



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica

Sequencia completa do genoma cloroplasmático do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e diversidade genética de variedades tradicionais brasileiras e africanas

Aluna: Ana Paula Zotta Mota

Orientador: Profº. Dr. Francisco José Lima Aragão

Dezembro de 2012

Brasília-DF

**A minha querida avó Diasis que
agora está cuidando de mim lá de cima
DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

Ao Francisco Aragão por ter me acolhido em seu grupo e por sempre ser um excelente orientador. Sem sua orientação e atenção nada disso seria possível.

À Fundação Arthur Bernardes pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos do laboratório de Transferência de Genes, por terem me proporcionado um ótimo ambiente de trabalho e por ajudar sempre que precisei e por tornar tudo mais agradável.

À Juliane, Andréa, André e Abdul, por serem esses amigos maravilhosos que encontrei em Brasília e que me ajudaram a amar essa cidade.

Aos meus mais queridos amigos Felipe Brisk, Max Ingberman, Pamela Harada e Paula Saizaki, que mesmo longe continuaram me apoiando, ajudando, conversando, ouvindo...

Aos colegas do programa de pós-graduação, Estevão, Gabriela, Priscila, Jair, Carol, Graça, Micheline e Paulo, por todas as horas de aulas, estudos, almoços, conversas e risadas.

Aos meus pais e irmã, por serem tudo na minha vida e me proporcionarem a incrível oportunidade de ter feito este mestrado.

Aos meus tios Conceição e Manuel, que estiveram presentes todos os dias dessa caminhada, sempre com esse coração imenso.

A Letícia por ser a pessoa que dá muito mais vida a tudo e sempre me fez sorrir até mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha avó Esther por sempre torcer e rezar por mim.

**O futuro tem muitos nomes.
Para os fracos é o inalcançável.
Para os temerosos, o desconhecido.
Para os valentes é a oportunidade.**

Vitor Hugo.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Esquema da organização das regiões presentes nos cloroplastos 7
- FIGURA 2. Mapa do cloroplasto de *Vigna unguiculata*. Apresenta quatro regiões, destacadas no círculo interno do mapa, LSC, SSC, IRa e IRb. As caixas representam os genes do genoma do cloroplasto de *Vigna unguiculata* 20
- FIGURA 3. Comparação do genoma cloroplastidial das leguminosas já sequenciadas e como genoma de referencia *Arabidopsis thaliana*. As linhas pretas abaixo dos genomas representam as regiões repetitivas de cada espécie 22
- FIGURA 4. Gel de agarose com produtos da PCR dos 9 pares de primers testados. Cada par de primer foi testado para as mesmas 6 plantas TVu 1887 (coluna 1), TVu 2339 (coluna 2), IT98-1101-5 (coluna 3), IT93K-452-1 (coluna 4), IT81D-784 (coluna 5) e MNC05 (coluna 6) 23
- FIGURA 5. Comparação dos 36 acessos de *Vigna unguiculata* no intervalo entre 59595 pb e 59725 pb. Detalhe em amarelo, sítio de BamHI, gerado pela transversão entre as bases T e C 24
- FIGURA 6. Árvore filogenética das diferentes cultivares de *Vigna unguiculata*. Os números indicados mostram a taxa de bootstrap de cada ramo 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das espécies de leguminosas já sequenciadas, tamanho do cloroplasto em pares de bases, autores e ano de publicação	8
Tabela 2. Solução de isolamento de cloroplastos	13
Tabela 3. Sequências dos primers testados para o genoma do cloroplasto de <i>Vigna unguiculata</i>	16
Tabela 4. Acessos de <i>Vigna unguiculata</i> utilizados para análise de filogenia	17
Tabela 5. Caracterização dos genomas das espécies de leguminosas sequenciadas	20

RESUMO

Cloroplastos são organelas presentes em todas as plantas e são responsáveis pelo processo da fotossíntese, além de funcionarem como reguladores de diversas vias metabólicas essenciais. Estes possuem seu próprio genoma que, por sua vez, é chamado de plastoma. Seu genoma é circular, altamente conservado e dividido em quatro regiões, sendo duas regiões invertidas e repetidas (IRa – Inverted repeat -, e IRb), uma região única de cópia longa (LSC – Large Single Copy) e uma região única de cópia curta (SSC – Small Single Copy). Atualmente, mais de 40 genomas cloroplastidiais de eudicotiledoneas já estão sequenciados e catalogados em bancos de dados específicos e funcionam como uma importante ferramenta para comparação de genomas. Portanto, com o avanço nos estudos nessa área foi possível observar que o cloroplasto possui um genoma extremamente conservado, apresentando poucas diferenças entre as espécies e, até mesmo, entre plantas e algas. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), espécie da família das Fabaceae subfamília papilionoídea, é uma leguminosa de grande importância econômica na América Latina, África e Ásia. Muitos grupos, hoje, estão trabalhando com as mais diversas espécies de plantas para, desta forma, obter respostas mais precisas sobre suas origens evolutivas, sua proximidade com outras espécies, como também, explicar a origem desta organela. O sequenciamento do presente trabalho foi obtido pelo método Platinum FLX, gerando um total de 96.215 reads. Esses dados foram analisados com o programa MIRA 3.0, que resultou em um contig final de 152.415 pb. As IR apresentaram 25.883 pb cada, a LSC 81.468 pb e a SSC 19.181. As anotações do genoma cloroplastidial mostraram que a espécie analisada possui 120 genes, sendo que 25 destes estão na região repetitiva do genoma. A comparação com os genomas de outras leguminosas já sequenciadas mostrou a alta conservação do genoma plastidial. Baseado nisso 9 pares primers foram montados para análise de diversas variedades de feijão caupi. Destes, o primer 7 foi selecionado por ser o qual apresentava maior número de polimorfismos entre as variedades. Com a análise destes polimorfismos, nas 36 diferentes variedades, foi possível separá-las em dois grupos, haplótipo 0, variedades que apresentavam um sítio de BamHI e haplótipo 1, variedades que não possuíam este sítio. Desta forma levantou-se a hipótese de que as cultívares do Brasil possuam mais de uma origem, além da nigeriana.

Palavras-chave: Genômica; Caupi; Cloroplasto;

ABSTRACT

Chloroplasts are important cellular organelles found in all plants, responsible for photosynthesis and regulation of different metabolic pathways. They possess their own genome, known as plastome, which is circular with highly conserved four regions; two inverted repeats (IR) designated Ira and IRb; a large single copy (LSC) region and a small single copy (SSC) region. Although analysis of different chloroplast genomes demonstrates that it is highly conserved amongst several plant with little or no difference between species and indeed between algae, more than 40 different plastomes of higher plants have been sequenced and are available in different data base and represent important tools for genome comparative analysis. Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), an important leguminous crop grown in different parts of the world. Different research groups are involved in work that ultimately seek to improve different varieties of the crop. Thus the availability of specific and precise information regarding its evolution and domestication will help in transgenic and breeding programs which will ensure the development of elite varieties of the crop. In this work, the complete chloroplast genome of *V unguiculata* was generated using Platinum FLX method, which gave a total of 96.215 reads. When analyzed using MIRA 3.0, the reads led to the identification of a final contig containing 152.415bp. The IRs of the plastosome comprise of 25,883 bp each while LSC contains 81.468bp and SSC contains 19.181 bp. Chloroplast genome annotation showed that *V unguiculata* chloroplast contains 120 genes, 25 of which are located in the repetitive region. Comparative analysis of genomes available from other leguminous species showed high degree of conservation in the chloroplast genome regions. In parallel, and based on the complete genome of *V unguiculata*, nine (9) pairs of primers (numbered 1 to 9) were designed to analyze 36 different cultivars. Primer 7 was selected because it presented a higher degree of polymorphism among varietys. This 36 varietys in which led to the identification of two distinct groups, designate haplotype 0 and haplotype 1. This divergence leads us to hypothesize that Brazilian cultivars may have originated from other regions of the world.

Key-words: Feijão-Caupi; Chlroplast; Genomic;

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>Vigna unguiculata</i>	12
1.2 Cloroplasto	13
2.1. Objetivos Gerais	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material vegetal	16
3.2. Isolamento do cloroplasto	16
3.2. Extração de DNA cloroplastidial para sequenciamento	17
3.3. Montagem e análise dos dados do sequenciamento	17
3.4. Análise da filogenia de <i>Vigna unguiculata</i>	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Sequenciamento e anotação dos genes	21
4.2. Análise filogenética dos acessos de <i>Vigna unguiculata</i>	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	36

1. INTRODUÇÃO

Cloroplastos são as organelas responsáveis pelo processo da fotossíntese, presentes tanto em plantas quanto em algas. Além da fotossíntese os cloroplastos são responsáveis por diversas vias metabólicas essenciais para planta, como biossíntese de aminoácidos, pigmentos e vitaminas (Taiz & Zeigler, 2004). Os cloroplastos possuem um genoma próprio, independente do DNA nuclear da planta, altamente conservado, e possui quatro regiões distintas, sendo duas regiões invertidas e repetidas (IR) que separam as regiões longa de cópia única (LSC) e curta de cópia única (SSC) e conformação circular (Palmer, 1991; Raubeson & Jansen, 2005) como demonstrado na figura 1. Sua origem na célula vegetal ocorreu há bilhões de anos, com a simbiose com uma cianobactéria e uma célula eucarionte não fotossintetizante (Cavalier-Smith, 2000). Estas características dos cloroplastos levaram a inúmeros estudos para compreender melhor sua estrutura e relação com o genoma nuclear das células vegetais. Já existem mais de 40 genomas cloroplastidiais publicados de eudicotiledôneas. Estes trabalhos tem visado principalmente o estudo das relações filogenéticas, teorias sobre o surgimento do cloroplasto, diferenciação intraespecífica e introgressão interespecífica (Petit et al, 2003, 2005).

Apesar desse alto nível de conservação, muitos rearranjos do genoma cloroplastidial têm sido reportados nos estudos, tais como a duplicação dos genes de tRNA, *ycf2*, *rpl19*, *rpl2*, *rpl23* e *psbA*, perdas de genes como genes *ndh*, genes *ycf*, *infA* e *accD* (Maier et al., 1995; Millen et al., 2001). Esses rearranjos foram reportados para

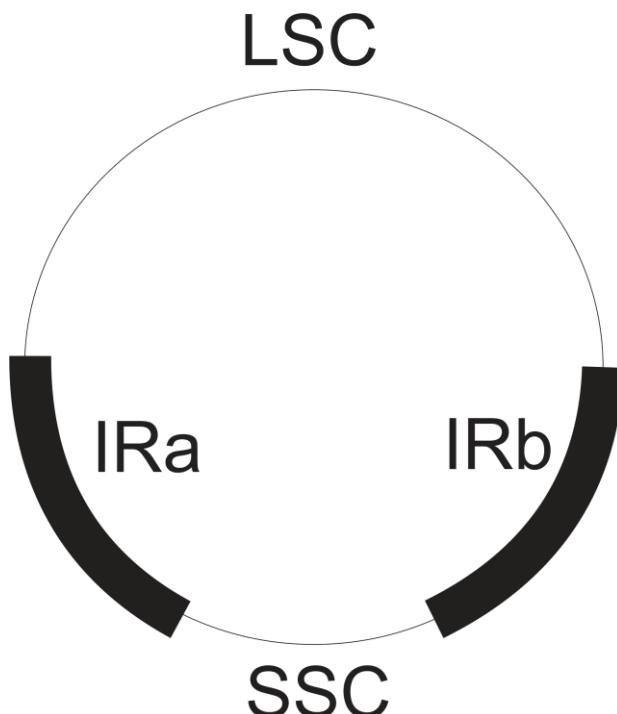


Figura 1. Esquema da organização das regiões presentes nos cloroplastos

linhagens específicas, que são: algas verdes, *Campanulaceae*, *Geraniaceae* e *Fabaceae* (Lee et al. 2007; Magee et al, 2010; Tangphatsornruang et al, 2009)

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa da família das *Fabaceae*, subfamília papilonoídea (Faboideae) de grande importância no Brasil, América do Sul e países africanos. O feijão-caupi é uma fonte de proteínas importante, apresenta ainda todos os aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais. Seu ciclo de vida é curto e tem poucas exigências quanto a solo e temperatura (Freire-Filho et al, 2005). Estas características nutritivas permitem que o feijão-caupi seja cultivado principalmente para obtenção de grãos, secos ou verdes, para consumo humano in natura, em conserva ou desidratado. Utilizado também como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e adubo verde.

Até o momento há sete genomas cloroplastidiais de leguminosas completos (Tabela 1)

Tabela 1. Relação das espécies de leguminosas já sequenciadas, tamanho do cloroplasto em pares de bases, autores e ano de publicação

Espécie	Tamanho em pb	Autor	Ano
<i>Lotus japonicus</i>	150.519	Kato et al	2000
<i>Glycine max</i>	152.218	Saski et al	2005
<i>Phaseolus vulgaris</i>	150.285	Guo et al	2007
<i>Cicer arietinum</i>	125.319	Jansen et al	2008
<i>Trifolium subterraneum</i>	144.763	Cai et al	2008
<i>Vigna radiata</i>	151.271	Tangphatsornruang et al	2009
<i>Medicago truncatula</i>	124.033	Young et al	2012

Esses sequenciamentos demonstraram que plantas da família das *Fabaceae* apresentam mais rearranjos do que a maioria das angiospermas (Jansen et al, 2008; Palmer et al, 1988). Os trabalhos de Palmer demonstraram que houve perda da região IR completa em um grupo de leguminosas (Palmer et al, 1987; Wojciechowski et al, 2004).

Nos últimos 10 anos a quantidade de trabalhos com o sequenciamento completo do cloroplasto de plantas e algas tem crescido em todo mundo devido a métodos para isolamento e sequenciamento de DNA terem sido aprimorados e de certa forma facilitados. Muitos grupos estão trabalhando com as mais diversas espécies de plantas para, desta forma, ter respostas sobre suas origens, sobre proximidade com outras espécies, e também como forma de explicar a origem do cloroplasto.

Com o sequenciamento do genoma cloroplastidial de *Vigna unguiculata*, assim como o sequenciamento de outras espécies, poderá se conhecer a sequência de nucleotídeos do genoma do cloroplasto, o que permite o conhecimento de regiões intergênicas, que são alvo para a inserção de genes de interesse através de transformação genética.

1.1 *Vigna unguiculata*

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma Dicotiledônea, da ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna*, secção *Catiang* (Verdecourt, 1970; Maréchal et al., 1978; Padulosi & Ng, 1997). É conhecido por diversos nomes populares, tais como: feijão-de-corda e feijão macáçar na região Nordeste; feijão-de-praia, feijão-da-colônia e feijão-de-estrada na região Norte; e feijão-miúdo na região Sul (Freire-Filho et al., 1983). É também chamado de feijão catador e feijão gerutuba em algumas regiões do estado da Bahia e norte de Minas Gerais e de feijão-fradinho no estado do Rio de Janeiro.

Segundo Freire-Filho (2005), o nome macáçar é o nome mais antigo do feijão-caupi, tendo sido assim batizado em razão de uma região na Indonésia de mesmo nome, onde situava-se um importante entreposto comercial português no século XVII (Boxer, 1981), todos os produtos provenientes desta região levavam o nome macáçar, por exemplo o algodão-de-macáçar (Albano, 1916).

Sua origem é mais comumente tida com sendo na África, e segundo alguns autores (Steele & Mehra, 1980 e Ng & Maréchal, 1985) seria a Nigéria o centro primário de diversidade da espécie. No Brasil foi introduzido a partir do século XVI, primeiramente no estado da Bahia, por colonizadores portugueses (Corrêa, 1952; Krutman, 1968 e Freire-Filho, 1988) e então para toda a região Nordeste, de onde foi disseminado para todo o país, apesar de ter sua produção concentrada no Nordeste (Freire-Filho et al, 2005). A cultura de feijão-caupi em muito se assemelha ao do feijoeiro comum, porém, tem uma melhor adaptação ao solo e clima dos trópicos semi-árido, úmido e subúmido (Freire-Filho et al, 2005).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, Brasil, 2008), considera somente as espécies de *Phaseolus vulgaris* (L.) e *Vigna unguiculata* (L.) Walp., como feijão, para efeito de regulamento técnico, o que dificulta determinar qual a parcela se refere a cada espécie, em relação a produtividade e produção. Dados apresentados por Freire-Filho (2011) mostram que na média de 2005 a 2009, a área cultivada de feijão-caupi em relação a área total de feijão comum correspondeu a 33,08% da região norte, 60,80%

na região nordeste e 18,05% na região centro-oeste. Em relação a produção no mesmo período, o feijão-caupi apresentou 37,64% no Norte, 45,67% no Nordeste e 9,12% no Centro-Oeste, enquanto a avaliação em relação a produtividade feijão-comum X feijão-caupi foi de 113% no região Norte, 75,3% na região Nordeste e 53,26% na região Centro-Oeste.

O feijão-caupi ainda é considerado uma cultura pouco explorada e estudada, mesmo tendo uma grande importância social e econômica para o país (Ehlers & Hall, 1997), porém, novos conhecimentos a respeito da cultura e também a própria versatilidade da espécie, colocam o caupi como uma das espécies de grande interesse para trabalhos com transformação genética.

1.2 Cloroplasto

Os plastídeos são organelas armazenadoras e quando maduros geralmente são classificados segundo a coloração que contêm, os principais plastídeos são os cloroplastos, amiloplastos, cromoplastos e leucoplastos (Raven et al., 2001). Possuem uma membrana dupla, fruto da origem dos plastídeos, a qual se acredita ter sido por uma relação endossimbiótica entre uma cianobactéria e uma célula não-fotossintetizante (Cavalier-Smith, 2000), formando assim as duas membranas. Nos cloroplastos, a membrana interna forma pequenas bolsas chamadas tilacóides, que em conjunto formam as *grana*. Os cloroplastos das folhas possuem como pigmentos a clorofila e os carotenóides. Essas estruturas são, geralmente, de forma discóide e tem entre 4 a 6 micrômetros de diâmetro. Possuem seu próprio genoma, independente do genoma nuclear, além de mRNA próprio. O genoma do cloroplasto pode variar entre 120 a 180 kb e contém sequências de codificação de 120 proteínas, aproximadamente. O genoma do cloroplasto é circular e contém regiões bem conservadas, mas uma evidencia da sua origem, que podem ser observadas desde algas até plantas superiores, este genoma próprio pode também ser chamado de plastoma. Quatro regiões dividem o plastoma, duas regiões repetidas e invertidas denominadas IRa e IRb, que separam as duas regiões de cópia única: uma longa (LSC) e uma curta (SSC). O cpDNA ainda tem por característica a poliploidia, podendo apresentar em uma única célula até 10.000 cópias (Palmer & Stein, 1986; Freitas & Bered, 2003).

Muitas das proteínas do cloroplasto são codificadas pelo seu genoma e também pelo genoma nuclear, estas que são codificadas no cloroplasto são sintetizadas em ribossomos cloroplastidiais, as que são codificadas no núcleo são então transportadas para os cloroplastos. Outros genes necessários para o seu funcionamento estão presentes

também no genoma nuclear, sendo igualmente necessários para o funcionamento do cloroplasto.

A reprodução do cloroplasto se dá por divisão, e não por síntese *de novo*, isto acontece, pois a informação genética da organela não está presente no núcleo. Nas plantas sexuadas, apenas a mãe cede o cloroplasto para o zigoto, portanto, se tem uma herança não mendeliana, ou herança materna (Taiz & Zeigler, 2004).

O núcleo das plantas é o alvo mais comumente empregado em trabalhos de transformação genética, tanto em transformação direta quanto em transformação indireta. Porém, com os avanços nos estudos com genomas de cloroplastos, novos estudos tem focado em transformação plastidial. A transformação de plastídeos é feita por recombinação homóloga, onde o vetor que será usado na transformação é desenhado com duas regiões homólogas flanqueadoras em cada lado, para desta forma facilitar a recombinação dupla. Para tanto, o conhecimento da sequência do genoma alvo se mostra essencial, uma vez que vetores espécie-específicos tem eficiência comprovadamente maior (Fernandez-San Millan et al., 2003). As vantagens na transformação plastidial em relação à transformação nuclear são fruto das características do próprio cloroplasto, como a poliploidia, onde cada célula vegetal pode conter mais de 10.000 cópias do genoma do cloroplasto, o que resulta na capacidade de armazenar uma quantidade muito grande de cópias de genes funcionais, além da capacidade de armazenar uma quantidade muito grande de proteínas externas ao seu genoma, mais de 46% do total das proteínas da folha, quando o transgene já está integrado estavelmente (De Cosa et al., 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

- Sequenciar o DNA cloroplastidial de *Vigna unguiculata*
- Comparar sequências do genoma cloroplastidial de *Vigna unguiculata* em diversas cultivares

2.2. Objetivos específicos

- Isolar cloroplastos e extrair o DNA cloroplastidial de *Vigna unguiculata*
- Montar a sequencia do DNA cloroplastidial de *Vigna unguiculata*
- Anotar os genes presentes em *Vigna unguiculata*
- Comparar regiões do genoma plastidial de diversas variedades tradicionais do Brasil e outros países (principalmente Nigéria) e buscar regiões polimórficas

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Plantas foram cultivadas em casa de vegetação para germinação das sementes e extração de discos foliares. As sementes de variedades tradicionais brasileiras foram cedidas pela Embrapa Meio-Norte. As variedades tradicionais africanas foram cedidas por Departament of Plant Science, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigéria.

3.2. Isolamento do cloroplasto

Folhas utilizadas no isolamento dos cloroplastos eram da cultivar Nova Era e foram cultivadas em casa de vegetação. Folhas com até 15 dias foram coletadas sendo então colocadas em gelo imediatamente. Em cada experimento foram utilizados 20 g de folhas, que foram maceradas com auxílio de um mixer em 50 ml de solução de isolamento de cloroplasto (tabela 2) até se obter uma mistura homogênea, esta mistura foi filtrada com auxilio de 4 camadas de gaze, para separar os resíduos. A solução obtida foi centrifugada a 200g por 5 minutos. Um gradiente de sacarose em três concentrações (2M, 1,5M e 1M) separou as fases da solução de cloroplastos, o gradiente foi centrifugado a 200 x g por 5 minutos e logo em seguida centrifugado a 1.500 x g por 30 minutos. Após a centrifugação retirou-se a fase de cloroplastos a qual foi colocada em inúmeros tubos de centrífuga. Em cada tubo acrescentou-se 0,5 ml de solução de isolamento de cloroplasto centrifugando por 3 minutos a 200 g, para então descartar o sobrenadante ressuspendeu-se o pellet em 50 µL de solução de DNase, a esta solução foi acrescentado 0.5 µL de DNase I (1U/µL) e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período acrescentou-se 15 µL de 0.5 M de EDTA agitando bem.

Tabela 2. Solução de isolamento de cloroplastos

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO
Tampão de isolamento de cloroplasto (CIB)	0.33 M Sorbitol 5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 5 mM Fosfato de sódio monobásico 5 mM Fosfato de sódio dibásico pH 6,8

3.2. Extração de DNA cloroplastidial para sequenciamento

Ao volume final da solução de isolamento de cloroplasto foi adicionado valor necessário para completar 500 µL com o tampão CTAB à 65ºC. A solução foi incubada a 55ºC por 10 min e imediatamente após, colocada no gelo por 1 min. Ao volume foi acrescentado 1 volume de isopropanol gelado e a solução agitada por inversão por 10 minutos e centrifugada por 10 min a 3000 x g. Esta lavagem foi repetida mais uma vez, para garantir a pureza do material. Após as lavagens, 0,1 volume de Acetato de sódio e 1 volume de isopropanol foram adicionados. As amostras foram incubadas a -70º C por 1 hora. Após este período centrifugou-se por 30 minutos a 4ºC. O sedimento formado foi lavado com 500 µL de etanol 70%, após a secagem foi ressuspensido em 20uL de água ultra pura.

O DNA obtido foi quantificado, e todas as amostras foram ajustadas para concentração de 100 ng/µL, para proceder com o sequenciamento. O sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen® pelo método de sequenciamento de nova geração 454 FLX.

3.3. Montagem e analise dos dados do sequenciamento

Os *reads* fornecidos do sequenciamento foram analisados através do programa MIRA (versão 3.0) desenvolvido por Chevreux e colaboradores (1999), o programa consiste em montar *contigs* (sequências contíguas) a partir de sequências de genomas menores (*reads*) gerados por sequenciadores como 454 (GS20, FLX ou Titanium), Solexa (Illumina) e Sanger. Os parâmetros usados no programa MIRA são apresentados no quadro 1. Cada um dos parâmetros gera um algoritmo, o qual determina a forma como será analisada a sequência. O parâmetro SB controla as opções gerais do programa, como nome do arquivo, local de origem, formato do arquivo. O parâmetro OUT determina quais tipos de resultados serão salvos para quais tipos de arquivo. Em GE se determina o número de threads que será utilizado, variando de acordo com o arquivo. Em LR determina-se quais reads serão utilizados. Os parâmetros contidos em AS são para a montagem dos dados, como ordem, quantos contigs serão montados por vez, dentre outros. SKIM é o parâmetro do algoritmo do programa. CO determina como serão analisados os *contigs*.

```

--job=mapping,est,normal,454
-DI:lrt=/local/temp/Vigna
SB:lsd=no:lb=yes:bsn=/genome/acgt/genomedb/Vigna_radiata_chloroplast_complete_genome.fasta:bft=fasta
-OUT:rrol=1:rld=0:orc=1:org=0:ora=0:ors=0:otf=0:otc=0
-GE:not=50
-LR:mxti=0
-AS:sd=0:uess=0:urd=0:ard=1
-SKIM:mmhr=0:mnr=yes -SKIM:nrr=19
-CO:mr=no -CO:asir=1
454_SETTINGS
-LR:wants_quality_file=0
-AS:epoq=no

```

Quadro 1. Parâmetros aplicados no programa MIRA 3.0

O

Os dados resultantes deste alinhamento foram analisados e com o auxilio da sequencia já publicada no banco de dados NCBI, de *Vigna radiata*, foi possível alinhar o genoma de *Vigna unguiculata*. As anotações do genoma cloroplastidial foram feitas através do programa DOGMA, Dual Organellar Genome Annotator (Wyaman et al, 2004) o qual, após submeter a sequência em formato FASTA, verifica os dados já publicados e faz uma análise de BLASTX e BLASTN, identificando genes comuns de cloroplastos, como genes codificantes de proteínas, tRNAs, rRNAs e também alguns *Opening Reading Frames* (ORFs) comuns. Após o fim da anotação do genoma, a sequência foi submetida ao banco de dados do NCBI, com o auxilio do programa SEQUIN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Sequin/>). O programa *on line* GenomeVx foi utilizado para montagem do mapa do cloroplasto.

3.4. Analise da filogenia de *Vigna unguiculata*

Acessos nativos da Nigéria e do Brasil, foram utilizados para verificar-se algumas regiões selecionadas no DNA cloroplastidial da cultivar Nova Era, como forma de verificar origem, mutações e outros aspectos. Os *primers* foram desenhados baseando-se nas regiões de maiores diferenças entre *Vigna radiata* e *Vigna unguiculata*, isto gerou nove pares de *primers* (tabela 3), o nome dos *primers* corresponde a posição na sequencia final do cloroplasto. Cada um deles foi inicialmente testado para 6 diferentes cultivares (TVu 1887, TVu 2339, IT98-1101-5, IT93K-452-1, IT81D-784 e Otília). Estes acessos foram

escolhidas sem seguir um padrão, dentre todos os acessos, através de PCR. Discos foliares de plantas cultivadas na casa de vegetação, com no máximo 15 dias após a germinação, foram extraídos para extração de DNA, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 3.2. Os parâmetros da reação foram: desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguido por 35 ciclos de: 1 minuto a 95°C, 1 min a 55°C e por fim 2 minutos a 72°C finalizados por uma extensão final de 7 min a 72°C. As regiões amplificadas na PCR foram clonadas no vetor pGEM-Teasy®, todas as amostras foram ajustadas para uma concentração de 100ng/μL e enviadas para sequenciamento. As sequências geradas dessas análises foram alinhadas com a sequência principal, da cultivar Nova Era com auxílio do programa MEGA, utilizando o método ClustalW para alinhamento.

A partir dos resultados obtidos com esta primeira seleção, verificando a quantidade de polimorfismos, foi possível escolher um par de *primers* que melhor atendesse aos objetivos do trabalho, ou seja, diferenças polimórficas entre os acessos.

Com a escolha do *primer*, as cultivares da Tabela 4 foram selecionadas para a análise final da filogenética de *Vigna unguiculata*, seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

Tabela 3. Sequências dos primers testados para o genoma do cloroplasto de *Vigna unguiculata*

PRIMER	NOME	SEQUÊNCIA
1	CLVU3342C	5'-CGAGCTAACCTGGTATGGA-3'
	CLVU2949	5'-CGCGCATGGTGGATTACAA-3'
2	CLVU8228	5'-TCCTTCCATACTTCGCAAGC-3'
	CLVU8374C	5'-AGGTGCTGTAGCTAATCGAG-3'
3	CLVU15762	5'-CTCTACCAACTGAGCTATCC-3'
	CLVU16595C	5'-CAGAGACTCTATGGAAGCTG-3'
4	CLVU150474	5'-ACTTGGTCCAGAGCATCTAC-3'
	CLVU151323C	5'-GTTGGCGATAGTGTCCCTTCC-3'
5	CLVU151602	5'-CAGAGTCAGGTTGAAGTCAGG-3'
	CLVU539C	5'-CTGATCCATTGACACGTGC-3'
6	CLVU24685	5'-GAGTAAGTTCTTGCTTG-3'
	CLVU25153C	5'-GAGGCTAGAGCAAGACCTAA-3'
7	CLVU42727	5'-ACCTCTTGTCTCCAGCTATC-3'
	CLVU43009C	5'-AGATCTAGTCGCCACCGGAG-3'
8	CLVU16745	5'-TTAAGTCCGTAGCGTCTACC-3'
	CLVU17666C	5'-ATGCGATGCTCTAACCTCTG-3'
9	CLVU59466	5'-GATAGTGAGTCCACTCTAGG-3'
	CLVU59958C	5'-CTCCTCCGGACGAACATACG-3'

Tabela 4. Acessos de *Vigna unguiculata* utilizados para análise de filogenia

Cultivar	ORIGEM
Babban Wake	Nigéria
Bauchi Variety	Nigéria
Black Eye	China
Cachiado	Brasil
Canapum	Brasil
Castillal	Peru
Chico Joaquim	Brasil
Costela de Vaca	Brasil
Danrima	Nigéria
Danwuri	Nigéria
Dorminhoco	Brasil
Feijão de Corda	Brasil
Fradinho	Brasil
IT81D-994	Nigéria
Janwake	Nigéria
José dos Santos	Brasil
Kamboise	Burkina Faso
Kanannado	Nigéria
Karamin Wake	Nigéria
Lizão	Brasil
Lizão 2	Brasil
Macáçar	Brasil
Makenp	Hungria
Milagroso	Brasil
Nabbereru	Nigéria
Nova Era	Brasil
Novato	Brasil
Otília	Brasil
Pitombeira	Brasil
Potomac	Brasil
Quarentinha	Brasil

Sempre Verde	Brasil
Seridó	Brasil
Tracuateua	Brasil
Vinagre	Brasil
Yarmaja	Nigéria

As sequencias obtidas através da amplificação da região do *primer 7* foram usadas na montagem de uma árvore filogenética dos acessos de *Vigna unguiculata* no programa MEGA, com 2.000 repetições e utilizando valores de *bootstrap* maiores que 50%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sequenciamento e anotação dos genes

Utilizando a plataforma 454 FLX foram gerados 96.215 *reads* de alta qualidade, que foram montados em 9.909 *singletons*, o que possibilitou uma montagem de *contigs* mais precisa, gerando um único *contig* com o tamanho de 152.415 pb. Como resultado da anotação do genoma feita no programa DOGMA, obteve-se uma lista de genes presentes no genoma do cloroplasto. A divisão do plastoma contém quatro partes, uma região de cópia única longa (LSC), uma região de cópia única curta (SSC) e duas regiões repetidas invertidas (IRa e IRb). A região de cópia única longa é formada por 81.468 pb, a região de cópia única curta 19.181 pb e as regiões repetidas 25.883 pb cada (Figura 2). O genoma de *Vigna unguiculata* (L.) Walp possui 113 genes, incluindo 35 genes de RNA transportador (tRNA) e quatro genes de RNA ribossômico (rRNA) e 74 genes codificantes de proteínas. Estes genes estão distribuídos em 14 categorias: Subunidade ribossômica menor (10 genes), subunidade ribossônica maior (oito genes), subunidades da RNA-polimerase plastidial (quatro genes), subunidade de NADH-desidrogenase (12 genes), subunidades do fotossistema I (cinco genes), subunidades do fotossistema II (14 genes), subunidade maior da Rubisco (um gene), subunidade do citocromob₆f (seis genes), subunidades da ATP-sintase (seis genes), Acetyl-CoA (um gene), maturase (um gene), protease (um gene), proteína de membrana envoltória (um gene), citocromo C proteína heme de ligação (um gene) e ycf's (três genes). Os nomes dos genes estão dispostos no anexo 1 e dos RNAs transportadores no Anexo 2.

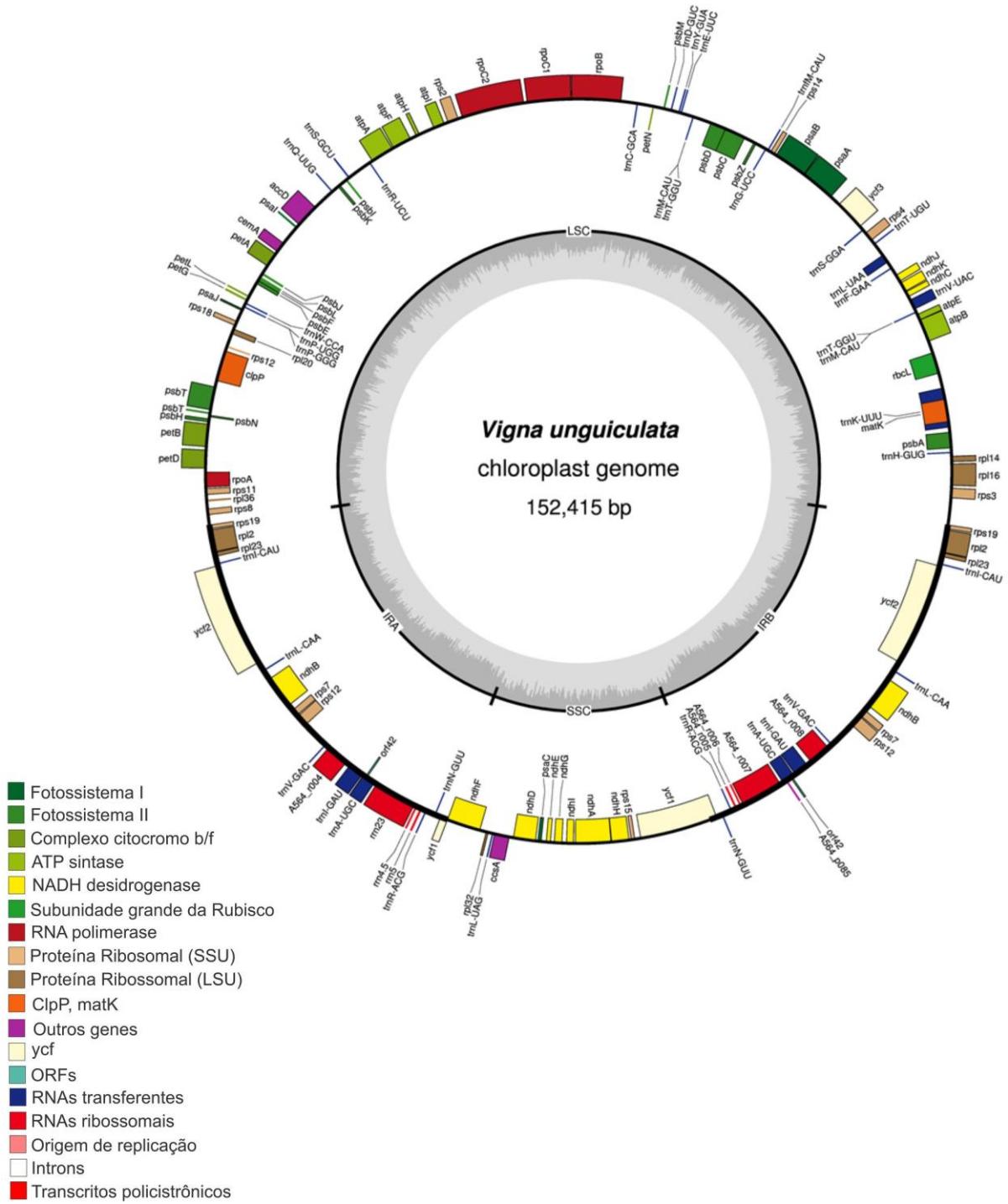


Figura 2. Mapa do cloroplasto de *Vigna unguiculata*. Apresenta quatro regiões, destacadas no círculo interno do mapa, LSC, SSC, IRA e Irb. As caixas representam os genes do genoma do cloroplasto de *Vigna unguiculata*

A sequência depositada no banco de dados do NCBI está no Anexo 3. Desses genes, 16 possuem um ou mais introns, sendo que 11 deles são genes codificantes de proteínas e 5 são tRNA, a comparação com os outros genomas já sequenciados de leguminosas está na tabela 5. Observou-se a ausência de dois genes, *rpl22* e *infA*, o que também foi observado em todas as outras espécies de leguminosas (Spielmann et al, 1988; Gantt et al, 1991). Análises filogenéticas do gene *rpl22* encontrado no núcleo demonstram que sua transferência, do cloroplasto para o núcleo, ocorreu num estágio inicial da evolução das angiospermas (Gantt et al, 1991). No caso do gene *infA*, transferências do cloroplasto para o núcleo ocorreram diversas vezes durante a evolução das angiospermas também ocorreu uma transferência para o núcleo (Millen et al, 2001). Outros cinco genes, *ycf4*, *ycf15*, *ycf68*, *rpl33* e *rps16*, não representados na figura 1, são genes não-funcionais, pois possuem stop códons prematuros, no caso dos genes *ycf15* e *ycf68*, outras espécies como *Vigna radiata* (Tangphatsornruang et al, 2009), *Phaseolus vulgaris* (Guo et al, 2007), *Eucalyptus globulus* (Steane, 2005) e *Spinacia oleracea* (Spielmann et al, 1988). Os genes *rpl33* e *rps16* também foram reportados como não-funcionais em *Vigna radiata* e *Medicago truncatula* (Young et al, 2012) e *Cicer arietinum* (Jansen et al, 2008). O gene *ycf4*, também chamado de *orf184*, presente em 15 das 28 tribos Papilionoideae (Doyle et al, 1995), não está presente em *Vigna unguiculata*.

Em relação ao genoma cloroplastidial de *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata* tem uma diferença de 1144 pb, no inicio da região de cópia longa, porém nesta região não há a presença de nenhuma sequência gênica.

A tabela 5 mostra as comparações entre as espécies já sequenciadas de leguminosas depositadas no banco de dados NCBI. O conteúdo de bases AT em *V. unguiculata* é de 64,75%, valor bem próximo ao das outras espécies sequenciadas.

Tabela 5. Caracterização dos genomas das espécies de leguminosas sequenciadas

Característica	<i>Trifolium subterraneum</i>	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lotus japonicus</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Vigna radiata</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
Tamanho (pb)	144763	124033	125319	150519	152219	150218	151271	152415
Tamanho da IR (pb)	N/A	N/A	N/A	25156	25574	26422	26474	25883
Nº de genes codificantes	77	75	77	82	83	83	75	74
Conteúdo de GC	34%	34%	34%	36%	35%	35%	35%	35%
Nº de genes de tRNA	30	31	30	30	30	30	29	35
Nº de genes de rRNA	4	4	4	4	4	4	4	4

Os genomas cloroplastidiais de leguminosas já sequenciados foram estruturalmente comparados com o genoma cloroplastidial de *V. unguiculata*, utilizando como grupo externo *Arabidopsis thaliana*. Esta comparação foi feita com o auxilio do programa MAUVE (Figura 3), onde pode-se observar a relação muito próxima de igualdade entre *V. radiata* e *V. unguiculata*, diferenciando entre si somente pela parte final, onde em *V. unguiculata* há uma região de aproximadamente 1.000 pb a mais, região esta muito próxima a observada em *Phaseolus vulgaris*. Em relação às regiões invertidas, observa-se a perda desta nas espécies *Trifolium subterraneum*, *Cicer arietinum* e *Medicago truncatula*, por consequência disto estas espécies também apresentam uma quantidade menor de pares de bases em relação as outras.

Pode-se observar ainda uma inversão de uma região gênica em comum entre *P. vulgaris*, *V. radiata* e *V. unguiculata*, de 51-kb entre os genes *rbcL* ao gene *rps16*, na região longa de cópia única. Esta inversão foi observada na maioria das espécies de *Papilionoideae*, subfamília das Leguminosea (Palmer et al, 1988).

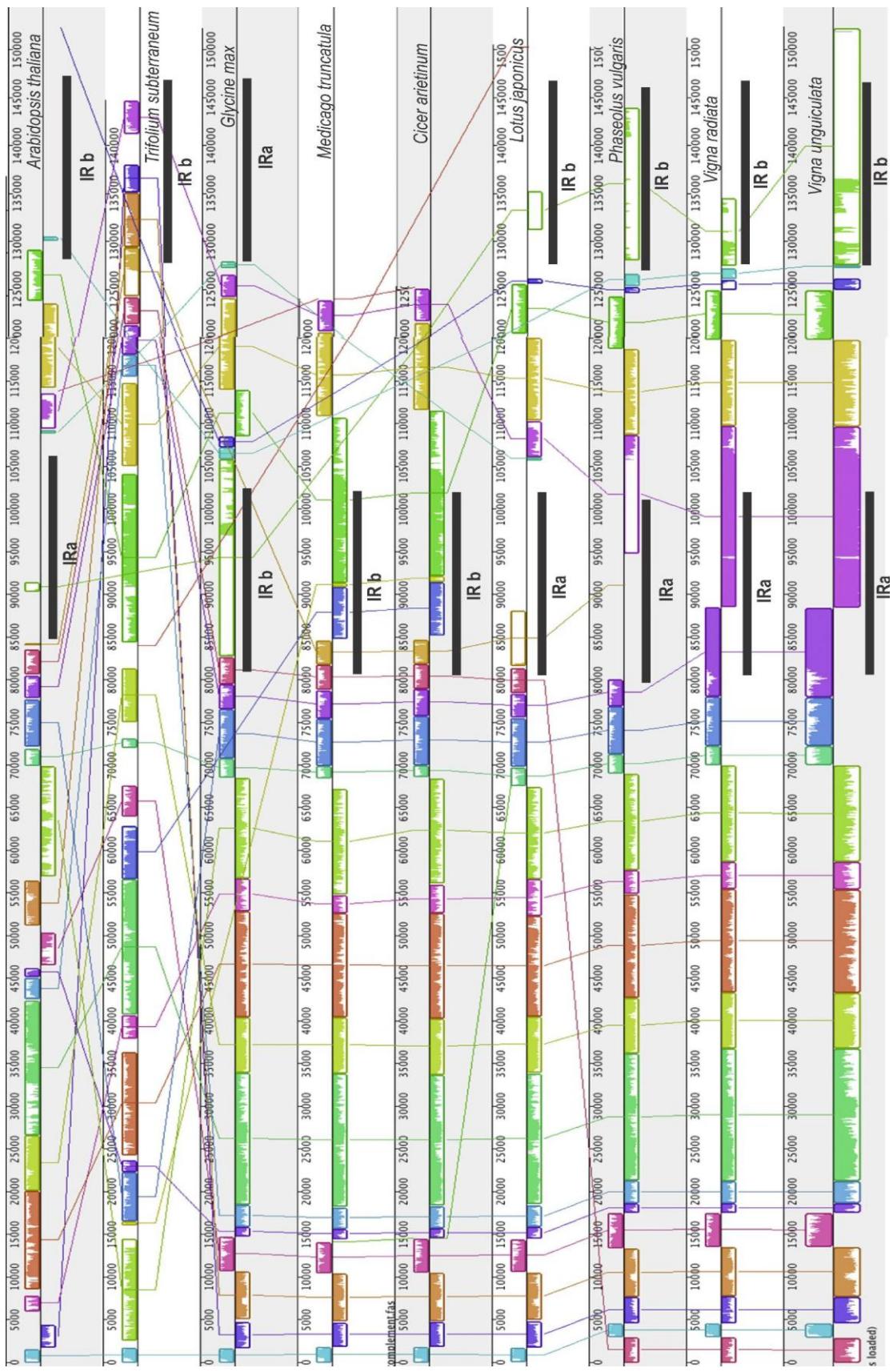


Figura 3. Comparação do genoma cloroplastídial das leguminosas já sequenciadas e como genoma de referência *Arabidopsis thaliana*. As linhas pretas abaixo dos genomas representam as regiões repetidas de cada espécie.

4.2. Analise filogenética das acessos de *Vigna unguiculata*

As análises filogenéticas com os seis acessos de *Vigna unguiculata*, geraram fragmentos entre 250pb e 1000pb (Figura 4). Dessas, o par de primer 7 foi o que apresentou a maior quantidade de polimorfismos em relação a sequência principal (Nova Era), o que levou ao sequenciamento de outras plantas com este mesmo par de primers. A região amplificada é uma região gênica localizada, entre 59456 pb e 59957 pb, do gene *accD* (Acetil Co-Enzima A). Esta região foi anteriormente descrita por Feleke (2006), onde dois acessos, um domesticado e um selvagem foram testadas para o mesmo par de primers, e a cultivar selvagem apresentou um sítio de *BamHI* que a cultivar domesticada não possuía, isto levou a investigação de diversas acessos e a separação em dois grupos, haplótipos 1, os que não possuem o sítio de *BamHI* e haplótipos 0, os que possuem o sítio de *BamHI*.

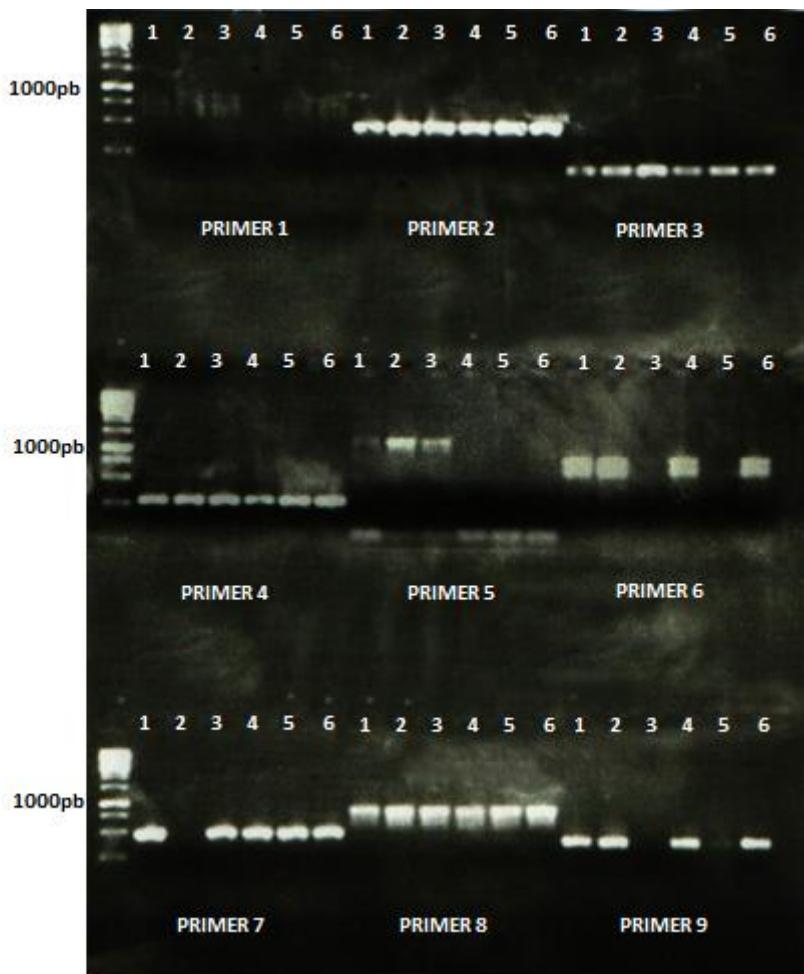


Figura 4. Gel de agarose com produtos da PCR dos 9 pares de primers testados. Cada par de primer foi testado para as mesmas 6 plantas TVu 1887 (coluna 1), TVu 2339 (coluna 2), IT98-1101-5 (coluna 3), IT93K-452-1 (coluna 4), IT81D-784 (coluna 5) e MNC05 (coluna 6)

Vaillancourt & Weeden (1992), em uma análise de diversas acessos de *Vigna unguiculata*, utilizando enzimas de restrição, reportou um alto índice de polimorfismos, separando 18 diferentes tipos de plastomas em 26 acessos de *Vigna ssp dekindtiana*. Esses plastomas foram divididos de acordo com as características que apresentavam quanto a digestão com 17 diferentes enzimas de restrição.

Neste trabalho, dos 36 acessos sequenciados com o par de *primers* 7, nove deles apresentaram uma transversão, ou seja, uma troca de uma purina T para uma pirimidina C, esta transversão acarretou na criação de um sítio de *BamHI* não presente nas outras 27 acessos (Figura 5). Isto sugere a formação de dois grupos distintos dentro dos acessos testados, assim como nos trabalhos anteriores, que podem ser chamados de haplótipo 1, os que não possuem o sítio de *BamHI* e haplótipo 0, os quais possuem o sítio de *BamHI*.

1. Nova Era	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
2. Compea China	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
3. Tracuateua	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
4. Costela de vaca	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
5. Feijao de Corda	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
6. Canapum	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
7. Quarentinha	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
8. Pitombeira	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
9. Potomac	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
10. Jose dos Santos	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
11. Novato	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
12. Makene	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
13. Lizao 2	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
14. Sempre Verde	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
15. Lizao	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
16. Chico Joaquim	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
17. Macassa	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
18. Dorminhoco	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
19. Vinagre	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
20. Fradinho	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
21. Milagroso	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
22. Serido	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
23. Cachiado	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
24. Kanannado	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
25. Karamin Wake	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
26. Bauchi Variety	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
27. Danwuri	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
28. Nabbereru	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
29. Janwake	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
30. Yarmaja	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
31. Danrima	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
32. Babban wake	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
33. Otilia	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
34. IT81D-994	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
35. Kamboise	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC
36. Castillal (Peru)	GGTACTTGGAAATCCTATGGATGAAAGACATGGTTTCCTGGATCCATTGGAAATTTCATTCGAAGAGAACCTTATAAAGATCGTATTGATTTCATTC

Figura 5. Comparação dos 36 acessos de *Vigna unguiculata* no intervalo entre 59595 pb e 59725 pb. Detalhe em amarelo, sítio de *BamHI*, gerado pela transversão entre as bases T e C.

Com a montagem da árvore filogenética de *Vigna unguiculata* (Figura 6) é possível observar esses mesmos dois grupos, um deles contém todas as acessos provenientes da Nigéria, China, Hungria e Peru, além de acessos do Brasil. Em outro grupo somente estão presentes acessos do Brasil. Estas acessos brasileiros são as identificadas como haplótipo 0, segundo a análise do sitio de *BamHI*.

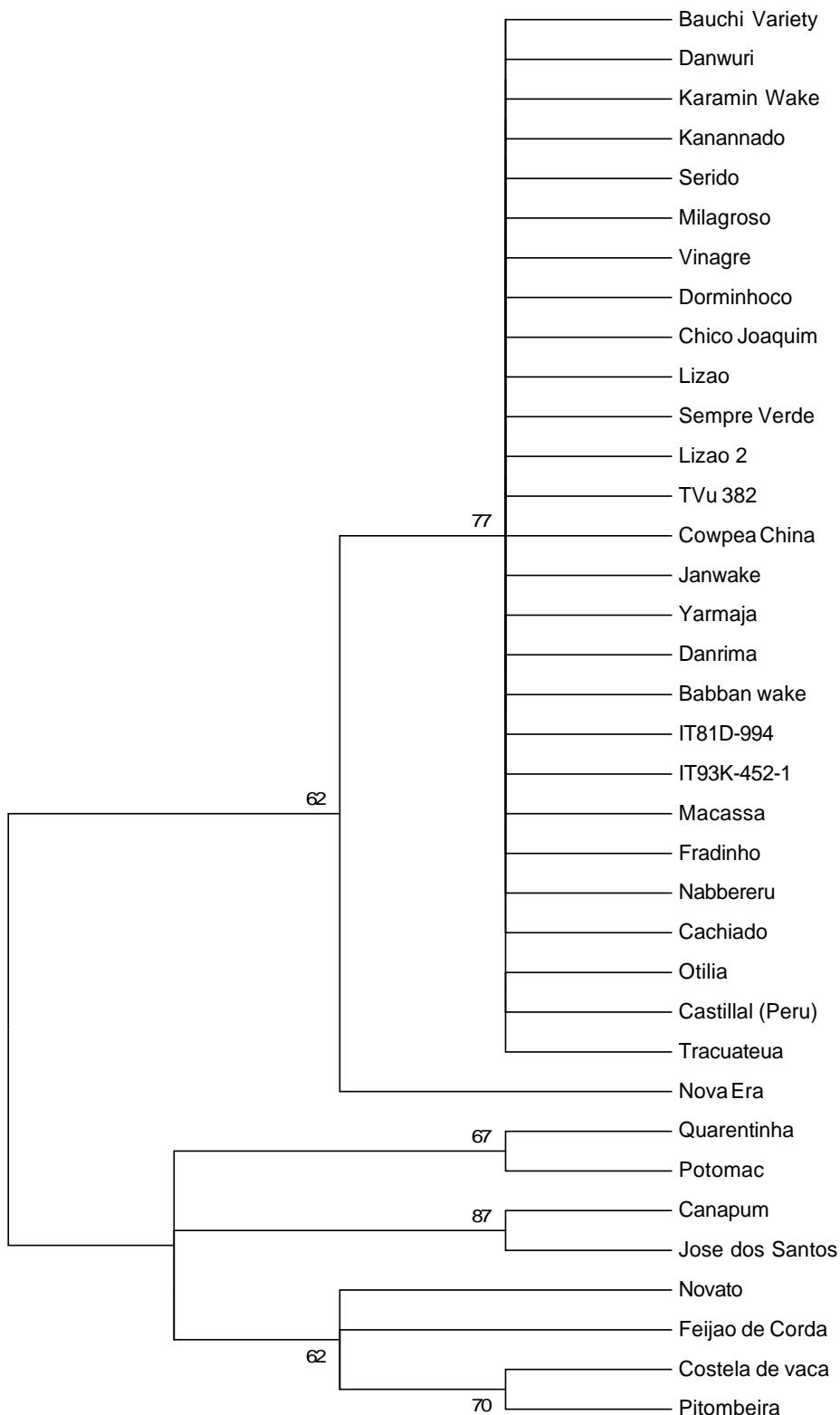


Figura 6. Árvore filogenética de diferentes acessos de *Vigna unguiculata*. Os números indicados mostram a taxa de bootstrap de cada ramo

Esta disposição da árvore leva a hipótese de que possivelmente o feijão-caipi introduzido no Brasil tem diversas origens. Segundo Vaillancourt & Weeden (1992) a Nigéria seria o centro de domesticação do feijão-caipi e segundo Freire-Filho (2011), a Nigéria também seria a origem mais provável do feijão-caipi no Brasil. Porém, ainda há a possibilidade de uma origem secundária, que fica evidenciada por uma das denominações dadas ao feijão-caipi, a de feijão Macáçar, nome associado a antiga cidade da Indonésia, Macaçar, hoje chamada Ujung Padang (Barraclough, 1995). Os resultados deste trabalho corroboram esta hipótese. Além disso, como todas as acessos tradicionais nigerianas ficaram agrupadas (haplótipo 1), bem como a cultivar de Burkina Faso, possivelmente centro de diversidade de *V. unguiculata* comprehende uma região que está além das fronteiras nigerianas.

Feleke et al. (2006) encontraram a perda do sítio de *BamHI* (haplótipo 1) em todos os 54 acessos domesticados de *V. unguiculata* coletados em Argélia, Camarões, California, Egito, Etiópia, Índia, Laos, Paquistão, Burkina Faso, Congo, Nova Caledônia, Filipinas, Uganda e Colômbia. O haplótipo 1 também é encontrado em acessos selvagens coletados em Botsuana, Camarões, República Centro-Africana, Congo, Gana, Guiné Bisau, Quênia, Malawi, Niger, Nigéria, Senegal, África do Sul e Tanzânia (Feleke et al. 2006). O fato de se encontrar o haplótipo 0 (presença de *BamHI*) nas variedades Tracateua, Costela de vaca, Feijão de corda, Canapum, Quarentinha, Pitombeira, Potomac, José dos Santos e Novato, leva a crer que algumas variedades tradicionais de feijão-caipi cultivadas no Brasil podem ser originadas dos acessos selvagens africanos e não das variedades domesticadas tradicionais.

A montagem do genoma de *Vigna unguiculata*, foi um importante passo para futuros estudos de transformação genética utilizando vetores para cloroplastos. O conhecimento aprofundado das regiões do cloroplasto possibilitará a escolha da melhor região para a inserção de genes, uma vez que a transformação genética por cloroplasto ocorre por recombinação homóloga.

Outras análises filogenéticas poderão ser feitas com a sequencia depositada no banco de dados do NCBI, possibilitando assim analisar a origem, distribuição e evolução de outros acessos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albano, I., **A cultura algodoeira no Ceará.** Conferência Algodoeira, Sociedade Nacional de Agricultura, v.2, p. 168-210, 1916
- Barraclough, G., **Atlas da história do mundo da Folha de São Paulo/Times**, 4. Ed. Rev. São Paulo: Folha da Manhã, p. 154-157, 1995
- Boxer, C. R., **O Império colonial português (1415 – 1825).** Lisboa: Edições 70, 406 p., 1981
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº12 de 29 de março. Seção 1, p. 11-14, 2008
- Cai, Z., Guisinger, M., Kim, H.G., et al., **Extensive reorganization of the plastid genome of Trifolium subterraneum (Fabaceae) is associated with numerous repeated sequences and novel DNA insertions**, J Mol Evol, 67 (6), 696–704, 2008
- Cavalier-Smith T. **Membrane heredity and early chloroplast evolution.** Trends Plant Sci. 5:174-182, 2000
- Chevreux, B., Wetter, T. and Suhai, S **Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB)** pp. 45-56, 1999
- Corrêa, M. P., **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Imprensa Nacional, v.3, p.70-111, 1952
- De Cosa, B., Rajasekaran, K., Smith, F., Sanford, J., Daniell, H., **Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals**, Nat Biotechnol v 19, p. 71-74, 2001
- Doyle, J.J., Doyle, J. L., Palmer, J.D., **Multiple independent losses of two genes and one intron from legume chloroplast genomes**, Syst. Bot. 20, p. 272-294, 1995
- Ehlers, Jd. & Hall Ae. **Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).** Field Crops Research 53, 187-204, 1997
- Feleke, Y., Pasquet, R.S., Gepts, P. **Development of PCR-based chloroplast DNA markers that characterize domesticated cowpea (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* var. *unguiculata*) and highlight its crop-weed complex**, Pl. Syst. Evol. 262: 75-87, 2006

Fernandez-San Millan, A., Mingo-Castel, A., Miller, M., Daniell H., **A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation**, Plant Biotechnol J, v.1, p. 71-79, 2003

Freire-Filho, F. R, Lima, J. A. A., Ribeiro, V. Q, **Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos** Embrapa Informação Tecnológica, 2005

Freire-Filho, F. R., Cardoso, M. J., Araújo, A. G. de, **Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares**. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v. 18, n.12, p. 136-137, 1983

Freire-Filho, F. R., **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Embrapa Meio-Norte, 84 p., 2011

Freire-Filho, F. R., **Origem, evolução e domesticação do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. In: Araújo, J. P. P. de, Watt, E. E. O caupi no Brasil. Embrapa- CNPAF, p. 25-46, 1988

Freitas, L. B., Bered, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: editora UFRGS, 463 p., 2003

Gantt, J.S., Baldauf, S.L., Calie, P.J., et al, **Transfer of rpl22 to the nucleus greatly preceded its loss from the chloroplast and involved the gain of an intron**, EMBO J. 10 (10), p 3073-3078, 1991

Guo, X., Castillo-Ramirez, S., Gonzalez, V., et al., **Rapid evolutionary change of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) plastome, and the genomic diversification of legume chloroplasts**, BMC Genomics, 8, 228, 2007

Jansen, R.K., Wojciechowski, M.F., Sanniyasi, E., et al., **Complete plastid genome sequence of the chickpea (*Cicer arietinum*) and the phylogenetic distribution of rps12 and clpP intron losses among legumes (Leguminosae)**, Mol Phylogenetic Evol, 48 (3), 1204 – 17, 2008

Jansen, R.K., Wojciechowski, M.F., Sanniyasi, E., et al., **Complete plastid genome sequence of the chickpea (*Cicer arietinum*) and the phylogenetic distribution of rps12 and clpP intron losses among legumes (Leguminosae)**, Mol Phylogenetic Evol, 48 (3), 1204–17, 2008

Kato, T., Kaneko, T., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., **Complete Structure of the Chloroplast Genome of a Legume, *Lotus japonicas*** DNA RESEARCH 7, 323-330, 2000

Krutman, S., Vital, A. F., Bastos, E. G., **Variedades de feijão macácar “*Vigna sinensis*”: características e reconhecimento**. IPEANE, 46p, 1968

Lee, H. L, Jansen, R. K., Chumley, T. W., Kim, K. J. **Gene relocations within Chloroplast Genome of Jasminum and Menodora (Oleaceae) Are Due to Multiple, Overlapping Inversions** Mol. Biol. Evol 24(5):1161-1180, 2007

Magee, A.M., Aspinall, S., Rice, D.W., Cusack, B.P., Sémon, M., Perry, A.S., Stefanovic, S., Milbourne, D., Barth, S., Palmer, J.D., Gray, J.C., Kavanagh, T.A., Wolfe, K.H. **Localized hypermutation and associated gene losses in legume chloroplast genomes.** Genome Res 20:1700–1710, 2010

Maier, R.M., Neckermann, K., Igloi, G.L., et al., **Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing,** J Mol Biol, 251 (5), 614 – 28, 1995

Maréchal, R.; Mascherpa, J. M; Stainier, F. **Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres Phaseolus et Vigna (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique.** Boissiera, n.28, p.1-273, 1978.

Millen, R.S., Olmstead, R.G., Adams, K.L., et al., **Many parallel losses of infA from chloroplast DNA during angiosperm evolution with multiple independent transfers to the nucleus,** Plant Cell, 13 (3), 645 – 58, 2001

Ng, N. Q.; Maréchal, R. **Cowpea taxonomy, origin germ plasm.** In: SINGH, S. R; RACHIE, K. O., eds. **Cowpea research, production end utilization.** Cheichester, John Wiley,. p.11-21, 1985

Padulosi, S.; Ng N. Q. **Origin taxonomy, and morphology of Vigna unguiculata (L.) Walp.** In: SINGH, B .B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E; JACKAI, L. E. N., eds. **Advances in Cowpea Research.** Tsukuba; IITA JIRCAS,. p.1-12, 1997

Palmer, J. D. **Plastid chromosomes: Structure and evolution.** In “The Molecular Biology of Plastids. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants” (R. G. Hermann, ed.), Springer–Verlag, Vienna 7A, pp. 5–53, 1991.

Palmer, J.D. & Stein D. B., Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. Curr. Genet. 10:823-833, 1986

Palmer, J.D., Osorio, B. and Thompson, W.F., **Evolutionary significance of inversions in legume chloroplast DNAs,** Curr Genet, 14, 65–74, 1988

Palmer, J.D., Osorio, B., Aldrich, J., et al., **Chloroplast DNA evolution among legumes:**

loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements, Curr Genet, 11, 275 – 86, 1987

Petit, R.J. et al.. **Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity.** Science 300, 1563–1565, 2003

Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., Vendramin, G.G., **Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations.** Mol. Ecol. 14, 689–701, 2005

Raubeson, L. A., and Jansen, R. K., **Chloroplast genomes of plants.** In “**Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants**” (R. J. Henry, ed.), pp.45–68. CAB International, Wallingford, UK, 2005

Raven, P.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. **Biologia Vegetal.** Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 6^a Edição. 906p. 2001

Saski, C., Lee, S.B., Daniell, H., Wood, T. C., Tomkins J, Kim H.G., Jansen R. K., **Complete chloroplast genome sequence of Glycine max and comparative analyses with other legume genomes.** Plant Molecular Biology 59:309–322, 2005

Spielmann, A., Roux, E., von Allmen, J. M., et al, **The soybean chloroplast genome: complete sequence of the rps19 gene, including flanking parts containing exon 2 of rpl2 (upstream), but rpl22 (downstream),** Nucleic Acids Res, 16 (3), p 1199, 1988

Steane, D.A., **Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the Tasmanian blue gum, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae),** DNA Res, 12 (3), p. 215-220, 2005

Steele, W. M, Mehra, K. L., **Structure, evolution and adaptation to farming system and inveronment in Vigna Advances in legume science**, Royal Botanic Gardens, p.459-468, 1980

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia vegetal** . Artmed 3^a ed., 2004

Tangphatsornruang, S.,Sangsakru, D., Chanprasert, J., Uthaipaisanwong, P., Yoocha, T., Jomchai, N., Tragoonrung, S. **The chloroplast genome sequence of Mungbean (*Vigna radiata*) determined by high-throughput pyrosequencing: structural organization and phylogenetic relationships,** DNA research, pp.1-12, 2009

Vaillancourt, R.E., Weeden, N. F., **Chloroplast dna polymorphism suggests Nigerian center of domestication for the cowpea, Vigna unguiculata (Leguminosae)** American Journal of Botany 79 (10), 1194-1199, 1992

Verdcourt, B. **Studies in the Leguminosae - Papilionoidea for the flora of tropical East Africa.** IV. Kew Bulletin, v.24, p.597-569, 1970.

Wojciechowski, M.F., Lavin, M. and Sanderson, M.J., **A phylogeny of legume (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family**, Am J Bot, 91, 1846 – 62, 2004

Wyaman, S. K., Jansen, R. K., Boore, J. L., **Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA**. Bioinformatics 20(17): 3252-3255, 2004

Young, N. D., et al, **The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses**, Nature 480 (7378) p. 520-524, 2012

ANEXOS

ANEXO1: Relação dos genes presentes no genoma de *Vigna unguiculata*

Categoria	Gene
RNAs ribossômicos	rRNA23
	rRNA5
	rRNA4.5
	rRNA16
Subunidade ribossômica menor	rps3
	rps4
	rps14
	rps2
	rps18
	rps12
	rps11
	rps8
	rps19
	rps7
	rps15
Subunidade ribossômica maior	rpl14
	rpl20
	rpl36
	rpl2
	rpl23
	rpl32
	rpl16
Subunidade da RNA-polimerase plastidial	rpoB
	rpoC1
	rpoC2
	rpoA
Subunidade da NADH-desidrogenase	ndhC
	ndhK
	ndhJ
	ndhF
	ndhD
	ndhE
	ndhG
	ndhI
	ndhA
	ndhH
	ndhB
Fotossistema I	psaA
	psaB
	psaL
	psaJ
	psaC
Fotossistema II	psbA
	psbZ
	psbC
	psbD
	psbM
	psbI
	psbK
	psbJ

Categoria	Gene
	psbL
	psbF
	psbE
	psbT
	psbN
Rubisco	rbcL
Citocromob ₆ f	petN
	petA
	petL
	petG
	petB
	petD
ATP-sintase	atpB
	atpE
	atpI
	atpH
	atpF
	atpA
Acetyl-CoA	accD
Maturase	matK
Protease	clpP
Proteína de membrana envoltória	cemA
Citocromo C proteína heme de ligação	ccsA
Ycf's/ORFs	ycf3
	ycf2
	ycf1
	orf42

Anexo 2. RNAs transportadores de *Vigna unguiculata*

tRNA	Cópias	Aminoácido
trnA	2	Alanina
trnR	3	Arginina
trnN	2	Asparagina
trnD	1	Aspartato
trnC	1	Cisteína
trnF	1	Fenilalanina
trnG	1	Glicina
trnE	1	Glutamato
trnQ	1	Glutamina
trnH	1	Histidina
trnI	4	Isoleucina
trnL	4	Leucina
trnK	1	Lisina
trnM	3	Metionina
trnP	2	Prolina
trnS	2	Serina
trnY	1	Tirosina
trnT	3	Treonina
trnW	1	Triptofano
trnV	5	Valina

ANEXO 3. Submissão da sequencia completa do cloroplasto de *Vigna unguiculata*

LOCUS JQ755301 152415 bp DNA circular PLN 20-MAY-2012

DEFINITION *Vigna unguiculata* chloroplast, complete genome.

ACCESSION JQ755301

VERSION JQ755301.1 GI:387598444

KEYWORDS .

SOURCE chloroplast *Vigna unguiculata* (cowpea)

ORGANISM *Vigna unguiculata*
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core
eudicotyledons;
rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Phaseoleae;
Vigna.

REFERENCE 1 (bases 1 to 152415)

AUTHORS Aragao,F.J.L. and Mota,A.P.Z.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-MAR-2012) Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia,
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), PqEB W5
Norte, Brasília, DF 70770-917, Brazil

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Assembly Method :: MIRA v. 3
Sequencing Technology :: 454
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..152415
/organism="*Vigna unguiculata*"
/organelle="plastid:chloroplast"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:3917"

gene complement(join(95377..96163,69627..69740))
/gene="rps12"
/trans_splicing

CDS complement(join(95377..95400,95933..96163,69627..69740))
/gene="rps12"
/trans_splicing
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ribosomal protein S12"
/protein_id="AFJ91837.1"
/db_xref="GI:387598445"

/translation="MPTMKQLIRNTRQPIRNVTKSPALRGCPQRGTCTRVYTITPKK
PNSALRKVARVRLTSGFEITAYIPGIGHNLQEHSVVLVRGGRVKDLPGVRYHIVRGTL
DAVGVKDRQQGRSYGAKKPK"

gene 1..651
/gene="rps3"

CDS 1..651
/gene="rps3"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ribosomal protein S3"

```

/protein_id="AFJ91839.1"
/db_xref="GI:387598447"



```

```

/db_xref="GI:387598450"



```

```


```

```

tRNA          /gene="trnM-CAU"
              complement(12426..12497)
              /gene="trnM-CAU"
              /product="tRNA-Met"
              /note="anticodon:CAU"
gene          complement(12433..12491)
              /gene="trnT-GGU"
tRNA          complement(12433..12491)
              /gene="trnT-GGU"
              /product="tRNA-Thr"
              /note="anticodon:GGU"
gene          12675..13346
              /gene="trnV-UAC"
tRNA          join(12675..12712,13310..13346)
              /gene="trnV-UAC"
              /product="tRNA-Val"
              /note="anticodon:UAC"
gene          13576..13938
              /gene="ndhC"
CDS           13576..13938
              /gene="ndhC"
              /codon_start=1
              /transl_table=11
              /product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
3"
              /protein_id="AFJ91847.1"
              /db_xref="GI:387598455"


```

```

/db_xref="GI:387598457"

11
/product="ribosomal protein S4"
/protein_id="AFJ91850.1"
/db_xref="GI:387598458"

11
/product="hypothetical chloroplast RF34"
/protein_id="AFJ91851.1"
/db_xref="GI:387598459"


```

SAQSEGNYAEALQNYEAMRLEIDPYDRSYILYNIGLIHTSNGEHTKALEYYFRALE

NPFLPQAFNNMAVICHYRGQAIRQGDSEVAESWFNQAAEYWQAIALTGNYIAAQN
WLKITGRFE"

exon 19150..19278
/gene="ycf3"
/number=1

exon 19949..20176
/gene="ycf3"
/number=2

exon 20973..21122
/gene="ycf3"
/number=3

gene 21857..24109
/gene="psaA"

CDS 21857..24109
/gene="psaA"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="photosystem I P700 apoprotein A1"
/protein id="AFJ91852.1"
/db xref="GI:387598460"

/translation="MIIRSPEPEVKILVDRDPIKTSFEEWAKPGHFSRTIAKGPDTTT

WIWNLHADAHDFDSHTNDLEEISRKVFSAHFGQLSIIFLWLSGMYFHGARFSNYEAWL

SDPTHIRPSAQVWPIVGQEILNGDVGGGFRGIQITSGFFQIWRASGITNELQLYCTA

IGALVFAALMLFAGWFHYHKAAPKLAWFQDVESMLNHHTGLGLGSLSWAGHQIHVS

LPIINQFLNAAVDPKEIPLPHEFILNRDLAQLYPSFSEGATPFTLNWSKYGEFLTFR

GGLDPVTGGLWLTDIRHHHLAIAILFLIAGHMYRTNWGIGHNIKDILEAHKGPF TGQG

HKGIYEILTSWHAQLSINLAMLGSLTIVVAHHMYSMPPYPYLATDYGTQLSLFTHHM

WIGGFLIVGAAAHAIFMVVRDYDPTIRYNDLLDRVLRHRDSIISHLNWCIFLGFSF

GLYIHNDTMSALGRPQDMFSDTAIQLQPIFAQWIQNTHALAPGTTAPGAATSTSLTWG

GENLVAVGGKVALLPIPLGTADFLVHHIAFTIHVTVLILLKGVLFARSSRLIPDKAN

LGFRFPCDGPGRRGGTCQVSAWDHVFLGLFWMYNSISVVIFHFSWKMQSDVWGSISDQG

IVTHITGGNFAQSSITINGWLDFLWAQASQVIQSYGSSL SAYGLFFGAHFVWAFSL

MFLFSGRGYWQELIESIVWAHNKLKVAPATQPRALSIVQGRAVGVTYLLGGIATTWA
FFLARIIAVG"

gene 24135..26339
/gene="psaB"

CDS 24135..26339
/gene="psaB"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="photosystem I P700 apoprotein A2"
/protein id="AFJ91853.1"

```

/db_xref="GI:387598461"

11
      /product="ribosomal protein S14"
      /protein_id="AFJ91854.1"
      /db_xref="GI:387598462"

11
      /product="photosystem II protein Z"
      /protein_id="AFJ91855.1"
```

```

/db_xref="GI:387598463"



```

```

gene complement(32255..32313)
/gene="trnM-CAU"
tRNA complement(32255..32313)
/gene="trnM-CAU"
/product="tRNA-Met"
/note="anticodon:CAU"
gene 33073..33145
/gene="trnE-UUC"
tRNA 33073..33145
/gene="trnE-UUC"
/product="tRNA-Glu"
/note="anticodon:UUC"
gene 33214..33297
/gene="trnY-GUA"
tRNA 33214..33297
/gene="trnY-GUA"
/product="tRNA-Tyr"
/note="anticodon:GUA"
gene 33748..33821
/gene="trnD-GUC"
tRNA 33748..33821
/gene="trnD-GUC"
/product="tRNA-Asp"
/note="anticodon:GUC"
gene 34210..34314
/gene="psbM"
CDS 34210..34314
/gene="psbM"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="photosystem II protein M"
/protein_id="AFJ91858.1"
/db_xref="GI:387598466"
/translation="MEVNILAFIATALFILVPTAFLLIIYVKTISKSD"
gene complement(34914..35003)
/gene="petN"
CDS complement(34914..35003)
/gene="petN"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="cytochrome b6/f complex subunit VIII"
/protein_id="AFJ91859.1"
/db_xref="GI:387598467"
/translation="MDIVSIAWAALMVVFSLSLVVGGRSGL"
gene complement(35989..36068)
/gene="trnC-GCA"
tRNA complement(35989..36068)
/gene="trnC-GCA"
/product="tRNA-Cys"
/note="anticodon:GCA"
gene 37102..40314
/gene="rpoB"
CDS 37102..40314
/gene="rpoB"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="RNA polymerase beta subunit"
/protein_id="AFJ91860.1"

```

```

/db_xref="GI:387598468"

11
              /product="RNA polymerase beta"
              /protein_id="AFJ91861.1"
              /db_xref="GI:387598469"



```

ELRPIIQQIDGGKLMSSDINELYRRVIYRNNTLIDLTTSRSTPGEVICQEKLVQAAV
 DTLLDNGIRGQPMRDGHNKVYKSFSDDIEGKEGRFRETLLGKRVDYSGRSVIIVGPSL
 SLHRCGLPGEIAIELFQTFLIRDLIRKHASNIGIAKSKIRQKEPIVWEILQEVMQGH
 PVLLNRAPTLHRLGIQAFQPILVGRAICLHPLVCKGFNADFDDQMAVHVPLSLEAQ
 AEARLLMFSHTNLLSPAIADPISVPTQDMLIGLYILTNGNRRGISSNRYNPRNCRNLK
 NERIPQKNYKYTKKEPFFWNSYDAIGAYQQKRITFDSPWLWRWLRLRIISSREVPI
 EVHYE SLGT YHEIYGHYL VVRSTKKQIRSIYIRTNVGHISFYREIEEAVQGF CRAYS Y
 GI"
 exon 40341..40775
 /gene="rpoC1"
 /number=1
 exon 41604..43220
 /gene="rpoC1"
 /number=2
 gene 43432..47547
 /gene="rpoC2"
 CDS 43432..47547
 /gene="rpoC2"
 /codon start=1
 /transl table=11
 /product="RNA polymerase beta' subunit"
 /protein id="AFJ91862.1"
 /db xref="GI:387598470"

 /translation="MAERTNLMFH NKVIGGTAIKRLISRLIDHFGMAYTSHILDQVK
 LGFRQATATSISLGID DLLTIPS KGWLVRDAEHQNLILEKQHHYGNV HAVEKLRQSIE
 IWYATSEYFRQEMNPNFRMTDPFNPVHIMS FSGARGNASQVHQ LVGMRG LMSDPQGQM
 IDLPIQSNLREGLSLT EYIISCYGARKGVVDTAVRTSDAGYLTRRLVEVVQHIVIRRT
 DCGTIRGISVNTQNETMPESSWTQTLIGRVLADDIYRGSRCIAIRNQDIGIGLFNRLK
 TFQTQPISIRTPFTCRNTSWICRLCYGQSPTQGHLVELGEAVGIIAGQSIGEPGTQLT
 LRTFHTGGVFTGGTAEQVRAPYNGKIKFNEDLVHPTRTRGHPAFLCYIDLYVSIENG
 DIIHNVTIPPKSFLLVQNNQYVKSEQVIAEILAGTYTFNLKEKVRKHVYSLEGEMHW
 STDVYHASEFKYSNVHILPKTSHLWILSGKSDRSASVSFSTRKDQDQLNIHYLSTGER
 DICNHLASNNKVRHNLFRFTPSEKKERRISDYSKNNQILCKDHCHFTHPAIFHD TDL
 LAKRRRNRFIIPFQFQSIQERDKALM LASSISIEIPIHGIFRRNSIFAYFDDPQYRTQ
 SSGITKYRTIDINYIFKKEDFLIEYPGIQEFKTKYQIKVDQFFFPEEVYILPEFSSI
 MVRNN SIEVDT PITVNIRS QVSGL VRLEK KKKKIQLK IFSGN IYFP GEMDK ISRHSA
 MLIP PRTV KKNSKG SKKMKN WIYA QWITIMKKKYFVLVRPV ILYE IADR INLIQFFS

QDMLQERDNLELQIIHYILSGNGKSIRGISNSNTSIQLVRTCLVLNWDQDKKLSSIEK
 GHASFVELSIKGLVRYFLKMDLGKSHISYIRKRKDPLGSRFILDNESDWTNINPFFFI
 DPREKVQQSLSQNHTIHMLLNRNECRSLIILSSSNCFQIRSFHGDKYNGIKEEIN
 PIQRDPLIPIQNSLGPLGIALQVAHFYFYLLITNNQISINKNGQLDKLKETFQVFKYY
 LIDENEIIYKSDLSSNILLNPFYLNWHFFHHNYCEKKTFPIISLGQFICENVICIVQTK
 NEPHLKSGQILTQMDSVGIRSANPYLATPGTTVHGHYGEILSEGDILVTIFIYQKSRS
 GDITQGLPKVEQVLEVRSIDSISINLEKRVDTWNGRITRILGIPWGFFISAELTIAQS
 RISLVNQIQKVYRSQGVHIHNRHIEIIVRQITSKVLVSEDGMSNVFLPGELIGLLRAE
 RAGRSLEESICYRVLLLGITKTSINTQSFISEASFQETARVLSKAALRGRIDDWLKGLK
 ENVVLGGMMPVGTGFKRIIYRSKQRQYNKITPETKKRIYVIHQNNLGFKNs"
 gene 47824..48534
 /gene="rps2"
 CDS 47824..48534
 /gene="rps2"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ribosomal protein S2"
 /protein_id="AFJ91863.1"
 /db_xref="GI:387598471"

 /translation="MTKRYWNILEEMMEAGVHFGHGTRKWNPKMSPYISAKRKGIHI
 TNLIRTARFLSECDLVFDAASGGKQFLIVGKKAAADSVARAIRARCHYVNKKWLG
 GMLTNWYTTKTRLQKFRDLRMQQKTGRFHSFPKKDAAILKRQLAQLETYLGGIKYMKG
 LPDIVIIVDQQEEYTALRECITLEIPTCLIDTNSDPDLDADISIPANDDAIASIRLIL
 NKLVFAICEGRSRYIRNS"
 gene 48780..49523
 /gene="atpI"
 CDS 48780..49523
 /gene="atpI"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ATP synthase CF0 subunit IV"
 /protein_id="AFJ91864.1"
 /db_xref="GI:387598472"

 /translation="MNVLLCSINTLKRLYDISAVEVGQHFYWQIGGFLVHAQVLITSW
 VVIAILLVSAILVIRNLQTIPFGQNLFEYVLEFIRDVSKTQIGEEYGPWVPFIGTLF
 LFIFVSNWSGALLPWKIIQLPHGELAAPTNDINTTVALALLTSVAYFYAGLSKKGLAY
 FSKYIQPTPILLPINILEDFTKPLSLSFRLFGNILADELVVVVLVSLVPLVVPIPVMF
 LGLFTSGIQALIFATLAAAYIGESIEGHH"
 gene 50534..50779
 /gene="atpH"
 CDS 50534..50779

```

/gene="atpH"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ATP synthase CF0 subunit III"
/protein_id="AFJ91865.1"
/db_xref="GI:387598473"

53
```

```

KN"
gene complement(54236..54307)
/tRNA complement(54236..54307)
/gene="trnR-UCU"
/product="tRNA-Arg"
/note="anticodon:UCU"
gene 55886..55972
/gene="trnS-GCU"
tRNA 55886..55972
/gene="trnS-GCU"
/product="tRNA-Ser"
/note="anticodon:GCU"
gene complement(56103..56213)
/gene="psbI"
CDS complement(56103..56213)
/gene="psbI"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="photosystem II protein I"
/protein_id="AFJ91868.1"
/db_xref="GI:387598476"
/translation="MLTLKLFVYTVVIFVFVSLFIFGFLSNDPGRNPGREE"
gene complement(56682..56867)
/gene="psbK"
CDS complement(56682..56867)
/gene="psbK"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="photosystem II protein K"
/protein_id="AFJ91869.1"
/db_xref="GI:387598477"

/translation="MLNIFSWICICIPSVLYSSSFLLEKLPEAYAFLNPIVDIMPIIP
LLFFLLAFVWQAAVSFR"
gene 57315..57386
/gene="trnQ-UUG"
tRNA 57315..57386
/gene="trnQ-UUG"
/product="tRNA-Gln"
/note="anticodon:UUG"
gene 58851..60392
/gene="accD"
CDS 58851..60392
/gene="accD"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase
beta
subunit"
/protein_id="AFJ91870.1"
/db_xref="GI:387598478"

/translation="MEKWWFNSRLLNRKFEYRCELSCKSMESLGPIENTSILSEEPKILT
DIDKKIQRWDDRNNSSYNSFDYLVGADNIQDFLSDKTFLVRDNKRNSYSIYLDIEKKT
LEINNNHHSFLSEQENFFSSYLNNTVIKSDYDHSMYDTPFSWNNYINSCIDSYFHSQICV

```

DSCILVDIDKYNDSSFYSYFFGKGRNGSESENYSFHЛИTSTNDSESTLGENYKNL
 HESEKLTHLWIECENCYELNYKKFWKSKRNICEYCGYHLKMDSSDRIEFSIDS GTWNP
 MDEDMVSLDLIEFHSEEFPYKDRIDSYQRKTGLTEAVQTGTGQVNGIPVAIGIMDFKF
 MGGSMGSVVGEKITRLVEYATNQLLPLILVCSSGGARMQEGLSLSMQMAKISSALYYY
 QTIQKLFYVSI LTSPTTGGVTASFGMLGDIИI ГЕРНAYIAFAGKRVIEQTLNKTVPED
 SQVAESLFNKGЛIDSIVPRNLLKGVVTELLQFHNFSLTKKERNYGIEIQNQNIQDQS
 NKIKE"
 gene 60594..60698
 /gene="psaI"
 CDS 60594..60698
 /gene="psaI"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="photosystem I subunit VIII"
 /protein_id="AFJ91871.1"
 /db_xref="GI:387598479"
 /translation="MINFPSIFVPLVGLVFPАIAMASLFLHVQKNKIF"
 gene 61974..62657
 /gene="cemA"
 CDS 61974..62657
 /gene="cemA"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="chloroplast envelope membrane protein"
 /protein_id="AFJ91872.1"
 /db_xref="GI:387598480"
 /translation="MKKKSIPLLYLTSIVFLPWCISFTFKKSLESWFINWWNTSQSEI
 FLNDIKEKSILNKFILEELFFLDDMLKECPKTYIQNLRTGIYKETIQLIKTHNEDRM
 NTILHFSTNIICFFILSGYSILGNQELVLINSLVREFIYNLSDTIKAFSILLTDLCI
 GFHSTHG WELLFGFVYKDFGFAQNDQIIISGLVSTFPVILD TILKYWIFRYLN RISPL
 VVIYHSMND"
 gene 62834..63796
 /gene="petA"
 CDS 62834..63796
 /gene="petA"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="cytochrome f"
 /protein_id="AFJ91873.1"
 /db_xref="GI:387598481"
 /translation="MQTRNAFSCIKEGITRSISISVMIYIIIRAPFSNAYPIFAQQGY
 ENPREATGRIVCANCLANKPVDIEVPQA LPDTVFEAVVRI PYDMQVKQVLANGKKG
 TLNVGAVLILPEGFELAPPDRISPEIKEKIGNLSFQNYRPTKKNILVVGPVPGQKYNE
 ITFPILSPDPASKRDIHFLKYP IYVGGNRGRGQIYLDGSKSNNNVYNATAAGIVKKII

```

RKEKGGYEITIVDALDEREVIDIIPPGPELLVSEGESIKLDQPLTSNPNVGGFGQGDA
    EIVLQDPLRVQGLLFFLASIILAQIFLVLKKQFEKVQLFEMNF"
gene      complement(64339..64461)
            /gene="psbJ"
CDS       complement(64339..64461)
            /gene="psbJ"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="photosystem II protein J"
            /protein_id="AFJ91874.1"
            /db_xref="GI:387598482"



```

```

    /translation="MPTITSYFGFLLSVLIITSSLFIGLSKIRLI"
gene      66330..66443
/gene="petG"
CDS       66330..66443
/gene="petG"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="cytochrome b6/f complex subunit V"
/protein_id="AFJ91879.1"
/db_xref="GI:387598487"
11
/product="photosystem I subunit IX"
/protein_id="AFJ91880.1"
/db_xref="GI:387598488"

11
/product="ribosomal protein S18"
/protein_id="AFJ91881.1"
/db_xref="GI:387598489"



```

```

/gene="rpl120"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ribosomal protein L20"
/protein_id="AFJ91882.1"
/db_xref="GI:387598490"


```

```

/gene="psbT"
/gene_synonym="psi"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="photosystem II 47 kDa protein"
/protein_id="AFJ91884.1"
/db_xref="GI:387598492"

59
```

```

VAMALFAIFLSIILEIYNSSILLDGISIN"
gene          74881..76367
/gene="petB"
CDS           join(74881..74886,75726..76367)
/gene="petB"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="cytochrome b6"
/protein_id="AFJ91888.1"
/db_xref="GI:387598496"

60
```

IGI AIRRILLGEIEGTCITRKSEKIPHEYSTIIGIEESVHEIFMNLKKIVLKSNSMYG
 TQDAWISFKPGYITAQDIILPPSVEIVDNRQHIANVTEPVNLIELKIERNRYRIK
 TLKNFQDGSYDIDARFMPVRNVNYSIHSYVNGNEKQEILFLEIWTNGSLTPKEALYE
 SQNLIDLFLPFLHAEEDNFHLEKNQDKVTPLFTFHDILVKDKLRKNKKEIALKSIFI
 DQLELPPRIYNCLRSNIHTLLELLNNSQEDLLKFEHFRVEDGKSILDILKIQKYFA"
 gene complement(79079..79495)
 /gene="rps11"
 CDS complement(79079..79495)
 /gene="rps11"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ribosomal protein S11"
 /protein_id="AFJ91891.1"
 /db_xref="GI:387598499"

 /translation="MAKSIPKKGSRKNRIGSRNHRKIPKGIIHVQASFNNNTIVTIT

 DVRGRVISWSSAGTCGFKGTRRGTPFAAQTAAGNAIRTVSDQGMQRAEIMIKGPGLGR
 DAALRAIRRSGILLNFIRDVTMPHNGCRSPKKRRV"
 gene complement(79824..79937)
 /gene="rpl36"
 CDS complement(79824..79937)
 /gene="rpl36"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ribosomal protein L36"
 /protein_id="AFJ91892.1"
 /db_xref="GI:387598500"
 /translation="MKINASVRKICEKCRLIRRGRRIIVICFNPKHKQRQG"
 gene complement(80418..80822)
 /gene="rps8"
 CDS complement(80418..80822)
 /gene="rps8"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ribosomal protein S8"
 /protein_id="AFJ91893.1"
 /db_xref="GI:387598501"

 /translation="MGKDTIANIITYIRNADMNKKGMVQLPFTNITEKTVKILLREGF

 VENIRKHRENDKYFLVLTRYRRNRKESYKSFFNLKRISTPGLRYYNYQQIPRILGG
 MGIVILSTSRGIMTDREARLEKIGGEVLCYIW"
 gene complement(81466..81744)
 /gene="rps19"
 CDS complement(81466..81744)
 /gene="rps19"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ribosomal protein S19"
 /protein_id="AFJ91894.1"
 /db_xref="GI:387598502"

```

62
```

HQESFIKLLDSRIWSILLSRNSQGSTSNRYFTIKYVVLFVVAVLIYRINNRKMVERKN
PYLTRLPIPMSIGPKNDTLEESSSESSNINRLIVPLLYLPKGKKISESSFLDPKEST
RVLPITKKYIMPEFNWDSRWWRNWIGKKSDSSCKISNETIAGIEISFKEKDIYLEFL
FVYYMDDPIRKDHWEFFDRLSPRKRRNIINLNSGQLFEILVKDWIYYLMFAFREKIP
KEVEGFFKQQGTGSIIQSNDIEHVSHFLRNKRAISLQNCAQFHMWQFRQDLFVSWGK
SPHESDFLRNMSRENWIWLDNVWLGNKDRFFSKVRNVSSNLQYDSTRSSFIQVTDSSQ
LKGSSDQSKDSFDSIRNEDSKYHTLINQREIQQLKERSILCWDPFLQTERTEIESER
FLKILSGYSSMCRLFMEREKQMNNHLLPEEIEEFFGNPARATRSFFSDRWSELHLGSN
PTDRSTRDQKLLKKEQKKHLAFSRRSEKKEIVNLFKIIMYLQNTVSIHPISSYRGCDM
VPKGELDSSNKISFLNKNPFWGLFHFLHDRNRGRYTLHHDFESEDIFQEMADLFTLSI
TEPDLVYHKEFDMSMDSSGLDQKHFLNELLNSRDESKKHSLLVLPPFYEEENESFYRR
IICKWVQTSCGNVVEDPKPKIVVFASNNIMEAVNQYRLIRNLIQIYQYSTHGYIRNVLN
RFNCNFYGIQRYQIGNDTLNHRTRMKYTINQHLSNLKKSQKKWFDPPLILISRTERS
NWDPNVYRYKWSNGSKNFQEHDYFISEQNSRFQVVFDRLHINQYSIDWSEVIDKKDL
SKSLCLFLSKLLLFLPKFLLFLNSLPSFLVSFGGIPIHRSEIHIYELKGPNDPLCN
QLESIGLQIFHLKKRKPLLDQDTSQSKFLINGGTISPFLFNKIPKWMIDSFHT
KNRRKSFDNTDSYFSMISHDPDNWLNPVKPFHRSSLIYYFYKANRLRFLNNQYHFCF
CNKRFPFYVEKARINNYDFTYQGFLKILFIRNKIFSFCDGQKKHAFLKRDTISPIELQ
VSNILIPNDFPQSGDEGYNFYKSFHFPIRYDPFVRGAIYADIISGTPLTEGQIVHFE
KTYCQPLSDMNIPDSEGKNLYQYLNFSNMGWIHTPCSEKYLPESEKRKKRSSCLQKCL
EKGQMYRTFQQDSVFSTLSKWNLFQTYIPWFLTSTGYKYLNFIFLDTFSDLLPILSS
QKFVSIFHDIMHGSDILWRIRQIPLCLPQWNLISEIPGNCFHNLLSEEMTHRN
LISTHLRSLNQEFFYSILFLLVAGYLVRTHLLFVSRVYSELQTEFEKVKS
MIELRKLLDRYPTSELNSFWLKNIFLVALEQLGDSLEEIRSFAFGSNMLWGGGPAYGV
KSIRSKNQYWNLIDLISIIPNPINRIA
FSRNTRHLSHPSKAIYSLIRKIKNVNGDWID
DQIESWVSNTDSIDDKEKEFLVQFSTLTTEKRIDQILLSLTHSDLLSKNN
SGYQISEQ
PGAIYLRYLV
DIQKKYLM
IYE
FNTSCL
VERRIF
LANYQT
ITYSHT
LGANS
LHFPSHG
KPF
SLRLA
LPPP
SRGIL
VIGSIG
TGRSYLV
KYLTT
NSYVP
FITVFL
NKFLDN
PKGF
L
IDDS
DDDS
DDDS
DDDI
DRD
LDME
LELL
TMM
NTLT
MDMM
PEID
RFYIT
HFEL

AKAMSPCIWIPNIHDLDVTESNYLSLGLLVNYLSRDCERCSTRNILVIASTHIPQKV
 DPALIAPNKFNTCIKIRLLIPQQRKHFFTLSYTRGFHLEKKMSHTNGFGSTTMGSNV
 RDLVALNNEALYSISIQQKSIIDTNIISSVLHRQTWDFRSQVRSVQDHGILFYQIGRA
 VSQNVLLSNCSIDPISIYMKKSCDGGSYLYKWFELGTSMKLTILLYLLSCSAGS
 VAQDLWSLPGPDEKNGITSYGLVEKNYDLVHGLLEVEGALVGSSRTEKDCSQFDKDRV
 TLLLSEPRNPLNRIQNGSYSIVDQRFLYEKYESEFEEGGGVLDPQQIEEDFFNHIVW
 APRIWRPWGFLFDCIERPNNLGFPYWARSFRDKRIIYDEEDELQENDSEFLQGGTMQY
 QTRDRSSKEQGFFRISQFIWDPVDPLFFLFKDQPFVSVFSHRQFFTDEEMSRELLTSQ
 TNLPTSIYKHWFIKNTQEKFELLHCQRWLRINSSSKGFFPSNTLSESYQYLSNLF
 LSNEALLDQMTKTLLRKRWLFPEIVVASCSNNESLV"
 exon 84189..91043
 /gene="ycf2"
 /number=2
 gene complement(91638..91718)
 /gene="trnL-CAA"
 tRNA complement(91638..91718)
 /gene="trnL-CAA"
 /product="tRNA-Leu"
 /note="anticodon:CAA"
 gene complement(92324..94494)
 /gene="ndhB"
 CDS complement(join(92324..93079, 93772..94494))
 /gene="ndhB"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
 2"
 /protein_id="AFJ91898.1"
 /db_xref="GI:387598506"

 /translation="MKAFLLLFDGSFIFPECILIFGLLLLLMIDSTS DQKDISWFYF
 ISSTSLVMSITALLFRWREEPMAFSGNFQTNNFNEIFQFLILLCSTLCIPLSVEYIE
 CTEMAITEFLLFILTTLGGMFLCGANDLITIFVALECFSLCSYLLSGYTKKDVR
 SNE ATT KYLLMGGASSSILVHGFSWLYGSSGGEIELQEIVNGLINTQMYNSPGIFIALLFI
 TVGIGFKLSPAPSHQWTPDVYEGSPTPVVAFLSVTSKVAASASATRIFDIPFYFSSNE
 WHLLLEILAILSMILGNLIAITQTSMKRLAYSSIQQIGYVIIGIIVGDSNGGYASMI
 TYMLFYISMNLGTFACIVSFGLRTGTDNIRDYAGLYTKDPYLALSLALCLLSLGG
 LPP LAGFFFGLHLFWCGWQAGLYFLVSIGLLTSVVSIYYYLKIIKLLMTGRNQEITPHVR
 YRRSPLRSNNSIELSMIVCVIASTIPGISMNPIIEIAQDTLF"
 exon complement(92327..93079)
 /gene="ndhB"
 /number=2

```

gene complement(94855..95322)
/gene="rps7"
CDS complement(94855..95322)
/gene="rps7"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ribosomal protein S7"
/protein_id="AFJ91899.1"
/db_xref="GI:387598507"

11
/product="hypothetical protein"
/protein_id="AFJ91900.1"
/db_xref="GI:387598508"



```

```

rRNA          105428..105548
/gene="rrn5"
/product="5S ribosomal RNA"
gene          105798..105871
/gene="trnR-ACG"
tRNA          105798..105871
/gene="trnR-ACG"
/product="tRNA-Arg"
/note="anticodon:ACG"
gene          complement(106442..106513)
/gene="trnN-GUU"
tRNA          complement(106442..106513)
/gene="trnN-GUU"
/product="tRNA-Asn"
/note="anticodon:GUU"
gene          106857..107351
/gene="ycf1"
/pseudo
CDS           106857..107351
/gene="ycf1"
/note="hypothetical chloroplast RF19"
/pseudo
/codon start=1
/transl table=11
gene          complement(107324..109573)
/gene="ndhF"
CDS           complement(107324..109573)
/gene="ndhF"
/codon start=1
/transl table=11
/product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
5"
/protein_id="AFJ91901.1"
/db_xref="GI:387598509"



```

```

SIRRLVKFNSFFDKKRIDGITNGIGITSFFLGEAIKYVGGGRIASYILFFILDILIFL
VILLLHRNK"
gene 109977..110138
/gene="rpl32"
CDS 109977..110138
/gene="rpl32"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ribosomal protein L32"
/protein_id="AFJ91902.1"
/db_xref="GI:387598510"

11
/product="cytochrome c heme attachment protein"
/protein_id="AFJ91903.1"
/db_xref="GI:387598511"

11
/product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
4"
/protein_id="AFJ91904.1"
/db_xref="GI:387598512"



```

LYSATKFILYTAGSSVFLLLGI LGMGFYSSNEPTLNFESLTNQSYPVALEIIFYMGFL
 IIAFKSPIIPLHTWLPDTGAEAHYSTCMLLAGILLKMGAYGLVRINMELLSRAHSIF
 CPWLMLLGSIQIIYAASTSLGQRNVKKRIAYSSVSHMGFLILGIGSISETGLNGAILQ
 IISHGFIGAALFFLAGTSYDRLRLLYLDEMGGMAIPMPKIFTIFTLSMASLALPGMS
 GFVAEFIGVLLGIITNQKYLFITKILITFVTAIGMILTPYLLSILRQMFYGYKLFNKQ
 NSYFFDSGPREFISIISILIPVISIGIYPDFIFSISADKVEAILSHF"
 gene complement(113384..113629)
 /gene="psaC"
 CDS complement(113384..113629)
 /gene="psaC"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="photosystem I subunit VII"
 /protein_id="AFJ91905.1"
 /db_xref="GI:387598513"

 /translation="MSHSVKIYDTCTIGCTQCVRACPTDVLEMIPWDGCKAKQIASAPR
 TEDCVGCKRCESACPTDFLSRVYWHETTRSMGLAY"
 gene complement(113931..114236)
 /gene="ndhE"
 CDS complement(113931..114236)
 /gene="ndhE"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
 4L"
 /protein_id="AFJ91906.1"
 /db_xref="GI:387598514"

 /translation="MIFEHALVLSAYLFSIGIYGLITSRNMVRALMCLELILNAVNI
 LVTFSDFFDRRQLKGNIIFSIVIAVAAAEEAAIGPAIVSSIYRNKRSTRINQSNLNNK"
 gene complement(114455..114985)
 /gene="ndhG"
 CDS complement(114455..114985)
 /gene="ndhG"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
 6"
 /protein_id="AFJ91907.1"
 /db_xref="GI:387598515"

 /translation="MDLSESLHDFILIFLGSGLILGSLGVVFTNPPIFSAFSLGLVLV
 CVSLFYILSNHFVAASQLLIYVGAINVLIIFAVMFMNGSDYYQNFRVWTVDGITLM
 VCTSIFLSQITTILDTSWHGI IWTRPNQILEQDLISTSQQIGIHLSTDFFLPFELIS
 IILLVALIGAIFVARQ"
 gene complement(115252..115737)
 /gene="ndhI"
 CDS complement(115252..115737)
 /gene="ndhI"

```

/codon_start=1
/transl_table=11
/product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
I"
/protein_id="AFJ91908.1"
/db_xref="GI:387598516"

11
/product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
1"
/protein id="AFJ91909.1"
/db_xref="GI:387598517"

11
/product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
7"
/protein_id="AFJ91910.1"
/db_xref="GI:387598518"



```

GGVATDLPYGWIDKCYDFCDYFLTSIAEYQKLITRNPIFLERVEGVGVVDVKEVINWG
 LSGPMLRASGIQWDLRKVDNYECYEEFHWEVQWQKEGDSLARYLVRIGEMIESIKIIQ
 QALEGLPGGPYENLEIRCFDREKEPEWNEFEYRFISKSSPSFELPKQELYVRVEAPK
 GELGIFLIGDQNGFPWRWKIHPPGFINLQILPQLVKRMKLADIMTILGSIDIIMGEVD
 R"
 gene complement(119468..119740)
 /gene="rps15"
 CDS complement(119468..119740)
 /gene="rps15"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ribosomal protein S15"
 /protein_id="AFJ91911.1"
 /db_xref="GI:387598519"

 /translation="MVKKSFISVISQEKKGKPGVLVEFQIFKFTNRIRRLSHFELHR
 KDYSSQRGLRKILGKRQRLLSYLSKKDGIRYKKLINQFNIRQSQIR"
 gene complement(120091..125265)
 /gene="ycf1"
 CDS complement(120091..125265)
 /gene="ycf1"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="hypothetical chloroplast RF19"
 /protein_id="AFJ91912.1"
 /db_xref="GI:387598520"

 /translation="MIFQSFILERLVFLCMKIINSIVVGLYYGFMTTSIGPSYLF
 LRARLVEEGTEKKIAATTGFITGQLIMFMSIYYAPLHLALGRPTITVIAIPYLLFQF
 FFGNSQKKFLNYGYKNPNSIRNFSIQRRFFQNLLFQFLNPLFLPSSIFMRFINIYLFR
 CNNKLLFLTSSFIGWIIGHIFFIKLIEFLLICIQQNNFIKSNVRIQSKKYILSDFRNS
 MFQIFVVFLSVTCLYYLGRIPPPFSKKLLESKESNEIYKKGKKDIETNLQRIRTKE
 KRSNNKDKLQKPLINILFNYKRWNRPFRYIKNNEFENIVKNEISEFFHTYQGDGREK
 ISFTYPQNLSTFEKLMETKIDLFTKNKISYDDLYNDSRYRNEEKINKLSNEFINRTKL
 IDKKSISLDIFENKIRFCNDETQKKYLTKDPFLNGPFRGRIKKGFSTSQHENSYK
 KNHIFINKIQDIFLSNKIDKKNTSNSPKLEENRKTFDKKLLVTTFLFNLISQFSKKLV
 SSLNSQVPYKEPEQVKMNSNYDTEKKQIIKIFFDAITTDLNEKRKVNRKTTKSIKRNE
 ICKKVPRWSYKFIDELEQLGGKIEKDNSQIRSRRKGKRVVILTNKHFFHKYKTYKDLG
 DTENTEKKNELALKRYSQQSDFRRDIIKGSIRAQRKRTVTWKFFQKRVHSPLFLDKIE
 KSIFFSFHSLKSMKRFFMLNIWIRKKTEFQILGSIEEKKSPKRGKKKENAERKRIE
 IAEAWDSIIFAQVIRGVLLITQCFIRKYIILPSLIIIKNTLRILFFQIPEWSEDYMDW

KREMYIKCTYNGVQLSEREFFPQKWLTDGIQIKILFPFRLKPWHKSKIRCNEKKNSKK
KKNFCFLTVSGMEVELPFSSSTKNRFEFFDPILKETKKKKQFEFFTGFVLKVLFSEKF
KLFLNMVIEKAKGIIQSILEIINKSLVFLMKKRKEFLNLKYFFIQRKPKLDELSNK
KDSTIWKNNSMISEATISIQSILTNYSLKKSISKDLNTKKVVVIKKIEKMKKEEKKR
GLVIPETNIHSKKKIYDSKRIEFGKKILQIFQRRNIRLTKKSHSFSFFQFFMKKIYID
IFLYIICILKIQLOPFLESTKKFLNKWLKDNEPTIERTYKTNQSIIPFILNLHKYFNN
RNANSHNYFDVSFLSQPYVFLNLLQTRILNINIYQLRLVFLEYQKNFFFFKNEIKDSFF
GAQGIVHSKIKQNNLLNSKLNQWTNWLKNHYYQYDLSNSSWSKLVSKKWRNRITKCGI
AQKNVTKWDSYGKSPLILYKEQQGVTLKKKIRKQYKYDLLSYNFMNYANKKDSYIYR
YRSQFQSNKNTLIYSNYNTYQKDLFDRISNLFIKNYIAEDTLIRNMEKNPDRKYLDWV
GINRKILNRSICNPEFWFFSKFVIFYNTYRGNSQILPINLLYLSIYLHSKGNQNVSE
NHITRKKKRIDGFTSKKTKNNMEEEIQLFLVRNFFNLHLNWKNNLGKKIFNNVKVYC
LLIRLKNLRKMTITSIQRGEGLDIMMIQNQKNFTLPGLRKKNKNNKFRKKELFVIEPV
RLSRKNNKKFFKYKTMGLSLIHKNKHKIDKKYSEKMNVNNKYFDKYITRTKDQKITEN
KEKENFNLLVPENIILSARCRCRRELIRIRICLDPNNINSMHRNTIFYNENKVKNCFKVLTK
KRNEKEKKLMNFKIFLWPKYRLEDLACINRYWFNTHNGSRFSIVRIHMYPRVKIR"

gene	125609..125680 /gene="trnN-GUU"
tRNA	125609..125680 /gene="trnN-GUU" /product="tRNA-Asn" /note="anticodon:GUU"
gene	complement(126251..126324) /gene="trnR-ACG"
tRNA	complement(126251..126324) /gene="trnR-ACG" /product="tRNA-Arg" /note="anticodon:ACG"
rRNA	complement(126574..126694) /product="5S ribosomal RNA"
rRNA	complement(126923..127026) /product="4.5S ribosomal RNA"
rRNA	complement(127125..129939) /product="23S ribosomal RNA"
gene	complement(130110..130993) /gene="trnA-UGC"
tRNA	complement(join(130110..130144, 130956..130993)) /gene="trnA-UGC" /product="tRNA-Ala" /note="anticodon:UGC"
CDS	130322..130426 /note="open reading frame 56"

```

/codon_start=1
/transl_table=11
/product="hypothetical protein"
/protein_id="AFJ91913.1"
/db_xref="GI:387598521"
/translation="MWFRRIQLQENRERRASPALFFSARLFALKNTGF"

gene 130698..130826
/gene="orf42"

CDS 130698..130826
/gene="orf42"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="hypothetical protein"
/protein_id="AFJ91914.1"
/db_xref="GI:387598522"

11
/product="ribosomal protein S7"
/protein_id="AFJ91916.1"
/db_xref="GI:387598524"

11
/product="NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit
2"
/protein_id="AFJ91917.1"
/db_xref="GI:387598525"


```

ISSTSLVMSITALLFRWREEPMIAFSGNFQTNNFNEIFQFLILLCSTLCIPLSVEYIE
 CTEMAITEFLLFILTTLGGMFLCGANDLITIFVALECFSLCSYLLSGYTKKDVRSE
 ATTKYLLMGGASSSI LVHGFSWLYGSSGEIELQEIVNGLINTQMYNSPGIFIALLF
 TVGIGFKLSPAPSHQWTPDVYEGSPTPVAFSLSVTKVAASASATRIFDIPFYFSSNE
 WHLLLEILAILSMILGNLIAITQTSMKRMLAYSSI QIGYVIIGIIVGDSNGGYASMI
 TYMLFYISMNLGTACIVSFGLRTGTDNIRDYAGLYTKDPYLALSLALCLLSLGGLPP
 LAGFFGKLHLFWCGWQAGLYFLV SIGLLTSVVS IYYYLKIIKLLMTGRNQEITPHVRN
 YRRSPLRSNNSI ELSMIVCVIASTIPGISMNP IIIEIAQDTLF"
 exon 137628..138350
 /gene="ndhB"
 /number=1
 exon 139043..139795
 /gene="ndhB"
 /number=2
 gene 140404..140484
 /gene="trnL-CAA"
 tRNA 140404..140484
 /gene="trnL-CAA"
 /product="tRNA-Leu"
 /note="anticodon:CAA"
 gene complement(141076..147933)
 /gene="ycf2"
 CDS complement(141076..147933)
 /gene="ycf2"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="hypothetical chloroplast RF21"
 /protein_id="[AFJ91838.1](#)"
 /db_xref="GI:387598446"

 /translation="MKGHQFKSWIFELREILREIKNSRYFLDSWTQFNSAGFFIHIFF
 HQESFIKLDSRIWSILLSRNSQGSTSNRYFTIKYVVLFVVAVLIYRINNRKMVERKN
 PYLTRLLPIPMSIGPKNDTLEESSSESSNINRLIVPLLYPKGKKISESSFLDPKEST
 RVLPIKKYIMPEFNWDSRWWRNWIGKKSDSSCKISNETIAGIEISFKEKDIKYLEFL
 FVYYMDDPIRKDHWEFFDRLSPRKRRNIINLNSGQLFEILVKDWIYYLMFAFREKIP
 KEVEGFFKQQGTGSIIQSNDIEHVSHLFLRNKRAISLQNCAQFHMWQFRQDLFVSWGK
 SPHESDFLRNMSRENWIWLDNVWLGNKDRFFSKVRNVSSNLQYDSTRSSFIQVTDSSQ
 LKGSSDQSKDSFDSIRNEDSKYHTLINQREIQQLKERSILCWDPFLQTERTEIESER
 FLKILSGYSSMCRLFMEREKQMNNHLLPEEIEEFFGNPARATRSFFSDRWSELHLGSN
 PTDRSTRDQKLLKKEQKKHLAFSRRSEKKEIVNLFKIIMYLQNTVSIHPISSYRGCDM
 VPKGELDSSNKISFLNKNPFWGLFHLFHDRNRGRYTLHHDFESEDIFQEMADLFTLSI

TEPDLVYHKEFDIFMDSSGLDQKHFLNELLNSRDESKKHSLLVPLFYEEENESFYRR
IIKKWVQTSCGNVVEDPKPKIVVFASNNIMEAVNQYRLIRNLIQIYSTHGYIRNVLN
RFNCNFSEYGIQRYQIGNDTLNHRTRMKYTINQHLSNLKKSQKKWFDPILISRTERSM
NWDPNVYRYKWSNGSKNFQEHDYFISEQNSRFQVVFDRLHINQYSIDWSEVIDKKDL
SKSLCLFLSKLLLFLPKFLLFLSNSLPSFLFVSFGGIPIHRSIEIHIYELKGPNDPLCN
OLLESIGLQIFHLKKRKPLLDQDTSQSKFLINGGTISPFLFNKIPKWMIDSFHTR
KNRRKSFNDNTDSYFSMISHDPDNWLNPVKPFHRSSLIYYFYKANRLRFLNNQYHFCFY
CNKRFPFYVEKARINNYDFTYQGFLKILFIRNKIFSFCDGQKKHAFLKRDTISPIELQ
VSNILIPNDFPQSGDEGYNFYKSFHFPIRYDPFVRGAIYADIISGTPLTEGQIVHFE
KTYCQPLSDMNI PDSEGKNLYQYLNFNSNMGWIHTPCSEKYLPESEKRKKRSSCLQKCL
EKGQMYRTFQQDSVFSTLSKWNLFQTYIPWFLTSTGYKYLNFIFLDTFSDLLPILSSS
QKFVSIFHDIMHGSDILWRIRQIPLCLPQWNLISEIPGNCFHNLLSEEMTHRNNELL
LISTHLRSLNQEFFYSILFLLVAGYLVRTHLLFVSRVYSELQTEFEKVKSLSMIPSY
MIELRKLLDRYPTSELNSFWLKNIFLVALEQLGDSLEEIRSFAFGSNMLWGGGPAYGV
KSIRSKNWKWNLIDLISIIPNPINRIAFSRNTRHLSHPSKAIYSLIRKIKNVNGDWID
DQIESWVSNTDSIDDKEKEFLVQFSTLTTEKRIDQILLSLTHSDLLSKNNSGYQISEQ
PGAIYLRYLVDIQQKKYLMIFYEFNTSCLVERRIFLANYQTITYSHTLGANSLHFPSHG
KPFSLRLALPPPSRGILVIGSIGTGRSYLVKYLATNSYVPFITVFLNKFLDNPKGFL
IDDSDDDDSDDDSDIDRDLDMELELLTMNLTMDMMPEIDRFYITFHFEL
AKAMSPCIWIIPNIHDLDVTESNYLSGLLVNYLSRDCERCSTRNILVIASTHIPQKV
DPALIAPNKFNTCIKIRRLIPQQRKHFFTSLYTRGFHLEKKMSHTNGFGSTMGSNV
RDLVALNNEALSIQKKSIIIDTNIISSVLHRQTWDFRSQVRSVQDHGILFYQIGRA
VSQNVLLSNCISIDPISIYMKKSCDGGDSYLYKWFELGTSMKKLTIILYLLSCSAGS
VAQDLWSLPGPDEKNGITSYGLVEKNYDLVHGLLEVEGALVGSSRTEKDQSFDKDRV
TLLLRSEPRNPLNRIQNGSYSIVDQRFLYEKEYESEFEEGGGVLPQQIEEDFFNHIVW
APRIWRPWGFLFDCIERPNNLGFPYWARSFRDKRIIYDEEDELQENDSEFLQGGTMQY
QTRDRSSKEQGFFRISQFIWDPADPLFFLFKDQPFVSVFSHRQFFTDEEMSRELLTSQ
TNLPTSIIYKHWFIKNTQEKFELLIHCQRWLRINSSSSKGFFPSNTLSESYQYLSNLF
LSNEALLDQMTKTLLRKRWLFPDEIVVASCSNNESLV"
exon complement (141076..147933)

```

/gene="ycf2"
/number=2
gene 148021..148094
/gene="trnI-CAU"
tRNA 148021..148094
/gene="trnI-CAU"
/product="tRNA-Ile"
/note="anticodon:CAU"
gene 148539..148820
/gene="rpl23"
CDS 148539..148820
/gene="rpl23"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ribosomal protein L23"
/protein_id="AFJ91918.1"
/db_xref="GI:387598526"

11
/product="ribosomal protein L2"
/protein_id="AFJ91919.1"
/db_xref="GI:387598527"

11
/product="ribosomal protein S19"
/protein_id="AFJ91920.1"
/db_xref="GI:387598528"


```

"RSRNDAKHNFRGHPLSFTGEKLHGVMRDRITYIPIHLNGEHNGIAITAIHTG"