatt	ttcttttttt
		****				
LEpIJB1	5833	-----	-----	-----	-----	-----
NT	5874	attataaata	aaaaaaaaaat	taataaatac	aaaaaataga	aataataagg
LEpIJB1	5833	-----	-----	-----	-----	-----
NT	5924	aagagtagga	tttttgcagg	gaatgattgg	tccgtcagaa	aaggaaaaag
LEpIJB1	5833	-----	-----	-----	-----	-----
NT	5974	gtgtgaaatt	ctatttcttt	cactttcatt	tgattcattg	ttaagacgag
LEpIJB1	5833	-----	-----	-----	-----	-----
NT	6024	atatccttat	ctccctccca	ccaagacagg	aaattaacaa	acgagaaatc
LEpIJB1	5833	-----	-----	-----	-----	-----
NT	6074	tagtaagcgg	gatcaagaag	aaaattcttt	tttctccaag	aatttagttc
LEpIJB1	5833	-----	-----	-----	-----	-----
NT	6124	aggagacaag	tagaatctct	tcattccatg	attcgatgaa	atatcttgaa

LEpIJB1	5833	-----	-----	-----	-----	-----
NT	6174	ttttatgttg	aattgctagg	tgtatgtaca	tgtatcaatc	aagtgaattt
LEpIJB1	5833	-----	-----	-----	-----AT	TCGAGTCGGT
NT	6224	tgttctggtg	ggatcaattc	aataaaagaa	aaaaagcaAT	TCGAGTCGGT
					**	*****
LEpIJB1	5845	CTTGAAACAA	TTCATTGCAT	TTTCTCCTAt	ACTTCCTAGG	TAAATCCATT
NT	6274	CTTGAAACAA	TTCATTGCAT	TTTCTCCTAg	ACTTCCTAGG	TAAATCCATT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5895	TTATTATTCA	ACAATGAGCC	ACTAGACACT	ATGTATCTAC	TGCACGTACT
NT	6324	TTATTATTCA	ACAATGAGCC	ACTAGACACT	ATGTATCTAC	TGCATGTACT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	5945	TAaTGCATAT	ATACTTATGT	TTATAATATA	AGTACATATA	GATATTTaAT
NT	6374	TA-TGCATAT	ATACTTATGT	TTATAATATA	TGTACCTATA	GATATTTtAT
		** *****	*****	*****	*****	***** **
LEpIJB1	5995	CCACATAGTG	AATAATTCCG	GAATTAAATA	AAAAAGGCC	TTTTAACTCA
NT	6423	CCACATAGTG	AATAATTCCG	GAATTAAATC	AAAAAGGCC	TTTTAACTCA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6045	GTGGTAGAGT	AACGCCATGG	TAAGGCGTAA	GTCATCGGTT	CAAATCCGAT
NT	6473	GTGGTAGAGT	AACGCCATGG	TAAGGCGTAA	GTCATCGGTT	CAAATCCGAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6095	AAGGGGCTTT	GTAAAACcCC	AATCTAGTAT	TCATATTTGA	TGGGAGAATT
NT	6523	AAGGGGCTTT	GTAAAACtCC	AATCTAGTAT	TCATATTTGA	GGGGAGAATT
		*****	***** **	*****	*****	*****
LEpIJB1	6145	TTCTTTTTAT	TTGTAATAAA	AAAAGTAACT	AAGTGGATAA	TACATTATC-
NT	6573	GTATTTTTAT	TTGTAATAAA	AAAAGTAACT	AAGTGGATAA	TACATTATCa
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6194	-----	--ATTATACT	TAGTTATAAA	GTTGAACATT	TGTTTAGTCA
NT	6623	ttataacttaa	ttATTATACT	TAGTTATAAA	GTTGAACATT	TGTTTAGTCA
			*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6232	ATTTTCATTA	GTATGAATTT	AGGAATAATG	AAAAGTCACT	TCTTGAA-TC
NT	6673	ATTTTCATTA	TTATGAATTT	CTGAATAATG	AAAAGTCACT	TCTTGAAcTC
		*****	*****	*****	*****	***** **
LEpIJB1	6281	ACCGAATATT	CCTATTTTCC	ATTATACCAA	CCAAATCgAT	TCGAAAGGTT
NT	6723	ACCGAATATT	CCTATTTTCC	ATTATACCAA	CCAAATCcAT	TCGAAAGGTT
		*****	*****	*****	***** **	*****
LEpIJB1	6331	AGAAATCAAC	AAAAGAAAAA	GTAAaaagta	aGTGGACCTG	ACCTATTGAA
NT	6773	AGAAATCAAC	AAAAGAAAAA	GTAA-----	-GTGGACCTG	ACCTATTGAA
		*****	*****	****	*****	*****

LEpIJB1	6381	TCATGACTAT	ATCCGCTATT	CTGATATTAA	AATTCGATAG	AGATGAAATT
NT	6816	TCATGACTAT	ATCCGCTATT	CTGATATTAA	AATTCGATAG	AGATGAAATT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6431	GGAGCAGTTG	A--TTTTTTT	TATTTTCATTT	TTTTGTTTTG	GAcTCCACAA
NT	6866	GGAGCAGTTG	AttTTTTTTTT	AATTTTCATTT	TTTTGTTTTG	GAtTCCACAA
		*****	* *****	*****	*****	** *****
LEpIJB1	6479	GAATTTGTCG	ATATTTCCGA	TTAAATCTTC	TTGTTACTAG	ATTTTCTATA
NT	6916	GAATTTGTCG	ATATTTCCGA	TTAAATCTTC	TTGTTACTAG	ATTTTCTATA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6529	GGAAAAATTA	TCGGAATAAt	TTGTTATTCC	TTTCCTCTAC	AGAGAAACCT
NT	6966	GGAAAAATTA	TAGGAATAAa	TTGTTATTCC	TTTCCTCTAC	AGAGAAACCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6579	TTCTTCCAAG	gCACACCATA	AGAGCCATTT	ATTATtTTTC	TTTGATTCTA
NT	7016	TTCTTCCAAG	tCACACCATA	AGAGCCATTT	ATTATcTTTC	TTTGATTCCA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6629	GATCAAAGAT	TAATTTTCATC	taTAt-----	-----	TATATATTAA
NT	7066	GATCAAAGAT	TAATTTTCATC	atTAatttct	atctagatta	TATATCTATA
		*****	*****	**		*****
LEpIJB1	6664	TTATATTAAG	TAGATTGTAg	attGATTTTCG	ATGTATATCT	ATCAGATCaT
NT	7116	TTATATTAAG	TAGATTGTAg	---GATTTTCG	ATGTATATCT	ATCAGATCgT
		*****	*****	*****	*****	***** *
LEpIJB1	6714	GGCTTCATGT	ACCAAATATT	TCAATATCGT	TGCATCCGGT	ATTTTTGTTT
NT	7162	GGCTTCATGT	ACCAAATATT	TCAATATCGT	TGCATCCGGT	ATTTTTGTTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6764	TGTTCCACCA	GTGTGATGAA	GAATAGATCc	CGAGAAAGAG	ACTTTTCATTT
NT	7212	TGTTCCAACA	GTGTGATGAA	GAATAGATC-	CGAGAAAGAG	ACTTTTCATTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6814	CCAGTCTCCT	ATTTA-----	--TTTATTGA	ATTTTAGATT	TTCTAAAAGG
NT	7261	TCAGTCTCTT	ATTTAAtttta	ttTTTATTGA	ATTTTCGATT	TTCTAAAAGG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6857	AAAA-----	-----ATA	GTAGATTATC	TCTTTTTTCTA	ACAGATAAAA
NT	7311	AAAAAtctaaa	aggaaaaATA	GTAGATTATC	TCTTTTTTCTA	ACAGATAAAA
		****	***	*****	*****	*****
LEpIJB1	6894	GAATCTAAAA	ATCAATATTC	GATCGAACTG	TCTTTTTTCC	TTCGATCCGg
NT	7361	GAATCTAAAA	ATAAATATTC	GATCGAACTG	TCTTTTTTCC	TTCGATCCGt
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	6944	GGAAAGATAT	ACTCTGGGGT	TTTCGATTTA	TTTATATGAA	GTATGAAGGA
NT	7411	GGAAAGATAT	ACTCTGGGGT	TTTAGATTTA	TTTATATGAA	GTATGAAGGA
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB1 NT	6994 7461	AAGGGACCGT AAGGGATCGC *****	TTGGTCCTTG TTGGTCCTTG *****	AAGAGTTCTT AAGAGTTCTT *****	TCAAAACAAG TCAAAACAAA *****	GGATTGATTG GGATTGATTG *****
LEpIJB1 NT	7044 7511	AATTATCTTA AATTGTCTTA *****	TTAAGACAAT TTAGGACAAT *****	TcATGGTTCA TaATGGTTCA * *****	TATGCTTAGT TATGCTTAGT *****	CAGAAGGAAT CAGAAGGAAT *****
LEpIJB1 NT	7094 7561	AATCCAATGG AATCCAATGG *****	AGTTCATGGA AGTTCATGGA *****	TTTACCTAGG TTTACCTAGG *****	TCAGTTTATG TCAGTTTATG *****	GGCTAATCAA GGCTAATCAA *****
LEpIJB1 NT	7144 7611	TAAAGgATTT TAAAGcATTT **** *	TTATCTTCGA TTATCTTCGA *****	AACCCATTGG AACCCATTGG *****	GAAGGGCAGT AAAGGGCAGT *****	GCAAGAGAAA GCAAGAGAAA *****
LEpIJB1 NT	7194 7661	TCAGACAAAA TCATACAAAA *****	ATGATCGGAT ATGATCGAAT *****	C'TTGGGACGC C'TTCGGACGC *****	CCCGAAAAAG CCCGAAAAAG *****	ATATGAGGTG ATATGAGGTG *****
LEpIJB1 NT	7244 7711	CTCGGAAATG CTCGGAAATG *****	GTCGAAGTAG GTCGAAGTAG *****	TTGAATAGGA TTGAATAGGA *****	GGATCACTAT GGATCACTAT *****	GA CTATAGCC GA CTATAGCC *****
LEpIJB1 NT	7294 7761	ATTGGTAAGT C'TTGGTAAGT *****	TTACCAAAGA TTACCAAAGA *****	CGAAAATGAT CGAAAATGAT *****	TTATTTGATA TTATTTGATA *****	TTATGGATGA TTATGGATGA *****
LEpIJB1 NT	7344 7811	CTGGTTACGG CTGGTTACGG *****	AGGGACCGTT AGGGACCGTT *****	TCGTTTTTGT TCGTTTTTGT *****	AGGCTGGTCC AGGCTGGTCC *****	GGTCTATTGC GGTCTATTGC *****
LEpIJB1 NT	7394 7861	TCTTTCCCTTG TCTTTCCCTTG *****	TGCCATATTTC TGCCATATTTC *****	GCTGTAGGGG GCTGTAGGGG *****	GTTGGTTTAC GTTGGTTTAC *****	AGGTACAACC AGGTACAACC *****
LEpIJB1 NT	7444 7911	TTTGTAACCT TTTGTAACCT *****	CATGGTATAC CATGGTATAC *****	CCATGGATTG CCATGGATTG *****	GCCAGTTCTT GCCAGTTCTT *****	ATTTGGAAGG ATTTGGAAGG *****
LEpIJB1 NT	7494 7961	CTGCAATTTTC CTGCAATTTTC *****	TTAACTGCCG TTAACTGCCG *****	CGGTTTCTAC CGGTTTCTAC *****	TCCTGCTAAT TCCTGCTAAT *****	AGTTTAGCAC AGTTTAGCAC *****
LEpIJB1 NT	7544 8011	ATTCGTTGTT ATTCGTTGTT *****	GTTACTATGG GTTACTATGG *****	GGTCCTGAAG GGTCCTGAAG *****	CACAAGGAGA CACAAGGAGA *****	TTTTACTCGT TTTTACTCGT *****
LEpIJB1 NT	7594 8061	TGGTGTCAAT TGGTGTCAAT *****	TGGGGGGTCT TGGGGGGTCT *****	GTGGACTTTT GTGGACTTTT *****	GTTGCTCTCC GTTGCTCTCC *****	ATGGAGCTTT ATGGAGCTTT *****

LEpIJB1	7644	TGGCCTAATA	GGTTTCATGT	TACGTCAATT	CGAGCTTGCT	CGATCTGTTC
NT	8111	TGGCCTAATA	GGTTTCATGT	TACGTCAATT	CGAGCTTGCT	CGATCTGTTC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	7694	AATTGAGACC	TTATAATGCA	ATCGCATTCT	CTGGTCCAAT	TGCTGTTTTT
NT	8161	AATTGAGACC	TTATAATGCA	ATCGCATTCT	CTGGTCCAAT	TGCTGTTTTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	7744	GTTTCTGTAT	TTCTGATTTA	TCCACTAGGT	CAGTCTGGTT	GGTTCTTTGC
NT	8211	GTTTCTGTAT	TTCTGATTTA	TCCACTGGGT	CAGTCTGGTT	GGTTCTTTGC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	7794	ACCTAGTTTT	GGTGTAGCAG	CTATATTTTCG	ATTCATCCTA	TTTTTTCAAG
NT	8261	ACCTAGTTTT	GGTGTAGCAG	CTATATTTTCG	ATTCATCCTC	TTTTTTCAAG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	7844	GGTTTCATAA	TTGGACCTTG	AACCCcTTTC	ATATGATGGG	AGTTGCCGGT
NT	8311	GGTTTCATAA	TTGGACCTTG	AACCCaTTTC	ATATGATGGG	AGTTGCCGGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	7894	GTATTGGGgG	CTGCTTTGCT	ATGCGCCATT	CATGGTGCTA	CCGTAGAAAA
NT	8361	GTATTGGGcG	CTGCTTTGCT	ATGCGCCATT	CATGGTGCTA	CCGTAGAAAA
		***** *	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	7944	TACTTTATTT	GAAGACGGTG	ATGGTGCAAA	TACATTCGGT	GCTTTTAACC
NT	8411	TACTTTATTT	GAAGACGGTG	ATGGTGCAAA	TACATTCGGT	GCTTTTAACC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	7994	CAACTCAAGC	CGAAGAAACT	TATTCAATGG	TCACCGCTAA	CCGCTTTTGG
NT	8461	CAACTCAAGC	CGAAGAAACT	TATTCAATGG	TCACCGCTAA	CCGCTTTTGG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8044	TCCCAAATCT	TTGGGGTTGC	TTTTTTCCAAT	AAACGTTGGT	TACATTTCTT
NT	8511	TCCCAAATCT	TTGGGGTTGC	TTTTTTCCAAT	AAACGTTGGT	TACATTTCTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8094	TATGTTATTT	GTACCAGTGA	CCGGTTTATG	GATGAGTGCT	CTTGGAGTAG
NT	8561	TATGTTATTT	GTACCAGTAA	CCGGTTTATG	GATGAGTGCT	CTTGGAGTAG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8144	TCGGTCTAGC	TCTGAACCTA	CGTGCCTATG	ACTTCGTTTC	TCAGGAAATT
NT	8611	TCGGTCTAGC	CCTGAACCTA	CGTGCCTATG	ACTTCGTTTC	TCAGGAAATT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8194	CGCGCAGCGG	AAGATCCTGA	ATTTGAGACT	TTCTACACCA	AAAATATTCT
NT	8661	CGCGCAGCGG	AAGATCCTGA	ATTTGAGACT	TTCTACACCA	AAAATATTCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8244	CTTAAACGAA	GGTATTCGCG	CTTGGATGGC	GGCTCAAGAT	CAGCCTCATG
NT	8711	CTTAAACGAA	GGTATTCGCG	CTTGGATGGC	GGCTCAAGAT	CAGCCTCATG
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB1	8294	AAAACCTTAT	ATTCCCTGAG	GAGGTTCTAC	CACGTGGAAA	CGCTCTTTAA
NT	8761	AAAACCTTAT	ATTCCCTGAG	GAGGTTCTAC	CACGTGGAAA	CGCTCTTTAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8344	TGGAACCTTA	GCCTTAGCTG	GTCGTGACCA	AGAAACCACa	GGTTTCGCTT
NT	8811	TGGAACCTTA	GCCTTAGCTG	GTCGTGACCA	AGAAACCACt	GGTTTCGCTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8394	GGTGGGCCGG	GAATGCCCGA	CTTATCAATc	TATCCGGTAA	ACTACTAGGG
NT	8861	GGTGGGCCGG	GAATGCCCGA	CTTATCAATt	TATCCGGTAA	ACTACTAGGG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8444	GCTCATGTAG	CCCATGCTGG	ATTAATCGTA	TTCTGGGCCG	GAGCAATGAA
NT	8911	GCTCATGTAG	CCCATGCTGG	ATTAATCGTA	TTCTGGGCCG	GAGCAATGAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8494	CCTATTTGAA	GTGGCCCAT	TCGTACCCGA	GAAGCCTATG	TATGAACAAG
NT	8961	CCTATTTGAA	GTGGCCCAT	TCGTACCAGA	GAAGCCTATG	TATGAACAAG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8544	GATTGATTTT	ACTTCCCCAC	CTAGCTACTC	TAGGTTGGGG	GGTAGGCCCT
NT	9011	GATTAATTTT	ACTTCCCCAC	CTAGCTACTC	TAGGTTGGGG	GGTAGGCCCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8594	GGGGGAGAAG	TTATAGATAC	CTTTCATAC	TTTGTATCTG	GAGTACTTCA
NT	9061	GGGGGAGAAG	TTATAGACAC	CTTTCATAC	TTTGTATCTG	GAGTACTTCA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB1	8644	TTTAATTTCT	TCTGCAG			
NT	9111	TTTAATTTCT	TCTGCAG	35848		
		*****	*****			

ANEXO B:

Alinhamento do fragmento cloroplastidial de tomate de 6.366 pb com o respectivo fragmento do genoma cloroplastidial de tabaco

Formato DIALIGN 2.1
*****
Burkhard Morgenstern (1999)

Sequências Alinhadas: tamanho (bases):

```
=====
1)      LEpIJB2      6366
2)      NT           6375
```

Somente letras maiúsculas devem ser consideradas alinhadas
Asteriscos confirmam identidade

Alinhamento:

```
=====

LEpIJB2      1      GTCGACCGCT AGAACTACTG GTTTTAAAGC CCGAAATAAA TAGGCTTACT
NT           70781  GTCGACCGCT AGAACTACTG GTTTTAAAGC CCGAAATAAA TAGGCTTACT
                *****

LEpIJB2      51      TTTTCTTCAC TTGAATCATA ATTACAAGAA tctagatttg agtgaatCTA
NT           +51    TTTTCTTCAC TTGAATCATA ATTACAAGAA -----TCTA
                *****

LEpIJB2      101     GATTTGAGTA TCGTGTCCTA AGAAAAAAa- TGAATCGGAA AAAAAGAAAT
NT           +85     GATTTGAGTA TCGTGTCGTA AGAAAAAAa TGAATCGGAA AAAAAGATTT
                *****

LEpIJB2      150     CTGTTTTTAT TGAATTGAAC GTGTTTCATTC ATTTTACTA CTTTAGTATA
NT           +135    CTTTTTTTAT TGAATTGAAC GTGTTTCATTC ATTTTACTA CTTTAGCATA
                *****

LEpIJB2      200     TTTTCTCATA ctAATTTCTA CTCTACCTTC CCGGAGTTCA TTCTCCGGGt
NT           +185    TTTTCTCATA gaAATTTCTA CTCTACCTTC CCGGAGTTCA TTCTCCGGGg
                *****

LEpIJB2      250     AACTCCATTT AAATTATTCT GGTGGATTCT TTCCAATCTA CTTCTTTTAT
NT           +235    AACTCCATTT AAATTATTCT GGTGGATTCT TTCCAATCTA CTTCTTTTAT
                *****

LEpIJB2      300     GATTTCGTTC GAAATCATAT AAAGACAATT CCTATTTGAT ATAGCTATTT
NT           +285    GATTTCGTTC GAAATCATAT AAAGACAATT CCTATTTGAT ATAGCTATTT
                *****
```

LEpIJB2	350	GTGCAAGTAT	TTTACGGTTA	AGAAGCAACT	GTCTCTTGTA	CAGATCGTGT
NT	+335	GTGCAAGTAT	TTTACGGTTA	AGAAGCAACT	GTCTCTTGTA	CAGATCGTGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	400	ATTAATCTAC	TATAACTATA	GGATACTCCC	CTTTCGCGAA	TTACTGCGTT
NT	+385	ATTAATCTAC	TATAACTATA	GGATACTCCC	CTTTCGCGAA	TTACTGCGTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	450	TATCCTAGTG	ATCCACAAAC	GACGAAAATC	TCTCTTTTTC	CTATCCCTAT
NT	+435	TATCCGAGTG	ATCCACAAAC	GACGAAAATC	TCTCTTTTTC	CTATCCCTAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	500	CCCGATGAGC	CGAAACTAAA	GCTCTTATTT	TCTGTTGAGT	AATAGTTCTA
NT	+485	CCCGATGAGC	CGAAACTAAA	GCTCTTATTT	TCTGTTGAGT	AATAGTTCTA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	550	GTAAGCCTTG	AATGAGCCCC	tCGAAAGCTT	GATGCAAATA	AACGAATTTT
NT	+535	GTAAGCCTTG	AATGAGCCCC	cCGAAAGCTT	GATGCAAATA	AACGAATTTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	600	TGTTCTACGT	CTCCGAGCTA	TATATCCCCG	TTTAATTCTG	GTCATTGAAT
NT	+585	TGTTCTACGT	CTCCGAGCTA	TATATCCCCG	TTTAATTCTG	GTCATTGAAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	650	AAATGAAACT	TTGACGAATA	ACTAATtGAT	TGCCTTTCTT	TCAGTTATTC
NT	+635	AAATGAAACT	TTGACGAATA	ACTAATcGAT	TGCCTTTCTT	TCAGTTATTC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	700	TTTTCCCCCT	TCCTAGTCTA	TTAATAACAA	AACGGATTTT	TCCAATGTAT
NT	+685	TTTTCCCCCT	TCCTAGTCTA	TTAATAACAA	AACGGATTTT	TCCAATGTAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	750	AAAATcAAAA	TTCCAATGGC	TTTGGCTACT	CTAACCTTCC	CGACCACGA-
NT	+735	AAAATaAAAA	TTCCAATGGC	TTTGGCTACT	CTAACCTTCC	CGACCACGAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	799	-----	-TTTTTTTTT	AGGTATTTCA	CTGCGAAATA	AGAcAGAACT
NT	+785	tttttttttt	tTTTTTTTTT	AGGTATTTCA	CTGCGAAATA	AGAAAGAAAT
			*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	838	AAGAAATTGT	ATTTTCCTAG	GTATCAAAAA	TaTAGTAAAT	AAAAGAAATA
NT	+835	AAAAAATTGT	ATTTTCCTAG	GTATCAAAAA	TcTAGTAAAT	AAAAGAAATC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	888	AAAAAAGAAA	-TAGTGGGTT	CCTTCGTTTC	TATGGTTACT	TCTTAAACGG
NT	+885	AAAAAATAAA	gTAGTGGGTT	CCTTCGTTTC	TATGGTTACT	TCTTAAACGG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	937	TGAGGTCTTC	TCTATACACC	GGAGCCTTTA	CTTTATACTT	TAAttTTTAA
NT	+935	TGAGGTCTTC	TCTATACACC	GGAGCCTTTA	CTTTATACTT	TAA--TTTAA
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB2	987	TATTTAATCA	ACTAATTGAT	GTTATTGGGA	ACTTGTATAG	TTCACACGCT
NT	+983	TATTTAATCA	ACTAATTGAT	GTTATTGGGA	ACTTGTATAG	TTCACACTCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1037	TTGGCTCTAC	CCATGAATTG	TCCAGTAATA	GGTCTTTCAC	AATCAGATCT
NT	+1033	TTGGCTCTAC	CCATGAATTA	TCCAGTAATA	GGTCTTTCAC	AATCAGATCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1087	ACCTATACAG	TAA-CGGTAT	TTAATTATGA	AAGTTTGCTG	GGTAGCTGAC
NT	+1083	ACCTATACAG	TAAgCGGTAT	TTAATTATGA	AAGTTTGCTG	GGTAGCTGAC
		*****	*** *****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1136	CCTCTTAGTC	CGTTCCTTGCC	AGATTGGGAG	CCTACCTAAT	CTTTATGTTT
NT	+1133	CCTCTTAGTC	CGTTCCTTGCC	AGATTGGGAG	CCTGCCTAAT	CTTTATGTTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1186	TATGCTTTTT	AAATAAGATT	TCCTCCGCTT	AATGGATAAC	CATTTGTTAC
NT	+1183	TATGCTTTTT	AAATAAGATT	TCCTCCGCTT	AATGGATAAC	CATTTGTTAC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1236	CAATGGAGAA	TTTCTTATCA	TCTtaaattc	agGTGATTGG	ATTTACACCA
NT	+1233	CAATGGAGAA	TTTCTTATCA	TCT-----	--GTGATTGG	ATTTACACCA
		*****	*****	***	*****	*****
LEpIJB2	1286	ACGGAAACCA	TAAACTTCAT	ACACAATagA	GGGGGATATG	GTAGAGTTTT
NT	+1274	ACGGAAACCA	TAAACTTCAT	ACACAAT--A	GAGGGATATG	AGAGAGTTTT
		*****	*****	***** *	*****	*****
LEpIJB2	1336	TTTTTTTATAA	TGgATGGAGT	TCCTTTTTTCC	ATCCTATCCC	ATTCACCGGT
NT	+1322	TTTTAAATAA	TGaATGGAGT	TCCTTCTTCC	ATCCTATCCC	ATTCACCGGT
		*****	** *****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1386	ACTGATCATT	GATACTGTAA	AAGTAGTTTT	CTTGCTTTTTt	GTGCCAGCTC
NT	+1372	ACTGATCATT	GATACTGTAA	AAGTCGTTTT	CTTGCTTTTT-	GTGCCAGCTC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1436	ATGATCTAAA	CGAGTCGCAC	ATACACCCTA	GTACATGTTC	CTCGACGCTG
NT	+1421	ATGATCTAAA	CGAGTCGCAC	ATACACCCTA	GTACATGTTC	CTCGACGCTG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1486	AGGGCACCCC	CGAAGAGCGG	GGGATTTCGT	GACATTTCTG	ATTGGCTGTC
NT	+1471	AGGACAGCCC	CGAAGAGCGG	GGGATTTCGT	GACATTTCTG	ATTGGCTGTC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1536	TTGTATTTCT	AATAAGTTGT	TTAATAGTTG	GCATGTTGAA	TCGTATACAT
NT	+1521	TTGTATTTCT	AATAAGTTGT	TTAATAGTTG	GCATGTTGAA	TCGTATACAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1586	AATATGATGG	GTTGGTTTAG	ATTGATCCTA	ACCGAATGAT	GgTGAATTAC
NT	+1571	AATATGATGG	GTTGGTTTAG	ATTGATCCTA	ACCGAATGAT	GaTGAATTAC
		*****	*****	*****	*****	* *****

LEpIJB2	1636	TTCTATTTAA	TAGAATATTC	AATTCGAAGA	TAAAACTCA	AATCATAGAT
NT	+1621	TTCTATTTAA	TAGAATATTC	AATTCGAAGA	TAAAACTCA	AATCACAGAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1686	CTGCGTGAAA	TCCATGTTCT	TTTCcTTGAA	CCGCTACAAA	ATCAACAATT
NT	+1671	TTGCGCGAAA	TCCATGTTAT	TTTCaTTCAA	CCGCTACAAG	ATCAACAATT
		*****	*****	**** *	*****	*****
LEpIJB2	1736	CCATAAGCTT	GGGCTTCTGT	TGCTGACATA	AAAATATCTC	TTTCCATATC
NT	+1721	CCATAAGCTT	GGGCTTCTGT	TGCTGACATA	AAAACATCTC	TTTCCATATC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1786	TTCGtgTATA	ACCCACACGG	GTTGGCCCGT	TTTTTcTgCA	TAAACCCTTG
NT	+1771	TTCGgaTACA	ACCCATAAGG	GTTTCCCCGT	TCTTTgTaCA	TAAACCCTTG
		**** *	*****	*****	***** *	*****
LEpIJB2	1836	TGAGGGTTTC	ACGCAGTTTC	gcCAtTTCTa	tCGCTTCCAG	GACAAATTCTG
NT	+1821	TGAGGGTTTC	ACGCAGTTTC	agCAgTTCTt	cCGCTTCCAG	GACAAATTCTG
		*****	*****	** ****	*****	*****
LEpIJB2	1886	CCTACTTGTG	CCATATAAAA	AccACTAtaA	GGTTCATGTA	TCATTACCCT
NT	+1871	CCTGTTTGTG	CCTCATAAAA	AgaACTAgcA	GGTTGATGGA	TCATTACCCT
		*****	*****	* **** *	*****	*****
LEpIJB2	1936	GATGATATAA	CAAAATAAAA	GCTTCCCCTA	TCTCGCATGA	TAAAGCAAAG
NT	+1921	GATGATATAA	CAAAATAAAA	GCTTCCCCTA	TCTCGCATGA	TAAAGCAAAG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	1986	AAAAAAGAAA	GATAAAGAAT	AGAAAAAAGA	TAGAATTGAA	CAACCGTACA
NT	+1971	AGAAAAGAAA	GATAAAGAAT	AGAAAAAAGA	TAGAATTGAA	CAACCGTACA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	2036	GGCATCTTTT	GTGCATACGG	CTCTACAAGA	AAATTGACCc	CC-----
NT	+2021	GGCATCTTTT	GTGCATACGG	CTCTACAAGA	AAATTGACCt	CCaactacttt
		*****	*****	*****	*****	**
LEpIJB2	2078	--ATTGAAGA	AAGAGAAAAA	TAGAATCTAT	CAGACTCAGA	TGGGTAAATA
NT	+2071	ctATTGAAGA	AAGAGAAAAA	TAGAATCTAT	CAGACTCAGA	TGGGTAAATG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	2126	ATCAAATTGC	CATCCTTCCT	TTCGGAGGAA	TTcAAAAATA	CTATGATGGC
NT	+2121	ATCAAATTGC	CATCCTTCCT	TTCGGAGGAG	TTaAAAAATA	CTATGATGGC
		*****	*****	*****	** *	*****
LEpIJB2	2176	TCCGTTGCTT	TATATGTTTA	TTTTTTCTTT	-----TTTTT	GTCTGTGATT
NT	+2171	TCCGTTGCTT	TATATGTTTA	TTTTTTCTTT	tttttTTTTT	GTCTGTGATT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	2221	CAGCAATCCC	AAAGTTTCTT	TTTAATCCGA	TCAAATAAGG	AAAAAtTa--
NT	+2221	CAGCAATCCC	AAAGTTTCTT	TTTAATCCGA	TCAAATAAGG	AAAAAaTctt
		*****	*****	*****	*****	***** *

LepIJB2	2269	----TTTTTT	TTTCGTACTC	TTTCATAACA	TAAATATTGT	TAAGAACTCT
NT	+2271	ttttTTTTTT	TTTCGTACTC	TTTCATAACA	TAAATATTGT	TAAGAACTCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LepIJB2	2315	CCGGCATGAA	AAC-AAAAAG	TTTGTGACGC	TGAACTGAAC	TCCCGATAtA
NT	+2321	CCGGCATGAA	AACaAAAAAG	TTTGTGACGC	TGAACTGAAC	TCCCGATAgA
		*****	*** *****	*****	*****	***** *
LepIJB2	2364	TAATAGAAAA	TCGGAAATAC	CCCTTATCTC	ATACTACTCT	CTCGATACAG
NT	+2371	TAAGAGAAAA	TCGGAAATAC	CCCTTATCTC	ATACTACTCT	CTCGATACAG
		*****	*****	*****	*****	*****
LepIJB2	2414	AATCTAATGT	TTTGAAAAAA	AAAaaCAATA	CAAAAATTTT	TCATATCGAA
NT	+2421	AATCTAATGT	TTTGAAAAAA	AAA--CAATA	CAAAAATTTT	TCATATCGAA
		*****	*****	*** *****	*****	*****
LepIJB2	2464	TTCGAAGTGC	CATGCTATTA	TTACTTAGTA	TTCATATGGC	GAAGGCATAG
NT	+2469	TTCGAAGTGC	CATGCTATTA	TTACTTAGTA	TTCATATGGC	GAAGGCATAG
		*****	*****	*****	*****	*****
LepIJB2	2514	TCTTCTTTTT	TTTCTCAAAT	AAAAACCTCA	TTGGCGCCAA	GCGTGAGGGA
NT	+2519	TCTTCTTTTT	TCTCTCAAAT	AAAAACCTCA	TTGGCGCCAA	GCGTGAGGGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LepIJB2	2564	ATGCTATACG	TTTGGTAAGT	TGTCCTCCGG	CCAGGATAAA	AGATCCCATT
NT	+2569	ATGCTAGACG	TTTGGTAATT	TCTCCTCCGA	CCAGGATAAA	AGATCCCATT
		*****	*****	*****	*****	*****
LepIJB2	2614	GAAGCAGCTA	ATCCTAGGCA	TATTGTATGG	ATATCTGGTC	GCACAAATTG
NT	+2619	GAAGCGGCTA	ATCCCATGCA	TATTGTATGG	ACATCTGGTC	GCACAAATTG
		*****	*****	*****	*****	*****
LepIJB2	2664	CATAGTATCA	TAAATgGcGgA	tCCCAGGTAT	TACCCAGCCC	CCAGGAGAGT
NT	+2669	CATAGTATCA	TAAATaGCcA	cCCCAGGTAT	TACCCAGCCC	CCAGGAGAGT
		*****	***** ** *	*****	*****	*****
LepIJB2	2714	TTAcAAACAA	ATACAGGTCT	TTGTTCTCAT	CCTCCATACT	GAGATAcAaC
NT	+2719	TTAtAAACAA	ATACAGATCT	TTGGTCTCAT	CCTCGATACT	GAGATAtAcC
		*** *****	*****	*****	*****	***** * *
LepIJB2	2764	ATAAGACCAA	TAAGTTGATT	CGAAAGCTCG	GTACCAAtCc	CTTGGCCTAA
NT	+2769	ATAAGACCAA	TAAGTTGATT	CGAAATCTCG	CTATCAAcCt	CTTGGCCTAA
		*****	*****	*****	***** *	*****
LepIJB2	2814	AAAAAGTAAT	CTTTCTCGAT	AAAGTCGGTT	GATTAGGGTA	AAATTGTATC
NT	+2819	AAAAAGTAAT	CTTTCTCGAT	AAAGTCGGTT	GATTAGGGTA	AAATTGTATC
		*****	*****	*****	*****	*****
LepIJB2	2864	CCTTAGGAAC	CGTACATGCG	CCTTTTGATG	CATACGGTTC	AAAAAAA---
NT	+2869	CCTTAGGAAC	CGTACATGCG	CCTTTTGATG	CATACGGTTC	AAAAAAAaaa
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB2	2913	TtGTGAATCA	ATGTAGAGAT	TCCAGTCCTC	TTTCTTTTTT	TCTAcAAgGG
NT	+2919	TgGTGAATCA	ATGTATAGAT	TCCAGTCCTC	TTTCTTTTTT	TCTAgAAaGG
		* *****	*****	*****	*****	**** * *
LEpIJB2	2961	TTCTTTCTTA	CTTCTAACGA	AAGGGCTTTT	CTTCGATTTT	TCAATAAAGA
NT	+2969	TTCTTTCTTA	CTTCTAACGA	AAGGGCTTTT	CTTCGATTTT	TTAATAAAGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3011	CGAGTTTTTA	CTCCTTTTTG	ATATTTTct-	-----ATTA	TAAAATTCGA
NT	+3019	CGAGTTTTGA	CTCCTTTTTT	ATATTTTCga	ttttccATTA	TAAAATTTGA
		*****	*****	*****	****	*****
LEpIJB2	3054	AGTTATAAGA	AAGGGTCATT	AAACTTATCG	AATTAACCTC	TCATTGATGT
NT	+3069	AGTTATAAGA	AAGGGTCATT	AAACTTATCG	AATTAACCTC	TCATTGATGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3104	ATTCTTTCAT	CGAGATTTAA	TCCAAACCGC	GATGGTATTT	TCTTGTTCCCT
NT	+3119	ATTCTTTCAT	CGAGATTTAA	TCCAAACCGC	GATGGTATTT	TCTTGTTCCCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3154	GAATGGGTCT	GTTTCATCTT	TTTAGGTTTA	TGCTCTACTC	CGGGTAAAGA
NT	+3169	GAATGGGTCT	GTTTCATCTT	TTTAGGTTTA	TGCTCTACTC	CGGGTAAAGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3204	TCCGCCCGAT	TTGGATTTGT	ACATATAGGA	CAAATGCTCC	CATTACCATT
NT	+3219	TCCGCCCGAT	TTGGATTTGT	ACATATAGGA	CAAATGCTCC	CATTACCATT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3254	TCTTTTTGTA	TTTt tt TTTT	TTTTTTTTCAA	TTCATTTTAT	ACAAGTATTT
NT	+3269	TCTTTTTGTA	TTTc--TTTT	TTTTTTTTCAA	TTCATTTTAT	ACAAGTATTT
		*****	*** *	*****	*****	*****
LEpIJB2	3304	aTTAGAGTTG	AGATAACTTT	GCTTGACAAT	TAGGATCTCT	TTACAAAGAA
NT	+3317	cTTAGAGTTG	AGATAACTTT	GCTTGACAAT	TAGGATCTCT	TTACAAAGAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3354	AAAATATGAA	TAGCAATCAT	AGATATCTTA	Catagatato	ttaccaATCC
NT	+3367	AAAATATGAA	TAGCAATCAT	AGATATCTTA	C-----	----CAATCC
		*****	*****	*****	*	*****
LEpIJB2	3404	AATTGGGTTT	TTTCTAAACG	GAGCCTGGAT	ACTTCATTTA	TTTAGTCCAA
NT	+3404	AATTGGGTTT	TTTCTAAACG	GAGCCTGGAT	ACTTCATTTT	TTTAGTCCAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3454	CCAAGCCAAC	CATAAATTA-	-----	---TTCTAAT	TGATAATAGT
NT	+3454	CCAAGCCAAC	CATAAATTat	tctaattgaa	tttTTCTAAT	TGATAATAGT
		*****	*****		*****	*****
LEpIJB2	3490	AATATGAATC	CCCTCAAAAA	TGGATCTAAT	TGCACCTCAC	GCTCCAAATT
NT	+3504	AATATGAATC	CCCTCAAAAA	TGGATCTAAT	TGCACCTCAC	GCTCCAAATT
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB2	3540	TTTGATGATT	cAATTTATCT	TTCTTGGGCG	AAACGGGGGA	TATCTCGATC
NT	+3554	TTTGATGATT	aAATTTATCT	TTCTTGGGTG	AAACGGGGGA	TATCTCGATC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3590	GGGGGAGAGA	ACGGGGAAAT	ACCATATGAC	CCAATATATC	TGACAAGTCG
NT	+3604	GGGGGAGAGA	ACGGGGAAAT	ACCATATGAC	CCAATATATC	TGACAAGTCG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3640	CACTATATGT	CAACCCAAGA	TGaAatTgga	TCTCCAGGAT	TTCGGAATAC
NT	+3654	CACTATACGT	CAACCCAAGA	TGcAtcTtcc	TCTCCAGGAC	TTCGGAAGG
		*****	*****	** * *	*****	*****
LEpIJB2	3690	AACCTCTTGA	ACACCAATAG	GCATTAAATG	AAAGAACGAA	TTAAATACTA
NT	+3704	GACTTTTGGG	ACACCAATAG	GCATTAAATG	AAAGAAAGAA	CTAAATACTA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3740	TATTTCACTT	TGAGGTGGAA	ACGTAACAAT	TTTTTTTATT	GTCTTTATAA
NT	+3754	TATTTCACTT	TGAGGTGGAA	ACGTAACAAT	TTTTTTTATT	GTCTTTATAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3790	TATgaATATT	GGTTTTTATC	GTATTTCTTT	TATCCATAGA	TTcTcAAAAT
NT	+3804	TATtcATATT	GGTTTTTATC	GTATTTATTT	TATCCATAGA	TTaTaAAAAT
		*** *****	*****	*****	*****	** * *****
LEpIJB2	3840	TCATAAAGAA	AGACAGAATG	AATAAACTCA	AATTATTACG	AATAGGTCTT
NT	+3854	TCATAAAGAA	AGACAGAATG	AATAAACTCA	AATTATTACG	AATAGGTCTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3890	TCTAATGATA	AATAAGTATG	GACTCATTCG	CTCATAGAAA	ATGGGATCAA
NT	+3904	TCTAATGATA	AATAAGTATG	GACTCATTCG	CTCATAGAAA	ATGGGATCAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3940	CTCCCCCATT	GCGTATTGGT	ACTTATCGAG	TATAGAATAA	ATCTGCTTCT
NT	+3954	CTCCCCCATT	GCGTATTGGT	ACTTATCGAG	TATAGAATAA	ATCTGCTTCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	3990	CTTTGTTCCCT	ACGAACAGAA	TTGTTCCATT	ATTACCAACA	GAATAGAA-A
NT	+4004	CTTTGTTCCCT	ACGAACAGAA	TTGTTCCATT	ATTACCAACA	GAATAGAAcA
		*****	*****	*****	*****	***** *
LEpIJB2	4039	CCCTTGTTTCG	GAAATAAATTG	ACTCAACAAG	AGTGGTCCAT	AGGATAGTCA
NT	+4054	CCCTTGTTTCG	GAAATAAATCG	ACTGAACAAG	AGTGGTCCAT	AGGATAGTCA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4089	TATTATAGTC	TTTTCCAATG	CAATAAAGTT	ACGTAGTGTT	CATTTATCTT
NT	+4104	TATTATAGTC	TTTTCCAATG	CAATAAAGTT	ACGTAGTGTC	TATTTATCTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4139	TGATATAAAGG	GGTATTTCCA	TGGGTTTGCC	TTGGTATCGT	GTTCATACCG
NT	+4154	TGATATAAAGG	GGTATTTCCA	TGGGTTTGCC	TTGGTATCGT	GTTCATACCG
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB2	4189	TTGTATTGAA	TGATCCCGGT	CGGTTGCTTT	CTGTTCATAT	AATGCATACA
NT	+4204	TTGTATTGAA	TGATCCCGGT	CGGTTGCTTT	CTGTTCATAT	AATGCATACA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4239	GCTCTGGTTG	CTGGTTGGGC	CGGTTTCGATG	GCTCTGTATG	AATTAGCGGT
NT	+4254	GCTCTGGTTG	CTGGTTGGGC	CGGTTTCGATG	GCTCTGTATG	AATTAGCGGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4289	TTTTGATCCT	TCTGATCCTG	TTCTTGATCC	AATGTGGAGA	CAGGGTATGT
NT	+4304	TTTTGATCCT	TCTGATCCTG	TTCTTGATCC	AATGTGGAGA	CAGGGTATGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4339	TCGTTATACC	CTTCATGACT	CGTTTAGGAA	TAACCAATTC	ATGGGGCGGT
NT	+4354	TCGTTATACC	CTTCATGACT	CGTTTAGGAA	TAACCAATTC	ATGGGGCGGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4389	TGGAGTATCA	CAGGGGGGAC	TGTAACGAAT	CCAGGTATTT	GGAGTTACGA
NT	+4404	TGGAGTATCA	CAGGGGGGAC	TGTAACGAAT	CCGGGTATTT	GGAGTTACGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4439	AGGTGTAGCG	GGAGCACATA	TTGTGTTTTT	TGGCTTATGC	TTTTTGGCAG
NT	+4454	AGGTGTAGCT	GGAGCACATA	TTGTGTTTTT	TGGCTTATGC	TTTTTGGCAG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4489	CTATCTGGCA	TTGGGTGTAT	TGGGATCTAG	AAATATTTTG	TGATGAACGT
NT	+4504	CTATCTGGCA	TTGGGTGTAT	TGGGATCTAG	AAATATTTTG	TGATGAACGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4539	ACAGGAAAAC	CcTCTTTTGA	TTTGCCAAAG	ATCTTTGGAA	TTCATTTATT
NT	+4554	ACAGGAAAAC	CtTCTTTTGA	TTTGCCAAAG	ATCTTTGGAA	TTCATTTATT
		*****	* *****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4589	TCTCTCAGGG	GTGGCTTGTT	TTGGTTTTGG	TGCATTTTCA	GTAACAGGCT
NT	+4604	TCTCTCAGGG	GTGGCTTGCT	TTGGTTTTGG	TGCATTTTCA	GTAACAGGCT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4639	TGTATGGTCC	CGGAATATGG	GTGTCCGAtC	CTTATGGACT	AACGGGAAAA
NT	+4654	TGTATGGTCC	CGGAATATGG	GTGTCCGAcC	CTTATGGACT	AACGGGAAAA
		*****	*****	***** *	*****	*****
LEpIJB2	4689	GTACAACCTG	TAAATCCAGC	GTGGGGCGTG	GAAGGTTTTG	ATCCTTTTGT
NT	+4704	GTACAACCTG	TAAATCCAGC	GTGGGGCGTG	GAAGGTTTTG	ATCCTTTTGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4739	TCCAGGAGGA	ATAGCCTCTC	ATCATATTGC	AGCAGGAACA	TTGGGCATAT
NT	+4754	TCCAGGAGGA	ATAGCCTCTC	ATCATATTGC	AGCAGGAACA	TTGGGCATAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4789	TAGCGGGCCT	ATTCCATCTT	AGCGTCCGTC	CGCCACAACG	TCTATACAAA
NT	+4804	TAGCGGGCCT	ATTCCATCTT	AGCGTCCGTC	CGCCACAACG	TCTATACAAA
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB2	4839	GGATTGCGTA	TGGGAAATAT	TGAAACCGTC	CTTTCCAGTA	GTATCGCTGC
NT	+4854	GGATTGCGTA	TGGGAAATAT	TGAAACCGTC	CTTTCCAGTA	GTATCGCTGC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4889	TGTCTTTTTT	GCAGCTTTTG	TTGTTGCCGG	AACTATGTGG	TATGGTTCGG
NT	+4904	TGTCTTTTTT	GCAGCTTTTG	TTGTTGCCGG	AACTATGTGG	TATGGTTCGG
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	4939	CAACtACCCC	GATTGAATTA	TTTGGGCCCA	CTCGTTAtCA	ATGGGATCAG
NT	+4954	CAACaACCCC	GATTGAATTA	TTTGGGCCCA	CTCGTTAcCA	ATGGGATCAG
		**** *	*****	*****	***** *	*****
LEpIJB2	4989	GGGTACTTCC	AGCAAGAAAT	ATATCGAAGA	GTTAGTGCTG	GGCTAGCAGA
NT	+5004	GGGTACTTCC	AGCAAGAAAT	ATATCGAAGA	GTTAGTGCTG	GGCTAGCAGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5039	AAATCAAAGT	TTATCAGAAG	CCTGGTCTAA	AATTCCTGAA	AAATTAGCTT
NT	+5054	AAATCAAAGT	TTATCAGAAG	CCTGGTCTAA	AATTCCTGAA	AAATTAGCTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5089	TTTATGATTA	CATCGGCAAT	AATCCGGCAA	AAGGAGGATT	ATTCAGAGCa
NT	+5104	TTTATGATTA	CATCGGCAAT	AATCCGGCAA	AAGGGGGATT	ATTCAGAGCg
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5139	GGtTCAATGG	ATAACGGGGA	TGGAATAGCG	GTTGGATGGT	TAGGACACCC
NT	+5154	GGcTCAATGG	ATAACGGGGA	TGGAATAGCG	GTTGGATGGT	TAGGACACCC
		** *	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5189	TATCTTTAGA	GATAAGGAAG	GGCGTGAAct	TTTTGTACCT	CGTATGCCTA
NT	+5204	TATCTTTAGA	GATAAAGAAG	GGCGTGAAct	TTTTGTACCT	CGTATGCCTA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5239	CTTTTTTTGA	AACATTTCCG	GTCGTTTTGG	TAGACGGCGA	TGGGATTGTT
NT	+5254	CTTTTTTTGA	AACATTTCCG	GTCGTTTTGG	TAGATGGCGA	TGGAATTGTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5289	AGAGCCGATG	TTCCTTTTAG	AAGGGCAGAA	TCGAAGTATA	GTGTTGAACA
NT	+5304	AGAGCCGATG	TTCCTTTTAG	AAGGGCAGAA	TCGAAGTATA	GTGTTGAACA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5339	AGTAGGTGTA	ACTGTTGAGT	TCTACGGCGG	TGAACTCAAC	GGCGTCAGTT
NT	+5354	AGTAGGTGTA	ACTGTTGAGT	TCTACGGCGG	TGAACTCAAC	GGCGTCAGTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5389	ATAGTGATCC	TGCTACTGTG	AAAAAATATG	CTCGACGAGC	TCAATTGGGT
NT	+5404	ATAGTGATCC	TGCTACTGTG	AAAAAATATG	CTAGACGTGC	TCAATTGGGT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5439	GAAATTTTcG	AATTAGATCG	TGCTACTTTG	AAATCCGATG	GTGTTTTTTCG
NT	+5454	GAAATTTTtG	AATTAGATCG	TGCTACTTTG	AAATCCGATG	GTGTTTTTTCG
		***** *	*****	*****	*****	*****

LEpIJB2	5489	TAGCAGTCCA	AGGGGTTGGT	TTACTTTTGG	GCATGCTTCG	TTTGCTTTGC
NT	+5504	TAGCAGTCCA	AGGGGTTGGT	TTACTTTTGG	GCATGCTTCG	TTTGCTTTGC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5539	TCTTCTTCTT	CGGACACATT	TGGCATGGTG	CTAGAACCCT	GTTCAGAGAT
NT	+5554	TCTTCTTCTT	CGGACACATT	TGGCATGGTG	CTAGAACCCT	GTTCAGAGAT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5589	GTTTTTGCTG	GTATTGACCC	AGATTTTAGAT	GCTCAAGTCG	AATTTGGAGC
NT	+5604	GTTTTTGCTG	GTATTGACCC	AGATTTTAGAT	GCTCAAGTCG	AATTTGGAGC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5639	ATTCCAAAAA	CTTGGAGATC	CAACTACAAA	AAGACAGGCA	GCCTGAaTAC
NT	+5654	ATTCCAAAAA	CTTGGAGATC	CAACTACAAA	AAGACAGGCA	GCCTGA-TAC
		*****	*****	*****	*****	***** **
LEpIJB2	5689	AACATTGCTT	TGGTATCTTT	CTTTCGCCCT	TATTTTCTTT	CTTTTACTTT
NT	+5703	AACATTACTT	TGGTATCTTT	CTTTCGCCCT	TATTTTCTTT	CTTTTACTTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5739	TATTGACATA	GGGTACCCGA	GAAATCTTTA	TTTGAATCAA	CTTCGTTTTT
NT	+5753	TATTGACATA	GGGTACCCGA	GAAATCTTTA	TTTGAATCAA	CTTCGTTTTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5789	ACTCTTGTTT	GTTCTTTATC	TGGAAGATGA	TAAAAAAAAG	GAAATAAAAA
NT	+5803	ACTCTTGTTT	GTTCTTTATC	CGGAAGATGA	CAAAAAAAG	AAAATAAAAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5839	GAAACAAACA	GGTATGAAAG	CTATAATTGT	AAACCACGAT	CGAATtTATG
NT	+5853	GAAACAAACA	GGTATGAAAG	CTATAATTGT	AAACCACGAT	CGAATcTATG
		*****	*****	*****	*****	***** **
LEpIJB2	5889	GAAGCATTGG	TTTATACATT	CCTCTTAGTC	TCGACTCTAG	GGATAATTTT
NT	+5903	GAAGCATTGG	TTTATACATT	CCTCTTAGTC	TCGACTCTAG	GGATAATTTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	5939	TTTCGCTATC	TTTTTTTCGAG	AACCGCCTAc	AaTTCCGAAC	AAAAAGAAC
NT	+5953	TTTCGCTATC	TTTTTTTCGAG	AACCGCCTAa	AgTTCCGAAC	AAAAAGAAC
		*****	*****	*****	* *****	*****
LEpIJB2	5989	AAAAGGGTGA	AATAATTTTT	ttttCATTAT	CTCAGTTGAA	GTACTGAGCC
NT	+6003	AAAAGGGTGA	AATAATTTCT	----CATTAT	CTCAGTTGAA	GTACTGAGCC
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	6039	TCCCGATATC	GGGAGGCTCA	GTACTTCAAC	TAGTCTCCAT	GTTCCTCGAA
NT	+6049	TCCCGATACC	GGGAGGCTCA	GTACTTCAAC	TAGTCTCCAT	GTTCCTCGAA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	6089	TGGATCTCTT	AGTTGTTGAG	AAGGTTGCC	AAAAGCGGTA	TATAAGGCGT
NT	+6099	TGGATCTCTT	AGTTGTTGAG	AAGGTTGCC	AAAAGCGGTA	TATAAGGCGT
		*****	*****	*****	*****	*****

LEpIJB2	6139	ACCCAGTAAA	ACTTACAAGT	AAACCAGATA	TAAAGATGGC	GACTAGGGTT
NT	+6149	ACCCAGTAAA	ACTTACAAGT	AAACCAGATA	TAAAGATGGC	GACTAGGGTT
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	6189	GCTGTTTCCA	TTCTTATCAT	ATTTATAtAA	TTggggatCC	tCtAATGGAT
NT	+6199	GCTGTTTCCA	TTCTTATCAT	ATTTATAaAA	TTtcaagaCC	cC-AATGGAT
		*****	*****	*****	**	** * *****
LEpIJB2	6239	CTATGATAGG	ATCGTTTATT	TACAACGGAA	TGGTATACAA	AGTCAACAGA
NT	+6248	CTATGATAGG	ATCGTTTATT	TACAACGGAA	TGGTATACAA	AGTCAACAGA
		*****	*****	*****	*****	*****
LEpIJB2	6289	TCTCAATGAA	TACAATAGGA	TTTATGGCTA	CACAAACTGT	TGAaAACAGT
NT	+6298	TCTCAATGAA	TACAATAGGA	TTTATGGCTA	CACAAACTGT	TGAaAACAGT
		*****	*****	*****	*****	*** *****
LEpIJB2	6339	TCTAGATCTG	GTCCAAGACG	AACTGCaG		
NT	+6348	TCTAGATCTG	GTCCAAGACG	AACTGCgG	77156	
		*****	*****	*****	*	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. & STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. USA: John Wiley & Sons, Inc., vol. 1, 2000.
- BENDICH, A.J. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? **Bioessays**, v.6, p.279-282, 1987.
- BOCK, R. Analysis of RNA editing in plastids. **METHODS: A Companion to Methods in Enzimology**. v.15, p.75-83, 1998.
- BOCK, R. Analysis of RNA Editing in Plastids. **METHODS: A Companion to Methods in Enzimology**, v.15, p.75-83, 1998b.
- BOCK, R. & HAGEMANN, R. Plastid genetics: Manipulation of plastid genomes and biotechnological applications. **Progress in Botany**, v.61, p.76-90, 1999.
- BOCK, R.; HERMANN, M. & KÖSSEL, H. *In vivo* dissection of *cis*-acting determinants for plastid RNA editing. **EMBO Journal**, v.15, p.5052-5059, 1996
- BOCK, R.; KOSSEL, H. & MALIGA, P. Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: The lack of RNA editing leads to já mutant phenotype. **Embo Journal**, v.13, p.4623-4628, 1994.

BOYTON, J.E.; GILLHAM, N.W.; HARRIS, E.H.; HOSLER, J.P.; JOHNSON, A.M.; JONES, A.R.; RANDOLPH-ANDERSON, B.L.; ROBERTSON, D.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B. & SANFORD, J.C. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. **Science**, v.240, p.1534-1538, 1988.

CARRER, H.; HOCKENBERRY, T.N.; SVAB, Z. & MALIGA, P. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. **Mol. Gen. Genet.**, v.241, p.49-56, 1993.

CARRER, H. & MALIGA, P. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene. **Bio/Technology**, v.13, p.791-794, 1995.

CHAUDHURI, S. & MALIGA, P. Sequences directing C to U editing of the plastid *psbL* mRNA are located within a 22 nucleotide segment spanning the editing site. **EMBO Journal**, v.15, p.5958-5964, 1996.

CHAUDHURI, S.; CARRER, H. & MALIGA, P. Site-specific factor involved in the editing of the *psbL* mRNA in tobacco plastids. **EMBO Journal**, v.14, p.2951-2957, 1995.

CHRISTOPHER, D.A.; KIM, M. & MULLET, J.E. A novel light-regulated promoter is conserved in cereal and dicot chloroplasts. **Plant Cell**, v.4, n.7, p.785-798, Jul, 1992.

DANIELL, H.; DATTA, R.; VARMA, S.; GRAY, S. & LEE, S.-B. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of chloroplast genome. **Nature Biotechnology**, v.16, n.4, p.345-348, 1998.

FISCHER, N.; STAMPACCHIA, O.; REDDING, K. & ROCHAIX, J.-D. Selectable marker recycling in the chloroplast. **Mol. Gen. Genet.**, v.251, p.373-380, 1996.

FARIA, R.T. & ILLG, R.D. Inheritance of in vitro plant regeneration ability in the tomato. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, p.113-116, 1996.

FISCHER, N.; STAMPACCHIA, O.; REDDING, K. & ROCHAIX, J.-D. Selectable marker recycling in the chloroplast. **Mol. Gen. Genet.**, v.251, p.373-380, 1996.

FILLATTI, J.J.; KISER, J.; ROSE, R. & COMAI, L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene in tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. **BioTechnology**, v.5, p.726-730, 1987.

GILHAM, N.W.; BOYTON, J.E. & HARRIS, E.H. Transmission of plastid genes. In: BOGORAD, L. & VASIL, I.K. (Eds.). San Diego, California. **The molecular biology of plastids**, Chap.3, p.56-92, 1991.

GILL, R.; MALIK, K.A.; SANAGO, M.H.M. & SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Journal of Plant Physiology**, v.2, p.274-276, 1995.

GOLDS, T.; MALIGA, P. & KOOP, H.U. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. **Bio/Technology**, v.11, p.95-97, 1993.

GRAY, M.W. Origin and evolution of plastid genomes and genes. In: BOGORAD, L. & VASIL, I.K. (Eds.). San Diego, California. **The molecular biology of plastids**, Chap.11, p.303-330, 1991.

HALL, L.N.; TUCKER, G.A.; SMITH, C.J.S.; WATSON, C.F.; SEYMOUR, G.B.; BUNDICK, Y.; BONIWELL, J.M.; FLETCHER, J.D.; RAY, J.A.; SCHUCH, W.; BIRD, C.R. & GRIERSON, D. Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.121-129, 1993.

HERRMANN, R.G.; WESTHOFF, P. & LINK, G. Biogenesis of plastids in higher plants. In: HERRMANN, R.G. (Ed.). Wien, Springer-Verlag. **Cell Organelles**, p.275-349, 1992.

HIROSE, T.; KUSUMEGI, T.; TSUDZUKI, T. & SUGIURA, M. RNA Editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. **Molecular General Genetics**, v.262, p. 462-467, 1999.

HOCH, B.; MAIER, R.M.; APPEL, K.; IGLOI, G.L. & KÖSSEL, H. Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. **Nature**, v.353, p.178-180, 1991.

HOPKINS, J.W. **Introduction in Plant Physiology**. New York, 1ed, 1995.

JOHNSTON, S.A.; ANZIANO, P.Q.; SHARK, K.; SANFORD, J.C. & BUTOW, R.A. **Science**, v.240, p.1538-1541, 1988.

KAVANAGH, T.A.; THANH, N.D., LAO, N.T., McGRATH, N.; PETER, S.O.; HORVÁTH, E.M.; DIX, P.J. & MEDGYESY, P. Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. **Genetics**, v.152, p.1111-1122, 1999.

KHAN MS, MALIGA P Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. **Nature Biotechnology**, v.17, n.9, p.910-5, Sep, 1999.

KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R. & SANFORD, J.C. High-velocity micro-projectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v.327, p.70-73, 1987.

KOOP, H.U.; EIGEL, L. & SPÖRLEIN, B. Protoplasts in organelle research: Transfer and transformation of plastids. **Physiol. Plant.**, v.85, p.339-344, 1992.

- KOOP, H.-H.; STINMULLER, K.; WAGNER, H.; ROBLER, C.; EIBL, C. & SACHER, L. Integration of foreign sequences into tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. **Planta**, v.199, p.193-201, 1996.
- KOTA, M.; DANIELL, H.; VARMA, S.; GARCZINKI, S.F.; GOULD, F. & MOAR, W.J. Overexpression of the *Bacillus turigiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. **Proc. Nat. Amer. Soc.**, v.96, n.5, p.1840-1845, 1999.
- LIDHOLM, J.A. **The chloroplast genome of *Pinus contorta* Dougl.: Studies of structure, rearrangements and gene content.** University of Umea, Sweden, 1992.
- LIU, C.; TIAN, Y.; SHEN, Q.; JIANG, H.; JU, R.; YAN, T., LIU, C. & MANG, K Cloning of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthetase cDNA and the inhibition of fruit ripening by its antisense RNA in transgenic tomato plants. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.14, n.2, p.75-84, 1998.
- MAIER, R.M., NECKERMANN, K. IGLOI, G.L. & KÖSSEL, H. Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. **Journal of Molecular Biology**, v.251, p.614-628, 1995.
- MALIGA, P. Towards plastid transformation in flowering plants. **Trends Biotechnology**, v.11, p.101-107, 1993.
- MALIGA, P.; CARRER H.; KANEVSKI, I.; STAUB, J. & SVAB, Z. Plastid engineering in land plants: a conservative genome is open to change. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v.342, p.203-208, 1993.
- MALIGA, P., STAUB, J., CARRER, H., KANEVSKI, I. & SVAB, Z. Homologous Recombination and Integration of Foreign DNA in Plastids of Higher Plants. In:

- PASZKOWSKI, J. (Ed.) **Homologous Recombination and Gene Silence in Plants**. Chap. 5, p.83-93, 1994.
- McBRIDE, K.E.; SVAB, Z.; SCHAAF, D.J.; HOGAN, P.S.; STALKER, D.M. & MALIGA, P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insectidal protein in tobacco. **Nature Biotechnology**, v.13, p.362-365, 1995.
- McCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R. & FRALEY, R. Leaf disk transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Report**, v.5, p.81-84, 1986.
- MAYFIELD, F. & BRUICK, C. Light-activated translation of chloroplast mRNAs. **Trends in Plant Science**, v. 4, n.5, p.190-195, May, 1999.
- MIYAGI, T.; KAPOOR, S.; SUGITA, M. & SUGIURA, M. Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveal the existence of a non-census type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence. **Molecular and General Genetics**, v.257, p.299-307, 1998.
- NAKATSUKA, A.; SHIOMI, S.; KUBO, Y. & INABA, A. Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. **Plant Cell Physiology**, v.38, n.10, p.1103-10. 1997.
- NAKATSUKA, A.; MURACHI, S.; OKUNISHI, H.; SHIOMI, S.; NAKANO, R.; KUBO, Y. & INABA, A. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. **Plant Physiology**, v.118, n.4, p.1295-305, 1998.

- O'NEILL, C.; HORVATH, G.V.; DIX, P.J. & MEDGYESY, P. Chloroplast Transformation in Plants: Polyethylene glycol (PEG) Treatment of Protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. **Plant Journal**, v.3, p.729-738, 1993
- OSTERYOUNG, K.W., STOKES, K.D., RUTHERFORD, S.M., PERCIVAL, A.L. & LEE, W.Y. Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial ftsZ. **Plant Cell**, v.10, n.12, p.1991-2004, Dec, 1998.
- PALMER, J.D. Comparative organization of chloroplast genomes. **Annual Review of Genetics**, v.19, p.325-54, 1985.
- PHILLIPS, A.L. Restriction map and clone bank of tomato plastid DNA. **Curr. Genet.**, v.10, p.147-152, 1985a.
- PHILLIPS, A.L. Localisation of genes for chloroplast componets in tomato plastid DNA. **Curr. Genet.**, v.10, p.153-161, 1985b.
- PROMEGA. Protocols and Applications Guide. Promega Corporation: USA, 1996.
- RANDOLPH-ANDERSON, B.L.; BOYTON, J.E.; GILLHAM, N.W.; HARRIS, E.H.; JOHNSON, A.M.; DORTHU, M.P.& MATAGNE, R.F. **Mol. Gen. Genet.**, v.236, p.235-244, 1993.
- ROMANO, E. Extração de DNA de Tecidos Vegetais. In: **BRASILEIRO, A.C.M. & CARNEIRO, V.T.C. Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, p.163-175, 1998.

- SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D & ALLEN, N. Delivery of Substances into Cells and Tissues Using a Particle Bombardment Process. **Particle Science Technology**, v.5, p.27-37, 1987.
- SANFORD, J.C.; DEVIT, M.J.; RUSSEL, J.A.; SMITH, F.D.; HARPENDING, P.R.; ROY, M.K. & JOHNSTON, S.A. An improved, helium-driven biolistic device. **Technique**, v.3, p.3-16, 1991.
- SERINO G. & MALIGA P. RNA polymerase subunits encoded by the plastid rpo genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. **Plant Physiology**, v.117, n.4, p.1165-70, Aug, 1998.
- SCHULER, M.A. Plastid Isolation. **Methods in plant molecular biology**. Academic Press London, 2 ed., 1989.
- SHIMADA, H. AND SUGIURA, M. Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.5, p.983-995, 1991.
- SHINOZAKI, K., OHME, M., TANAKA, M., WAKASUGI, T., HAYASHIDA, N., MATSUBAYASHI, T., ZAITA, N., CHUNWONGSE, J., OBOKATA, J., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., OHTO, C., TORAZAWA, K., MENG, B.Y., SUGITA, M., DENO, H., KAMOGASHIRA, T., YAMADA, K., KUSUDA, J., TAKAIWA, F., KATO, A., TOHDOH, N., SHIMADA, H. AND SUGIURA, M. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. **EMBO Journal**, v.5, p.2043-2049, 1986.
- SIDOROV, V.A.; KASTEN, D.; PANG, S.-Z.; HAJDUKIEWICZ, P.T.J.; STAUB, J.M. & NEHRA, N.S. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. **The Plant Journal**, v.19, n.2, p.209-216, 1999.

- SPÖRLEIN, B.; STREUBEL, M.; DAHLFELD, G.; WESTHOFF, P. & KOOP, H.U.
PEG-mediated plastid transformation: a new system for transient gene expression assays in chloroplasts. **Theor. Appl. Genet.**, v.82, p.717-722, 1991.
- STAUB, J. & MALIGA, P. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. **Plant Cell**, v.4, p.39-45, 1992.
- STAUB, J.M.; GARCIA, B.; GRAVES, J.; HAJDUKIEWICZ, P.T.; NEHRA, N.; PARADKAR, V.; SCHLITTLER, M.; CARROLL, J.A., SPATOLA, L.; WARD, D.; YE, G. & RUSSELL, D.A. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. **Nature Biotechnology**, v.18, n.3, p.333-338, 2000.
- STERN, D.B. & GRUISSEM, W. Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processig and stabilizing elements but do not terminate transcription. **Cell**, v.51, p.1145-1157, 1987.
- STRICKBERGER, M.W. **Genetics**. Macmillan Publishing Company: New York, New York. Third Edition, 842pp, 1985.
- SUGIURA, M. The chloroplast genome. **Plant Molecular Biology**. Kluwer Academic Publishers: Belgium, v.19, p.149-168, 1992.
- SVAB, Z.; HAJDUKIEWICZ, P. & MALIGA, P. Stable transformation of plastids in higher plants. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, U.S.A., v.87, p.8526-8530, 1990.
- SVAB, Z. & MALIGA, P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, U.S.A., v.90, p.913-917, 1993.

YOSHINAGA, K.; IINUMA, H.; MASUZAWA, T. & UEDA, K. Extensive RNA editing of U to C in addition to C to U substitution in the *rbcL* transcripts of hornwort chloroplasts and the origin of RNA editing in green plants. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.1008-1014, 1996.