

**Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia
Universidade Federal do Amazonas**

Lidiane Gonçalves Lunguinho

FLORESCIMENTO EM GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbillis*):

Dissertação de Mestrado do Curso Multi
Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal do
Amazonas como requisito final para a
obtenção do título de Mestre.

MANAUS

2007

LIDIANNE GONÇALVES LUNGUINHO

Florescimento em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

ORIENTAÇÃO: Dra.: Paula Cristina da S. Ângelo

CO-ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho.

COLABORADORES: Dr. Firmino José do Nascimento Filho e Dr. André Atroch
– Pesquisadores da Embrapa Amazônia Ocidental

Dissertação de Mestrado do Curso
Multi Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal do
Amazonas como requisito final para a
obtenção do título de Mestre.

MANAUS

2007

Lunguinho, Lidianne G.

Padrão de Florescimento em Clones de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) Lidianne Gonçalves Lunguinho – 2007.

Manaus: UFAM, 2007.

Dissertação de mestrado: Universidade Federal do Amazonas , 2007.

Palavras chaves: guaraná, genes homeóticos, RT-PCR,

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA por ter permitido a coleta do material vegetal (raiz, caule, folha e inflorescência do guaranazeiro, *Paullinia cupana* var *sorbillis*) do seu banco de germoplasma. e, possibilitado, o desenvolvimento dos experimentos desta dissertação no Laboratório de Biologia Molecular.

À UFAM por ter permitido estocar o material vegetal em frizer a -80°C no Laboratório de DNA.

À Dra Paula Cristina da Silva Ângelo, pesquisadora da EMBRAPA, por dispor parte do seu tempo para orientar-me no decorrer da pesquisa, bem como, ao Dr Spartaco Astolfi Filho, professor do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM, pela sua co-orientação na pesquisa.

Aos pesquisadores da EMBRAPA, Dr. Firmino José do Nascimento Filho e Dr. André Atroch – por colaborar com dados referentes aos clones de guaranazeiro.

Ao Jéferson Chagas da Cruz, técnico do Laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA, por sua ajuda na coleta do material vegetal e auxílio nos experimentos.laboratoriais.

Aos Drs Luiz Antônio, Edmar Andrade, Firmino Nascimento e Jose Odair, pelas sugestões apresentadas a este trabalho.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Dr Jose Odair pelo encorajamento de concluir com sucesso este trabalho, e, principalmente, por sua capacidade de dialogar e buscar as melhores soluções para eminentes problemas.

À Dra Sebastiana Lima, bem como, a Dra Rubenita Almeida, pelo apoio emocional imprescindível para que eu pudesse escrever esta dissertação.

À minha querida família por apoiar-me nos momentos mais difíceis e hoje poder compartilhar dessa conquista.

PADRÃO DE FLORESCIMENTO EM CLONES DE GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

RESUMO

O guaranazeiro, *Paulínia cupana* var. *sorbilis*, é uma planta nativa e cultivada na região Amazônica. Sua maior produção concentrou-se no Estado do Amazonas, mas atualmente a Bahia e o maior produtor e o Acre, Para, Mato Grosso, Rondônia são grandes produtores. (Calderazo *et. al.*, 1986). A expansão de sua cultura é atribuída, à grande utilidade na indústria de refrigerantes e farmacopéia. Pertencente a família Sapindaceae, é uma planta tropical de baixa altitude, arbustiva, lenhosa, trepadeira adaptada ao clima quente e úmido, produz o fruto conhecido como guaraná. Geograficamente existem duas variedades definidas, a Sorbilis e a Typica: sendo que a primeira é a mais cultivada, responsável por quase toda a produção nacional, a segunda encontrada em quantidades restritas nas bacias fluviais do Alto Orenoco e Alto Rio Negro.

Os objetivos dessa dissertação foram verificar a ocorrência de padrões diferentes de florescimento entre clones de guaranazeiro, mantidos com e sem adubação; sondar a existência de ortólogos (seqüências homologas) de genes de Arabidopsis implicados no florescimento em plantas de guaranazeiro e, analisar o padrão espacial e temporal de expressão dos ortólogos dos genes LEAFY, APETALA e AGAMOUS em tecidos vegetativos e reprodutivos de guaranazeiro.

Realizou-se durante o período de florescimento do ano de 2004 (agosto a outubro) foi realizada a contagem em dez inflorescências de quatro plantas de cada clone em três segmentos do seu raquis do número de flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas. A análise estatística foi realizada mediante a tabulação semanal do número de flores femininas e masculinas para facilitar a análise de correlação com o comprimento das inflorescências. Os resultados permitiram sugerir que a ocorrência de fases predominantemente femininas nas inflorescências é uma característica menos plástica que o número de fases predominantemente masculinas.

Para amplificar por RT-PCR o RNA total de diferentes tecidos e o DNA de guaranazeiro foram sintetizados primers para APETALA, LEAFY, AGAMOUS e primers para os transcritos do gene da ACTINA foram utilizados como controle de concentração do RNA. Os experimentos de transcrição reversa e amplificação foram realizados em temperaturas de anelamento dos primers de 45 a 50 °C, gerando bandas específicas muito tênues e/ou, principalmente, inespecíficas. Os resultados alcançados não permitiram afirmar que o guaranazeiro apresenta genes LEAFY, APETALA 1 e AGAMOUS altamente similares as seqüências que serviram de modelo para a síntese dos primers.

PADRÃO DE FLORESCIMENTO EM CLONES DE GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

1-INTRODUÇÃO

O guaranazeiro, *Paullinia cupana* var. *sorbilis* é uma planta nativa e cultivada na região Amazônica. Sua maior produção concentrou-se no Estado do Amazonas, sendo o Acre, Pará, Mato Grosso, Rondônia, Bahia, territórios do Amapá e Roraima grandes produtores. (Calderazo *et al.*, 1986)

A expansão da cultura de guaraná é atribuída a grande utilidade na indústria de refrigerantes e farmacopéia. Há um grande potencial de mercado externo principalmente para o Japão e Estados Unidos. (Nascimento *et al.*, 1983) O guaraná pode ser comercializado em forma de bastão (artesanato), pó (grão torrado e moído) e em rama (grão torrado) (Garcia *et al.*, 1999) este último, oriundo do fruto maduro que depois de descascado torna-se livre do pericarpo e do arilo, sendo em seguida limpo e desidratado, constitui a principal forma do guaraná exportada. (Silva *et al.*, 1989)

São atribuídos ao guaraná as seguintes propriedades medicinais: antitérmico, antigripal, antineural e antidiarréico. (Garcia *et al.*, 1999)

O avanço de programas de melhoramento genético de guaranazeiros é atribuído principalmente, ao domínio da técnica de clonagem, a qual permite a geração de diversos clones, visando aumentar o índice de produtividade e a tolerância à principal doença do guaraná, a antracnose. A utilização de clones

de guaranazeiro melhorados refletiu-se em baixo custo para produtores que visavam um retorno econômico em curto espaço de tempo (Nascimento *et al.*, 2000).

1.1. Aspectos Botânicos

O guaranazeiro é uma planta tropical de baixa altitude, arbustiva, lenhosa, trepadeira adaptada ao clima quente e úmido, pertencente a família Sapindaceae, produz o fruto conhecido como guaraná. (Figura 1) Geograficamente existem duas variedades definidas, a *Sorbilis* e a *Typica*: sendo que a primeira é a mais cultivada, responsável por quase toda a produção nacional, a segunda encontrada em quantidades restritas nas bacias fluviais do Alto Orenoco e Alto Rio Negro.

O fruto do guaranazeiro é uma cápsula pequena, deiscente de coloração vermelha a alaranjada; quando maduro, abre-se parcialmente deixando aparecer as sementes com tegumento castanho-escuro, envoltas parcialmente por uma substância branca (arilo). (Figura 2) Quanto a forma, são arredondadas pretas e brilhantes e, após sofrerem torrefação e limpeza liberam as amêndoas, produto mais utilizado da planta. (Faria, 2000 e Souza *et al.*, 1996).

O sistema radicular é do tipo pivotante fasciculado, o caule de coloração castanho amarelada, as folhas são alternas, compostas de cinco folíolos, (Figura 3) o pecíolo de aproximadamente 8 a 19cm é canaliculado no bordo superior (Nascimento *et al.*, 1983),



Figura1: guaranazeiro, planta tropical de baixa altitude, arbustiva, lenhosa, trepadeira adaptada ao clima pertencente à família Sapindaceae.(www.inbev.com)



Figura 2: fruto do guaranazeiro maduro em forma de pequena cápsula deiscente de coloração vermelha, deixando aparecer parcialmente as sementes com tegumento castanho-escuro, envoltas parcialmente por uma substância branca (arilo) (www.cpaa.embrapa.br/portfolio/sistemadeprodução/guaraná).



Figura 3: folhas do guaranazeiro constituídas por cinco folíolos (foto Lidianne).

1.2. Flores do guaranazeiro

As flores do guaranazeiro ocorrem em inflorescências de dois tipos: as de ramo que se desenvolvem nas axilas das folhas, e, as penduladas, que se desenvolvem nas gavinhas (Figura 4). São parcialmente unissexuadas, zigomorfas e pequenas, com comprimento aproximado entre 1,5 a 2 cm a partir do ponto de inserção do pedúnculo; apresentam cinco sépalas das quais duas são menores e externas, enquanto que as outras três são mais estreitas e semelhantes as pétalas; quatro pétalas brancas em forma de capus ou calha, possuindo internamente escama coréáceas; oito estames e três carpelos fundidos (Figura 5). As flores masculinas possuem ovários rudimentares e diferenças no comprimento dos estames, sendo que de oito estames deiscentes, cinco são expostos e três ficam no interior da corola; já as femininas, possuem anteras indeiscentes, estigma trifido e ovário trilocular com um óvulo por lóculo, podendo ser fecundados um, dois ou os três óvulos (Escobar *et al.*, 1984 e Nascimento-filho *et al.*, 2001) (Figura 6).

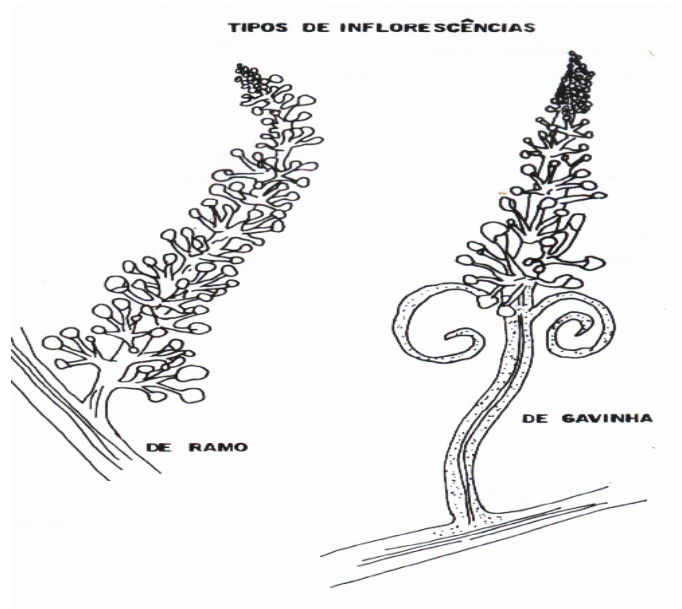


Figura 4: inflorescência de ramo e de gavinha (Escobar *et al.*, 1984).



Figura 5: flores do guaranazeiro, com comprimento aproximado entre 1,5 a 2 cm a partir do ponto de inserção do pedúnculo (www.botanypictures.com).

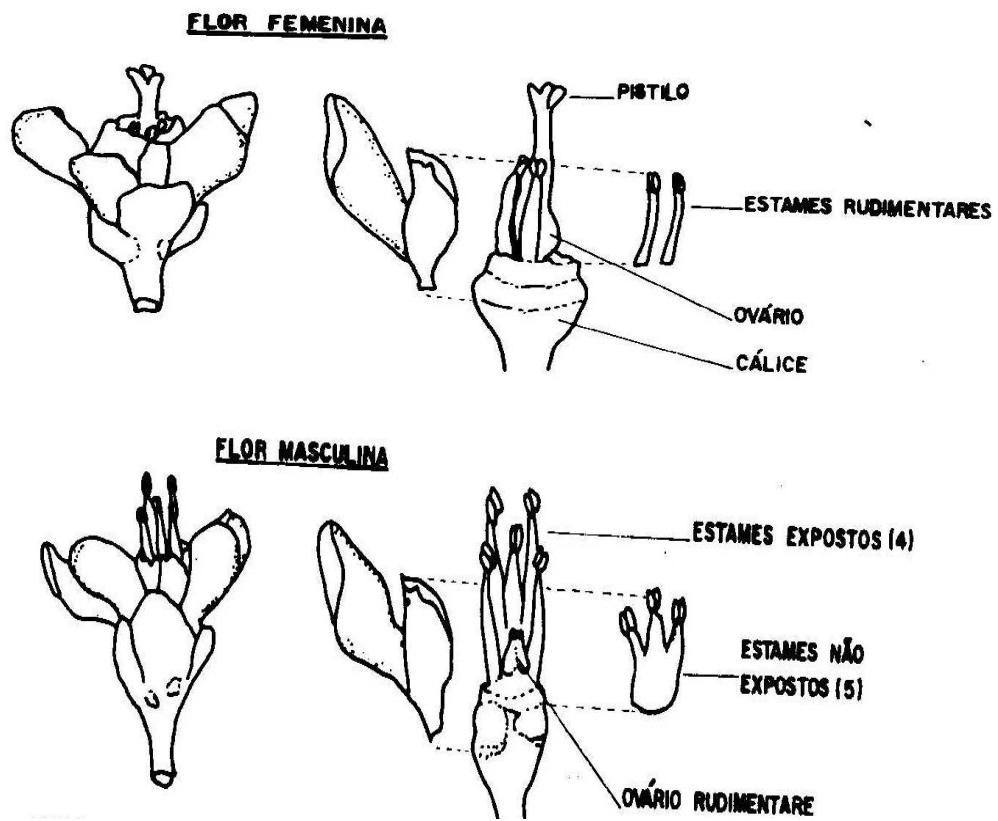


Figura 6: estrutura floral do guaranazeiro, flores funcionalmente feminina e masculina mostrando sépalas, pétalas com escamas expostas, estames expostos e não expostos e cálice (Escobar *et al.*, 1984).

1.3. Florescimento do guaranazeiro

Estudos realizados por Schultz e Valois (1974), indicaram que o guaranazeiro possui ciclos alternados de formação de flores femininas e masculinas.

O número de flores femininas em cada inflorescência é, geralmente, menor que o número de flores masculinas, mas há relatos da existência de plantas com tendência à produção apenas de flores femininas ou de flores masculinas, (Escobar *et al.*, 1984 e Nascimento-filho *et al.*, 2001) com isso, o critério de separação de plantas matrizes de guaranazeiro deixou de ser realizada somente com base no aspecto floração, para ser também adotado o aspecto frutificação que por sua vez depende da qualidade da floração (Pereira *et al.*, 1987).

A antese inicia-se pela abertura das flores masculinas, seguida das femininas, contudo, existem períodos em que as flores masculinas e femininas de uma mesma inflorescência estão abertas simultaneamente, mudando portanto, o conceito de espécie predominantemente alógama. (Nascimento *et al.*, 1983) Estudo realizado por Goldim (1978) indicou que o guaranazeiro é uma planta panmítica cuja polinização é feita principalmente por abelhas.

A duração do período juvenil, o número de flores femininas e o período de tempo transcorrido entre a maturação das primeiras e das últimas flores (e frutos) nas inflorescências do guaranazeiro, características estas que influenciam diretamente a produtividade em guaranazais cultivados são indicativos de que entre clones , hajam suficientemente variáveis para gerar oportunidade de

exploração em programas de melhoramento. No entanto, tal variabilidade entre clones apenas começou a ser avaliada (Ângelo *et al.*, 2005).

1.4. Similaridade gênica entre as famílias Sapindaceae e Brassicaceae

O alinhamento entre duas ou mais seqüências gênicas consiste em se obter o maior grau de similaridade entre elas, bem como, a possibilidade de homologia, ou seja, a atribuição de descendentes de um mesmo ancestral. A busca por ortólogos de genes no Banco Público de Genes, visa a obtenção de seqüências homólogas pertencentes a um ancestral comum durante o processo de especiação.

Dado a similaridade entre as seqüências de genes conservados do cloroplasto e nucleares (sub-unidade maior da rubisco, rbcL e sub-unidade B da ATP sintase e DNA ribossomal 18S), (Soltis *et al.*, 1999) entre as famílias Sapindaceae (*Paullinia cupana* var *sorbilis* o guaranazeiro) e Brassicaceae, (*Arabidopsis thaliana*) planta "modelo" para o estudo do florescimento, admite-se que genes implicados no processo de florescimento, que tenham sido conservados ao longo da evolução dos vegetais, também apresentem similaridades nessas famílias. Este fato permite supor que sondas ou "primers" complementares aos genes de *Arabidopsis* possam ser utilizados com sucesso para analisar genes correspondentes em guaranazeiro (Soltis *et al.*, 1999).

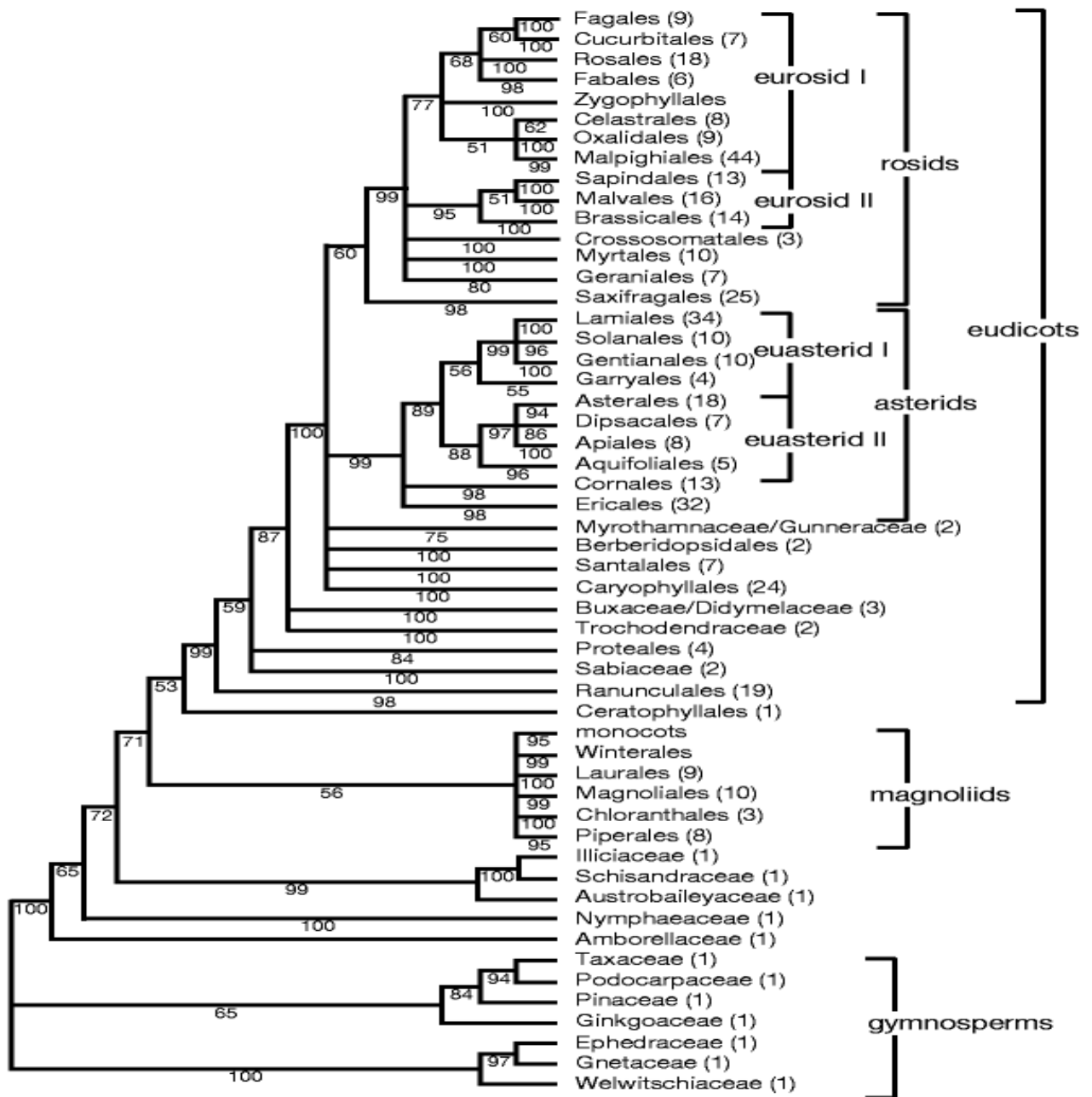


Figura7: cladograma das seqüências de genes conservados do cloroplasto e nucleares (sub-unidade maior da rubisco, rbcL e sub-unidade B da ATP sintetase e DNA ribossomal 18S) entre as ordens Sapindales (*Paullinia cupana* var *sorbilis* o guaranazeiro) e Brassicales (Soltis *et al.*, 1999).

1.5. Domínio MADS-box

Os genes envolvidos no florescimento de plantas vasculares, são homeóticos, reguladores e possuidores de um domínio obrigatório característico chamado MADS-box (Purugganar *et al.*, 1995). Este, consiste numa seqüência altamente conservada de aproximadamente 180 nucleotídios; presentes em distintos táxons; recebe este nome devido aos quatro primeiros membros das famílias identificados: MCM1 (*Saccharomyces cerevisiae*), AGAMOUS (*Arabidopsis thaliana*), DEFICIENS (*Antirrhinum majus*) e SRF (*Homo sapiens*) (TheiBen *et al.*, 1996). As proteínas MADS-box (fatores de transcrição) são estruturas modulares importantes para o desenvolvimento da arquitetura floral nas plantas vasculares, são constituídas por cinco domínios estruturais: a região N, o domínio MADS (M) (altamente conservado), intermediário (I), (pouco conservado, ajuda a determinar a formação de dímeros que se ligam ao DNA), queratina-like (K) (moderadamente conservado e importante na dimerização entre proteínas e na especificidade funcional) e a região C-terminal (C) (pouco conservado mas que pode funcionar como um domínio de trans-ativação). Winter *et al.*, 1999) (Figura 3) Quanto a sua função, regulam a diferenciação celular e atuam no controle da transição do meristema apical em meristema floral. A união desses fatores de transcrição ao DNA se dá na forma de homo e heterocomplexos, mediante o reconhecimento da seqüência consenso CC(A/T)6GC denominada CArG-box, na região promotora (Krizek *et al.*, 1996). Estes fatores de transcrição se tornam ativos durante o processo de formação das flores, atuando também, no controle do tempo necessário para o florescimento e desenvolvimento vegetativo (Medard

& Yanofsky, 2001). De acordo com a função, a família gênica MADS-box pode ser dividida em subfamílias que representam clados de genes que podem ser ortólogos extremamente conservativos ou parálogos recentes originados a partir de duplicação.

Os genes MADS-box, além de codificarem fatores de transcrição altamente conservados, tendem a compartilhar funções similares durante o processo da formação das flores entre diferentes táxons; a busca por seus ortólogos, tem possibilitado a determinação de homologia entre eles, ajudando assim na compreensão da evolução.



Figura 8: esquema de um fator de transcrição MADS-box, MADS-box domínio de ligação ao DNA (Riechmann *et al.*, 1999).

1.6. Modelo ABC do florescimento

.A partir de estudos com mutantes homeóticos de *Arabidopsis thaliana* foi possível descrever o modelo de atividade gênica responsável pelo controle da arquitetura floral da maioria das dicotiledôneas com flores completas; este modelo conhecido como modelo ABC. (Figura 3) reúne os genes ativos nas vias que definem a identidade dos meristemas florais; agindo de forma combinada, a expressão de A sozinho especifica a formação das sépalas, a combinação AB

específica a formação das pétalas, a combinação específica de BC a formação de estames e, a expressão de C, a formação dos carpelos. A função dos genes a classe A é fornecida por APETALA 1 e 2 (AP1 e AP2), a da classe B por APETALA 3 (AP3) e PISTILLATA (PI) e da classe C por AGAMOUS (AG) (Medard & Yanofsky, 2001); homólogos de AG foram encontrados em diversas espécies de plantas tais como no tabaco e tomate.

A ação combinada da expressão dos genes AP1, AP2, AP3, PI e SEP3 demonstrou ser capaz de converter folhas em pétalas; estudo com dois híbridos de levedura revelou que AP1 interage com SEP3 e, AG com SEP1, SEP2 e SEP3. A expressão de genes ortólogos de SEP é semelhante a de famílias de plantas distantes de dicotiledôneas e monocotiledôneas. (Pelaz et al 2000) Genes que atuam na formação dos óvulos, foram reunidos na classe D e, os genes homeóticos SEP na classe E, tornando o modelo ABC em A-E Em gymnospermas também têm ortólogos de SEP1/2 que são expressos antes do desenvolvimento reprodutivo indicando que a importância destes genes antecede ao florescimento das plantas. A teoria que flores são órgãos modificados de folhas é evidenciado pelas observações de que nos mutantes triplo que faltam todos os três genes da classe ABC resultaram na formação somente de folhas, porém a tentativa de converter folhas em órgãos florais por expressão de genes ativos do modelo ABC em ecótipos foram fracassados, indicando que um outro fator é necessário para esta conversão (Pelaz *et al.*, 2000).

A expressão inicial do gene LFY ativa a os genes AP3 e AG; e, a de AP1 e LFY, à ativação de PI e AP3. O gene AP2 reprime a expressão de AG. Com exceção de AP2 os demais genes das classes ABC foram identificados como

genes MADS-box. Pelaz *et al.*, 2000).

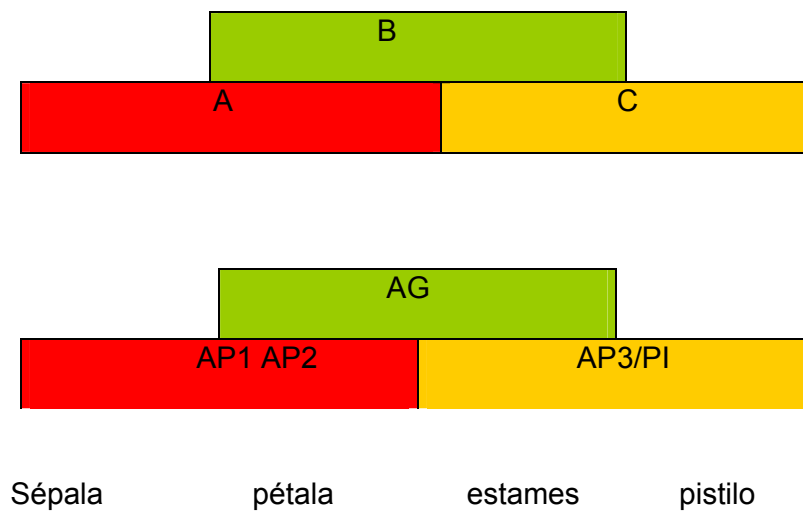


Figura 9: modelo “ABC” para a determinação da identidade dos órgãos florais em *Arabidopsis* (Blazques & Weigel, 2000).

1.7. Indução da evocação floral em *Arabidopsis*

Análises genética e fisiológica do tempo de florescimento em *Arabidopsis* indicam que há um grande número de genes responsáveis pela regulação do tempo de florescimento (>80) em resposta a fatores ambientais e endógenos. Os genes envolvidos neste processo, estão organizados em duas rotas: a dependente de fatores ambientais tais como exposição a períodos de temperatura baixa

(vernalização) e duração do fotoperíodo, e, a rota autônoma (independente de fatores ambientais).

Em *A. thaliana*, os genes homeóticos AP1 e LFY constituem elementos importante na transição da fase vegetativa e reprodutiva. A expressão de LFY durante a fase vegetativa é inicialmente baixa, aumentando à medida que a planta amadurece. (Mouradov *et al.*,1998) A presença da luz tem efeitos marcantes sobre os níveis endógenos de giberelina, fato este, que aumenta a expressão do gene LEAFY (LFY) que possui homologia ao genes EgFLY de *Eucalyptus grandis* e a FLO de *Antirrhinum*. Tanto LFY quanto FLO, compartilham 70% de aminoácidos, tendo cada um, uma região rica no aminoácido prolina e um domínio ácido que indica seu possível papel como ativador transcricional (Dornela *et al.*.,2004)

Durante o desenvolvimento do meristema floral e formação dos primórdios florais, o gene EgFLY de *Eucalyptus grandis* está ativo, codificando uma proteína de 359 aminoácidos idêntica 67% à FLY de *Arabidopsis* e 71% à proteína FLO de *Antirrhinum*. Ortólogos desses genes foram clonados e caracterizados em diversas espécies perenes tais como pinho e videira (Dornela *et al.*, 2004).

A vernalização, ou seja, a exposição à temperaturas frias, causa mudanças no metabolismo das histonas em domínios discretos dentro do locus de FLC; a partir desse evento, as histonas adquirem uma memória epigenética do inverno que indica à planta o término do inverno e o momento de começar a florescer (Bastow *et al.*,2004)

Quando inativado pela vernalização, o gene FLC torna-se um regulador transcricional do MADS-box, reprimindo outros genes requeridos para a transição

do meristema apical em meristema floral.

A expressão dos genes pela rota autônoma reprimem a expressão do gene FLOWERING LOCUS C (FLC), que por sua vez é um repressor do florescimento (Blásques & Weigel, 2000). O FLC foi o primeiro gene maior identificado nesta rota em ecótipos de *Arabidopsis* de ocorrência natural e não em mutantes homeóticos, o que pode ser considerado como indicação da existência de ortólogos em outras espécies (Medard & Yanofsky, 2001).

Quanto à indução do florescimento vinculada à duração do dia, a via tem início a partir da percepção de luz por fotorreceptores de luz azul CRYPTOCHROME (CRY1, CRY2). Por mecanismos ainda não totalmente conhecidos estes fotorreceptores disparam cascatas de transdução de sinais, que incluem a ativação da expressão do gene CONSTANS (CO), por exemplo. A proteína CO é um fator de transcrição chave para induzir o florescimento sob dias longos.(Blázquez *et al.*,2001).

Não há publicação de seqüências nucleotídicas, relacionadas ao florescimento do guaranazeiro. Foram depositados no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) duas seqüências descritas como proteína "leafy-like" (GI 83595838) e proteína "MADS box 1" (GI 51832629), identificadas em *Dimocarpus logan* e *Litchi chinensis*, que são espécies da família Sapindaceae. Em frutos e sementes de guaranazeiro, foram identificados ESTs com domínios altamente conservados em plantas e fungos, conhecidos como: SRS-TF e o K-box.(Soares *et al.*,2004).

2. OBJETIVOS

- Verificar a ocorrência de padrões diferentes de florescimento entre clones de guaranazeiro, mantidos com e sem adubação;
- Sondar a existência de ortólogos (seqüências homólogas) de genes de *Arabidopsis* implicados no florescimento em plantas de guaranazeiro;
- Analisar o padrão espacial e temporal de expressão dos genes LFY, FLC, AG em tecidos vegetativos e reprodutivos de guaranazeiro.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACAO DO PADRAO DE FLORESCIMENTO EM CLONES DE GUARANAZEIRO

1.1. MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de florescimento do ano de 2004 (agosto a outubro) analisou-se diariamente dez inflorescências dos clones 224, 300, e 609, registrando o numero de flores funcionalmente masculinas e funcionalmente femininas, realizando-se também, a medição semanal do comprimento das inflorescencias. Estes clones foram escolhidos para a investigação com base nas observações feitas informalmente pelos Drs Firmino Jose do Nascimento Filho e André Luiz Atroch, que perceberam diferenças entre os padrões de florescimento dos mesmos, ao longo das atividades do

Programa de Melhoramento do Guaranazeiro.

A análise estatística foi realizada mediante a tabulação semanal do número de flores femininas e masculinas para facilitar a análise de correlação com o comprimento das inflorescências. Foi realizada a análise de variância para o número de flores femininas e masculinas tendo como fontes de variação os clones, o sistema de cultivo (plantas adubadas e não adubadas), as plantas e as inflorescências. A significância das diferenças entre médias foi avaliada pelo teste de Tukey. As correlações entre as variáveis foi estimada e a probabilidade de significância das correlações foram calculadas pelo método de Bonferroni.

1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.2.1. Avaliação de ocorrência de padrões diferentes de florescimento entre clones de guaranazeiro, mantidos com e sem adubação

Durante o ano de 2004 a contagem do número de flores masculinas foi sempre maior que o número de flores femininas; no entanto, a proporção entre os tipos de flores foi sempre maior para o clone 300 independente do sistema de cultivo. A proporção entre os três clones ficou em 4,62 flores masculinas para cada flor feminina.. Este número ficou dentro do intervalo de confiança registrado para progênies avaliadas em 1974 (Schultz & Valois, 1974)

Tabela 1: Dados coletados para plantas de guaranazeiro adubadas e não adubadas durante o ano de 2004 (Embrapa Amazônia Ocidental).

Plantas adubadas	CLONES	FLORES FEMININAS	FLORES MASCULINAS	COMPRIMENTO DAS INFLORESCÊNCIAS	Nº SEMANAS
	224	108	209	20,50±4,95	1,50±0,73
	300	131	852	14,67±3,21	2,27±1,12
	609	328	894	15,25±2,60	1,96±0,88
Plantas não adubadas	224	137	171	23,00±7,07	1,38±0,65
	300	151	1.922	18,60±3,36	2,23±1,01
	609	558	2.480	20,83±4,79	2,50±1,22
	Total	1.413	6.528		

*comprimento médio das inflorescências na segunda semana do período de florescimento

Entre clones a diferença entre o número de flores femininas contadas por semana foi significativa, contudo, a influência do sistema de cultivo das plantas não foi significativa (Tabela 2). O clone 300 apresentou um menor número de flores femininas por semana (Tabela 3).

Tabela 2: Análise de variância para o número de flores femininas contadas por semana em plantas de guaranazeiro. Os dados foram transformados para $\sqrt{x} + 0,5$.

FONTE DE VARIACAO	GL	Q.M	P
Clones	2	21.400	0,007
Sistema de cultivo	1	3.029	0,399
Clones x sistema de cultivo	2	1.599	0,689
Residuo	156	4.236	

Tabela 3: Resultado do teste de Tukey para a diferença entre as médias do número de flores femininas contadas por semana para três clones de guaranazeiro. Os dados foram transformados para $\sqrt{x} + 0,5$.

CLONE	MEDIA DO NUMERO DE FLORES POR PLANTA
609	2,667 a
224	2,560 ab
300	1,588 b

*Médias de letras diferentes apresentam diferença significativa 5% de probabilidade

O clone e o sistema de cultivo tiveram influencia no numero de flores masculinas contadas por semana (Tabela 4). O clone 224 apresentou um menor numero de flores masculinas por semana (Tabela 5). Por semana houve a menor produção de flores nas plantas adubadas (Tabela 6).

Tabela 4: Analise de variância para o numero de flores masculinas contadas por semana em plantas de guaranazeiro. Os dados foram transformados para $\sqrt{x} + 0,5$.

FONTE DE VARIACAO	GRAU DE LIBERDADE	QUADRADO MEDIO Q.M.	P
Clones	2	109,002	<0,001
Sistema de cultivo	1	52,457	0,011
Clones x sistema de cultivo	2	16,983	0,121

Tabela 5: Resultado do teste de Tukey para diferença entre as medias do numero de flores masculinas cotadas por semana para três clones de guaranazeiro. Os dados foram transformados para $\sqrt{x} + 0,5$.

CLONE	MEDIA
609	6,528 a
200	5,661 a
224	3,089 b

*Medias seguidas de letras diferentes apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 6: Resultado do teste de Tukey para a diferença entre as medias do numero de flores masculinas contadas por semana para dois sistemas de cultivo de plantas de guaranazeiro

SISTEMA DE CULTIVO	MEDIA
Plantas não adubadas	6,406 a
Plantas adubadas	4,610 b

*Medias seguidas de letras diferentes apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade

O numero de semanas durante as quais as inflorescências produziram flores foi significativamente diferente entre clones (Tabela 7). As inflorescência do clone 224 permaneceram viáveis por um período mais curto (Tabela 8).

Tabela 7: Análise de variância para o numero de semanas em que foram encontradas flores em plantas de guaranazeiro. Os dados foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$.

FONTE DE VARIACAO	G.L.	Q.M.	P
Clones	2	0,731	0,001
Sistema de cultivo	1	0,420	0,509
Clones x sistema de cultivo	2	0,136	0,250
Residuo	156	0,097	

Tabela 8: Resultado do teste de Tukey para a diferença entre as médias do número de semanas em que foram encontradas flores em plantas de guaranazeiro. Os dados foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$.

Nº DE SEMANAS	MEDIA
609	1,632 a
300	1,628 a
224	1,378 b

*Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença significativa a 5% de probabilidade

Tabela 9: Matriz dos coeficientes de correlação de Pearson para as variáveis referentes a plantas de guaranazeiro.

	COMPRIMENTO DAS INFLORESCENCIAS	Nº DE SEMANAS	FLORES MASCULINAS
Nº DE SEMANAS	0,198		
FL. MASCULINAS	0,217	-0,095 *	
FL. FEMININAS	-0,043	-0,215 *	-0,086

*significativo a 5% de probabilidade

nº de semanas= número de semanas em que foram encontradas flores nas plantas.

fl. Masculina=número de flores masculinas.

fl. Femininas = número de flores femininas.

2.Conclusão

A análise dos três clones estudados revelou diferença de padrão de florescimento.

CAPÍTULO 2

EXPRESSÃO DE GENES ORTOLOGOS DE *Arabidopsis* IMPLICADOS NO FLORESCIMENTO EM GUARANAZEIRO

2.1. MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado para a extração do RNA foi submetido a um tratamento a fim de eliminar Rnases, para isto, as cubas para eletroforese foram lavadas com detergente e enxaguadas em água DEPC (1 mL/L). A vidraria foi lavada e mantida a 180°C por oito horas antes do preparo de soluções. Pipetas foram destinadas exclusivamente para o trabalho com o RNA. Ponteiras e tubos Eppendorfs foram autoclavados e reservados para o trabalho com o RNA. Luvas descartáveis foram utilizadas durante todos os procedimentos.

2.1.2. Extração e Purificação de RNA total de tecidos vegetais

O protocolo utilizado (Sistema de Purificação de RNA total micro-to-midi, Invitrogen) descreve o método de extração de RNA total de amostras de aproximadamente 250 mg de tecido vegetal (raízes, caule, folhas e inflorescências).

As amostras foram pesadas maceradas em almofariz com auxílio de pilão, adicionando-se nitrogênio líquido, até que adquirissem o aspecto de pó. O pó foi transferido para tubos Eppendorfs resfriados em nitrogênio líquido, adicionando-se em cada uma das amostras, 1 mL de solução de lise + 10 µL de β-mercaptoetanol, que protege o RNA da ação de RNAses endógenas. As amostras lisadas foram vortexadas várias vezes, a fim de dispersar o pó. Por 3 minutos, estas ficaram em repouso na bancada, antes de serem submetidas à centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos. Com a finalidade de eliminar impurezas, removeu-se o sobrenadante para novos Eppendorfs, adicionando-se 0,5 V de etanol a 100% misturando 5 x , vertendo-os para cima e para baixo. Com a finalidade de separar o RNA total dos demais componente celulares, transferiu-se 750 µL de cada amostra, com auxílio de pipeta, para colunas sobre microtubos, para serem centrifugadas a 12.000 rpm por 15 segundos. Este procedimento foi repetido até que todo o volume passasse pela coluna, deixando retido na mesma, o RNA total das amostras. Descartou-se o eluente. Sobre a mesma coluna, adicionou-se 700 µL do tampão de lavagem I, centrifugando-as em seguida a 2.000 rpm por 15 segundos e descartando o eluente. A coluna foi transferida para tubo limpo de 2 mL e adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem II, acrescido de etanol. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 segundos, descartando-se o eluente. Esta etapa foi repetida e a coluna foi centrifugada por mais 1 minuto para secagem. A coluna foi transferida para tubos de recuperação adicionou-se 30 µL de água livre de RNase, deixando descansar por 1 minuto na bancada, antes de centrifugar a 12.000 rpm, por 2 minutos. Removeu-se a coluna, e transferindo-a para outro tubo de recuperação e adicionou-se mais 30 µL de água livre de RNase. Todo procedimento foi realizado à temperatura ambiente. As amostras de RNA total foram estocadas à temperatura de – 20 °C.

2.1.3. Quantificação do RNA

A quantificação das amostras de RNA de tecidos vegetativos de guaranazeiro foi realizada através de espectrofotometria em aparelho "GeneQuant pro RNA/DNA calculator" (Amersham Pharmacia Biotech); este foi calibrado com água destilada, utilizando-se cubeta de quartzo ou capilar.

Para o cálculo da concentração de RNA total utilizou-se capilares sem diluição da amostra; seguindo a recomendação do fabricante do espectrofotômetro, aplicou-se a fórmula:

$$\text{Concentração (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 20^* \times 40$$

* fator de correção para o cálculo de concentração utilizando capilares

Para o cálculo da concentração de RNA total utilizando cubeta, diluição de 5 μl de amostra em 500 μl de água livre de RNase, foi utilizada a fórmula:

$$\text{Concentração (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 40 \times 100$$

Géis de agarose (1,0%) corados com brometo de etídio (cerca de 2 $\mu\text{g/ml}$) espalhados em placas de Petri foram utilizados para comparar os valores de concentração do RNA total obtidos via absorvância com a fluorescência emitida pelas amostras, sob iluminação ultra-violeta obtendo-se a estimativa final da concentração. Como padrão de concentração nestes experimentos utilizou-se RNA total de caule de guaranazeiro, previamente testado em reações de transcrição reversa e amplificação utilizando "primers" para a actina.

2.1.4. “Primers” utilizados para amplificar seqüências relacionadas como o florescimento em guaranazeiro

Para amplificar por RT-PCR ("reverse transcription - polymerase chain reaction") o RNA total de diferentes tecidos do guaranazeiro e o DNA de folhas utilizou-se os seguintes pares de "primers":

- para APETALLA 1:

AP E 5'-GCTTAAGAGCAGTATCAAGCTG-3' e

AP D 5'-CAAGCTTGAAGAGGATAGAG-3'

- para LEAFY:

LF E 5' - CGGATCCGTGICKIARIYKIGTTGGIACRT - 3' e

LF D 5' - GCGAATTCACIAAYCARGTITTYMGIYAYGC - 3'

Os “primers” para APETALA 1 são específicos para *Brassica oleraceae*, utilizados para amplificar por RT-PCR o RNA total de *Metrosideros excelsa* (Sreekantan *et al.*, 2004). Nesta última espécie, o fragmento de amplificação gerado por este par de "primers" tinha 325 pares de base. O fragmento de amplificação gerado com os primers para LEAFY apresentou 202 pares de base (Sreekantan *et al.*, 2004).

Para a síntese dos "primers" para AGAMOUS foi realizada busca no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) por seqüências nucleotídicas ortólogas ao gene de *A. thaliana* (em anexo) pertencentes às famílias botânicas Malvaceae, Betulaceae, Asteraceae, Lardinaceae, Rosaceae, Sabiaceae, Fabaceae e Solanaceae. Estas

seqüências foram alinhadas utilizando o aplicativo Dialign (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>). Os trechos onde ocorreu maior grau de consenso entre estas seqüências foram selecionados como modelo para a síntese de “primers” degenerados. A localização dos “primers” dentro de cada trecho consenso foi definida utilizando o aplicativo PRIMER 3 e sempre que necessário foram incluídas variações naquelas seqüências pré-definidas, para permitir um grande número de possibilidades de complementaridade. Os “primers” utilizados foram:

AG E 5´- ATYGARAAAYACHACVAAYCGHCAR - 3' e

AG D 5´- YCTYTTHTGCATRTABTCDATYTC - 3'

Os “primers” degenerados para amplificação do cDNA da ACTINA (Jameson *et al.*, 2004) foram utilizados como controle positivo de concentração do RNA nas reações de RT-PCR:

AC E 5´ - CGGATCCGTGCKIAARIYKIGTIGGIACRT-3' e

AC D 5´ - GCGAATTCTTCACCACYACHGCGYGARCG-3'

O fragmento de amplificação gerado por RT-PCR para *M. excelsa* tinha 423 pares de base (Jameson *et al.*, 2004).

2.1.5. Transcrição reversa e amplificação do RNA de guaranazeiro utilizando “primers” degenerados

Utilizando-se o kit “ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit” (New England Biolabs) e os “primers” citados anteriormente visou-se obter por RT-PCR

fragmentos amplificados de cDNAs relacionados com o florescimento de guaranazeiro. As reações de RT-PCR e amplificação foram realizadas em volume total de 50 μ L, com 1 μ g de RNA total e número de moles variável dos "primers" E e D, nas tentativas de ajuste das reações, 25 μ L de "mix" contendo cloreto de magnésio e 1 μ L da combinação de enzimas reverse transcriptase e Taq polimerase. Dependendo da concentração do RNA, também foi adicionado água DEPC. No aparelho Termociclador utilizou-se inicialmente a seguinte programação: 1 ciclo de 50 °C por 30 minutos, outro ciclo de 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos respectivamente, de 94 °C por 15 segundos, 50 °C por 30 segundos e 70 °C por 30 segundos e, por último, 1 ciclo de 70 °C por 7 minutos. Foi testada também a temperatura de 45 °C para o anelamento dos "primers", durante as reações de transcrição reversa e de amplificação, na tentativa de obter resultados mais expressivos de amplificação, ainda que com menor especificidade.

2.1.6. Macro extração de DNA de guaranazeiro

Antes da realização do experimento selecionou-se preferencialmente folhas jovens do clone 300 de guaranazeiro da casa de vegetação; pós a coleta conservou-nas imediatamente em nitrogênio líquido até o momento de se pesar 3 g do tecido vegetal em balança analítica; após essa etapa, a amostra foi transferida para um almofariz; onde foi macerada com auxílio de pilão adicionando-as nitrogênio líquido até que adquirisse o aspecto de pó. Este, foi rapidamente transferido para um tubo de polipropileno contendo 15 mL de tampão CTAB pré-aquecido a 65 °C, em banho maria, por 30 minutos, agitando-o a cada

10 minutos; após o referido tempo, a amostra ficou em capela de exaustão até seu total esfriamento. Em capela de exaustão, adicionou-se 1V de clorofórmio:álcool isoamílico em tubo Ependorf, agitando-o manualmente por 10 minutos, para evitar a quebra do DNA. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 8000 rpm por 10 minutos, no rotor Sorvall SS34. Transferiu-se a fase aquosa (fase superior) para um novo Ependorf. Repetiu-se novamente o procedimento que acabou de ser descrito. Após a repetição, adicionou-se 1/10 do volume de solução CTAB 1,4M NaCl à fase aquosa. Adicionou-se 2/3 de álcool isopropanol à temperatura de -20°C à fase aquosa. Após esse procedimento, esta foi centrifugada a 10 000 rpms por 30 minutos para se formar o pellete; derramou-se gentilmente o sobrenadante com a máxima cautela de não o perdê-lo; pois o mesmo, costuma estar difuso, no fundo ou ao longo da parede do tubo dependendo do ângulo do rotor do aparelho da centrifuga. Lavou-se o pellet 2x com 5 mL de etanol 70% deixando-o imerso por 5 a 10 minutos para que adquirisse os aspecto esbranquiçado; o etanol foi retirado e o pellete secado, ao se inverter o tubo Ependorf em papel toalha. Com auxílio de micropipeta com a extremidade da ponteira cortada, o DNA foi resuspenso em aproximadamente 400 µL de TE incubado-o à temperatura de 4°C por 2 horas.

2.1.7. Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose 1% em TBE

Na capela de exaustão preparou-se um gel de agarose a 1% para um volume final de 50 mL de TBE 1X contendo brometo de etídeo (0,5 ug/ml); ressaltando que a solução de agarose com TBE foi fundida em forno microondas.

O registro dos resultados foi realizado utilizando o sistema de foto documentação Kodak Zoom Digital Câmera e o aplicativo Kodak digital Science DC 120 Kit Gel Documentation Accessory Kit and 1D Image Analysis Software.

2.1.8. Análise do padrão de expressão espacial de folhas, caules, raízes e inflorescências

Para a análise de expressão espacial folhas, caules e raízes foram coletados de mudas de guaranazeiro mantidas em casa de vegetação. Folhas destas mesmas mudas foram coletadas para extração de DNA.

Para análise do padrão de expressão ao longo do desenvolvimento das inflorescências, utilizando-se uma escala de comprimento em centímetros averiguou-se, no Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus/AM) o comprimento das inflorescências de cada clone, coletando-se amostras de segmentos do ápice, meio e base, das inflorescências que apresentavam comprimentos de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 cm. Tendo sido coletados os segmentos foram preservados em gelo seco, até serem levados para o laboratório da Universidade Federal do Amazonas, onde ficaram estocados a temperatura de -80°C . Para a análise dos padrões de expressão de FLC, folhas recém-lancadas foram coletadas mensalmente de abril de 2004 a março de 2005, no mesmo local e preservadas da mesma maneira.

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1. Verificação da presença de ortólogos (seqüências homólogas) de genes de *Arabidopsis* implicados no florescimento em plantas de guaranazeiro;

Para ajustar as concentrações de RNA total e “primers” necessários para a obtenção de produtos de amplificação que pudessem ser recuperados do gel para serem clonados e utilizados como sondas foram realizados experimentos com 10 nmoles, como recomendado pelo fabricante do kit “ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit” (New England Biolabs) e, com 10 pmoles de primers para amplificar 1 ug de RNA total de caule de guaranazeiro (Figura 10). Houve a geração de um produto de PCR com cerca de 400 pares de bases na reação em que foi adicionada à menor quantidade dos “primers” (Figura 10, item 3). O tamanho do produto de amplificação foi similar ao produzido por RT-PCR para RNA total de *M. excelsa* utilizando “primers” com as mesmas seqüências (Sreekantan *et al.*, 2004).

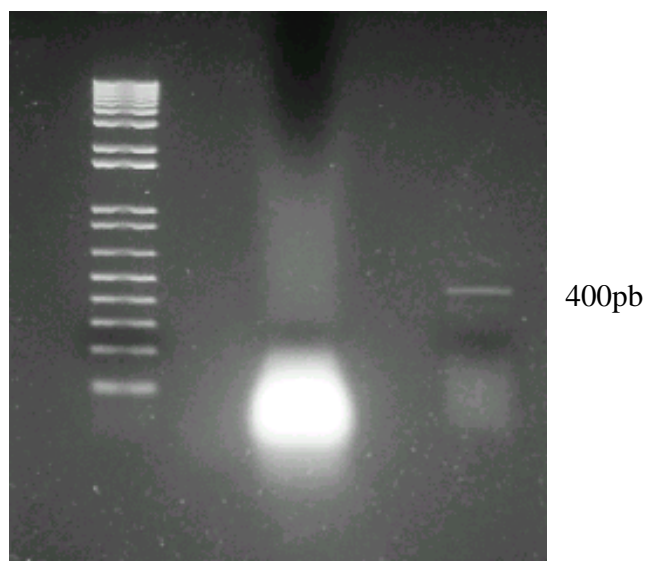


Figura 10: eletroforese em gel de agarose 1% do produto da reação de RT-PCR com 1 ug de RNA total de caule de guaranazeiro do clone 300. Temperatura de anelamento 50 °C. **1** - marcador 1 kb plus; **2** - reação de RT-PCR com 10 nmoles de "primers" para ACTINA, conforme instruções do fabricante do Kit ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit" (New England Biolabs); **3** - produto da RT-PCR com 10 pmoles "primers" para ACTINA.

As reações de RT-PCR subseqüentes foram tentativas de amplificação de RNA total de inflorescências de 1 e 3 cm com os "primers" degenerados (10 pmoles) para APETALLA 1 e para AGAMOUS, respectivamente. Nestas duas reações foram adicionados os "primers" para ACTINA, que serviria de controle de carregamento. Não houve visualização de produtos de amplificação destas reações e procedeu-se a reamplificação, utilizando 10 µL da reação de RT-PCR, Taq polimerase, os mesmos "primers", as mesmas temperaturas e programação do termociclador para a PCR. Resultaram da reamplificação, fragmentos

amplificados com cerca de 300 a 400 pares de bases quando foram utilizados os “primers” para APETALLA 1 e ACTINA (Figura 11, item 1).

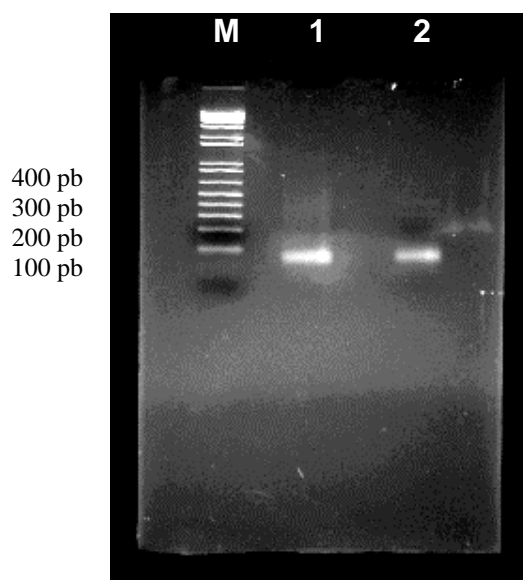


Figura 11: eletroforese em gel de agarose 1% do produto da reamplificação da reação de RT-PCR com 1 ug de RNA total de 1 - de inflorescência de guaranazeiro com 1 cm, utilizando “primers”para APETALA 1 e ACTINA; 2 - inflorescência de guaranazeiro com 3 cm utilizando “primers”para AGAMOUS e ACTINA. M - marcador, 1 KB PLUS

O fragmento amplificado com “primers”para APETALLA 1 em *M. excelsa* tinha 325 pares de base e, como já foi dito, o fragmento gerado com “primers”para actina tinha 400 pares de bases. A reação de reamplificação utilizando “primers”para AGAMOUS e ACTINA produziu dois fragmentos, muito tênues, ambos com cerca de 400 pares de bases (Figura 11, item 2). Esperava-se um tamanho do fragmento amplificado com os “primers” para AGAMOUS de cerca de 420 pares de bases .

Portanto, o tamanho dos fragmentos amplificados neste experimento correspondeu ao que era esperado, mas à intensidade da amplificação ficou muito abaixo do resultado anterior (Figura 10) tendo sido necessário realizar a reamplificação.

A ausência de produtos de amplificação em concentração mais alta poderia estar vinculada à concentração baixa de RNA nas amostras de inflorescência utilizadas. Inicialmente as concentrações de RNA total (ng/μL) dos tecidos de guaranazeiro foram determinadas por espectrofotometria. Optou-se, em seguida, pela certificação destas concentrações em gel de agarose corado com brometo de etídeo, em placas de Petri (Figura 12), utilizando como padrão RNA total do caule do clone 300, previamente utilizado para a reação de RT-PCR combinada com amplificação. Estas estimativas (Tabela 1) foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

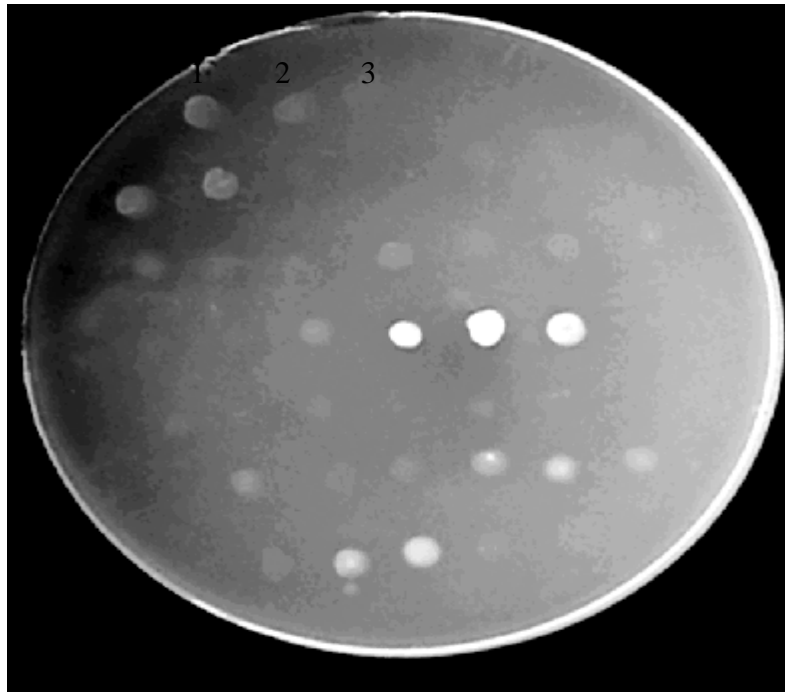


Figura 12: placa de Petri contendo gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (cerca de 2 μg) e 2 μL de amostras de RNA total de guaranazeiro. 1, 2 e 3, RNA total de caule de guaranazeiro utilizado como padrão de concentração.

abela 1: Estimativa da concentração (ng/ μ L) de RNA total de guaranazeiro baseada em espectrofotometria e na comparação com o RNA padrão de caule.

AMOSTRA *	ORIGEM DA AMOSTRA	[] ng/ μ l	volume
1	RNA de caule clone 300	120	25
2	RNA de caule clone 300	60	25
3	RNA de caule clone 300	30	25
4	RNA de inflorescência clone 609 1cm	0	20
5	RNA de inflorescência clone 609 1cm	200	5
6	RNA de inflorescência clone 609 1cm	150	25
7	RNA de inflorescência clone 609 1cm	0	25
8	RNA de inflorescência clone 609 1cm	10	50
9	RNA de inflorescência clone 609 1 cm	30	25
10	RNA de inflorescência clone 609 3 cm	20	20
11	RNA de inflorescência clone 609 3 cm	90	20
12	RNA de inflorescência clone 609 3 cm	80	55
13	RNA de inflorescência clone 609 3 cm	80	25
14	RNA de inflorescência clone 609 3 cm	20	18
15	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento ápice)	150	25
16	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento ápice)	60	20
17	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento ápice)	80	25
18	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento ápice)	50	25
19	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento meio)	20	50
20	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento meio)	0	50
21	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento meio)	150	20
22	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento base)	700	50
23	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento base)	900	20
24	RNA de inflorescência clone 609 6 cm (segmento base)	600	50
25	RNA de inflorescência clone 609 9 cm (segmento base)	0	20
26	RNA de inflorescência clone 609 9 cm (segmento meio)	50	50
27	RNA de inflorescência clone 609 12 cm (segmento meio)	30	25
28	RNA de inflorescência clone 609 12 cm (segmento meio)	80	50
29	RNA de inflorescência clone 609 15 cm (segmento meio)	20	20
30	RNA de inflorescência clone 609 15 cm (segmento meio)	120	50
31	RNA de inflorescência clone 609 18 cm (segmento ápice)	30	50
32	RNA de inflorescência clone 609 18 cm (segmento ápice)	0	20
33	RNA de inflorescência clone 609 18 cm (segmento meio)	0	50
34	RNA de inflorescência clone 609 18 cm (segmento meio)	150	25
35	RNA de inflorescência clone 609 18 cm (segmento base)	60	20
36	RNA de inflorescência clone 609 18 cm (segmento base)	120	50
37	RNA de inflorescência clone 609 21 cm (segmento ápice)	230	50
38	RNA de inflorescência clone 609 21 cm (segmento ápice)	170	20
39	RNA de inflorescência clone 609 21 cm (segmento meio)	200	20
40	RNA de inflorescência clone 609 21 cm (segmento meio)	240	50
41	RNA de inflorescência clone 609 21 cm (segmento base)	300	50
42	RNA de inflorescência clone 609 21 cm (segmento base)	80	20

* numeração correspondente aos resultados da Figura 11.

Levando em conta às estimativas de concentração do RNA total corrigidas por observação da fluorescência em comparação com o RNA de caule, foram realizadas repetições dos experimentos com a temperatura de anelamento dos “primers” igual a 45 °C.

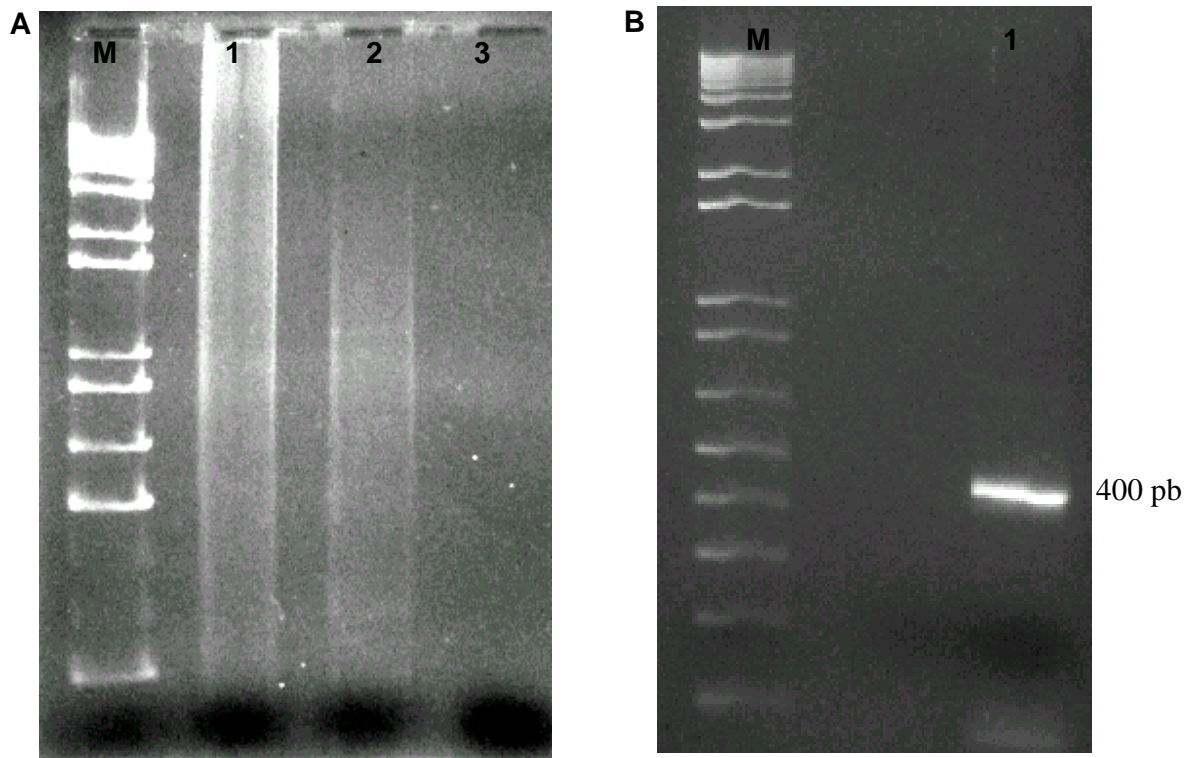


Figura 13: eletroforese em gel de agarose a 1% do produto das reações de RT-PCR com 1 ug de RNA total, temperatura de anelamento dos “primers” mantida em 45 °C.
A: 1 - inflorescência de 1 cm, utilizando “primers” para LEAFY; **2 e 3** - inflorescências

de 3 cm utilizando “primers” para APETALLA 1 e AGAMOUS, respectivamente. **B: 1** - caule de guaranazeiro, utilizando “primers” para ACTINA. **M** - marcador, 1 KB Plus.

Com a redução da temperatura de anelamento dos “primers”, foram gerados fragmentos de amplificação menos específicos, mas nenhuma banda bem definida e com concentração alta de fragmento amplificado foi identificada, com exceção para os fragmentos obtidos com “primers” para ACTINA (Figura 14 B), que surgiram com muito mais intensidade do que nos experimentos realizados com temperatura de anelamento de 50 °C.

Os próximos experimentos foram realizados com a intenção de testar a possibilidade de amplificação de fragmentos de genes e não de transcritos utilizando os mesmos “primers”. Fragmentos que fossem amplificados seriam purificados dos géis de agarose, clonados, marcados para emissão de luminescência e utilizados como sondas para a análise de expressão dos genes relacionados com o florescimento em "slots blots" com RNA total, como explicado acima. A opção pela realização de experimentos de hibridização para a análise de expressão explica-se pela maior praticidade, uma vez que com um único experimento de hibridização bem sucedido, para cada gene, utilizando fragmento resultante de amplificação, como sonda, poderia ter sido analisada a expressão nos diferentes tecidos e nos diferentes estádios de desenvolvimento das inflorescências. Além disso, depois de imobilizado o RNA na membrana (5 ug por amostra), esta poderia ser utilizada para hibridações sucessivas, lavando-se sondas previamente utilizadas e preparando-se a membrana para receber novas sondas. Além disso, uma vez clonado o fragmento amplificado poderia ser reamplificado muito mais facilmente e seqüenciado.

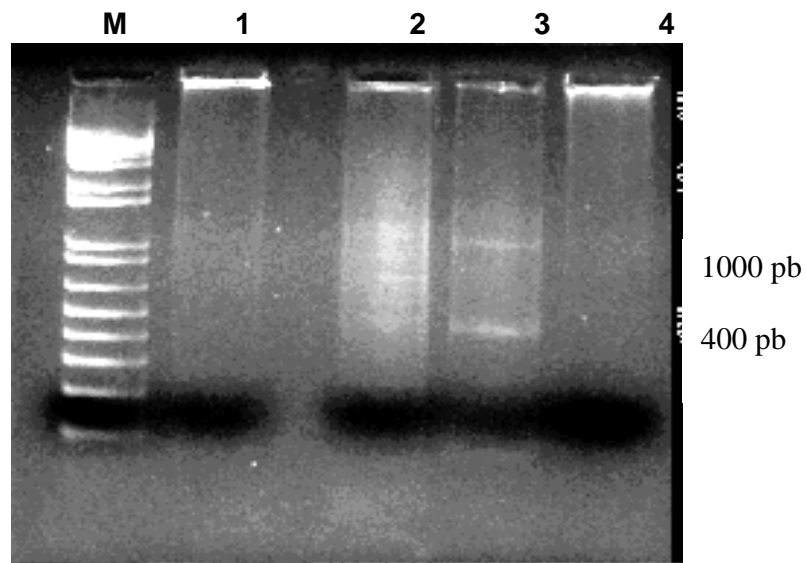


Figura 14: eletroforese em gel de agarose a 1% do produto das reações de PCR com 1 200 ng de DNA, temperatura de anelamento dos “primers” mantida em 45 °C. **1** - utilizando “primers” para LEAFY; **2** - utilizando “primers” para APETALA 1 e **3** - utilizando “primers” para ACTINA; **4** - utilizando “primers” para AGAMOUS. **M** - marcador, 1 KB Plus.

A amplificação de DNA com os “primers” descritos não gerou bandas específicas com exceção, mais uma vez, para a ACTINA (Figura 14, 3), com visualização de fragmentos de amplificação com aproximadamente 400 pares de bases e 1000 pares de bases. Os “primers” específicos para APETALA 1 produziram fragmentos amplificados com tamanhos variando de 400 a cerca de 1200 pares de bases. A elevação da temperatura de anelamento de 45 °C para 50 °C nas reações de amplificação do DNA provocou o aumento da expressão do fragmento de ACTINA com 400 pares de bases e eliminou os fragmentos gerados com “primers” para APETALA 1 (Figura 15).

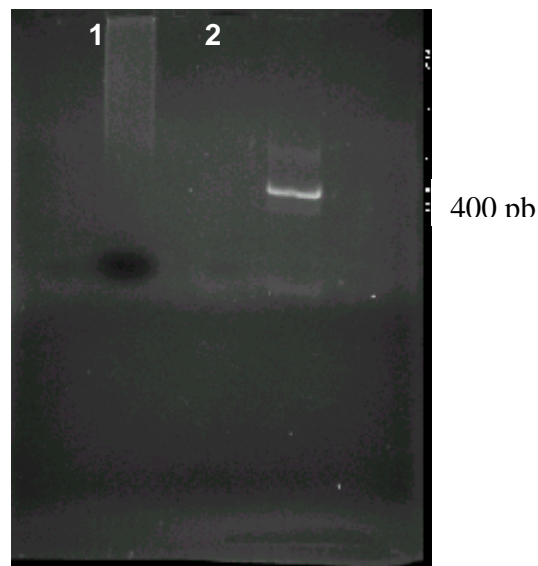


Figura 14: eletroforese em gel de agarose a 1% do produto das reações de PCR com 200 ng de DNA, temperatura de anelamento dos “primers” mantida em 50 °C. **1** - utilizando “primers” para APETALA 1; **2** - utilizando “primers” para ACTINA

Com o intuito de aumentar a especificidade dos fragmentos obtidos com “primers” para APETALLA 1 por amplificação do DNA e do cDNA de inflorescências de 3 cm, estes “primers” foram utilizados em reações de RT-PCR e PCR com temperaturas de anelamento de 55 °C e o produto destas reações foi reamplificado utilizando temperaturas de 45 e 50 °C. Resultaram das reações de reamplificação do DNA fragmentos com tamanhos variando de 400 a 1200 pares de bases (Figura 16), como havia sido obtido para amplificações de DNA

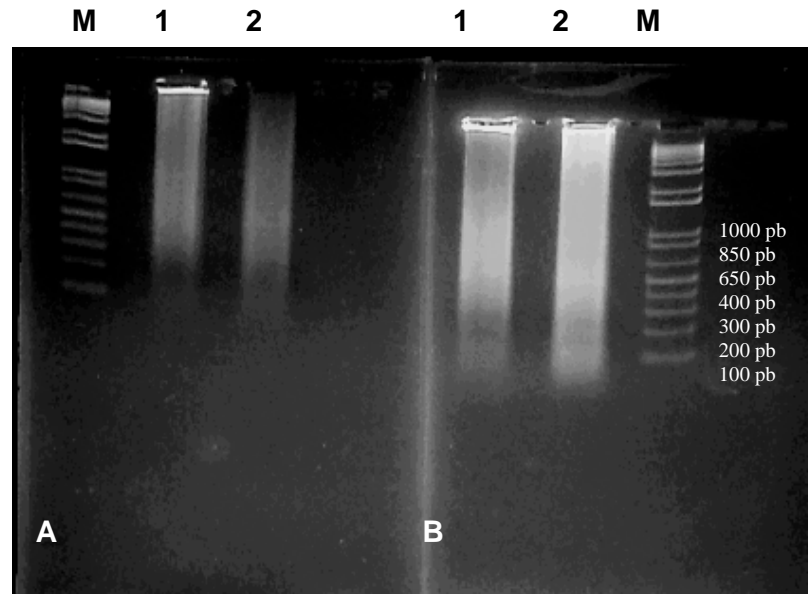


Figura 16: eletroforese em gel de agarose a 1% do produto das reações de PCR, com “primers” para APETALLA 1. **1** - reamplificação do produto de RT-PCR de inflorescência com 3 cm (1 μ g); **2** - reamplificação do produto de amplificação do DNA (200 ng). **A** - reações realizadas a 50 °C; **B** - reações realizadas a 45 °C.

Para realizar as reações de transcrição reversa e amplificação de fragmentos do cDNA e de DNA foram utilizados “primers” degenerados para os genes LEAFY e ACTIN, que geraram resultados satisfatórios para *M. excelsa*. Os “primers” para ACTIN (controle de carregamento), foram efetivos em amplificar segmentos específicos de cDNA e de DNA de guaranazeiro em diversos experimentos. Os “primers” para LEAFY não foram efetivos na amplificação de seqüências de guaranazeiro e para isto existem duas hipóteses: as seqüências não foram suficientemente similares aos ortólogos do guaranazeiro ou os estádios de desenvolvimento das inflorescências utilizadas eram muito avançados para que

houvesse detecção da expressão. Fragmentos amplificados com tamanhos esperados para produtos dos “primers” para APETALA 1 e AGAMOUS foram visualizados em pelo menos um experimento (Figura 11), mas não foram aproveitados para clonagem e este resultado não se repetiu.

Os “primers” utilizados para APETALA 1 foram desenhados para amplificar seqüências de *B. oleracea* (Sreekantan *et al.*, 2004) e com eles foram resultados de amplificação pouco específicos. A melhor adequação dos “primers” para APETALA a seqüências de guaranazeiro do que dos “primers” para LEAFY, pode ser parcialmente explicado admitindo-se que Brassicales e Sapindales sejam mesmo famílias próximas evolutivamente. No entanto, seria necessário verificar se os fragmentos amplificados apresentam similaridade com seqüências APETALA. Visto isto, talvez seja possível considerar que “primers” desenhados especificamente para genes de *Arabidopsis*, ou de Brassicales, teriam sido mais úteis na tentativa de alcançar os objetivos deste trabalho.

Não foram sintetizados “primers” para amplificação de FLC.

2.3. CONCLUSÃO:

Os resultados alcançados não permitem concluir sobre a presença de homólogos dos genes LEAFY, APETALA 1 e AGAMOUS em *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, ou sobre a expressão destes genes nos estádios de inflorescências avaliados.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, Paula Cristina da Silva; ATROCH, André Luiz; NASCIMENTO FILHO, Firmino José Do; SOUSA, Nelcimar Reis; MENDONÇA, Washington Carlos da Silva; FONSECA, Anna Paula Athayde da. Padrões de florescimento de clones de guaranazeiro. In: I SEMINÁRIO SOBRE PESQUISAS COM O GUARANAZEIRO NO AMAZONAS, 2005, Manaus - Amazonas. **Anais do I Seminário sobre Pesquisas com o Guaranazeiro no Amazonas**. Manaus - AM: Embrapa Amazônia Ocidental -SEBRAE, 2005. p. 25-29.

AUSIN, I., ALONSO-BLANCO, C., JARILLO, J.A.; RUIZ-GARCIA, L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.,. (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. **Nature Genetics** 36: 162-6.

BASTOW, R.; MYLNE, J.S.; LISTER, C.; LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R.A.; DEAN, C.;(2004) Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. **Nature** 427: 164-167.

BLAZQUEZ, M.; KOORNEEF, M.; PUTTERILL, J. (2001) Flowering on time: genes that regulate the floral transition. **EMBO Reports** 2: 1078-82.

BLAZQUEZ, M.A & WEIGEL, D. (2000). Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. **Nature** 404: 889-92. doi: 10.1038/35009125.

BERNIER, G.. The control of floral evocation and morphogenesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 175-219,1988.

CARROLL, S.B. (2001). Endless Forms: The Evolution of Gene Regulation and Morphological Diversity. **Cell** 101: 577-80.

COUTINHO, E.F.;SILVA, J.F. da; CRAVO, M. da S.; ATROCH, A.L. (1999) Controle de plantas daninha na cultura do guaranazeiro **Boletim**, 15. 2p.

CALDERAZZO, G.G. (1986) Guaraná., **Manuais práticos da vida**. Rio de Janeiro 32p.

CORRÊA, M.P.F.; POPINIGIS, F. & FIGUEIRÊDO, F.J.C. (1980) Identificação das estruturas embrionárias do guaraná. **Anais EMBRAPA UEPAE** de Manaus. 3p.

ESCOBAR, J.R.; CORREA, M.P.F; AGUILERA, F.J.P. (1984). Estruturas florais, floração e técnicas para a polinização controlada do guaranazeiro. In: I simpósio Brasileiro do Guaraná – Anais. Manaus, Embrapa- UEPAE. PP. 222.

GARCIA, T.B.; NASCIMENTO FILHO,F.J. do. SILVA, S.E.L da. Propagação vegetativa do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis*) (1999) **Circular técnica**, 4. 20p.

GOLDIM, C.J.E. (1978) Alguns Aspectos da Biologia Reprodutiva do Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) **Tese** p.83.

He, Y.; michaels, s.k.; amasino, r.m. (2003). Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. **Science** 302: 1751-4.

KRIZEK, B.A.;RICHAMANN,J.L;MEYEROWITZ, E.M. (1999) Use of the APETALA1 promoter to assay the in vivo function of chimeric MADS box genes .**Original Paper** 12:14-26.

LOBO, C.A.; DORNELAS, M.C. (2002). Biologia molecular do desenvolvimento reprodutivo em Pinus. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 28: 40-3.

MOURADOV, A.; GLASSICK, I.; HAMDORF, B.; MURPHY, L.; FOWLER , B.; MARLA, S.; TEASDALE, R.D. (1998) Needly, a Pinus radiata ortholog of FLORICAULA/LEAFY genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. **Plant Biology** 95: 6537-6542.

NASCIMENTO F.O.; ATROCH, A.L.; SOUSA, N.R.; GARCIA, T.B.; CRAVO, M.S.; COUTINHO, E.F. (2001). Divergência genética entre clones de guaranazeiro. **PAB** 36: 501-6.

NASCIMENTO FILHO, F.J. do; ATROCH A.L.; CRAVO, M. da S. (2000) Melhoramento Genético do guaranazeiro resultado de ensaios de avaliação de clones fase produtiva 1985 a 1994 **Boletim de Pesquisa**, 7. 54p.

NASCIMENTO FILHO, F.J. do; GARCIA, T.B. (1991) Competição e avaliação de clones de guaranazeiro (*Paullinia cupana var sorbilis*) **Boletim de Pesquisa**, 8.7p.

NASCIMENTO FILHO, F.J. do. (1983). Aspectos biológicos, taxonômicos, geográficos e potencial da cultura do guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K) Trabalho de revisão bibliográfica apresentada À disciplina Origem e Evolução das Plantas Cultivadas, do curso de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas 42p.

NG, M. & YANOFSKY, M.F. (2001). Function and evolution of the plant mads-box gene family. **Nature Reviews Genetics** 2: 186-95. doi: 1038/35056041.

PELAZ, S.; DITTA, G.S.; BAUMANN, E.; WISMAN, E.; YANOFSKY, M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. **Nature** 405: 200-3.

PENA, L., MARTIN-TRILLO, M., JUAREZ, J., PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. (2001). Constitutive Expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology** 19:236-7 doi: 10.1038/85719.

PURUGGANAR, M.C.; ROUNSLEY, S.D.; SCHMIDT, R.J AND YANOFSKY M.F. (1995) Molecular Evolution of Flower Development: Diversification of the Plant MADS-box Regulator Family. **Genetis**. 9: 345-356.

RIECHMANN, J.L.; HEARD, J.; MARTIN, L.; REUBER, L.; JIANG, C-Z.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIGGE, O.J.; SAMAHA, R.R.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, J.Z.; GHANDHARI, D.; SHERMAN, B.K.; YU, G.L. (2000).

Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukariotes. **Science** 290: 2105-10.

SOARES, S.K.B.; CARVALHO, N.D.M.; ANGELO, P.C.S.; FILHO, S.A (2006). MADS Box encontrados em ESTs de frutos e sementes de guaraná são tipo II Pôster SBPC regionall Manaus.

SAKAMOTO T, MORINAKA Y, ISHIYAMA K, KOBAYASHI M, ITOH H, KAYANO T, IWAHORI S, MATSUOKA M, TANAKA H. (2003). Genetic manipulation of gibberellin metabolism in transgenic rice. **Nature Biotechnology** 21: 909-13. Epub 2003 Jul 13.

SREEKANT, L.; CLEMENS, J.; MCKENZIE, J.M.;LENTON, R.J.;CROKER, J.S.;JAMESON, E.P. (2004). Flwwering genes in *Metrosideros* fit a broad herbaceous model encompassing *Arabidopsis* and *Antirrhinum* . **Physilogia Plantarum** 121:1-163 doi: 10.1111/j.0031-9317.

SUNG, S.; AMASINO, R.M. (2004). Vernaliztion in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. **Nature** 427: 159-64.

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* **Nature** 408: 796-815.

SOLTIS, P.S.; SLTIS, D.E.; CHASE, M.W. (1999). Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. **Nature** 402: 402-4 doi: 10.1038/46528.

SILVA, A.F., AZEVEDO; E.S.; GUERREIRO, F.M.; SOUZA, G.N.P.; CHAGAS, V.R. (1989) Guaraná em pó Centro Brasileiro de Apoio à pequena e média empresa CEBRAE 45p.

THEIBEN, G.; KIM, J.T.; SAEDLER, H. (1996): Classification and Phylogeny of the MADS-Box Multigene Family Suggest Defined Roles of MADS-Box Gene Subfamilies in the Morphological Evolution of Eukaryotes. **Molecular Evolution** 43: 484-516.

EINTER, K.U.; BECKER,A.; MÜNSTER, T.; KIM, J.T.; SALDLER, H.; THEISSEN. G. (1999): MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants.**Evolution**. 96: 7342-7347.

Anexo

SOLUÇÕES UTILIZADAS

Preparação de TBE 5X

Tris Base.....	54,0g
Ácido Bórico.....	27,5g
EDTA 0,5M pH 8	20,mL
Brometo de Etídeo.....	50µL
Completar com água destilada para 1000mL.	

Tampão de Extração 2X CTAB

2,0%CTAB.....	2,0G
1,4m NaCl.....	8,12g
2,0mM EDTA.....	4,0mL estoque 0,5M
100mM EDTA pH 8.....	4,0mL estoque 1M
1,0% polivinil-pirrodine.....	1,0g
Completar com água destilada para 100mL	
0,2% 2-mercaptoetanol 2µL/mL de Tampão CTAB	

Tampão de Precipitação CTAB

2,0% CTAB.....	2,0g
20mM EDTA.....	4,0mL estoque 0,5M

100mM Tris-Cl pG 8.....10mL estoque 1,0M

Água destilada para 100MI

Tampão TE

10mM Tris-Cl.....10mL 1M Tris-Cl pH 8

1Mm EDTA.....2mL estoque 0,5M EDTA pH 8

LOCUS NM_118013 1532 bp mRNA linear PLN 25-JAN-2005

DEFINITION Arabidopsis thaliana floral homeotic protein AGAMOUS (AG)

(At4g18960) mRNA, partial cds.

ACCESSION NM_118013

VERSION NM_118013.2 GI:22328781

KEYWORDS .

SOURCE Arabidopsis thaliana (thale cress)

ORGANISM [Arabidopsis thaliana](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;

Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;

rosids; eurosids II; Brassicales; Brassicaceae; Arabidopsis.

COMMENT PROVISIONAL [REFSEQ](#): This record has not yet been subject to final

NCBI review. This record is derived from an annotated genomic

sequence (NC_003075). The reference sequence was derived from

mrna.At4g18960.1.

On Aug 20, 2002 this sequence version replaced gi:[18415208](#).

ORIGIN

1 ctaaagtac tgaaaagaaa caccagttta attaattata cttccctcat atataactat

61 caaccaagta caaaactttt gtcaattctc aaaatcaact ttaccacat aattatctaa

121 catgtgatg ttccaaaacc agtttaata gaattacttt tcagaaaata catgtatatt
181 aactctatct aataaagaag aaacacatac ttatctcata gattccattc ataaaactat
241 gctttagtg gtaagaaaac cagtaatcaa acacaaattg acaagacact atatggatg
301 aaaaagtggg gaaaaatggg gataaatagt agagaaaatt aaaaagaaaa aaaatattcc
361 ttataaatg tatataccca tctcttcacc agcacaacct taccttccat tttctgcaac
421 ttctccaat ctcatacttt ccagaaaatc atttcccaa gaaaaataaa actttcccct
481 ttgttctct ccccccaaca gcaatcacgg cgtaccaatc ggagctagga ggagattcct
541 ctcccttgag gaaatctggg agaggaaaga tcgaaatcaa acggatcgag aacacaacga
601 atcgtaagt cactttttgc aaacgtagaa atggtttgct caagaaagct tacgagctct
661 ctgttcttg tgatgctgaa gtcgcaactc tcgtcttctc tagccgtggt cgtctctatg
721 agtactctaa caacagtgtg aaagggacta ttgagaggtg caagaaggca atatcggaca
781 atttaaacac cggatcggtg gcagaaatta atgcacagta ttatcaacaa gaatcagcca
841 aattgcgta acaataatc agcatacaaa actccaacag gcaattgatg ggtgagacga
901 tagggtcaat gtctcccaaa gagctcagga acttggaagg cagattagag agaagtatta
961 cccgaatccg atccaagaag aatgagctct tattttctga aatcgactac atgcagaaaa
1021 gagaagtga ttgcataac gataaccaga ttctctgtgc aaagatagct gaaaatgaga
1081 ggaacaatcc gagtataagt ctaatgccag gaggatctaa ctacgagcag cttatgccac
1141 cacctcaaac gcaatctcaa ccgtttgatt cacggaatta ttccaagtc gcggcattgc
1201 aacctaacaa tcaccattac tcatccgagg gtcgccaaga ccaaaccgct ctccagttag
1261 tgtaatatag gctgaaggaa atggccggga gtgaataaaa accagaattg ggtgagcaa
1321 gcaatataaa gctaatgcat gttatatata ttttatccc atgaatgtg taccagttaa
1381 tttatgctt atgtgatgt gaaattaata tcttaagac atgtcattaa tggcttaaat
1441 ttgctcaaa acatctatgt gtataagtgt actattagtt caattgtgt atttaattac
1501 caattcctgc tctattaatg atttattat ag

DIALIGN 2.2.1

Program code written by Burkhard Morgenstern and Said Abdeddaim

e-mail contact: bmorgen@gwdg.de

Published research assisted by DIALIGN 2 should cite:

Burkhard Morgenstern (1999).

DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment
approach to multiple sequence alignment.

Bioinformatics 15, 211 - 218.

For more information, please visit the DIALIGN home page at

<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>

```
program call:/usr/local/bio/src/dialign2_dir/dialign2-2 -fn /tmp/tmpweb/analseq/dialign227616/dialign2.out -n  
/tmp/tmpweb/analseq/dialign227616/dialign2.jeu
```

Aligned sequences: length:

=====

Malvaceae	1) gi 19743773	763
Betulaceae	2) gi 4103756 g	1179
Asteraceae	3) gi 27657746	1200
Lardinaceae	4) gi 48727609	1029
Rosaceae	5) gi 6970412 d	1054
Fabaceae	6) gi 62132638	1089
Rosaceae	7) gi 4096981 g	1116
Sabiaceae	8) gi 42794559	1333
Solanaceae	9) gi 848998 gb	1224
Asteraceae	10) gi 27804364	1001
Brassicaceae	11) gi 22328781	1532

Average seq. length: 1138.2

Please note that only upper-case letters are considered to be aligned.

Alignment (DIALIGN format):

=====

```
gi|19743773| 1 t----- -----  
gi|4103756|g 1 gaattcggca cgagcc-----  
gi|27657746| 1 gttttttt tttttttg ctataagtct tgaacaatat atatagcaaa  
gi|48727609| 1 -----  
gi|6970412|d 1 -----  
gi|6970412|d 1 -----  
gi|4096981|g 1 attgtgg-----  
gi|42794559| 1 aacagtggta tcaacggcaa agtacgctgg gatccacta ccctcacca  
gi|848998|gb 1 ctcttttg atgcatacaa aatatttctc ttagacgaca tgactT----  
gi|27804364| 1 tctgctagca -----  
gi|22328781| 1 ctaaattgac tgaaaagaaa caccag-----T----
```

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

```
gi|19743773| 2 -----  
gi|4103756|g 17 -----  
gi|27657746| 51 aaa-----A TGATTGAATA Ttggatta  
gi|48727609| 1 -----  
gi|6970412|d 1 -----  
gi|6970412|d 1 -----  
gi|4096981|g 8 -----  
gi|42794559| 51 cacttaaca tggatggtaa tggcgattcA TGAGTGAATA Tcaatcccc  
gi|848998|gb 47 -----
```


gi|27804364| 11 -----

gi|22328781| 28 -----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 2 -----

gi|4103756|g 17 -----

gi|27657746| 75 agatataatg attaaggta agaggTTTA TTAATTTAaa ggaca----

gi|48727609| 1 CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTC-----

gi|6970412|d 1 -----

gi|6970412|d 1 -----

gi|4096981|g 8 -----

gi|42794559| 101 CTTTACCTTT CTTTCGTTGC TTCTC-----

gi|848998|gb 47 -----TTAA TTAATTTAgc taacgtgcat

gi|27804364| 11 -----

gi|22328781| 28 -----TTAA TTAATTatac ttcctcata

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 2 -----

gi|4103756|g 17 -----

gi|27657746| 120 -----

gi|48727609| 26 -----

gi|6970412|d 1 -----

gi|6970412|d 1 -----

gi|4096981|g 8 -----

gi|42794559| 126 -----

gi|848998|gb 71 cgttgattg gt-----

gi|27804364| 11 -----

gi|22328781| 52 tataactatc aaccaagtac aaaactttg tcaattctca aaatcaact

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 2 -----
gi|4103756|g 17 -----
gi|27657746| 120 -----
gi|48727609| 26 -----TTCAT ATGTGTAT-----
gi|6970412|d 1 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|4096981|g 8 -----
gi|42794559| 126 -----TTTCTT CTTTATAga-----
gi|848998|gb 83 -----
gi|27804364| 11 -----
gi|22328781| 102 tcaccacata attaTCTAAC ATGTGTATgt tccaaaacca gtttaaatag

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 2 -----
gi|4103756|g 17 -----
gi|27657746| 120 -----
gi|48727609| 40 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|4096981|g 8 -----
gi|42794559| 141 -----
gi|848998|gb 83 -----
gi|27804364| 11 -----
gi|22328781| 152 aattactttt cagaaaatac atgtatatta actctatcta ataaagaaga

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gj|19743773| 2 -----
 gj|4103756|g 17 -----
 gj|27657746| 120 -----
 gj|48727609| 40 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|4096981|g 8 -----
 gj|42794559| 141 -----
 gj|848998|gb 83 -----
 gj|27804364| 11 -----
 gj|22328781| 202 aacacatact tatctcatag attccattca taaaactatg cttagtgag

000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

gj|19743773| 2 -----
 gj|4103756|g 17 -----
 gj|27657746| 120 -----
 gj|48727609| 40 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|4096981|g 8 -----
 gj|42794559| 141 -----
 gj|848998|gb 83 -----
 gj|27804364| 11 -----
 gj|22328781| 252 taagaaaacc agtaatcaaa cacaaattga caagacacta tatggatgta

0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

gj|19743773| 2 -----
 gj|4103756|g 17 -----
 gj|27657746| 120 -----AAAAAGT CGTT-----

gj|48727609| 40 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|4096981|g 8 ----- AAAAGAAAAG
 gj|42794559| 141 -----GAG AGAAAGGGAG AGAATCGATA GAGAAAAGGA CGAT-----
 gj|848998|gb 83 -----
 gj|27804364| 11 -----
 gj|22328781| 302 aaaagtgGGG AAAAATGGTG ATAAATAGTA GAGAAAAtta AAAAGAAAAA

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gj|19743773| 2 -----
 gj|4103756|g 17 -----
 gj|27657746| 131 -----G TCTACTTTAT AAATACTCAT Caaccatccc acctc---C
 gj|48727609| 40 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|4096981|g 18 AAgtctaaga -----
 gj|42794559| 178 -----T TTAAGATTAT AAATACCCAT CTGTaaaagc ta----CTC
 gj|848998|gb 83 -----
 gj|27804364| 11 -----
 gj|22328781| 352 AAatattccT TTATAAATGT ATATACCCAT CTCTtacca gcacaacCTT

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gj|19743773| 2 -----
 gj|4103756|g 17 -----C AGATCTGT-- -----
 gj|27657746| 168 CCATTCCATT TTCTGCAATC TTtctgttC AGATTTGT-- -----
 gj|48727609| 40 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|6970412|d 1 -----

gi|4096981|g 28 -----
gi|42794559| 214 TCTTTACAAT TTCTGCATCC TTcaggtgcg gtcctattgc ttaaagaaca
gi|848998|gb 83 -----
gi|27804364| 11 -----GA-----
gi|22328781| 402 ACCTTCCATT TTCTGCAACT Tctcaa--- -----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 2 -----
gi|4103756|g 26 -GGCAAAACA AGAGAGAGTA Aacctagcaa a-----G ACAGAGAAAC
gi|27657746| 206 -GGGAAACCC TCAAAAAGC- -----
gi|48727609| 40 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|4096981|g 28 -----
gi|42794559| 264 gGGAAAATCG AGAGAGAGAA Acagttttg ttgtaattG AGAGAGAAGC
gi|848998|gb 83 -----
gi|27804364| 13 -GGGAATGCT CTAAAAAAG- -----
gi|22328781| 429 -----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 2 -----
gi|4103756|g 67 CTCTGCTTCT GTtctgtcct aaaattccat catctcccc t-----
gi|27657746| 224 -----
gi|48727609| 40 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|4096981|g 28 -----
gi|42794559| 314 AGTTGTTTCT ATCTCATAag tttctcgtt tcctacc-- -----
gi|848998|gb 83 -----

gi|27804364| 31 -----
gi|22328781| 429 ----- ATCTCATAct tccagaaaa tcatttccc aagaaaaata

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 2 -----CAAGT TA-----
gi|4103756|g 108 -----C CATTGTTTGC TTTTACCAGC TA-----
gi|27657746| 224 -----AGAGAGA GATCAAAAAG
gi|48727609| 40 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|4096981|g 28 -----AAA AACCCAAAAG
gi|42794559| 352 -----AG
gi|848998|gb 83 -----TTTGC TTTTTCAGC TtAGAGAAA AATTAAGATG
gi|27804364| 31 -----TAAGAAA GAGAAAAAAG
gi|22328781| 469 aaacttccc CTTTGTCTT CTCCCCCAA CA-----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 9 --GG-----
gi|4103756|g 131 --GC-----
gi|27657746| 241 GTGT-----
gi|48727609| 40 -TTT-----
gi|6970412|d 1 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|4096981|g 41 CTGC-----
gi|42794559| 354 GTTA-----
gi|848998|gb 118 GTGT-----
gi|27804364| 48 TTgaaactt gattagtctc taggcctcaa ttatacatca agattcattt
gi|22328781| 501 --GC-----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 11 -----
gi|4103756|g 133 -----
gi|27657746| 245 -----
gi|48727609| 43 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|4096981|g 45 -----
gi|42794559| 358 -----
gi|848998|gb 122 -----
gi|27804364| 98 ctcaagtctc aaccccaccc attattctt ctaagtacaa gtaatcaaca
gi|22328781| 503 -----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 11 -----
gi|4103756|g 133 -----
gi|27657746| 245 -----
gi|48727609| 43 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|6970412|d 1 -----
gi|4096981|g 45 -----
gi|42794559| 358 -----
gi|848998|gb 122 -----
gi|27804364| 148 aacattcta taaaatacta gtcaagctca ttctatgtg attggtgca
gi|22328781| 503 -----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gj|19743773| 11 -----
 gj|4103756|g 133 -----
 gj|27657746| 245 -----
 gj|48727609| 43 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|6970412|d 1 -----
 gj|4096981|g 45 -----
 gj|42794559| 358 -----
 gj|848998|gb 122 -----
 gj|27804364| 198 agattcatgg caaattctga tgctttgag ctgatttca gctgcataga
 gj|22328781| 503 -----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gj|19743773| 11 ---AAGCATG GTGTACCCCA ATGAATC--- CCTTGAAGAC TCTC-----
 gj|4103756|g 133 ---AACCATG GAGTTCAGAC ACCAATC--- GATGTCAGTC TCTC-----
 gj|27657746| 245 --ATCCATG TCTTTTCCCA ATGAGTC--- AGGTGAGATG TCTC-----
 gj|48727609| 43 --AATTACA GATTTTCCAA ATCGATC--- ATCCAACAAT TCTC-----
 gj|6970412|d 1 -----ATG GCCTATGAAA ACAAACC--- CAACACGGTC CTGGACTCTG
 gj|6970412|d 1 -----ATG GCCTATGAAA ACAAACC--- CAACACGGTC CTGGACTCTG
 gj|4096981|g 45 ---AACTATG GCCTATGAAA ACAAACC--- CAACACGGTC CTGGACgCTG
 gj|42794559| 358 ---AACACG GATTTCTCCA ATCAAGC--- AACcctggaa acaC-----
 gj|848998|gb 122 --TTCCtaa tcaagaattt gagtcatca- ----- TCTT-----
 gj|27804364| 248 tcgATCCATG TCGTTTCCAG ATGAATC--- CGCGGACATG TCTC-----
 gj|22328781| 503 ---AATCAG GCGTACCAat cggagctagg AGGAGATTCC TCTC-----

000000111 111111111 1111111000 111111111 222200000

gj|19743773| 49 ---CCCAGAA GAAAATGGGG AGAGGAAAGA TCGAGATCAA GCGGATCGAA
 gj|4103756|g 171 ---CCCAGAG AAAATTGGGC AGGGGAAAGA TTGAAATCAA GCGGATCGAA
 gj|27657746| 283 ---CACAGAG AAAATTGGGT AGGGGAAAGA TCGAAATCAA ACGGATCGAA

gj|48727609| 81 ---CCCAAAG AAAAATGGGT AGAGGAAAGA TTGAAATTAA GCGGATCGAA
 gj|6970412|d 41 ATGCCCAAAG AAGATTGGGA AGGGGAAAGA TCGAGATCAA GCGGATCGAA
 gj|6970412|d 41 ATGCCCAAAG AAGATTGGGA AGGGGAAAGA TCGAGATCAA GCGGATCGAA
 gj|4096981|g 89 ATGCCCAAAG AAGATTGGGA AGGGGAAAGA TCGAGATCAA GCGGATCGAA
 gj|42794559| 396 ---CAAGAAG AAAGATGGGA CGAGGGAAAA TCGAGATCAA GCGGATTGAA
 gj|848998|gb 152 ---CTCAGAG GAAATCAGGA AGAGGAAAAA TTGAAATTAA GAGGATCGAA
 gj|27804364| 289 ---CACACG AAAGTTGGGC AAGGGAAAGA TCGAGATCAA GCGGATCGAG
 gj|22328781| 544 ---CCTTGAG GAAATCTGGG AGAGGAAAGA **TCGAAATCAA ACGGATCGAG**

0002233344 4444455666 7777888888 8888788788 7899988888

gj|19743773| 96 AACACGACGA ACCGCCAAGT TACCTTTTGT AAGAGGCGCA ATGGTTTGCT
 gj|4103756|g 218 AACACAATA ATCGACAAGT CACCTTCTGT AAGAGGCGCA ACGGCCTGCT
 gj|27657746| 330 AACACGACAA ATCGACAAGT GACATTTTGC AAACGCCGCA ACGGTTTGCT
 gj|48727609| 128 AACACAATA ATCGTCAAGT CACCTTTTGT AAGCGTCGCA ATGGATTACT
 gj|6970412|d 91 AACACCACCA ATCGTCAAGT CACCTTCTGC AAAAGGCGCA ATGGTTTGCT
 gj|6970412|d 91 AACACCACCA ATCGTCAAGT CACCTTCTGC AAAAGGCGCA ATGGTTTGCT
 gj|4096981|g 139 AACACCACCA ATCGTCAAGT CACCTTCTGC AAAAGGCGCA ATGGTTTGCT
 gj|42794559| 443 AACACTACCA ATCGCCAGGT TACCTTCTGT AAGCGCCGTA ATGGCTTACT
 gj|848998|gb 199 AATACTACGA ATCGACAAGT TACTTTTTGC AAGCGTAGAA ATGGTctttT
 gj|27804364| 336 AACACCACGA ATCGACAAGT GACTTTCTGT AAGCGTCGCA ACGGGTTGCT
 gj|22328781| 591 **AAC**ACAACGA ATCGTCAAGT CACTTTTTGC AAACGTAGAA ATGGTTTGCT

888867777 777677777 777775666 665556666 6666655566

gj|19743773| 146 CAAAAAGGCT TATGAGCTAT CGGTTCTTTG TGATGCTGAG GTTGCTTTGG
 gj|4103756|g 268 CAAAAAGGCC TATGAATTGT CTGTTCTCTG TGATGCTGAG ATTGCCCTCA
 gj|27657746| 380 GAAGAAGGCT TATGAGTTGT CTGTACTTTG TGATGCTGAG GTTGCGCTTA
 gj|48727609| 178 CAAGAAGGCT TATGAATTAT CTGTACTTTG CGATGCCGAA GTAGCTCTCG
 gj|6970412|d 141 CAAGAAGGCC TATGAGCTCT CTGTGCTCTG TGATGCTGAG GTTGCTCTCA
 gj|6970412|d 141 CAAGAAGGCC TATGAGCTCT CTGTGCTCTG TGATGCTGAG GTTGCTCTCA

gi|4096981|g 189 CAAGAAGGCC TATGAGCTCT CTGTGCTCTG TGATGCTGAG GTTGCTCTCA
gi|42794559| 493 CAAGAAGGCC TATGAATTAT CTGTCCTCTG CGATGCCGAA GTTGCCCTAA
gi|848998|gb 249 GAAAAAGGCT TATGAACTAT CTGTGCTTTG TGATGCTGAA GTTGCCCTTA
gi|27804364| 386 CAAGAAGGCG TATGAATTGT CTGTTCTTTG TGATGCTGAG GTTGCTCTTA
gi|22328781| 641 CAAGAAAGCT TACGAGCTCT CTGTTCTTTG TGATGCTGAA GTCGCACTCA

6766877888 8888866668 8888788888 888887887 7777556666

gi|19743773| 196 TTGCCTTCTC TAGCCGTGGT CGACTCTATG AGTATGCTAA CAAT---AGT
gi|4103756|g 318 TCGTCTTCTC TAGCCGTGGC CGCCTTTATG AGTATGCTAA CAACAGcAGT
gi|27657746| 430 TCGTCTTCTC GAGCCGCGGT CGCCTCTATG AGTATGCCAA CAAT---AGT
gi|48727609| 228 TCGTCTTCTC CAATCGCGGT CGCCTTTATG AGTACTCAA CAAT---AGT
gi|6970412|d 191 TAGTCTTCTC TAACCGTGGC CGTCTCTATG AGTATTCAA CAACAG---T
gi|6970412|d 191 TAGTCTTCTC TAACCGTGGC CGTCTCTATG AGTATTCAA CAACAG---T
gi|4096981|g 239 TAGTCTTCTC TAACCGTGGC CGCCTCTATG AGTATTCAA CAACAG---T
gi|42794559| 543 TCGTCTTCTC CACTCGCGGC CGGCTTTATG AATATGCAA CAATAG---T
gi|848998|gb 299 TTGTTTTCTC TAGCCGTGGC CGTCTCTATG AATATGCCAA CAACAG---T
gi|27804364| 436 TCGTCTTCTC GAGCCGTGGA CGCCTTTATG AGTATGCCAA CAACAG---T
gi|22328781| 691 TCGTCTTCTC TAGCCGTGGT CGTCTCTATG AGTACTCTAA CAACAG---T

7777888885 555677777 777777777 7677555566 6664330115

gi|19743773| 243 GTTAAAGCAA CAATTGAGAG GTATAAAAAG GCTT---CTG ATTCCTCAA
gi|4103756|g 368 GTCAAACAA CAATTGAGAG GTACAAGAAG GCATGCGCTG ATTCCTCAA
gi|27657746| 477 GTGAAAGGAA CCATAGATAG GTACAAAAG GCATGCCTGG ATCCACCAAG
gi|48727609| 275 GTCAAACAA CAATTGAGAG GTACAAGAAG GCTTGTGTAG ATTCCTCAA
gi|6970412|d 238 GTTAGAGAAA CAATTGAACG ATACAAGAAG GCATGTGCAG ATTCTTCAA
gi|6970412|d 238 GTTAGAGAAA CAATTGAACG ATACAAGAAG GCATGTGCAG ATTCTTCAA
gi|4096981|g 286 GTTAGAGAAA CAATTGAACG ATACAAGAAG GCATGTGCAG ATTCTTCAA
gi|42794559| 590 GTTAAAGCAA CAATTGATAG GTACAAAAG GCATGTGCAG ATACCTCTAA
gi|848998|gb 346 GTTAGGGCGA CTATTGATAG GTACAAGAAa caccaTGCTG ATTCCACAAG

gi|27804364| 483 GTTAGAGGGA CAATCGACAG GTACAAAAAG GCATGCCTAG ATCCACCAAG
gi|22328781| 738 GTAAAAGGGA CTATTGAGAG GTACAAGAAG GCAatatCGG ACAATTCTAA

555554456 6666666566 666666665 543333334 4444444333

gi|19743773| 290 TACTGGATCA GTTGCTGAAG TTAATGCTCA GTTCTATCAG CAAGAAGCTG
gi|4103756|g 418 TTCTGGATCT GTTTCTGAAG CTAATACTCA GTTCTACCAG CAAGAGGCTG
gi|27657746| 527 CAGTGGCTCT GTTGCAGAAG CAAATGCTCA GTTTTACCAA CAAGAAGCTG
gi|48727609| 325 TTCTGGGTCT GTTTCAGAAG CCAATGCCCA GTTCTACCAG CAAGAATCCT
gi|6970412|d 288 TAATGGATCT GTCTCTGAAG CTACTACTCA GTACTATCAG CAAGAAGCTG
gi|6970412|d 288 TAATGGATCT GTCTCTGAAG CTACTACTCA GTACTATCAG CAAGAAGCTG
gi|4096981|g 336 TAATGGATCT GTCTCTGAAG CTACTACTCA GTACTATCAG CAAGAAGCTG
gi|42794559| 640 TACTGGGTCG GTTTCAGAAG CCAATGCTCA GTTTTATCAG CAAGAATCCT
gi|848998|gb 396 TACAGGATCT GTTTCTGAAG CTAATACGCA GTATTACCAG CAAGAAGCAG
gi|27804364| 533 CAGTGGCTCG GTTTCTGAAG CCAATGCTCA GTATTACCAG GAAGAATCTG
gi|22328781| 788 CACCGGATCG GTGGCAGAAA TTAATGCACA GTATTATCAA CAAGAATCAG

3334444555 555555555 5565556666 6666666666 6666665544

gi|19743773| 340 ACAAACTCCG AAATCAAATC CGGAATTTGC AGAATGCAAA CAGGCATATG
gi|4103756|g 468 CTAAACTGCG TGGCCAAATT AGAAGTGTGC AGGATTCAA CAGGCATATG
gi|27657746| 577 CAAAACTCCG TCAGCAAATC GCCAACCTTC AGAACCAAAA CAGGCAATTT
gi|48727609| 375 TAAAATTGCG CCAACAGATA GGAATTTGC AAAACTTAAA CAGACACTTG
gi|6970412|d 338 CCAAACTGCG TGCCCAGATA ACCACTTTGC AGAACAGTAA CAGGGGTTAT
gi|6970412|d 338 CCAAACTGCG TGCCCAGATA ACCACTTTGC AGAACAGTAA CAGGGGTTAT
gi|4096981|g 386 CCAAACTGCG TGCCCAGATA ACCACTTTGC AGAACAGTAA CAGGGGTTAT
gi|42794559| 690 CAAAACTGCG CCAACAGATT GTCATTTTAC AAAACTCAA CAGACATTTG
gi|848998|gb 446 CAAAACTGCG ACGACAAATT CGAGATATAC AGACTTATA CAGGCAAATT
gi|27804364| 583 GAAAACTGCG TTCACAAATC GCAAACCTTC AGAATCAAAA CAGGCAATTT
gi|22328781| 838 CCAAATTGCG TCAACAAATA ATCAGCATAC AAAACTCAA CAGGCAATTTG

445555555 322333222 122222222 222222222 222222222

gi|19743773| 390 ----- --CTGGGAGA GTCCATAGGG GGATTGCCTA TGAAAGAGCT
gi|4103756|g 518 ----- --TTGGGCGA GGCTTTGAGC GAgtTAAATT TCAAAGAGCT
gi|27657746| 627 TATAGGAACA TCATGGGTGA ATCACTAGGA AACATGCCAG CAAAAGATCT
gi|48727609| 425 ----- --ATGGGTGA GGCTCTCGGC AGTATGTCTA TTAAGGAGCT
gi|6970412|d 388 ----- --ATGGCTGA GGGTTTGAGC AATATGTCTA TCAAGGAGCT
gi|6970412|d 388 ----- --ATGGCTGA GGGTTTGAGC AATATGTCTA TCAAGGAGCT
gi|4096981|g 436 ----- --ATGGCTGA GGGTTTGAGC AATATGTCTA TCAAGGAGCT
gi|42794559| 740 ----- --ATGGGTGA GGCTCTCAGT GCAATGACTG TTAAGGAACT
gi|848998|gb 496 ----- --GTTGAGAGA GGCATTGAGC AGTTTaaagcC CAAGGGACCT
gi|27804364| 633 TACAGGAACA TCATGGGTGA ATCTTTGACG GACATGCCAA TGAAAGATCT
gi|22328781| 888 ----- --ATGGGTGA GACGATAGGG TCAATGTCTC CCAAAGAGCT

000000000 002222222 222222111 111122222 222233333

gi|19743773| 428 TAAGAGCTTG GAGAGTCGTT TAGAAAAAGG AATTAGCAGA ATCCGTTCCA
gi|4103756|g 556 CAAGAACTTG GAGAAAATT TAGAGAAAGG AATTAACAGA ATCAGATCCA
gi|27657746| 677 CAAGAATCTT GAAGGCAAGT TAGAGAAAGG CATTAGCAGG ATCAGATCAA
gi|48727609| 463 AAAGCAACTA GAACTAGAA TAGAGAAGGG AATCAGTAGA ATCAGATCGA
gi|6970412|d 426 CAAGGGCGTG GAGACCAAAC TTGAGAAAGC AATTAGCAGA ATTAGATCCA
gi|6970412|d 426 CAAGGGCGTG GAGACCAAAC TTGAGAAAGC AATTAGCAGA ATTAGATCCA
gi|4096981|g 474 CAAGGGCGTG GAGACCAAAC TTGAGAAAGC AATTAGCAGA ATTAGATCCA
gi|42794559| 778 GAAGCAACTG GAAGGTAGAC TGGAGAAAGG CATTAGCAGA ATCCGATCCA
gi|848998|gb 534 CAAGAATCTG GAAGGCAAGC TTGAGAAAGC CATCGGTAGA GTTCGTTCCA
gi|27804364| 683 GAAGAACCTT GAACTAAGT TAGAGAAAGC AATTACCCGA ATTCGATCAA
gi|22328781| 926 CAGGAACCTG GAAGGCAGAT TAGAGAGAAG TATTACCCGA ATCCGATCCA

222222222 222222222 335555555 566666666 666777777

gi|19743773| 478 AAAAGAATGA GCTGTTGTTT GCTGAAATTG AGTATATGCA GAAAAGGGAA
gi|4103756|g 606 AAAAGAATGA GCTCCTGTTA GCAGAAATTG AGTATATGCA TAAAAGGGAA
gi|27657746| 727 AAAAGAATGA ACTTCTGTTT GCTGAAATCG AGTATATGCC AAAGCGAGAA
gi|48727609| 513 AAAAGAATGA ATTGTTGTTT GCGGAGATCG AGTATATGCA GAAGAGGGAA
gi|6970412|d 476 AGAAGAACGA GCTCTTGTTT GCCGAAATTG AGTACATGCA GAAAAGGGAA
gi|6970412|d 476 AGAAGAACGA GCTCTTGTTT GCCGAAATTG AGTACATGCA GAAAAGGGAA
gi|4096981|g 524 AGAAGAATGA GCTCTTGTTT GCCGAAATTG AGTACATGCA GAAAAGGGAA
gi|42794559| 828 AGAAGAACGA GATGTTATTT GCTGAAATAG AATACATGCA AAAAAGGGAG
gi|848998|gb 584 AAAAGAATGA ATTGCTCTTC TCAGAAATAG AGCTCATGCA AAAGAGGGAG
gi|27804364| 733 AAAAGAATGA ATTGTTATTT GCTGAAATCG AGTATATGCA GAAGAGGGAA
gi|22328781| 976 AGAAGAATGA GCTCTTATTT TCT**GAAATCG ACTACATGCA GAAAAGA**GAA

7777777776 5444555666 5557777767 7776677777 7777777777

gi|19743773| 528 ATTGACTTGC ATAACAATAA CCAACTTCTT CGAGCCAAGA TAGCTGAGAA
gi|4103756|g 656 GTTGACTTGC ATAACAATAA CCAGTTTCTC CGAGCAAAGA TAGCGGAGAA
gi|27657746| 777 AATGAGTTGC ATAACAATAA TCAGTTCCTC CGAGCAAAGA TTGCTGAAAA
gi|48727609| 563 ATTGACTTGC AGAACGATAA CATGTACCTC CGTGCTAAGA TAGCGGAGAA
gi|6970412|d 526 CTTGACTTGC ACAACAATAA CCAGCTCCTC CGAGCAAAGA TAGCTGAGAA
gi|6970412|d 526 CTTGACTTGC ACAACAATAA CCAGCTCCTC CGAGCAAAGA TAGCTGAGAA
gi|4096981|g 574 CTTGACTTGC ACAACAATAA CCAGCTCCTC CGAGCAAAGA TAGCTGATAA
gi|42794559| 878 ATTGACATGC AAAATGACAA CATGTATCTT CGAGCTAAGA TAGCTGAAAA
gi|848998|gb 634 ATTGAGATGC AGAACGCCAA CATGTACCTT CGAGCAAAGA TTGCTGAGGT
gi|27804364| 783 CTTGAGTTGC ATAACAATAA TCAGTTCCTT CGAGCAAAGA TAGCTGAAAA
gi|22328781| 1026 GTTGATTTGC ATAACGATAA CCAGATTCTT CGTGCAAAGA TAGCTGAAAA

6677766777 7566656666 6555556777 7777777777 766665555

gi|19743773| 578 CGAGAGG--- ---AAGCAGC AGAGCATGAA TTTGATGCCC GGAGGT---T
gi|4103756|g 706 TGAGAGA--- ---AACCAGC AGAACTTGAA TGTGATGCCA GGAGGG---G
gi|27657746| 827 TGAAAGATCC ---CAGCAGC AACACATGAG CTTGATGCCT GGAAGT---T

gj|48727609| 613 CGAGAGAGCG ---GGA---C AACATATGAA CCTGATGCCA GGAATGAA-
 gj|6970412|d 576 TGAGAGG--- ---CACCAGC AAAGCATAAA TGCGATTGCA GGTGGGCATG
 gj|6970412|d 576 TGAGAGG--- ---CACCAGC AAAGCATAAA TGCGATTGCA GGTGGGCATG
 gj|4096981|g 624 TGAGAGG--- ---CACCAGC AAAGCATAAA TGCCATTGCA GGTGGGCATG
 gj|42794559| 928 CGAGAGAGCT ---CAA---C AACACATGAG CATGATGCCT acatcTGAA-
 gj|848998|gb 684 AGAGAGAGCA ---ACA---C AGCAAATGAA CTTGATGCCT GGAGGA---G
 gj|27804364| 833 TGAAAGATCa gctCAGCAGC AGCACATGAG CTTGATGCCT GGAAGT---T
 gj|22328781| 1076 TGAGAGG--- ---AACAATC CGAGTATAAG TCTAATGCCA GGAGGA---T

5544442000 0002222222 2222222222 2222222222 2221110001

gj|19743773| 619 CaagtgcAA CTTGAGGCC CT----- ACATTCTCAA
 gj|4103756|g 747 GA-----AA CTATGAGCTC AT----- GCAGTCTCAG
 gj|27657746| 871 CT-----GA TTATGATCTT GTACC----- ACCTCATCAA
 gj|48727609| 656 -----TACGAGGTC AT----- GTCTTCTGCA
 gj|6970412|d 620 GA-----AG CTACGACATC AT----- GCAGCCGACT
 gj|6970412|d 620 GA-----AG CTACGACATC AT----- GCAGCCGACT
 gj|4096981|g 668 GA-----AG CTACGAGATC AT----- GCAGCCGACT
 gj|42794559| 971 -----TATGAAGCA AT----- GCCTCCTCAA
 gj|848998|gb 725 GAtctgaata ccagcaacag cccatgagca gtac-----TTCTCAG
 gj|27804364| 880 CT-----GA CTATGAGCTT GTGAC----- ACCTCACCAA
 gj|22328781| 1117 CT-----AA CTACGAGCag cttatgccac cacctcaaac GCAATCTCAA

110000011 1111100111 110000000 000000000 1111112222

gj|19743773| 651 CCAT----- ATGACTCTCG GAACTACTTC CAAGTCGATG CTTTACAACC
 gj|4103756|g 773 TCAT----- TTGATTCTCG AAATAATTTT CAAGTAGATG CACTACAACC
 gj|27657746| 900 CCAT----- TTGATGGTCG AAATACTT CAAGTCAACG ATCTTCAACC
 gj|48727609| 677 CCAT----- TTGACTCTCG AAATACTT CAAGTAAATC TATTGGAACC
 gj|6970412|d 646 CAGCCATTTT ATGAGGCTCG CAATAATTTT CAAGTGAATG CTTTGAACC
 gj|6970412|d 646 CAGCCATTTT ATGAGGCTCG CAATAATTTT CAAGTGAATG CTTTGAACC

gi|4096981|g 694 CAGCCATTTC ATGAGGCTCG CAACTATTTT CAAGTGAATG CTTTGGAACC
gi|42794559| 992 CAAT----- TTGACTCAAG GAACTTCCTG CAAGTAAATC TACTAGAACC
gi|848998|gb 766 CCTT----- ATGATGCTCG CAACTTCCTG CCTGTAAATC TGCTCGAACC
gi|27804364| 909 CCCT----- TCGATGGTCG AACTATCTT CAGTCGAATG AAATGCAACC
gi|22328781| 1161 CCGT----- TTGATTCACG GAATTATTTT CAAGTCGCGG CATTGCAACC

222200000 222233333 3444433333 3333333333 3333333333

gi|19743773| 695 Cgccaccaat tattATA--- ACCCTCAGCT ----- --GCAGCAAG
gi|4103756|g 817 CA----- ----ATC--- ATCACTACCC ----- --ACGCCAAG
gi|27657746| 944 GA----- ----ATA--- ACAGTTACTC ----- --TTGCCAAG
gi|48727609| 721 CA----- ----ATA--- ACCATTACTC ----- --GCATACGG
gi|6970412|d 696 CA----- ----ATATCC ATCAGTACTC ----- --GCGCCATG
gi|6970412|d 696 CA----- ----ATATCC ATCAGTACTC ----- --GCGCCATG
gi|4096981|g 744 CA----- ----ATATCC ATCAGTACTC ----- --GCGCCATG
gi|42794559| 1036 CA----- ----ATC--- ACCATTACTC ----- --CCGCCAGG
gi|848998|gb 810 TA----- ----ATC--- CTCATTACTC ----- --TCGTCAGG
gi|27804364| 953 CA----- ----GTA--- ATGATTACTC ----- --TTGCCAAG
gi|22328781| 1205 TA----- ----ACA--- ATCACCAAtta ctcatccgcg ggTCGCCAAG

220000000 0000221000 1122222222 0000000000 0022333333

gi|19743773| 730 ACCAGATAGC TCTTCACTAG TCTAATGTTA TGgg-----
gi|4103756|g 840 ACCAGATGGC ACTTCAGTTA GTTTAATAAT TATATGCTTG agggagtgtt
gi|27657746| 967 ATCAAACCCC TCTCCAGTTG GTGTAATTCA TGatggGCAT AAAGGATTTg
gi|48727609| 744 ATCAAACAGC CCTCCAACCT GGTTGATAT- -----GCCT AAAGGACTT-
gi|6970412|d 722 ACCAGATTTT CCTTCAATTA GTTTGATATA TGTATGCTTG GCCTGGTTTC
gi|6970412|d 722 ACCAGATTTT CCTTCAATTA GTTTGATATA TGTATGCTTG GCCTGGTTTC
gi|4096981|g 770 ACCAGATTTT CCTTCAATTA GTTTGATATA TGTATGCTTG GCCTGGTTTC
gi|42794559| 1059 AGCAAACCTGC CCTCCAACCT GGGTGACAT- -----Ggtc aaaagtccaa
gi|848998|gb 833 ACCAAACTGC TCTACAGCTT GTCTGATAat ctggaggaa tctactatcc

gi|27804364| 976 ACCAAACTCC TCTCCAGTTA GTGTAA-----
gi|22328781| 1240 ACCAAACCGC TCTCCAGTTA GTGTAATATA GGctgaagga aatggccggg

3333333333 3333333322 2222221111 1111111111 0000000000

gi|19743773| 764 -----
gi|4103756|g 890 aactgtgct gtacgtatT A-----
gi|27657746| 1017 gggttctac ttgcta---T A-----
gi|48727609| 786 -----
gi|6970412|d 772 TGCTGA---C TTCATCTTCA ATGG-----
gi|6970412|d 772 TGCTGA---C TTCATCTTCA ATGG-----
gi|4096981|g 820 TGCTGA---C TTCATCTTCA ATGG-----
gi|42794559| 1102 a-----
gi|848998|gb 883 agtttctga attagctca gggatcttC TTCATCTTCA gaaacgtcct
gi|27804364| 1002 -----
gi|22328781| 1290 agtgaataaa aaccagaatt gggtt-----

0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

gi|19743773| 764 -----
gi|4103756|g 911 -----
gi|27657746| 1035 -----
gi|48727609| 786 -----
gi|6970412|d 793 -----
gi|6970412|d 793 -----
gi|4096981|g 841 -----
gi|42794559| 1103 -----
gi|848998|gb 933 gcagtttaa cctatagttt gtaaactcct agaactgcta ccactgagat
gi|27804364| 1002 -----
gi|22328781| 1315 -----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 764 -----
gi|4103756|g 911 --TGATCTCC ATGGAGTG-- -----TAT CGAATATGAC ATCAAGTGAA
gi|27657746| 1035 --ACATCTTC ATGGTGATTA ATATGGTTTT ATGGTTTGTT Acaaccttat
gi|48727609| 786 -----
gi|6970412|d 793 ----- AGGGTGCA-- -----TAT GTGTTATGGC AAGAGATGAA
gi|6970412|d 793 ----- AGGGTGCA-- -----TAT GTGTTATGGC AAGAGATGAA
gi|4096981|g 841 ----- AGGGTGCA-- -----TAT GTGTAATGGC AACAGATGAA
gi|42794559| 1103 -----
gi|848998|gb 983 ttATATGTTT CTGGTTAAGC ATTTAGTTAT CTGTTTCGTT AAGGAATGAA
gi|27804364| 1002 -----
gi|22328781| 1315 -----GAGCA

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 764 -----
gi|4103756|g 950 -----AGA TATATAAGAG GTAT-----
gi|27657746| 1083 tctaagtATC TAGTTTGAct ttg-----
gi|48727609| 786 -----C TGAT-----
gi|6970412|d 824 -----AGC TAGCTAGCTA CAAGTAGCAC TT-----
gi|6970412|d 824 -----AGC TAGCTAGCTA CAAGTAGCAC TT-----
gi|4096981|g 872 -----AGC TAGCTAGCTA CAAGTAGCAC TT-----
gi|42794559| 1103 -----
gi|848998|gb 1033 -----ATC TTGTTTGATg ttgccttta ttcttacagg ctctataaa
gi|27804364| 1002 -----
gi|22328781| 1320 -----AGC AATATAAAGC TAAT-----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gj|19743773| 764 -----
 gj|4103756|g 967 -----GC ATGATGTcag
 gj|27657746| 1107 -----
 gj|48727609| 791 -----TG ATGCTCTCTA
 gj|6970412|d 849 -----
 gj|6970412|d 849 -----
 gj|4096981|g 897 -----
 gj|42794559| 1103 -----AGTCTGGTG ATGATCTCTT
 gj|848998|gb 1076 tgtaaagagt gttgataat gttgatgg tAGCCTAGTG ATAATCTTTa
 gj|27804364| 1002 -----
 gj|22328781| 1337 -----GC ATGTTATATA

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gj|19743773| 764 -----
 gj|4103756|g 979 gcactaacag gaggctacac tccaataata taatggcttt gtagacacta
 gj|27657746| 1107 -----TG TTCTTGTTTT attgcatg ggtgcca--
 gj|48727609| 803 TATACATATC TAATTGaatg ctataaggta tct-----
 gj|6970412|d 849 -----TGTTAAGTAG GAGTTAAGCA
 gj|6970412|d 849 -----TGTTAAGTAG GAGTTAAGCA
 gj|4096981|g 897 -----TGTTAAGTAG GAGTTAAGCA
 gj|42794559| 1122 CCTTCCTTTG TTCTTGTTTT catatttga TGTAAGTAG TAAGTTATCA
 gj|848998|gb 1126 aaaccagcct caaatcttat gggggacct -----
 gj|27804364| 1002 -----
 gj|22328781| 1349 TATATTTATC CCATgaatgt tgtatca--

000000000 000000000 000000000 111111111 111111111

gj|19743773| 764 -----
 gj|4103756|g 1029 ct-----
 gj|27657746| 1136 ----CAATG TGTATTTTAT GAAACAact gttttccac -----

gj|48727609| 836 -----TG AGAAAGCTAT GAAgctggtt gtatccatgg ag--ATGAGG
 gj|6970412|d 869 GAAACCAACT TCGCTT---- -----
 gj|6970412|d 869 GAAACCAACT TCGCTT---- -----
 gj|4096981|g 917 GAAACCAACT TCGCTT---- -----
 gj|42794559| 1172 GAAAGCAATG AGAATGCTAA GAACCAgaag gaaaataatg ccaaATGAGG
 gj|848998|gb 1156 -----
 gj|27804364| 1002 -----
 gj|22328781| 1376 -----G TGAATTTTAT Gcttatgttg atgtgaaatt aatatcttaa

1111111100 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

gj|19743773| 764 -----
 gj|4103756|g 1031 -----CATAA
 gj|27657746| 1171 -----
 gj|48727609| 876 GCCTTAGCAT TTTCTCT-- ----- ---ACTCAG ATat-----
 gj|6970412|d 885 ----- ---TGTGGT TAATTAATTA AAAAACCTCT CCCACAGTTA
 gj|6970412|d 885 ----- ---TGTGGT TAATTAATTA AAAAACCTCT CCCACAGTTA
 gj|4096981|g 933 ----- ---TGTGGT TAATTAATTA AAAAACCTCT CCCACAGTTA
 gj|42794559| 1222 GTCTTAGCAT AACTCT-- ----- ---ACTTAC ATGGGCATAA
 gj|848998|gb 1156 -----T CCCACCGTTA
 gj|27804364| 1002 -----
 gj|22328781| 1417 agacatgca ttaaTGTGCT TAATTTGCTT CAAAACATCT ATGTGTATAA

0000000000 0000111000 0000000000 0000111111 1100000000

gj|19743773| 764 -----
 gj|4103756|g 1036 GACTcctaAG TATT----- ---CCTAT TAGAA---G TATTGGACAT
 gj|27657746| 1171 ----- ---GGTTAT
 gj|48727609| 903 -----AT AA----- ---CTCATAA TCCTCCTTAA TTGGTGAGGA
 gj|6970412|d 921 G TACTGGCAT TA----- ---CACCAAG TACTAATTAA AAGGGGATAT
 gj|6970412|d 921 G TACTGGCAT TA----- ---CACCAAG TACTAATTAA AAGGGGATAT

gi|4096981|g 969 G TACTGGCAT TA----- --CACCAAG TACTA----A AAGGGGATAT
gi|42794559| 1255 GACT----AG TATT----- ----CTTAT ctgttattt tgcgaacca
gi|848998|gb 1167 GTTCATGTAT Tttttttg gtcCTCATAA Tatgaagtat ac-----GA
gi|27804364| 1002 -----
gi|22328781| 1467 GTGT----AC TATTagtca -----

000000000 000000000 000000000 000000000 0001111111

gi|19743773| 764 -----
gi|4103756|g 1071 CTTTTCTGTA TGTTTATgct tgcactaagc atatagt-- -----
gi|27657746| 1178 CTTCTTTGTA Tt----- -----
gi|48727609| 934 CTTGTTCTGa actaacctt atgcaagACT TAAATCCACA CCACTATATT
gi|6970412|d 960 CTTGTTTGTGTA TAATTATT-- -----ACT GAATGCTGCA GCAATATGTA
gi|6970412|d 960 CTTGTTTGTGTA TAATTATT-- -----ACT GAATGCTGCA GCAATATGTA
gi|4096981|g 1004 CTTGTTTGTGTA TAATTATT-- -----ACT GAATGCTGCA GCAATATGTT
gi|42794559| 1290 ttattatat aaaagacc- -----
gi|848998|gb 1211 CTTTTTCTGg gctt----- -----
gi|27804364| 1002 -----
gi|22328781| 1483 -----ATT

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 764 -----
gi|4103756|g 1109 ----ATTCT GTGAcagaat cataattagc tgaTTTTAAC AGcctctctt
gi|27657746| 1190 -----
gi|48727609| 984 GGTATATTAT CAAACGTATT CCCTC-----
gi|6970412|d 1001 CTAAGATTCT GTGAGATACA C----- ---TTTTAAC AGTTGAATTC
gi|6970412|d 1001 CTAAGATTCT GTGAGATACA C----- ---TTTTAAC AGTTGAATTC
gi|4096981|g 1045 CTAAGATTCT GTGAGATACA C----- ---TTTTAAC AGTTGAATTC
gi|42794559| 1309 -----
gi|848998|gb 1225 -----

gi|27804364| 1002 -----
gi|22328781| 1486 GTTGTATTTA ATTACCAATT CCTGC-----

000000000 000000000 000000000 000000000 000000000

gi|19743773| 764 -----
gi|4103756|g 1154 tgtaacat-- -----AAA AAAAAAAAAA AAAAA-----
gi|27657746| 1190 -----AA AAAAAAAAAA-----
gi|48727609| 1009 -TC-----AAA AAAAAAAAAA AAAAA-----
gi|6970412|d 1039 ATC-----AAA AAAAAAAAAA-----
gi|6970412|d 1039 ATC-----AAA AAAAAAAAAA-----
gi|4096981|g 1083 ATcattgatc ttttaTAAAA AAAAAAAAAA AAAAA-----
gi|42794559| 1309 -----TAAAA AAAAAAAAAA AAAAAaaaa
gi|848998|gb 1225 -----
gi|27804364| 1002 -----
gi|22328781| 1511 -TC-----TATT AAtgattta ttatag---

010000000 000000111 111111110 000000000

