

ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE BETERRABA
AÇUCAREIRA (*Beta vulgaris* L.) E ESPÉCIES
SELVAGENS RELACIONADAS, ATRAVÉS DO
ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS SÍTIOS DE
RESTRIÇÃO DO DNA TOTAL E MITOCONDRIAL.

RENATO ALAS MARTINS
BIÓLOGO

Orientador: Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Agronomia. Área
de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro de 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USF

Martins, Renato Alas
M386a Análise filogenética entre beterraba açucareira
(*Beta vulgaris* L.) e espécies selvagens relacionadas,
através do estudo do polimorfismo dos sítios de restri-
ção do DNA total e mitocondrial. Firacicaba, 1993.
103p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Beterraba açucareira - Filogenia 2. DNA de beterraba açucareira 3. Mitocondria 4. RFLP I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Firacicaba

CDD 633.63

À minha família dedico e à
Beth Pimenta ofereço com
muitocarinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente a:

- Prof. Dr. Akihiko Ando pela orientação, estímulo e ajuda na viabilização desta pesquisa.
- Prof. Dr. Toshiro Kinoshita por ter me recebido em seu laboratório, pela co-orientação e apoio constante.
- Prof. Dr. Tetsuo Mikami pela oportunidade de trabalhar com sua equipe de alunos, pela atenção dispensada e co-orientação.
- Prof. Dr. Itsuro Takamura por toda a atenção e dedicação prestadas.
- Ao Dr. Mineo Senda que tanto me ajudou.
- Ao Dr. Inukai pela recepção nas Filipinas.
- Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky por sua ajuda na análise estatística e revisão da dissertação.
- Ao CNPq pela concessão das Bolsas de Estudos no Brasil e Japão.
- Aos amigos Kubo, Nikura e Shirai pelo exemplo que foram para mim e pelo prazer de trabalhar com eles.
- Às amigas Catarina, Elisa e Olga pelo apoio a mim prestado.
- Aos amigos Puppim, Fred, Pablo, Kisasi, Hugo, Oswaldo, Júlio e Christopher, pelos ótimos momentos que passamos juntos.
- Aos funcionários do Departamento de Genética.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| INDICE..... | iv |
| LISTA DE FIGURAS..... | v |
| LISTA DE TABELAS..... | ix |
| LISTA DE QUADROS E FOTOGRAFIAS..... | xi |
| 1-INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2- REVISÃO DA LITERATURA..... | 04 |
| 2.1-HISTÓRICO E ORIGEM DA BETERRABA AÇUCAREIRA..... | 07 |
| 2.2 SISTEMÁTICA DA BETERRABA AÇUCAREIRA..... | 11 |
| 2.3- A MACHO ESTERILIDADE CITOPLASMÁTICA..... | 12 |
| 2.3.1- CMS EM MILHO..... | 13 |
| 2.3.2- CMS EM PETUNIA..... | 14 |
| 2.3.3- CMS EM ARROZ..... | 16 |
| 2.3.4- CMS EM BETERRABA AÇUCAREIRA..... | 20 |
| 2.4- A MICROSPOROGENESE..... | 24 |
| 2.5- SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA..... | 27 |
| 3- MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 3.1- ESPÉCIES E LINHAGENS UTILIZADAS..... | 31 |
| 3.2-EXTRAÇÃO DE tDNA DE FOLHAS..... | 33 |
| 3.3-PRECIPITAÇÃO COM ETANOL..... | 33 |
| 3.4- DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE DNA..... | 34 |
| 3.5- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE mt DNA DA RAIZ E DE FOLHAS..... | 37 |
| 3.6- PREPARAÇÃO DO VETOR..... | 37 |
| 3.7-TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES..... | 39 |
| 3.8- PRODUÇÃO DE SONDAS QUENTES DE DNA (32P)..... | 41 |
| 3.9- ELETRÓFORESE EM GEL DE AGAROSE..... | 42 |
| 3.10- "SOUTHERN BLOT" E HIBRIDIZAÇÃO COM SONDAS FRIAS..... | 43 |
| 3.11- PRODUÇÃO DO "SIZE MARKER"..... | 51 |
| 3.12- ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES..... | 52 |
| 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 54 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 64 |
| 5- CONCLUSÃO..... | 84 |
| 6- REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 85 |

 LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|--|---------|
| FIGURA 1- Obtenção de “Weiße Schesische Rübe” (FISCHER, 1989).----- | 06 |
| FIGURA 2- Cariótipo de <i>B. vulgaris</i> apresentado por Winge e Heel (citado por ARTSCHWAGER, 1927).----- | 10 |
| FIGURA 3- Região do mtDNA, urf13, que codifica a proteína de 13KDa (Hanson & Folkerts, 1992).----- | 12 |
| FIGURA 4- Região do mtDNA de Petúnia S-pcf, que codifica a proteína de 25KDa (Hanson & Folkerts, 1992).----- | 13 |
| FIGURA 5- Mapa de restrição de DNAs tipo plasmídeo em arroz (SAKAMOTO et alii, 1989).----- | 15 |
| FIGURA 6- A- <i>B. vulgaris</i> planta normal (fértil) e B- planta macho estéril. (KINOSHITA, 1971).----- | 19 |
| FIGURA 7 - Seção transversal da antera de beterraba açucareira, A - Antera em estádios iniciais e B - Estádio avançado do desenvolvimento da antera (ARTSCHWAGER, 1927).----- | 20 |
| FIGURA 8 - A, B e C - Estágios finais da meiose em célula esporogênica, D- Tetrade, E- Grão de pólen jovem e F- Grão de pólen maturo de beterraba açucareira (ARTSCHWAGER, 1927).----- | 20 |
| FIGURA 9 - Desenvolvimento normal de grãos de pólen (BEDINGER, 1992).-- ----- | 21 |
| FIGURA 10. Plasmídeo pUC 119. (catalogo “New England Biolabs ®, 1992)---- ----- | 37 |
| FIGURA 11- Fotografia da digestão do plasmídeo pUC8 pelas enzimas de restrição EcoR I e Pst I. Gel de agarose S 1.0%.----- | 44 |
| FIGURA 12- Fotografia da digestão do plasmídeo pUC8 pelas enzimas de restrição EcoR I e Hind III. Gel de agarose S 1.0%.----- | 45 |
| FIGURA 13- A- Detalhe do plasmídeo pUC18 e sua região “linker”. B- Fotografia da digestão do plasmídeo pUC 18 pelas enzimas de restrição EcoR I e Sal I. Gel de agarose S 0.8%.----- | 46 |
| FIGURA 14- A- Detalhe do plasmídeo pUC118 e sua região “linker”. B- Fotografia da digestão do plasmídeo pUC 118 pela enzima de restrição Sty I e liberação do fragmento de 0.66Kb. Gel de agarose S 2.0%.----- | 47 |

LISTA DE FIGURAS (continuação).

- FIGURA 15- A- Detalhe da distribuição dos sítios de restrição no gene da subunidade 9 da ATPase. B- Fotografia da digestão do plasmídeo pUC 118 pelas enzimas de restrição Xho I e Eco RV e liberação do fragmento de 0.65Kb. Gel de agarose S 2.0%.-----48
- FIGURA 16- A- Detalhe da distribuição dos sítios de restrição no gene para (cob). B-Fotografia da digestão do plasmídeo pUC 118 pela enzima de restrição Eco RI. Gel de agarose S 2.0%.-----49
- FIGURA 17- A- Detalhe da distribuição dos sítios de restrição no gene para rrn 18S. B- Fotografia da digestão do plasmídeo pUC 118 pela enzima de restrição Xho I e EcoRI. Gel de agarose S 1.0%.-----50
- FIGURA 18- Padrão de digestão do DNA do vírus lâmbida por Styl.-----51
- FIGURA 19- Padrão de digestão do plasmídeo pBR322 por HpaII.-----52
- FIGURA 20- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA/Eco RI.-----55
- FIGURA 21- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mtDNA/Eco RI.-----56
- FIGURA 22- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA/Bam HI.-----57
- FIGURA 23- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mtDNA/Bam HI.-----58
- FIGURA 24- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA/Hind III.-----59
- FIGURA 25- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mtDNA/Hind III.-----60
- FIGURA 26- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.-----61
- FIGURA 27- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mtDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.-----62
- FIGURA 28- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de tDNA/Eco RI.-----63
- FIGURA 29- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de tDNA/Eco RI.-----64
- FIGURA 30- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de tDNA/Bam HI.-----65
-

 LISTA DE FIGURAS (continuação)

- FIGURA 31- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de tDNA/Bam HI.-----66
- FIGURA 32- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de tDNA/Hind III.-----67
- FIGURA 33- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de tDNA/Hind III.-----68
- FIGURA 34- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de tDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.-----69
- FIGURA 35- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de tDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.-----70
- FIGURA 36- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA e tDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.-----71
- FIGURA 37- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mtDNA e tDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.-----72
- FIGURA 38- Distribuição geográfica da seção *Patellares*. (CURTIS, 1968).----74
- FIGURA 39- Padrão de eletroforese obtido por hibridização de mtDNA/EcoRI hibridizado com gene *cob*, onde A = TK81-0, B = TK81-MS, C = *B. maritima*, D = *B. lomatogona*, E = *B. trigyna*, F = *B. webbiana* e G = *B. patellaris*, Tabelas 1 e 4.-----75
- FIGURA 40- Padrão de eletroforese obtido por hibridização de tDNA/BamHI com gene *o cob*. Presença de fragmento de 20.0kb comum entre a planta cms e as plantas da seção *Patellares* onde A = TK81-0, B = TK81-MS, C = *B. maritima*, D = *B. lomatogona*, E = *B. trigyna*, F = *B. webbiana* e G = *B. patellaris*, (fragmentos em kb, Tabela 5).--76
- FIGURA 41- Padrão de eletroforese obtido por hibridização de tDNA/EcoRI com o gene para F-ATPase subunidade 9. Sendo possível a identificação das plantas da seção *Corollinae* através das bandas de 4.2, 3.4 e 2.0kb, onde A = TK81-0, B = TK81-MS, C = *B. maritima*, D = *B. lomatogona*, E = *B. trigyna*, F = *B. webbiana* e G = *B. patellaris*, (fragmentos em kb, Tabela 4).-----77
- FIGURA 42- Padrão de eletroforese obtido por hibridização de mtDNA/BamHI hibridizado com gene F₁-ATPase subunidade a, com a presença de um fragmento de 3.4kb comum à planta cms e as plantas da seção *Corollinae*, onde: A = TK81-0, B = TK81-MS, D = *B. lomatogona*, E = *B. trigyna*, (fragmentos em kb, Tabela 2).-----78
-

LISTA DE FIGURAS (continuação)

FIGURA 43- Dinâmica do mtDNA em *B. vulgaris* linhagem I-12CMS(2), representando a formação do cromossomo principal resultante da interação de duas moléculas subgenômicas. A seta maior indica uma grande seqüência repetida envolvendo vários genes e os pequenos pentágonos e triângulos, seqüências menores (KUBO et alii, 1991).-----80

LISTA DE TABELAS

Páginas

| | | |
|------------|--|-----|
| TABELA 1- | Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do mtDNA com a enzima de restrição EcoRI e revelados através de hibridização com as sondas indicadas.----- | 96 |
| TABELA 2- | Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do mtDNA com a enzima de restrição BamHI e revelados através de hibridização com as sondas indicadas.----- | 98 |
| TABELA 3- | Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do mtDNA com a enzima de restrição HindIII e revelados através de hibridização com as sondas indicadas.----- | 100 |
| TABELA 4- | Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do tDNA com a enzima de restrição EcoRI e revelados através de hibridização com as sondas indicadas.----- | 102 |
| TABELA 5- | Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do tDNA com a enzima de restrição BamHI e revelados através de hibridização com as sondas indicadas.----- | 103 |
| TABELA 6- | Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do tDNA com a enzima de restrição HindIII e revelados através de hibridização com as sondas indicadas.----- | 105 |
| TABELA 7- | Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard para os dados de mtDNA/ EcoRI.----- | 55 |
| TABELA 8- | Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice para os dados de mtDNA/ EcoRI.----- | 56 |
| TABELA 9- | Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard para os dados de mtDNA/ Bam HI.----- | 57 |
| TABELA 10- | Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice para os dados de mtDNA/ Bam HI.----- | 58 |
| TABELA 11- | Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard para os dados de mtDNA/ Hind III.----- | 59 |
| TABELA 12- | Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice para os dados de mtDNA/ Hind III.----- | 60 |
| TABELA 13- | Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard para todos os dados de mtDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.----- | 61 |
| TABELA 14- | Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice para todos os dados de mtDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.----- | 62 |
| TABELA 15- | Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard para os dados de tDNA/ Bam HI.----- | 63 |

LISTA DE TABELAS (continuação).

| | |
|--|----|
| TABELA 16- Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice para os dados de tDNA/ EcoRI.----- | 64 |
| TABELA 17- Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard para os dados de tDNA/ Bam HI.----- | 65 |
| TABELA 18- Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice para os dados de tDNA/ Bam HI.----- | 66 |
| TABELA 19- Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard para os dados de tDNA/ Hind III.----- | 67 |
| TABELA 20- Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice para os dados de tDNA/ Hind III.----- | 68 |
| TABELA 21- Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard para todos os dados de tDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.----- | 69 |
| TABELA 22- Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice para os dados de tDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.----- | 70 |
| TABELA 23- Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Jaccard para os dados de mtDNA e tDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.----- | 71 |
| TABELA 24-Valores de similaridades obtidas pelo coeficiente de Dice para os dados de mtDNA e tDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.----- | 72 |

LISTA DE QUADROS E FOTOGRAFIAS

| | Páginas |
|---|---------|
| QUADRO 1- Taxonomia da beterraba açucareira e especies selvagens relacionadas (CRONQUIST, 1988).----- | 07 |
| QUADRO 2- Relação entre fatores Mendelianos e tipos de citoplasmas. Dados extraídos de Owen (1942).----- | 16 |
| QUADRO 3- Material fornecido pelo HNAES.----- | 27 |
| FOTOGRAFIAS A - <i>B. vulgaris</i> (TK81-O); B- <i>B. trigyna</i> ; C - <i>B. maritima</i> ; D- <i>B. webbiana</i> ; E- <i>B. patellaris</i> . (<i>B. lomatogona</i> , não apresentada)..... | 30 |
| QUADRO 4- Diagrama de ausência e presença de bandas (BUSSAB et alii 1990).----- | 53 |

ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE BETERRABA
AÇUCAREIRA (*Beta vulgaris* L.) E ESPÉCIES
SELVAGENS RELACIONADAS, ATRAVÉS DO
ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS SÍTIOS DE
RESTRIÇÃO DO DNA TOTAL E MITOCONDRIAL.

Autor: RENATO ALAS MARTINS

Orientador: Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

RESUMO

O mtDNA e tDNA de sete plantas do gênero *Beta* foram estudados pela técnica de RFLP e hibridação com sondas específicas de genes mitocondriais.

A relação filogenética entre estas plantas foi estabelecida pela análise dos dados no programa de computador NTSYS, usando-se os coeficientes de Jaccard e Dice, sendo os dendrogramas construídos pelo método UPGMA.

As plantas da seção *Patellares* apresentaram grande divergência genética em relação às plantas de outras seções e vários fragmentos comuns à planta TK81-MS foram encontrados nas seções *Corollinae* e *Patellares*.

De modo geral, a relação filogenética entre as sete plantas foi concordante com a filogenia estabelecida para o gênero *Beta* por dados morfológicos e biogeográficos.

PHYLOGENETIC ANALYSIS AMONG SUGAR BEET (*Beta vulgaris* L.) AND RELATED WILD SPECIES, BY POLYMORPHIC RESTRICTION SITES STUDIES FROM TOTAL AND MITOCHONDRIAL DNA.

Author: RENATO ALAS MARTINS

Adviser: Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

SUMMARY

The mtDNA and tDNA from seven plants of the genus *Beta* were studied by RFLP analysis and hybridization with specific mitochondrial gene probes.

Phylogenetic relationship among these plants was established by NTSYS program, using coefficient of Jaccard and Dice; their dendograms were made by UPGMA cluster analysis.

Plants of *Patellares* section showed high genetic diversity in relation to the others, and various common fragments shared with TK81-MS plants were found in *Corollinae* and *Patellares* sections.

In general, the phylogenetic relationship among the seven plants agreed with the phylogeny established for the genus *Beta* through morphological and biogeographic data.

1- INTRODUÇÃO.

A beterraba açucareira está amplamente distribuída pelas regiões de clima temperado, atingindo na Europa desde a região oeste, Ilhas dos Açores em Portugal, à região leste da Rússia, a região norte, Finlândia, até a região sul da Espanha (Ilhas Canárias). É também cultivada no Canadá, Japão, Egito e nos planaltos do estado do Colorado (EUA) (AMARAL, 1978).

Apesar do comércio mundial de açúcar estar passando por profundas transformações, o cultivo da beterraba açucareira ainda é de extrema importância para estas regiões. Estas transformações são apontadas por AHLFELD (1990), como tendo três causas principais: A) o fato de o cultivo da beterraba açucareira estar amplamente difundido por diversos países, e mais recentemente, pela retomada do crescimento pelos países do leste europeu e de seus interesses pela cultura; B) pelo programa da indústria do álcool no Brasil e C) pelo processo de racionalização e concentração de grandes estoques do produto nos grandes países exportadores. Destaca também a competição já estabelecida entre o açúcar e os adoçantes de baixas calorias.

Todavia, a busca pela produção de sementes híbridas de beterraba açucareira parece não ter sido abalada, tanto que, pelo interesse do vigor de híbrido e pela necessidade de produção de sementes em maior escala, tornou-se importante a utilização de técnicas mais rápidas do que a de emasculação manual das flores. Tanto a beterraba açucareira como a hortícola, estas plantas possuem flores muito pequenas que inviabilizam a produção de sementes pelo processo

manual; deste modo, a utilização da macho esterilidade citoplasmática vem recebendo atenção especial por parte dos pesquisadores.

Em geral, podem-se distinguir três tipos de macho esterilidade em plantas, quais sejam: macho-esterilidade genética, macho esterilidade citoplasmática e a interação entre ambas (GOTTSCHALK & KAUL, 1974). O fenômeno da macho esterilidade genética pode ser observado em 617 espécies e em 320 espécies resultantes de cruzamentos interespecíficos, abrangendo 162 gêneros de 43 famílias, das quais a macho esterilidade causada por genes nucleares (g-mst ou mst) ocorre em 216 espécies e 17 espécies resultantes de cruzamentos interespecíficos. E quanto à macho esterilidade causada pela interação núcleo/citoplasma (gc-mst ou cms), este fenômeno ocorre em 16 espécies e 271 originárias de cruzamentos interespecíficos. As diferenças nas frequências são explicadas pela necessidade de ocorrência de mutação apenas no núcleo para plantas mst e simultaneamente no núcleo e citoplasma de plantas cms (KAUL, 1988).

Muitos estudos têm sido realizados para se explicar o tipo mitocondrial que caracteriza a macho esterilidade citoplasmática presente nas seções do gênero *Beta* (BUTTLER, 1977), associada a rearranjos no mtDNA (KAUL, 1988). Surge a questão sobre o impacto que os rearranjos podem causar na estrutura das populações naturais de espécies do gênero *Beta*, uma vez que este fenômeno é comumente observado nas espécies selvagens do mesmo. Estudos nesta linha são conduzidos no laboratório de melhoramento de plantas da Universidade de Hokkaido, no qual este trabalho foi desenvolvido, liderado pelo Prof. Dr. Toshiro Kinoshita.

Tem se caracterizado o DNA mitocondrial (mtDNA) de diversas plantas quanto à sua variabilidade inter e intra específicas através de enzimas de restrição associadas à hibridação com sondas de DNA específicas, observando-se que o mtDNA possui uma taxa menor de substituição de bases em relação ao DNA nuclear, sendo então, um ótimo recurso para os estudos sobre diversidade genética entre espécies relacionadas (NEI & LI, 1979).

Os estudos desenvolvidos nos programas de melhoramento da beterraba açucareira, no entanto, vêm causando uma redução da variabilidade genética nas plantas cultivadas, assumindo-se que estas possuam o mesmo tipo ou tipos similares de citoplasma e que esta redução na variabilidade já não possa mais assegurar os progressos nestes programas (BOCK, 1986). Além disto, estes estudos são em maior número que os conduzidos em relação à sistemática do gênero *Beta*, e a falta de comunicação entre sistematas e melhoristas tem sido um dos maiores obstáculos para o progresso dos trabalhos de sistemática e taxonomia (BUTTLER, 1977).

Neste sentido, o presente estudo tem por objetivo relacionar os dados de fragmentos de restrição de DNA total e mitocondrial, obtidos pelas enzimas Eco RI, Hind III e Bam HI e hibridizados à sondas específicas de mtDNA, como contribuição para elucidar a relação filogenética, estabelecida através da análise de similaridade estabelecida pelos coeficiente de Jaccard e Dice, entre plantas de espécies diferentes pertencentes a três seções do gênero *Beta*, em relação à linhagem CMS de *B. vulgaris* (TK81-MS). Realizar também uma comparação dos resultados obtidos através dos coeficientes de Jaccard e Dice bem como, comparar os dados moleculares com os dados morfológicos e biogeográficos presentes na literatura.

2- REVISÃO DA LITERATURA.

2.1-HISTÓRICO E ORIGEM DA BETERRABA AÇUCAREIRA.

A beterraba foi um componente comum na dieta dos egípcios durante a construção das pirâmides, dos antigos gregos, romanos e povos orientais. Galeno (129-200 ac) ressaltou as propriedades de um produto designado *sakcharon* originário da Índia e Arábia, recomendado para doenças do estômago, rins e intestino. Durante o período medieval o açúcar era conhecido como “mezinha” e até o século XIX era uma especiaria cujo consumo se limitava às classes privilegiadas. O consumo generalizado por parte dos europeus no entanto, deveu-se com a expansão do consumo do chá vindo da China, do café da Arábia e do cacau da América, (citado por AMARAL, 1978).

O agrônomo francês Olivier de Serres(1539-1619) referiu-se em seu “Theatre de Agriculture” à beterraba açucareira como uma planta sacarina que, quando fervida, originava um xarope de bonito aspecto vermelho (citado por AMARAL ,1978). Em 1747, o químico alemão Andreas Segismundo Marggraff (1707-1782), então diretor da Academia das Ciências de Berlim, publicou um estudo sobre experiências químicas para se obter açúcar de plantas que se desenvolviam bem em climas europeus. O então rei da Prússia, Frederico II, inspirou Franz Karl Achard (1753-1821), discípulo de Marggraff, a desenvolver tais estudos.

O sucessor de Frederico II, Frederico III, procurou emancipar o país das importações de açúcar, apoiando Achard na condução das primeiras seleções que originaram a beterraba açucareira (Weiße Schlesische Rübe). Esta planta, hoje, é considerada a ancestral da beterraba açucareira utilizada nos programas de melhoramento desde então. Atualmente é plantada em todos os países de clima temperado e de zonas sub-tropicais, representando uma das culturas mais difundidas na Europa Central (FISCHER, 1989).

A principal característica dos primeiros programas de melhoramento da beterraba açucareira, no entanto, tem sido o fato de estes terem se utilizado, desde o século XIX, de uma única espécie dita *saccharifera*. Outras espécies, as quais apresentam inúmeras características de interesse agrônomo, só foram exploradas no início da década de 30, quando então surgiram as primeiras teorias da origem do gênero *Beta* (LEBEDINSKY, 1937).

Foi Zossimovitch quem apresentou a teoria de origem do gênero *Beta* de melhor aceitação entre os estudiosos de sua época, localizando como centro de origem as regiões do sudoeste asiático, Turquia, Transcaucásia, Síria e Mesopotâmia, e não na região do oeste europeu, como defendiam outros pesquisadores (citado por LEBEDINSKY, 1937).

Cinco espécies são encontradas nestas regiões na forma de plantas colonizadoras, atingindo grandes altitudes, sendo resistentes a invernos rigorosos. O teor de sacarose nestas espécies chegam a atingir de 16% a 18% e em média atingem de 9% a 12%.

Durante os anos de 1931 e 1935, o Instituto do Açúcar soviético enviou diversas expedições especiais para estas regiões a fim de coletar sementes de beterrabas selvagem e cultivadas. Uma das beterrabas cultivadas na região apresentava raiz arredondada e achatada, com resistência à aridez, mas também adaptada à irrigação praticada pelos nativos. Juntamente com a descoberta da beterraba selvagem, *Beta maritima*, resistente ao *Cercóspora*, encontrada na França, Suíça, Dinamarca e Holanda, estes materiais passaram a ser de

fundamental importância no desenvolvimento de novas variedades da beterraba açucareira cultivada (LEBEDINSKY, 1937).

Recentemente, no entanto, os ganhos na quantidade de açúcar obtidos pelos processos de melhoramento não têm sido expressivos, causados pelo estreitamento do “pool” gênico da cultura e por uniformização citoplasmática pela utilização de plantas cms. Na tentativa de se obter maior variabilidade, FISCHER (1989) conduziu um experimento onde foram cruzadas as chamadas pró-variedades Rote Weiße (fooder beet) e Lukullus (chard beet) e foi então observada segregação para formas e cores, como obtidos nos experimentos de Achard. Este evento foi chamado de ressíntese da beterraba açucareira ancestral, como mostrado na Figura 1. A ancestral ressintetizada foi retrocruzada desta vez com a pró-variedade Lukullus e não com a pró-variedade Rote Weiße, como realizado nos experimentos de Achard, observando-se heterose significativa para os teores de açúcar.

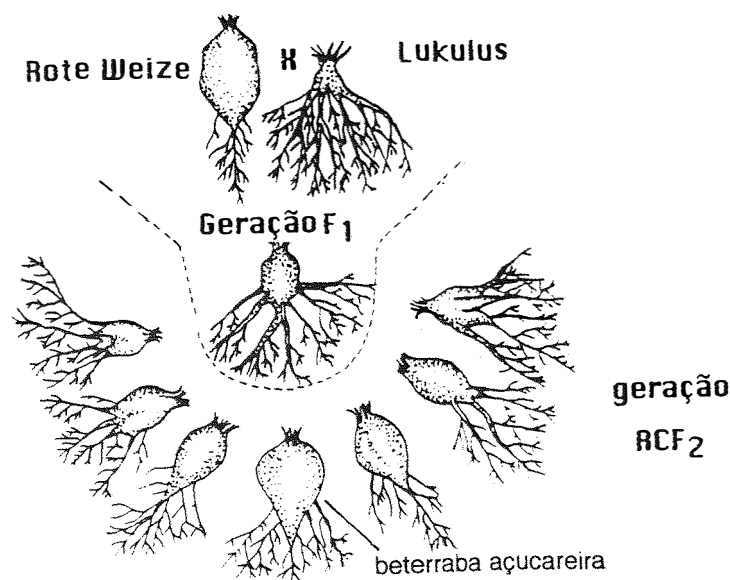


FIGURA 1- Obtenção de “Weiße Schlesische Rübe” (FISCHER, 1989).

Com o mesmo intuito, em programas de melhoramento, as formas “primitivas” ou selvagens da beterraba cultivada vêm sendo utilizadas como fonte de importantes características econômicas a serem exploradas. No entanto, destes cruzamentos resultam características agrônômicas indesejáveis que ainda não puderam ser eliminadas por introgressão, impedindo a comercialização deste material (VAN GEYT et alii, 1990). Estas características são comentadas no item a seguir.

2.2 SISTEMÁTICA DA BETERRABA AÇUCAREIRA.

Taxonomicamente a beterraba açucareira e espécies relacionadas estão organizadas conforme ilustrado no Quadro 1.

| Classe | Sub-classe | Ordem | Família | Gênero | Seção | Espécie |
|---------------|----------------|----------------|----------------|--------|------------|----------------|
| Magnoliopsida | Caryophyllidae | Caryophyllales | Chenopodiaceae | Beta | Vulgares | vulgaris |
| | | | | | | maritima |
| | | | | | | macrocarpa |
| | | | | | Corollinae | orientalis |
| | | | | | | atriplicifolia |
| | | | | | | lomatogona |
| | | | | | | trigyna |
| | | | | | Patellares | corolliflora |
| | | | | | | intermedia |
| | | | | | | patellaris |
| | | | | | | patula |
| | | | | | | procumbens |
| | | | | | Nanae | webbiana |
| nana | | | | | | |

QUADRO 1 - Taxonomia da beterraba açucareira e espécies selvagens relacionadas (CRONQUIST, 1988).

As plantas da família Chenopodiaceae apresentam porte freqüentemente herbáceo, com folhas de limbo plano ou sub-rolço e carnudo; flores pequenas com peças espiraladas, de perianto simples, hermafroditas ou unissexuadas, dispostas em glomérulos; cinco a um estames; ovário uniovulado; frutos tipo aquênio.

A seção *Vulgares* compreende as formas de beterrabas de jardins, açucareira, forrageira e formas selvagens. A espécie *Beta vulgaris* L. apresenta glomérulos uni- a quadrifloras, dispostos em longas espigas subáfilas e com pequenas folhas bracteiformes, perianto frutífero com tépalas inflectidas e convergentes, endurecidas, ovário semi-ínfero e pericarpo lenhoso. Esta espécie é a mais importante para os programas de melhoramento, pois é dela que derivam todas as formas cultivadas (AMARAL, 1978).

Beta maritima (Thell.) apresenta três ecótipos (variedades) de interesse em melhoramento. As variedades adriática, mediterrânica e atlântica apresentam resistência à salinidade do solo e imprimem a resistência ao *Cercospora beticola* quando cruzadas com variedades cultivadas. A variedade atlântica é a de maior interesse por possuir maior quantidade de sacarose apesar de ter maior tendência a ser bianual ou plurianual em relação à variedade mediterrânica (AMARAL, 1978).

Beta macrocarpa (Guss.) Moq. é muito próxima da variedade mediterrânica de *Beta maritima* e é de ocorrência natural no norte da África, nas Ilhas Canárias, Portugal e no sul da Espanha, sendo uma planta anual. O problema que persiste na obtenção de híbridos entre a beterraba açucareira cultivada *Beta vulgaris* (anual) e os outros membros da seção *Vulgares*, tanto em programas de melhoramento como em estudos clássicos de sistemática, está no caráter predominantemente bianual destas espécies (AMARAL, 1978).

Na geração F1 do cruzamento entre *B. vulgaris* e *B. macrocarpa* ou *B. maritima* ou *B. atriplicifolia*, os problemas são a esterilidade dos grãos de pólen e o aborto de sementes. Já na geração F2, observam-se híbridos fracos, esterilidade e clorose (ABE & TSUDA, 1988).

Bons resultados só foram obtidos quando do cruzamento de plantas diplóides e tetraplóides de *B. vulgaris* com plantas triplóides e tetraplóides de *B. macrocarpa*, resultando em plantas de porte menor, melhor produtividade e

segregação para precocidade (LANGE & De BOCK, 1989).

B. maritima foi utilizada como ponte para transpor características favoráveis de *B. trigyna* para *B. vulgaris* em experimentos realizados por ¹Vargas em 1952 (citado por VAN GEYT et alli, 1990).

As espécies da seção *Corollinae* possuem uma distribuição geográfica limitada ao meio-leste europeu. A espécie *Beta lomatogona* (Fischer&Mey.) é originária das estepes da Anatólia, apresentando florescimento no segundo ano e sementes monogérmicas de germinação muito lenta (BONAVENT et alii, 1989). *Beta trigyna* (Waldst.&Kit.) possui dois tipos, um hexaplóide originário dos Balcãs e Hungria (6n=54 cromossomos) e um tetraplóide (4n=36 cromossomos), originária na Pérsia, Turquia e Transcaucásia.

DE BOCK & LEKKERKERKER (1976) testaram cruzamentos com beterraba açucareira de diferentes ploidias com *B. lomatogona*, pertencente à seção *Corollinae*, e obtiveram alguns poucos híbridos quando utilizaram os tetraplóides de *B. vulgaris*. O pareamento cromossômico é bastante dificultado devido a diferentes números de cromossomos nas duas espécies, sendo 36 cromossomos (n=18) em *B. lomatogona* diplóide e 18 cromossomos (n=9) em *B. vulgaris* também diplóide, além das diferenças na constituição dos cromossomos.

Uma outra desvantagem da utilização das espécies da seção *Corollinae* é a tendência de reprodução apomítica. No entanto, os esforços na obtenção dos híbridos se justificam por algumas boas características agrônômicas encontradas nesta espécie, como a resistência a certos vírus.

¹VARGAS, A.. Preliminary report of *Beta* species Hybrids. Novénytermelés, 1:151-4. 1952(inHungarian).

Abaixo é apresentado o cariótipo de *B. vulgaris* (Figura 2) conforme ¹Winge e ²Dukok van Heel (citados por ARTSCHWAGER, 1927).



FIGURA 2- Cariótipo de *B. vulgaris* apresentado por Winge e van Heel (citado por ARTSCHWAGER, 1927).

As espécies da seção *Patellares* ocorrem nas Ilhas Canárias, sul da Espanha e Marrocos, sendo compostas apenas por espécies selvagens (BONAVENT et alii, 1989). Nas espécies pertencentes à seção *Patellares*, como *B. webbiana* Moq. e *B. patellaris* (Moq.&Tond), os interesses se concentram na resistência a nematóides, ao fungo *Cercospora beticola*, e a vírus e por apresentarem sementes monogérmicas, o que facilita a prática agrícola evitando a necessidade do desbaste, podendo ser anuais ou bianuais FEHR (1987).

A seção *Nanae* compreende somente uma espécie diplóide *B. nana* (2n=18) (Boiss.&Heldr.), sendo de ocorrência restrita a áreas cobertas por neve nas montanhas gregas Olimpos, Parnassos e Taiyetos (FORD-LLOYD&WILLIAMS, 1975). Não tem recebido atenção experimental e é pouco referida na literatura, não havendo formação de híbridos com *B. vulgaris*, (REAMON-RAMOS & WRICK, 1992).

¹WINGE, Ô. The Chromossomes. Their Nunber and General Importance. Compt. Rend. Lab. Carlsberg, 13: 131-275, illus.

²HEEL, J. P. van Onderzoekingen Over de Ontwikkeling van de Anthere, van den Zaadknop en van Het Zaad Bij *Beta vulgaris* L. 67p., illus. Naaden. (Thesis, Delft).

2.3- A MACHO ESTERILIDADE CITOPLASMÁTICA

Após a observação de sexo em plantas, feita por ¹Camerarius em 1694, um outro pesquisador ²Kölreuter, em 1763, observou a abortão da antera dentro de uma mesma espécie em híbridos interespecíficos. Diversos outros autores, inclusive ³Darwin em 1890, constataram que este aborto era freqüente em algumas famílias de plantas como Caryophyllaceae, Ericaceae e Liliaceae. Darwin atribuiu a este tipo de esterilidade, em 1893, um papel fundamental na evolução de plantas dióicas (citado por KAUL, 1988).

O fenômeno foi sendo observado em diversas espécies de plantas, mas somente em 1908 ⁴Correns apresentou as primeiras evidências de uma herança não mendeliana para este caráter (citado por KAUL, 1988).

A herança não mendeliana caracteriza um tipo especial de esterilidade masculina, que é a macho esterilidade citoplasmática (cms), a qual afeta apenas a porção masculina da flor. Com o interesse pelo vigor de plantas híbridas e a necessidade do aumento na produção de sementes, cresceu a utilização da esterilidade citoplasmática, também referida na literatura como esterilidade núcleo-citoplasmática (gc-mst ou cms), diferenciando-se da macho esterilidade causada por genes nucleares (mst). A vantagem encontrada na gc-mst ou cms é a ocorrência de 100% de esterilidade (KINOSHITA, 1990).

¹CAMERARIUS, R. J. De sexu Plantarum epistola. In Möbius M (ed) Oswalds Klassiker der exacten Wiss Nr 105. Engelmann Leipzig, DDR, 1899 p, 1694.

²KÖLREUTER, D. J. G. Vorläufige Nachricht von einigene das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungene Fortsetzung 1. Oswalds Klassiker der Exakten Wissenschaten Nr.41, Engelmann, Leipzig, 1763.

³DARWIN, C. The variation of animals and plants under domestication. Murray London, 1890.

⁴CORRENS, C. Die Rolle der mannlichen keimzellen bei der geschtsbestimmung der gynodioecischen pflanzen. Ber Dtsch. Bot Get. 26A: 686-701, 1908.

2.3.1- CMS EM MILHO

A primeira publicação sobre a herança extranuclear da macho esterilidade citoplasmática foi feita por Rhoades, em 1931, em trabalhos conduzidos em milho (*Zea mays* L.) (citado por LAUGHNAN & GABAY-LAUGHNAN, 1983).

Atualmente, se conhecem quatro tipos de citoplasmas que conferem a macho-esterilidade em milho, estando associados a seis genes restauradores da fertilidade. O tipo T (Texas) está relacionado aos restauradores Rf₁ e Rf₂, sendo que estes estão presentes respectivamente nos cromossomos três e nove. Em linhagens estéreis, detectou-se, por técnicas imunológicas, a presença de uma proteína de 13 KDa (kilodaltons) que parece estar associada às mudanças estruturais da membrana mitocondrial, o que levaria a uma sensibilidade da planta às toxinas de fungos, como o *Bipolaris maydis* raça T. Esta proteína de 13KDa é codificada por uma região do mtDNA, conforme mostrado na Figura 3. Quando o gene Rf₁ está presente, observa-se uma diminuição da proteína de 13 KDa, e quanto ao restaurador Rf₂, sua função ainda é desconhecida (HANSON & FOLKERTS, 1992).

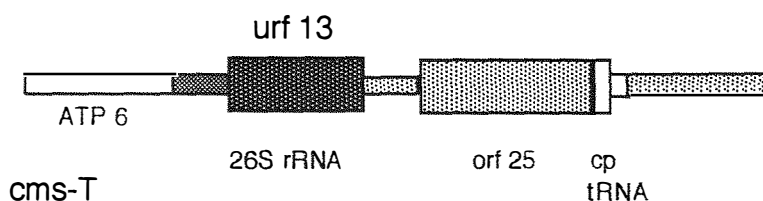


FIGURA 3- Região do mtDNA, urf13, que codifica a proteína de 13KDa (Hanson & Folkerts, 1992).

1RHOADES, M. M.. Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*
 Science. 73:340-341, 1931.

No citoplasma de milho cms-S, é observada somente a ação de um gene restaurador Rf₃, o qual está localizado no cromossomo dois (LAUGHNAN & GABAY-LAUGHNAN, 1983). Neste caso não tem sido noticiada a relação do restaurador Rf₃ e a produção de proteínas específicas. No cms-S encontram-se, no entanto, dois plasmídeos chamados S₁ e S₂ os quais não estão presentes nos outros tipos de citoplasmas conhecidos de milho (HANSON & FOLKERTS, 1992).

Outro tipo é o citoplasma cms-C que está relacionado com outros três genes restauradores Rf₄, Rf₅ e Rf₆, sendo que a localização cromossomal destes ainda é desconhecida. Este tipo de citoplasma contém vários genes mitocondriais aberrantes, mas não estão envolvidos com a esterilidade. O gene para a subunidade seis da F₁-ATPase é composto de parte do gene para a subunidade 9 da F₁-ATPase e parte advinda do DNA cloroplastidial (ctDNA) (HANSON & FOLKERTS, 1992).

2.3.2- CMS EM PETÚNIA

O mecanismo pelo qual o desenvolvimento normal do grão de pólen é afetado em plantas estéreis ainda se desconhece. Todavia, pela utilização de técnicas imunológicas, detectou-se uma proteína de 25KDa (Figura 4) em petúnia, presente em linhagens estéreis e, em menor quantidade, em plantas com fertilidade restaurada por ação do gene Rf. Esta proteína também está codificada no mtDNA, pelo gene pcf (petunia cms-associated fusion), como em milho, urf13, e está envolvida com a diminuição do transporte de elétrons, por afetar a regulação da via de oxidação alternativa (HANSON & FOLKERTS, 1992).

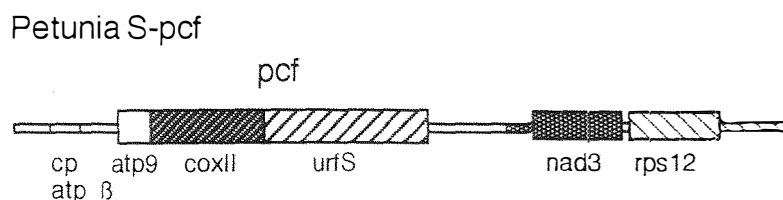


FIGURA 4- Região do mtDNA de Petúnia S-pcf, que codifica a proteína de 25KDa (Hanson & Folkerts, 1992).

CONNET & HANSON (1990) destacam a existência de duas hipóteses para o mecanismo molecular da cms em petúnia. Uma seria a de o polipeptídeo codificado pela seqüência de mtDNA, *pcf*, que contém seqüências homólogas aos genes para ATPase subunidade 9, e para *coxII* poderia integrar-se à membrana mitocondrial, ocasionando uma interferência no transporte de elétrons por desarranjo do complexo enzimático. Outra hipótese seria que os genes para NAD subunidade 3 e *rps 12* poderiam ser mal expressos quando localizados depois da região *pcf* em relação ao sentido de leitura. Isto ocorreria pelo fato de serem genes de cópias únicas no mtDNA e que também interfeririam no funcionamento normal da mitocôndria. No mesmo trabalho, CONNET & HANSON (1990) constataram variação na expressão ou atividade do transporte de elétrons na via de oxidação alternativa, quando estudadas culturas de células com 3 a 5 dias de cultivo. Estas apresentavam-se isonucleares variando apenas quanto ao fenótipo para esterilidade citoplasmática.

2.3.3- CMS EM ARROZ

Em arroz, são muitas as referências à macho-esterilidade. Quanto à sua natureza, tem sido relatada a presença de DNAs tipo plasmídeo, estando estes associados ao fenômeno de macho-esterilidade citoplasmática. Os plasmídeos B_1 e B_2 presentes em linhagens estéreis foram analisados por SHINAKAI et alii (1987); foi encontrada seqüência homóloga ao plasmídeo B_4 no DNA nuclear, mas não no genoma principal do mtDNA (SHINAKAI & YAMADA, 1988). Foram encontrados DNAs tipo-plasmídeo superhelicoidizados em linhagens estéreis, mas não em linhagens férteis, ditos plasmídeos B_1 e B_2 (NAWA et alii, 1986), os quais eram ausentes em linhagens revertidas (férteis) por ação de 2,4-D (NAWA et alii, 1987).

Os mapas de restrição dos DNAs, tipo plasmídeo B₁ e B₂ em arroz, foram apresentados por SAKAMOTO et alii (1989), sem contudo identificarem a natureza destes DNAs tipo-plasmídeo, como mostrado na Figura 5.

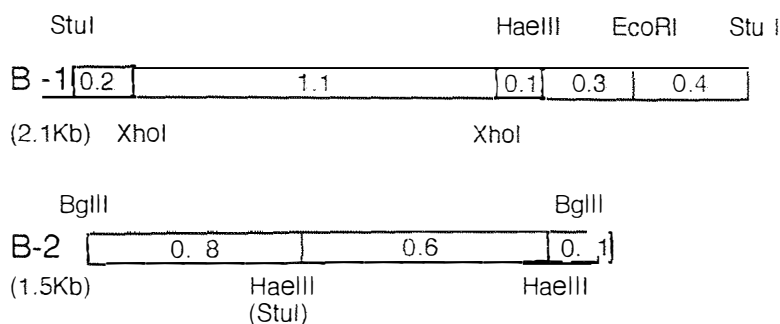


FIGURA 5- Mapa de restrição de DNAs tipo plasmídeo em arroz (SAKAMOTO et alii, 1989).

A macho-esterilidade estudada em arroz também está associada à interrupção do desenvolvimento normal do grão de pólen, acompanhando assim o que ocorre em milho, beterraba açucareira e petúnia. A interrupção no desenvolvimento dos grãos de pólen foi detectada por ¹Chu e colaboradores, em 1972, nos primeiros estágios do desenvolvimento, sendo apontado como fato raro em arroz, uma vez que a interrupção é normalmente observada nos estádios tardios (²Tamaru et alii, 1980, citado por KAUL, 1988).

¹CHU Y. E.; SHINJYO, C.; LI, H. W. Hybrid rice breeding III. Cytological investigation of pollen degeneration in anthers of cytoplasmic male sterile plants. Japanese Journal of Genetics. 47: 179-183, 1972.

²TAMARU, N. ; KINOSHITA, T.; TAKAHASHI, M. Observations on pollen development in the cytoplasmic male sterile induced by the nuclear substitutions. Genetical studies on rice plant, LXXIII. Mem. Faculty of Agriculture Hokkaido University, Japan. 12: 124-128. 1980.

2.3.4- CMS EM BETERRABA AÇUCAREIRA

OWEN (1942) identificou em beterraba açucareira dois tipos diferentes de citoplasmas mutantes, onde um deles resultava em plantas com produção de pólen normais e abundantes e, no outro, o aborto dos grãos de pólen tornando a planta completamente estéril. O primeiro chamou-se citoplasma normal (N; xxzz) e ao outro citoplasma estéril (S; xxzz), e suas conclusões foram de que fatores com herança mendeliana atuariam quando da presença de citoplasma S, o que não ocorreria na presença do tipo N.

Os resultados de OWEN (1942) podem ser explicados assumindo-se a presença de dois fatores com herança mendeliana como representado no Quadro 2. Os fatores mendelianos a que Owen se referiu são hoje ditos fatores de restauração da fertilidade, ou simplesmente genes Rf ($x = Rf_1$ e $z = Rf_2$). Estes restauradores interagem com o citoplasma tipo S quando em caráter dominante, onde então, são observados níveis diferentes de restauração da fertilidade.

| Tipos de Citoplasma | Fatores Mendelianos | Fenótipo Resultante |
|---------------------|--------------------------|---|
| S | xxzz | macho-esterilidade e anteras vazias |
| S | Xxzz, xxZz XXzz, xxZZ | semi-esterilidade com anteras amarelas e pouco ou nenhum pólen |
| S | XxZz, XXZz XxZZ, XXzz | maior ou menor quantidade de pólen dependendo das condições ambientais e ocorrência de não abertura das anteras |
| N | indiferente | anteras normais |

QUADRO 2- Relação entre fatores mendelianos e tipos de citoplasmas. Dados extraídos de Owen (1942).

Em trabalhos conduzidos em beterraba açucareira, POWLING (1982) identificou dois tipos de mitocôndria, um associado à macho-fertilidade e o outro com cms, utilizando de padrões de RFLP obtidos pelas enzimas BamHI e SalGI.

KINOSHITA (1990) descobriu três novos tipos de citoplasmas (S₂ S₃ e S₄) em beterraba açucareira, pela análise de polimorfismo em mtDNA e ctDNA que coincidiram com os diferentes graus de restauração por genes Rf. As flores de plantas estéreis apresentam anteras enrugadas, que gradativamente tornam-se escuras, em contrapartida as anteras normais, que são amarelo-esverdeadas e entumecidas, conforme a Figura 6 (KINOSHITA, 1971).

Na tentativa de se encontrar a região do mtDNA responsável pela macho esterilidade, intensos esforços estão sendo dedicados à análise do mtDNA de beterraba açucareira pela busca de polimorfismo entre mtDNA de citoplasmas N e S, e do papel de proteínas codificadas por este genoma, além da tentativa de se explicar o complexo comportamento de recombinação entre o genoma principal da mitocôndria e seus DNAs tipo-plasmídeo (SENDA et alii, 1991; KUBO, 1991; EBE, 1992; ¹MIKAMI, comunicação pessoal).

Os genes nucleares, que participam no fenômeno da esterilidade gênica, provocam perturbações nas células esporogênicas durante as fases paquíteno, zigóteno e metáfase I da meiose, impedindo ou provocando o pareamento parcial dos cromossomos. Este processo de não pareamento ou pareamento parcial ou assinapse, do qual GOTTSCHALK & KAUL (1980) ressaltam a importância de não se confundir com dessinapse, faz referência à separação dos homólogos após o paquíteno ter se processado normalmente, influenciando apenas na frequência da formação de quiasmas. Estes eventos influenciariam os estágios inicial e mediano da prófase meiótica, durante a formação dos grãos de pólen.

¹MIKAMI, T. Universidade de Hokkaido/Japão. comunicação pessoal. 1992.

Já na esterilidade citoplasmática ocorreria uma interferência na delicada relação entre as células esporogênicas e o tapetum, que é uma membrana glandular responsável pela produção de enzimas e pelo fornecimento de nutrientes e outras substâncias para o desenvolvimento normal dos grãos de pólen (GIFFORD & FOSTER, 1990).

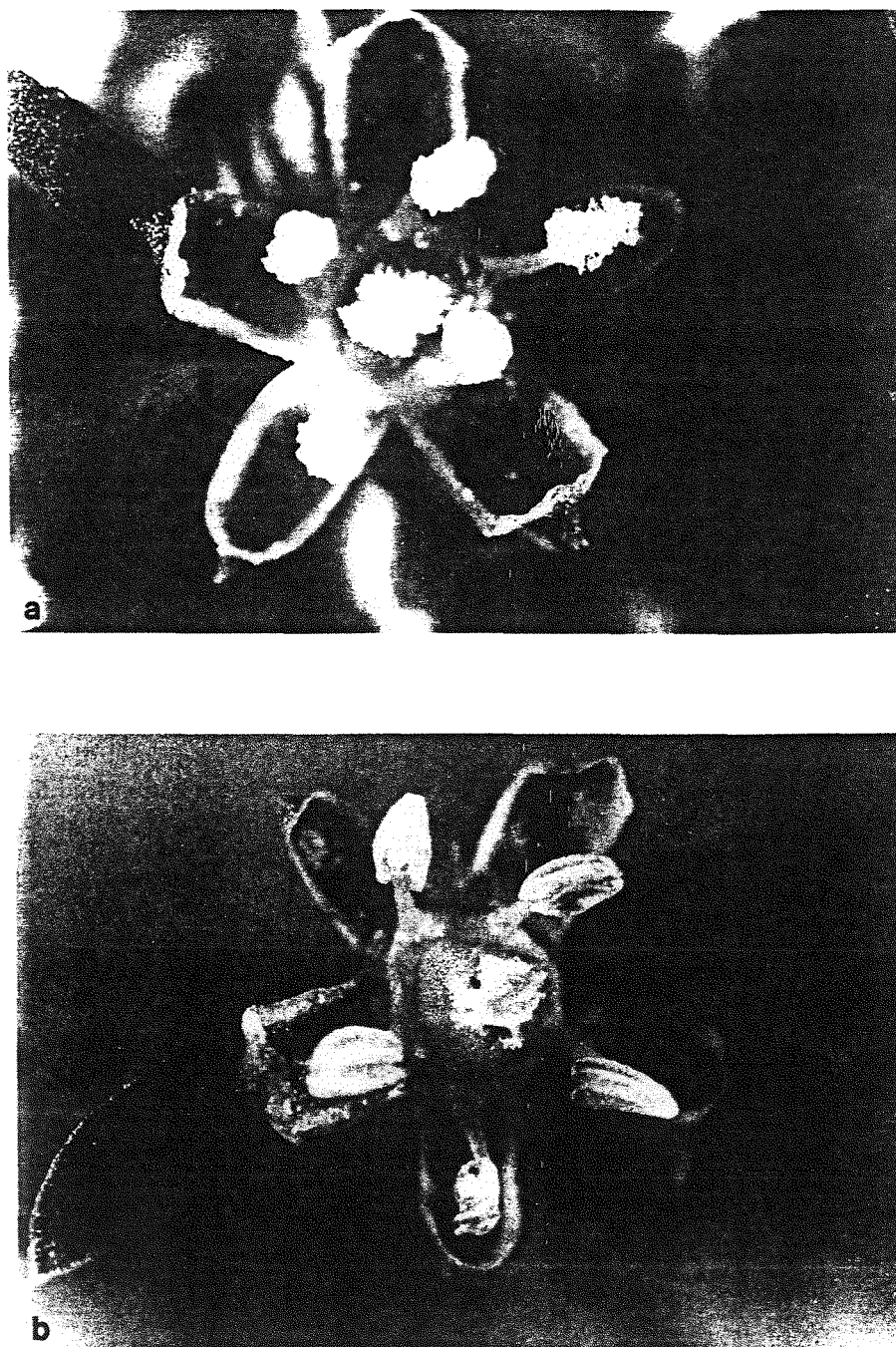


FIGURA 6- **a** *B. vulgaris* planta normal (fétil) e **b** planta macho-estéril (KINOSHITA, 1971).

2.4- A MICROSPOROGÊNESE.

Os grãos de pólen desenvolvem-se no interior das anteras sob a proteção de três membranas, quais sejam: epiderme, endotécio e tapetum (Figura 7).

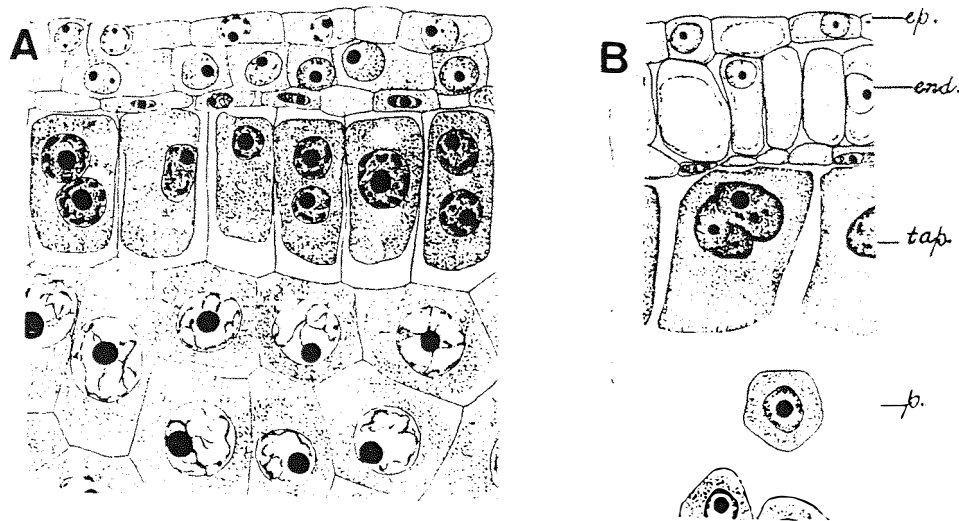


FIGURA 7 - Seção transversal da antera de beterraba açucareira, A- Antera em estádios iniciais e B- Estádio avançado do desenvolvimento da antera (ARTSCHWAGER, 1927).

O ambiente envolvido pelo tapetum (lóculo) contém células esporogênicas, as quais sofrem meiose, originando as tetrades de células haplóides chamadas micrósporos, que são contidos em paredes celulósicas (Figura 8).

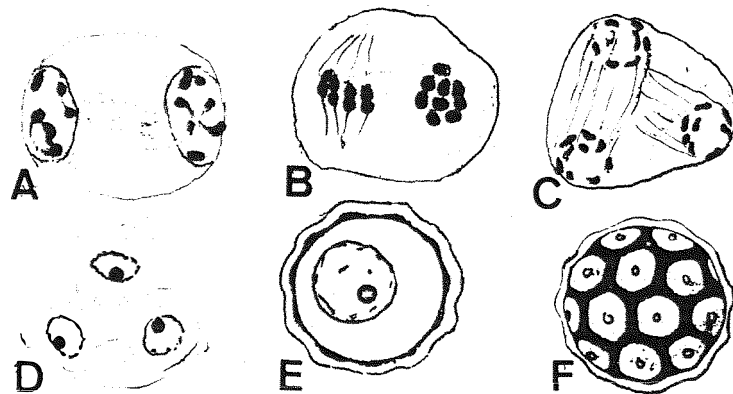


FIGURA 8 - A, B e C- Estádios finais da meiose em célula esporogênica, D- Tétrade, E- Grão de pólen jovem e F- Grão de pólen maduro de beterraba açucareira (ARTSCHWAGER, 1927).

Conjuntamente com a dissociação da parede celulósica, o micrósporo cresce e forma-se neste uma fina membrana externa de exina. O núcleo que está mais ao centro migra para a periferia em sentido oposto ao poro do micrósporo. Surgem vacúolos no seu interior que podem eventualmente se fundir. Após sofrer mitose, do micrósporo são formadas duas células, que são então definidas como grãos de pólen. Durante o processo de maturação do grão de pólen, que em milho é de sete dias, ocorre no seu interior a divisão da célula generativa em duas células espermáticas. O pólen então acumula grãos de amido em seu interior e desidrata-se ficando com 40% a 58% do seu conteúdo de água inicial até a abertura da antera. Todo este processo é bastante dispendioso para a planta e envolve um grande número de genes (BEDINGER, 1992) conforme ilustrado na Figura 9.

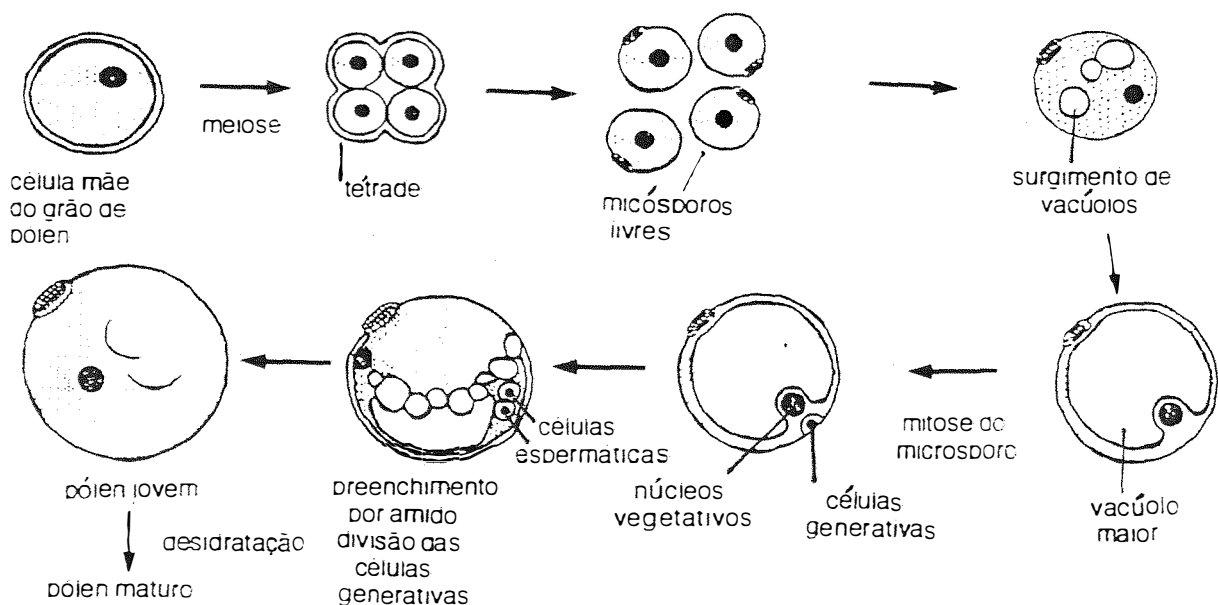


FIGURA 9 - Desenvolvimento normal de grãos de pólen (BEDINGER, 1992).

Durante a mitose do micrósporo, o tapetum sofre diferenciação bastante pronunciada, donde desaparecem as paredes primárias das células que o constituem, permitindo assim que pontes citoplasmáticas se formem entre elas. As células invadem o lóculo da antera, mantendo contato com estas através de sincícios. Também são observadas nestas células vesículas secretoras nas regiões mais próximas dos micrósporos, que têm como função nutri-los, além de liberá-los da parede celulósica através da produção de β 1,3 glucanase (celulase). É este o ponto crítico no estudo da macho-esterilidade citoplasmática, pois o tempo de duração da dissociação da parede de celulose, que envolve o micrósporo é de fundamental importância para o desenvolvimento normal dos grãos de pólen. Nas anteras de plantas cms de petúnia, observa-se uma prematura dissociação da parede de celulose e a má formação dos grãos de pólen (BEDINGER, 1992).

Parece existir uma interdependência entre o micrósporo e as células do tapetum, segundo resultados de estudos de indução da ação de β 1,3 glucanase no lóculo de antera de tabaco (WORRALL et alii, 1992), onde ambos apresentam anormalidades durante o desenvolvimento dos grãos de pólen, sendo que o papel da fina camada de celulose que envolve o micrósporo ainda não foi esclarecido. A indução desta esterilidade parcial foi resultante da reprodução da ação prematura da β 1,3 glucanase que ocorre em linhagens cms de petúnia.

Neste mesmo estudo, WORRALL et alii (1992) também ressaltaram a ação de genes restauradores da fertilidade em linhagens cms de petúnia e *Lilium*, por provocarem um retardo da dissociação da celulose contida na parede dos micrósporos. Destacaram este efeito como sendo a principal causa da macho esterilidade nestas plantas. WARMKE & OVERMAN (1972) observaram o mesmo fato em linhagens cms de sorgo. WORRALL et alii (1992) também enfatizam que o excesso de aminoácidos no interior do lóculo e alterações morfológicas no tapetum parecem antecipar a dissociação da parede de celulose do micrósporo, juntamente com a observação de uma nova proteína que interferiria na produção de energia por parte da mitocôndria.

MARTÍNEZ-ZAPATER et alii (1992) associaram mutações recessivas ocorridas no locus (CHM) em *Arabidopsis* como responsáveis pela produção de uma proteína que provocaria rearranjos no mtDNA.

Em experimentos conduzidos em linhagens cms e restauradas para fertilidade de *Phaseolus vulgaris*, JOHNS et alii (1992) constataram uma estrita relação entre uma região quimérica, resultante de rearranjos mitocondriais contendo porções de ctDNA, e o padrão de desenvolvimento de grãos de pólen. Em linhagens cms, a microsporogênese é interrompida no estágio de tétrade do micrósporo por apresentarem conexões citoplasmáticas entre estes, indicando assim falhas na citocinese. Em contrapartida, observa-se uma diminuição ou desaparecimento da seqüência de mtDNA associada à esterilidade em plantas cms, restauradas para fertilidade por ação de genes Rf.

Existe uma concordância quanto aos efeitos dos genes que afetam a microsporogênese nas plantas. Estes atuam de modo a não interferir no processo até o início da meiose, quando então os genes começariam a atuar; o conteúdo das células mães de pólen (PMCs) é rapidamente degradado, e há ocorrência de assínapse nos estádios iniciais da meiose e dessínapse não produzem alterações na estrutura e função da porção feminina da flor (GOTTASCHALK & KAUL, 1974).

Nestes estudos, em geral, são analisados caracteres morfológicos observados durante a microsporogênese, como por exemplo, o tamanho das anteras e de outras estruturas florais, funcionando assim, como marcadores morfológicos. Estes são associados a eventos genéticos que são estudados pela análise de hibridação do RNA mensageiro (mRNA), que varia em tipo e quantidade no transcorrer dos eventos celulares, com os fragmentos de DNA que constituem o banco de cDNA da planta estudada. É baseado neste tipo de análise que diversos genes que atuam no desenvolvimento do grão de pólen vêm sendo estudados; ALBANI et alii, (1990) em *Brassica napus* e TWELL et alii (1989) em tomate identificaram três genes considerados pólen-específicos. Em *Nicotiana tabacum*, KOLTUNOW et alii. (1990), estudando tipos de RNAs de estruturas

florais e de tamanhos diferentes, também identificaram três genes pólen-específicos.

2.5- SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA

Nos últimos 20 anos, a sistemática biológica tem sofrido um verdadeiro impacto com a implantação de métodos empíricos e da mudança de atitude em relação à obtenção dos dados, podendo-se observar um rigor em relação à qualidade e análises. Esta mudança se deve principalmente pela aplicação dos métodos filogenéticos. A filogenética, segundo FINK (1986), abrange duas questões básicas que são:

- As espécies estão conectadas genealógicamente através de uma relação ancestral-descendente e esta genealogia pode ser representada através de árvores ou gráficos, chamados clendrogramas filogenéticos.

- Assume-se que as características das espécies se modificam através do tempo, sendo que algumas destas características passam para os descendentes.

O termo "sistema" possui vários significados nas diversas áreas da ciência, mas existe um consenso quando interpretado como sendo: "Uma estrutura, da qual partes individuais, por uma ordenação específica de seus componentes, originam um todo". A organização dos seres vivos em uma estrutura lógica é um processo de sistematização e não classificação. Em toda a história da humanidade, são vistos esforços na tentativa de se organizar os seres vivos por um sistema lógico baseando-se em caracteres comuns, por similaridade e por diferenças. A idéia de se agrupar os indivíduos por desfrutarem de características comuns foi a base para a classificação tipológica de Aristóteles, a qual dominou o meio científico até o século XIX, sustentado pelo "Systema Naturae" de Linnæus (AX, 1987).

Neste contexto, a utilização do termo "Táxon", que se refere à unidade de agrupamento dos indivíduos, os quais são dependentes de tempo e espaço e são

a unidade evolutiva onde ocorrem as mutações e conseqüentemente surgem as novidades evolutivas, só é possível porque existe um elo de ligação (que é o sexo) que permite a passagem destas novidades evolutivas para outras gerações. O estudo destas novidades evolutivas é o alvo da sistemática filogenética, a qual permite o estabelecimento de um traçado evolucionário evidenciado pelo conjunto de novidades evolutivas desfrutadas por grupos de indivíduos (HENNIG, 1966).

A sistemática filogenética está fundamentada nos seguintes axiomas:

- As características se desenvolvem como novidades evolutivas pela alteração da informação genética de um único indivíduo de uma população pertencente a uma espécie.
- As espécies surgem por ruptura ou fusão de espécies.
- Comunidades próximas de descendentes desenvolvem-se pela ruptura de uma espécie base “stem species”.
- Este processo de ruptura das espécies leva à conexão, ao parentesco, a uma estrutura hierárquica entre as espécies e às comunidades de descendentes próximos.

Baseando-se nestes axiomas, resultam apenas dois modos de se definir os “Taxa” que são:

- Os taxa ao nível de espécie são equivalentes a comunidades próximas reprodutivamente na natureza, nas quais a evolução pode ocorrer por ruptura, entrando em um processo de filogênese.
- Os taxa supra-específicos ou “superiores”, tendo como base a espécie, são equivalentes a comunidades de descendentes próximos na natureza. A união de um ramo de uma espécie com suas espécies descendentes gera uma comunidade de descendentes próximos no processo histórico da filogênese. Para um grupo de organismos assim constituído é dito taxon monofilético (ou monófilo).

Para a sistemática filogenética, a congruência entre comunidades de descendentes próximos tem que ser absoluta, sendo que um taxon específico

pode ser constituído de no mínimo duas espécies. Conforme se agrupam novas comunidades de descendentes com menor identidade, maior o taxon e mais antiga é a relação entre eles (AX, 1987).

No processo de ruptura de uma espécie, ou grupo de organismos que se caracteriza por uma série de novidades evolutivas, essa ruptura origina um outro grupo de descendentes ou espécie, que possui seu próprio conjunto de novidades evolutivas, diferenciando-se assim da espécie original. Cada novidade evolutiva ou caráter que participa desta distinção é chamada de autapomorfia. Sendo que para as características comuns entre espécies irmãs (adelfotaxa) são ditas sinapomorfias (AX, 1987).

A base da sistemática filogenética é então a busca por caracteres sinapomórficos que contribuam para evidenciar a história filogenética dos organismos vivos. Para tal, são necessárias hipóteses objetivas sobre a existência de sinapomorfias concordantes entre as espécies e hipóteses associativas sobre as relações filogenéticas entre espécies (AX, 1987).

A filogenética numérica tem passado por recentes avanços, tendo sido impulsionada por vários programas de computador, que tiveram seus algoritmos originados em outras áreas como matemática aplicada e teoria gráfica. Uma outra evolução que também marcou a sistemática filogenética foi o problema de Steiner ou o “traveling salesman problem”, como é conhecido o método de escolha da menor árvore que representa os dados, que na verdade, em termos filogenéticos, é equivalente a se encontrar a menor mudança entre os caracteres estudados. Restam ainda dois problemas, que é o fato de o número de árvores possíveis crescer rapidamente com o aumento dos taxa analisados e que, para grandes conjuntos de dados, ainda não há programas disponíveis (FINK, 1986).

3- MATERIAL E MÉTODOS.

3.1- ESPÉCIES E LINHAGENS UTILIZADAS.

As linhagens cultivadas de beterraba açucareira, utilizadas neste trabalho, foram desenvolvidas na Estação Nacional de Agricultura Experimental de Hokkaido (HNAES), Japão, que são TK81-O e TK81-MS (*B. vulgaris*), que diferem geneticamente quanto ao tipo mitocondrial. A linhagem TK81-O (N, rf1 e rf2) é chamada mantenedora e TK81-MS (S, rf1 e rf2) estéril. As espécies selvagens também foram obtidas na mesma estação experimental. As linhagens utilizadas são apresentadas no Quadro 3.

| Seções | Espécie / linhagem | Fonte | n° cromossomos | n° de plantas |
|------------|-----------------------------------|-------|----------------|---------------|
| Vulgares | <i>B. vulgaris</i> (TK81-0) | HNAES | 2n=18 | 1 |
| | <i>B. vulgaris</i> (TK81-MS) | HNAES | 2n=18 | 1 |
| | <i>B. maritima</i> (SP673000-0) | HNAES | 2n=18 | 1 |
| Corllinae | <i>B. lomatogona</i> (SP743000-0) | HNAES | 2n=36 | 1 |
| | <i>B. trigyna</i> (SP753012-2) | HNAES | 2n=36 | 1 |
| Patellares | <i>B. webbiana</i> (WB11) | HNAES | 2n=18 | 1 |
| | <i>B. patellaris</i> (WB29) | HNAES | 2n=36 | 1 |

QUADRO 3- Material fornecido pelo HNAES.

As sementes foram plantadas em semeadeiras e mantidas em casa de vegetação à temperatura de 25°C por três meses, de onde foram levadas ao campo com espaçamento de 0.5 metros entre plantas e entre linhas. O plantio foi realizado no mês de abril e as plantas foram coletadas em outubro para extração de DNA.

Abaixo estão apresentadas as fotografias das plantas utilizadas no presente estudo, as quais foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Melhoramento de Plantas da Universidade de Hokkaido.



A



B



C

**D****E**

FOTOGRAFIAS: A - *B. vulgaris* (TK81-O); B - *B. trigyna*; C - *B. maritima*; D - *B. webbiana*; E - *B. patellaris*. (*B. lomatogona*, não apresentada).

3.2-EXTRAÇÃO DE tDNA DE FOLHAS

A extração de tDNA de folhas jovens foi realizada segundo o método de DOYLE & DOYLE (1987).

Soluções:

- Tampão de Homogeneização.

50mM Tris HCl (pH=8.0)

5mM EDTA

0.5mM Espermidina

1% Polietileno-glicol

0.1% 2-mercapto-etanol

0.35 M Sacarose.

- Tampão de Lavagem.

50mM Tris HCl (pH=8.0)

25mM EDTA

0.5mM Espermidina

0.1% 2-Mercapto-etanol

0.35 M Sacarose.

5M NaCl

10% SDS (w/v)

10% CTAB (w/v)

24:1 Clorofórmio/álcool isoamil.

- Tampão de Eluição (TE).

1M Tris HCl (pH 8.0)

1mM EDTA.

Procedimento:

Pesou-se de 5 a 10 gramas de folhas jovens lavadas em água destilada e secas em papel toalha. Transferiu-se para um cadinho previamente resfriado com nitrogênio líquido e macerou-se até a formação de pó. Este foi transferido para tubos de centrífuga contendo 75ml de tampão de homogeneização pré-aquecido a 60°C por 30 minutos, agitando-se a solução lentamente. Após o pré-aquecimento, resfriou-se a 25°C e adicionou-se clorofórmio/álcool isoamil (24:1; v:v) e centrifugou-se a 3.500g por 20 minutos em um rotor "swinging bucket" pré-resfriado a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrífuga e repetiu-se o processo duas vezes. Ao final da centrifugação, transferiu-se o sobrenadante, adicionando-se 2/3 de isopropanol previamente resfriado a -20°C. Centrifugou-se a 1600g por 10 minutos em um "swinging bucket". eliminando-se o sobrenadante, o precipitado foi então resuspenso em 1ml de TE, acrescentando-se RNase a uma concentração final de 10µg/ml, incubando-se por 30 minutos a 37°C. O volume da amostra foi diluído em dois volumes de TE e fez-se a precipitação com etanol (item 3-3). Após a precipitação com etanol, ressuspendeu-se o precipitado em 10ml de tampão de lavagem, onde foi deixado por 20 minutos. Centrifugou-se a 1.600g por 10 minutos a 25°C em um rotor de ângulo fixo, ressuspendo-se o precipitado em 1ml de TE.

3.3-PRECIPITAÇÃO COM ETANOL

Soluções:

- NaOAc
0.3M Acetato de sódio (pH 5.2 e 7.0)
ajustado pH com ácido acético glacial e completado 1l.
- Etanol 80%

Procedimento:

Para a precipitação do ácido nucléico de uma solução, adicionou-se 1/10 da solução de NaOAc 3M, juntamente com 2,5 vezes de etanol 80%; após homogeneizada, a solução foi deixada por 20 minutos a -80°C , ou por 19 horas a -20°C , para que ocorresse a precipitação do ácido nucléico. O material foi então centrifugado a 1.600g por 10 minutos em um rotor “ângulo fixo”, desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco sob vácuo e ressuspenso em tampão TE (item 3-2) para a diluição desejada.

3.4- DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE DNA

O espectrofotômetro foi calibrado com TE (item 3-2) e procedendo-se às leituras nos comprimentos de onda 260 e 320nm.

A quantidade de DNA foi determinada pela fórmula:

$\text{DNA(quantidade)} = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) / 20 \times \text{volume (ml)}$, onde OD= densidade óptica.

Os volumes finais foram ajustados para $1\mu\text{g/ml}$ com TE.

3.5- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE mtDNA DA RAIZ E DE FOLHAS

Na extração de mtDNA, foi utilizado o método de KOLODNER & TEWARI (1972).

Soluções:

- Tampão J

1mM Tris-HCl (pH=8.0)

0.1M EGTA

0.1M Sacarose

- Tampão J+BSA

50mM Tris-HCl (pH=8.0)

2.5mM EGTA

0.44M Sacarose

0.15% BSA

5Mm 2-mercapto-etanol

- Solução fenol/clorofórmio (v/v)

- Solução 1M MgCl₂

Procedimento:

Pesaram-se 300g de raiz , já lavadas em água destilada. Colocou-se em um Becker 300ml de tampão J+BSA, previamente resfriado a 4°C, adicionando-se uma alíquota de 2-mercaptoetanol. Adicionou-se a raiz cortada em pedaços e homogeneizou-se por 30 segundos. O extrato foi filtrado em papel de filtro "Whatman 3MM", transferindo-o para tubo de centrífuga com 30ml, e centrifugou-se a 1.020g por 15 minutos a 4°C em um rotor "swinging bucket".

Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos de centrifuga e, em um rotor de ângulo fixo, centrifugou-se a 12.000g por 20 minutos a 4°C. Após desprezado o sobrenadante e os tubos vertidos sobre um papel toalha para secagem, os materiais secos foram levados ao gelo adicionando-se 5ml de tampão J para ressuspendensão do precipitado. Após homogeneizada, centrifugou-se a solução a 1.020g por 15 minutos a 0°C em um rotor “swinging bucket”.

Adicionaram-se 75 μ l de MgCl₂ a 1M para cada 25ml da solução e em seguida DNase suficiente para uma concentração final de 50 μ g/ml em cada tubo, deixando-se os tubos descansarem por 1 hora a 25°C. Centrifugou-se a 12.000g por 20 minutos a uma temperatura entre 0 e 4°C em um “swinging rotor”. Ressuspendeu-se o precipitado em 2ml de tampão de lavagem (item 3-2). Após a formação da solução, completou-se o volume do tubo com mais tampão de lavagem e tornou-se a centrifugar a 12.000g por 20 minutos com temperatura entre 0 e 4°C em um rotor “swinging bucket”. Este procedimento foi repetido três vezes. Desprezou-se o sobrenadante, deixando os tubos vertidos em papel toalha por 1 hora a 25°C.

Ressuspendeu-se o precipitado em 1ml de TE (item 3-2), transferiu-se a solução para um Erlenmeyer, acrescentando-se solução de 10% Sarcosil e uma alíquota de proteinase, somando cerca de 8% do volume contido no Erlenmeyer e aguardou-se por 1 hora sob agitação branda a 37°C.

Acrescentou-se o mesmo volume do Erlenmeyer de solução 1:1 fenol/clorofórmio (v/v) e aguardou-se por 15 minutos; transferiu-se o conteúdo do Erlenmeyer para um tubo de centrifuga e centrifugou-se a 1.020g por 15 minutos a 20°C em um rotor “swinging bucket”.

Removeu-se a fase superior formada no sobrenadante para um novo tubo de centrifuga e adicionou-se 500 μ l de TE; adicionou-se o mesmo volume de fenol/clorofórmio (v/v) e centrifugou-se a 1020g por 15 minutos a

20°C em um rotor “swinging bucket”. Fez-se a precipitação com etanol (item 3-3) e ressuspendeu-se em 3.6ml de tampão TE.

Para um volume inicial de 3.6 ml de tampão TE contendo o DNA extraído de raiz , o procedimento para a purificação do material obedeceu as seguintes etapas:

Após a precipitação com etanol (item 3-3), ressuspendeu-se o precipitado em 3.6ml de TE, sendo este volume distribuído em seis tubos de centrífuga com 6ml cada. Em condições de semi-escuro, acrescentou-se 2g de cloreto de cézio e 50 μ l de brometo de etídio (20mg/ml), o qual descansou por uma hora a 4°C. Centrifugou-se a 1.020g por 15 minutos a 20°C em um rotor “swinging bucket”. Separou-se seis tubos de centrífuga (Quick-Seal ® Bell top), para os quais transferiu-se os sobrenadantes. Os tubos foram selados e centrifugados a 900.000g por 20 horas a 20°C em um rotor de ângulo fixo.

Com a ajuda de um transiluminador e uma seringa, transferiram-se as bandas superiores formadas no sobrenadante para tubos de ensaio, desprezou-se o sobrenadante que continha brometo de etídio em um Becker que continha hipoclorito (99.0%), em igual volume.

Nos tubos de ensaio adicionou-se isopropanol/TE (50:8) e desprezou-se o sobrenadante. Após, transferiu-se a solução para membranas de diálise, que foram levadas a um Becker com 500ml de TE a 4°C, sendo esta solução trocada de hora em hora durante seis horas. A solução foi transferida para Eppendorfs onde se fez a precipitação com etanol (item 3-3) e determinou-se a quantidade de DNA conforme item 3-4, ajustando-se o volume final do DNA para 1 μ g/ml.

3.6- PREPARAÇÃO DO VETOR

A preparação do vetor foi utilizada para a ligação do gene para cob e *rrn18S* com o plasmídeo pUC 119 (Figura 10). No caso do gene para cob, o plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e para o gene *rrn18S*, pela enzima de restrição *HindIII*.

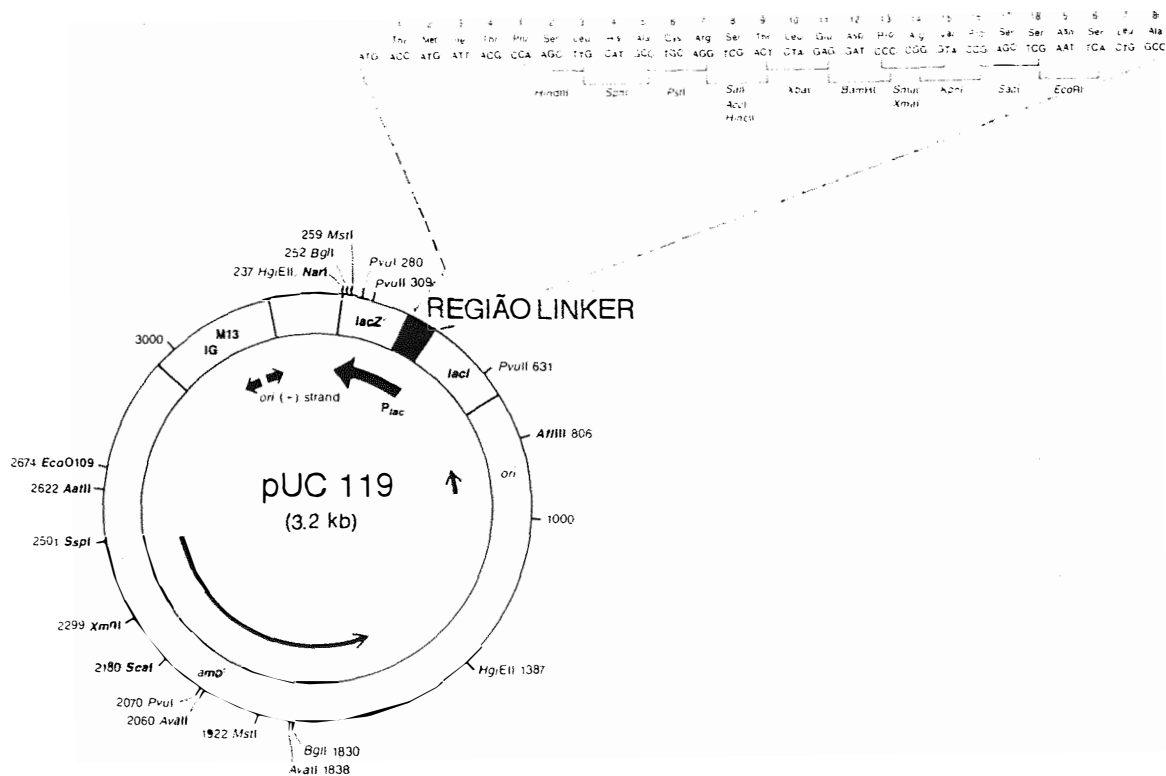


FIGURA 10. Plasmídeo pUC 119. (catalogo "New England Biolabs ®, 1992).

Soluções:

• Solução A

0.4M Sacarose

0.05M Tris-HCl

0.005M Na₂EDTA 2H₂O (pH=7.5)

0.1% BSA

5mM 2-Mercapto-etanol

• Solução B

0.3M Sacarose

0.05M Tris-HCl

1mM Na₂EDTA 2H₂O (pH=7.5)

0.05% BSA

5mM 2-Mercapto-etanol

• Tampão de Eluição

0.5M acetato de amônia

1mM Na₂EDTA

• Gel de poliacrilamida

Acrilamida 1/10 do volume total

20X TBE

10% APS

3% Temed

para volume final de 30ml

• 20X TBE (500ml)

Tris.....180g

Ácido bórico.....55g

0.5M Na₂EDTA (pH=8.0)

Completar 500ml com água bidestilada e autoclavada.

Procedimento:

O DNA mitocondrial de *B. webbiana* foi digerido com a enzima EcoRI, conforme especificado pelo fabricante, sendo os fragmentos separados em gel de poliacrilamida 4% em tampão 1XTBE a 1.60cm/Volt.

Um fragmento de 0.70Kb foi recortado do gel e levado a um Eppendorf juntamente com 1ml de tampão de eluição e deixado a 37°C por 19horas, após então, fez-se a precipitação com etanol (item 3-3) e ressuspendeu-se o precipitado em 10 μ l de TE.

O plasmídio pUC119 foi digerido com EcoRI, e 4 μ l da solução que continha os fragmentos de 0.70Kb foram adicionados a 1 μ l da solução do vetor, onde adicionou-se 20 μ l da solução A de ligação sendo homogeneizado por 5 minutos. Após então, adicionou-se o mesmo volume da solução B e levou-se ao banho Maria por 19 horas a 16°C.

Fez-se a precipitação com etanol (item 3-3) e ressuspendeu-se o precipitado em 10 μ l de TE.

3.7-TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

Soluções:

- Meio SOC

2% Bacto-triptona

0.5% Extrato de levedura

10mM NaCl

2.5mM KCl

10mM MgCl₂

10mM MgSO₄

20mM Glicose

- 2X TY (100ml)

1.6g Triptona

1.0g Extrato de levedura

0.5g NaCl

1.2g Agar

• Solução de desnaturação

0.5N NaOH

• Solução de neutralização

1.5M NaCl

0.5 M Tris (pH=7.4)

• Solução de lavagem

2X SSC

Procedimento:

Utilizando-se o aparelho de eletroporação “Gene Pulser System” (Bio-Rad), transformou-se 200 μ l de bactérias da linhagem JM 109 (*E. coli*), adicionados de 2 μ l da solução contendo o vetor com o gene a ser inserido.

Após ter sido submetida ao eletroporador, adicionou-se rapidamente às bactérias 1ml de meio SOC e homogeneizou-se.

500 μ l da solução das bactérias submetidas ao eletroporador foram transferidas para 5ml do meio 2X TY mantidos a 50°C. Este conteúdo foi transferido para placas mestras, onde adicionaram-se 100 μ l de X-Gal e 100 μ l de IPTG, ambos a 200 μ g/ml e 30 μ l de ampicilina a 25mg/ml. As plantas foram levados à estufa por 17 horas a 37°C.

As colônias transformadas foram então transferidas para placas de Petri com 5ml do meio 2X TY sob o qual foi depositada uma membrana de nylon quadriculada, e levadas à estufa por 17 horas a 37°C.

As membranas foram transferidas para papel de filtro “Whatman 3MM” saturado com solução de desnaturação por 5 minutos. Transferiu-se as membranas para papel toalha rapidamente e levou-se a outro papel “Whatman 3MM” saturado com solução de neutralização por mais 5 minutos.

Transferiu-se novamente para papel toalha e levou-se a novo papel “Whatman 3MM” saturado com solução de lavagem por 5 minutos. Retirou-se o excesso da solução em papel toalha e depositou-se as membranas em papel de filtro “Whatman 3MM” por 1 hora a 25°C.

Após então, deixou-se as membranas embaladas em papel “Whatman 3MM” sob vácuo a 80°C por 3 horas.

3.8- PRODUÇÃO DE SONDAS QUENTES DE DNA (³²P)

A metodologia utilizada para a produção das sondas de DNA foi a de RIGBY, 1977.

Solução:

- Tampão de hibridação
- 50% Formamida
5X SSC
25mM Fosfato de sódio

Procedimento:

Para se identificar quais colônias haviam sido transformadas com os fragmentos de DNA de interesse (cob e rrn18S), fez-se a hibridização das colônias com sondas marcadas com ³²P. Estas sondas foram produzidas da seguinte maneira:

Em um Eppendorf, adicionaram-se 2µl de TE, 2µl da solução com o gene a ser hibridizado (cob ou rrn18S) e 1µl de “primer” e levou-se a 100°C

por 5 minutos. A este Eppendorf adicionaram-se 55ng/ μ l de “primer” aleatórios, 1.5 μ l de ditiontreitol 20mM, 1.5 μ l de (dGTP, dATP, dTTP) a 5mM e 1.5 μ l de 10XRP. Após homogeneizado, adicionaram-se 2 μ l de água destilada, e 2.5 μ l de dCTP (fósforo radioativo), totalizando 14 μ l. Adicionou-se a este volume de 14 μ l, 1 μ l de fragmentos de Klenow, homogeneizou-se e levou-se à estufa por 3 horas a 37°C.

As membranas de nylon, ao serem retiradas da estufa (item 3-7), foram colocadas em saco plástico, onde adicionou-se 1ml de tampão de hibridação contendo 1/20 de solução “Irish Cream”. Lacrado, este foi levado à estufa por 3 horas a 42°C. Após então, adicionou-se os 15 μ l de solução que continha as sondas marcadas e levou-se a 37°C por 19 horas.

Para a visualização das bandas que revelaram as colônias transformadas pelos fragmentos que continham os genes cob ou rrn18S. procedeu-se conforme especificado no manual do Kit “ECL gene detection system RPN 2101”, Amersham versão 2.

3.9- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os DNAs total e mitocondrial (1 μ g/ml) foram digeridos com enzimas de restrição EcoRI, BamHI e HindIII (item 3-1), conforme especificado pelo fabricante. Os fragmentos foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose S a 0.8%, 1.0% e 2.0% em corridas de 1.85cm/V. Após então, corou-se com brometo de etídio 25mg/50ml e fotografou-se em transiluminador (UV 254nm)(SUGIURA & KUSUDA, 1979).

3.10- "SOUTHERN BLOT" E HIBRIDAÇÃO COM SONDAS FRIAS

Solução:

- Tampão alcalino de transferência.

50mM glucose

25mM TrisHCl (pH 8.0)

10mM EDTA (pH 8.0)

Procedimento:

Conforme descrito por SOUTHERN (1975), após fotografar o gel de eletroforese, este foi colocado em solução de desnaturação (item 3-7), por 30 minutos sob agitação branda. Foram cortados três pedaços de papel de filtro Whatman 3MM e um de membrana de nylon (BIODYNE™) do tamanho do gel. O sistema de transferência foi montado, utilizando o tampão alcalino de transferência. A transferência procedeu-se por 19 horas.

Para a hibridação, utilizou-se o kit (ECL, RPN 3004, Amersham International®) conforme instruções do fabricante.

O gene para citocromo oxidase subunidade III (coxIII) de *Oenothera* foi liberado do plasmídeo pUC 8 pela digestão com as enzimas de restrição Eco RI e Pst I, liberando um fragmento de 0.92Kb (HIESEL et alii, 1987), conforme indicado na Figura 11.

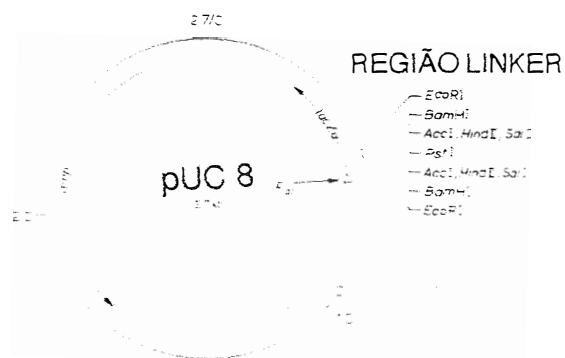
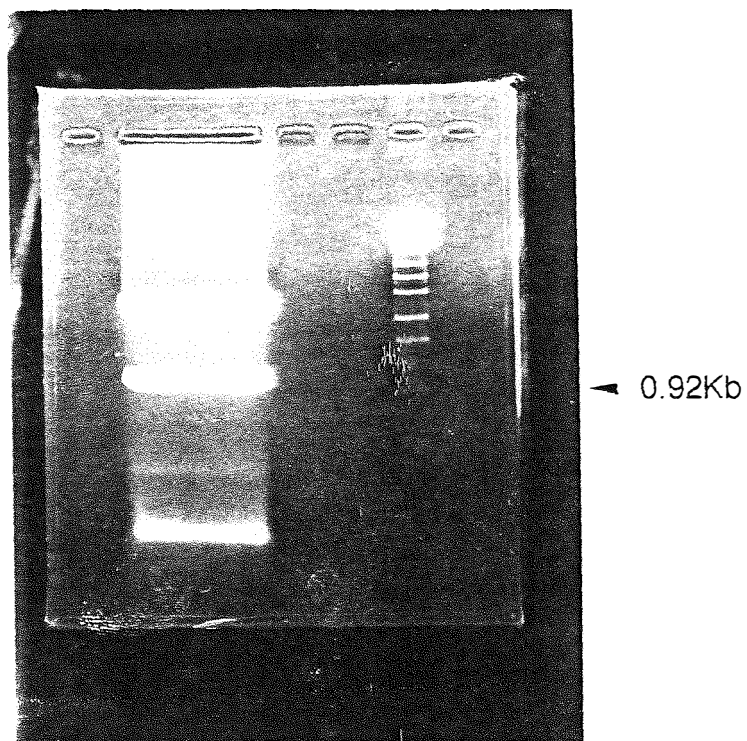


FIGURA 11- Fotografia da digestão do plasmídeo pUC8 pelas enzimas de restrição EcoRI e Pst I. Gel de agarose S 1.0%.

O gene para ATPase subunidade alfa de ervilha foi liberado do plasmídio pUC 119 pela digestão com as enzimas de restrição Eco RI e Hind III, liberando um fragmento de 1.40Kb (MORIKAMI & NAKAMURA, 1987a), conforme indicado na Figura 12.

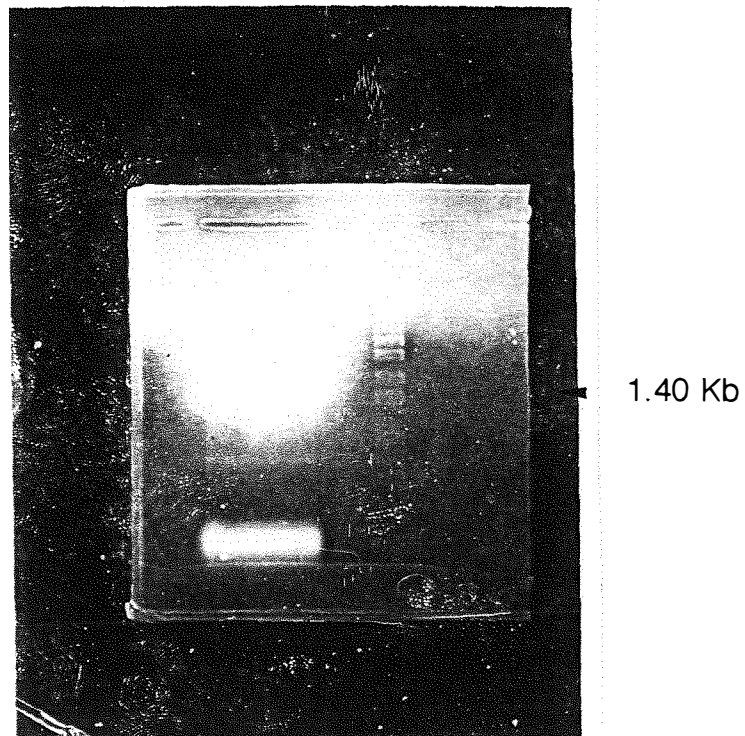


FIGURA 12- Fotografia da digestão do plasmídio pUC8 pelas enzimas de restrição EcoR I e Hind III. Gel de agarose S 1.0%.

O gene para ATPase subunidade β de *B. vulgaris* foi liberado do plasmídeo pUC 18 pela digestão com as enzimas de restrição Eco RI e Sal I, liberando um fragmento de 3.30Kb (SENDÁ, dados não publicados), conforme indicado na Figura 13.

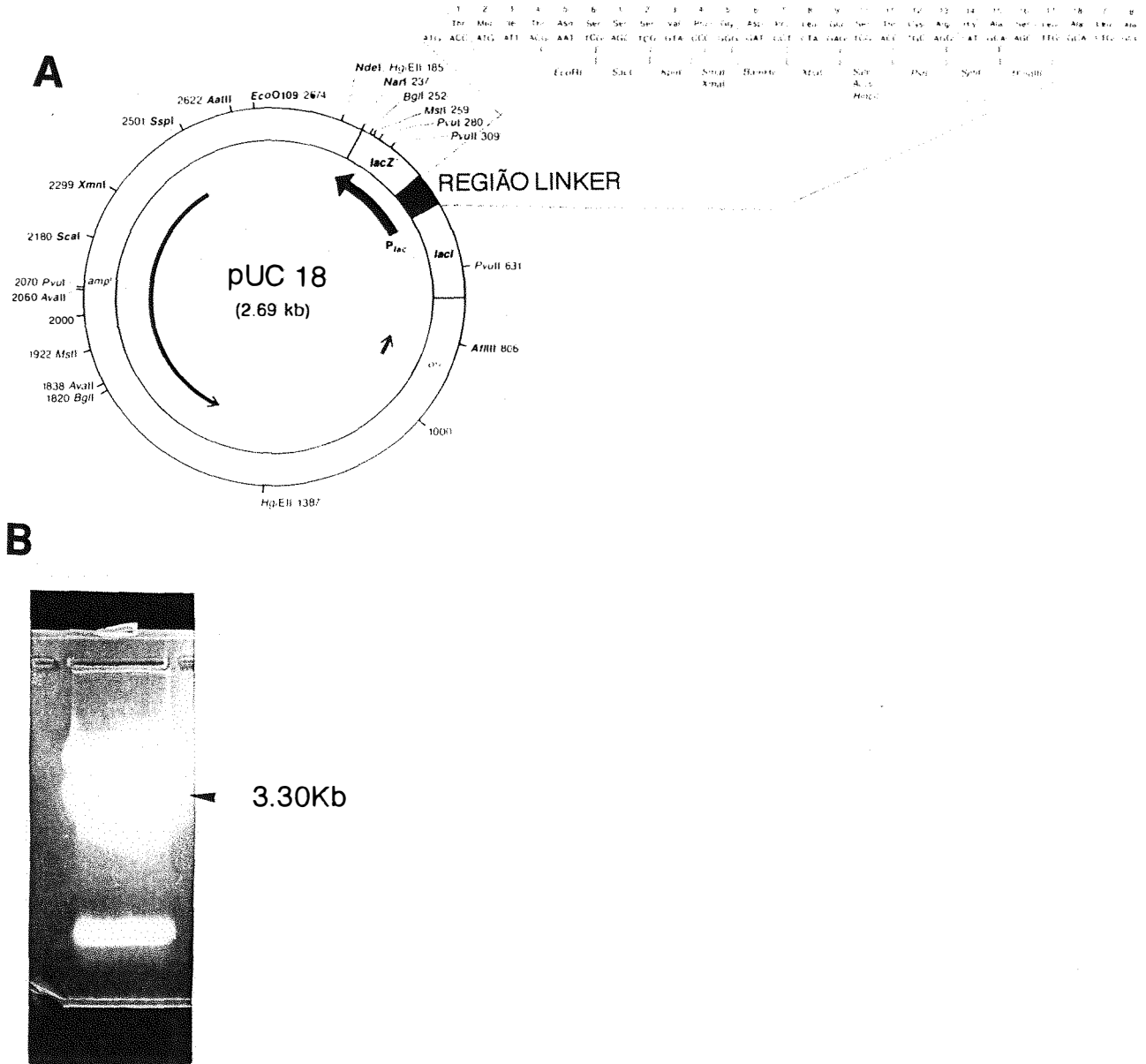


FIGURA 13- A - Detalhe do plasmídeo pUC18 e sua região "linker". B - Fotografia da digestão do plasmídeo pUC 18 pelas enzimas de restrição EcoR I e Sal I. Gel de agarose S 0.8%.

O gene para ATPase subunidade 6 de *Oenothera* foi liberado do plasmídio pUC 118 pela digestão com a enzima de restrição Sty I, liberando um fragmento de 0.66Kb (SCHUSTER & BRENNICKE, 1987), conforme indicado na Figura 14.

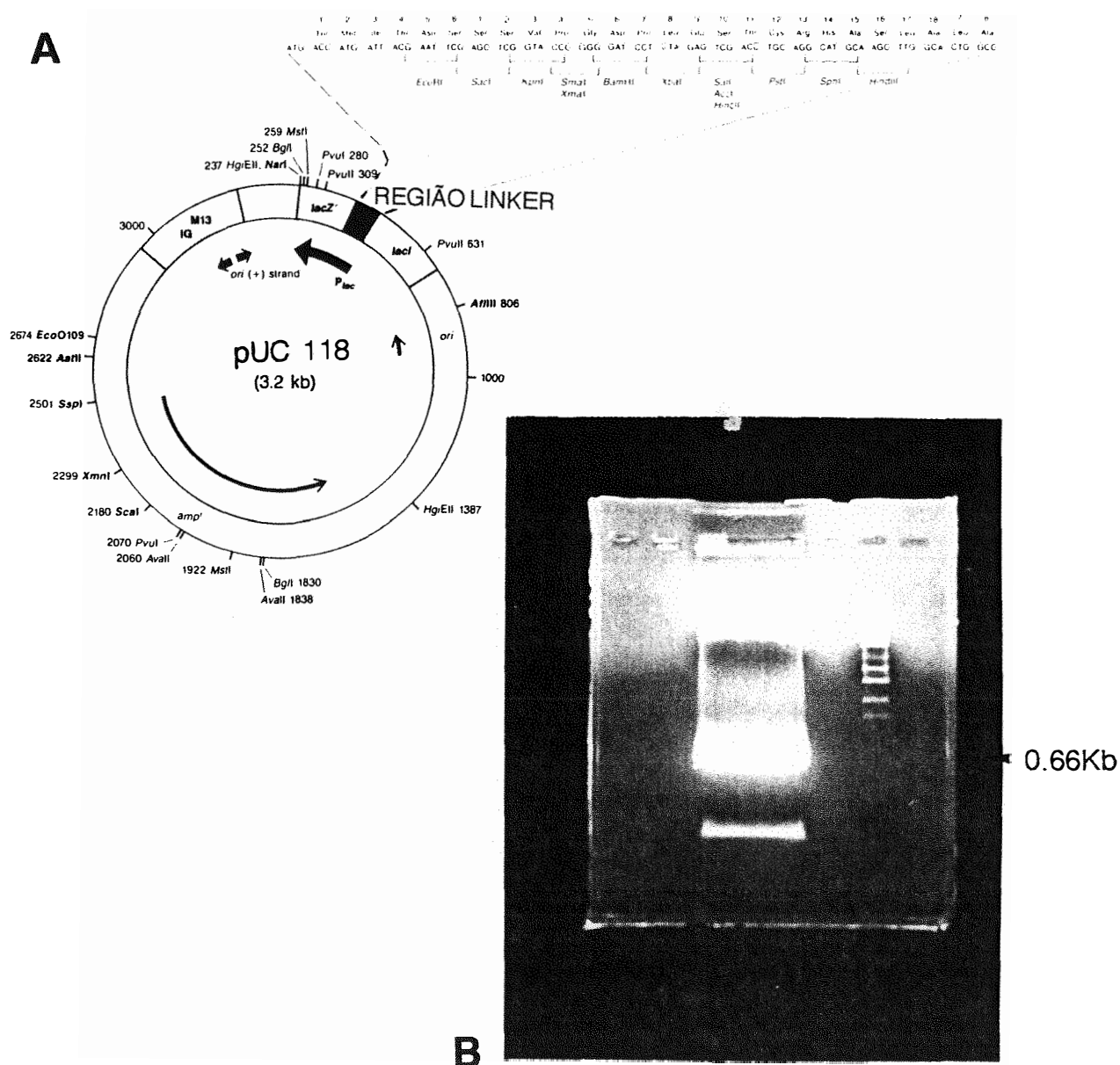


FIGURA 14- A - Detalhe do plasmídio pUC118 e sua região "linker". B - Fotografia da digestão do plasmídio pUC 118 pela enzima de restrição Sty I e de liberação do fragmento de 0.66Kb. Gel de agarose S 2.0%.

O gene para ATPase subunidade 9 de ervilha foi liberado do plasmídio pUC 118 pela digestão com as enzimas de restrição Xho I e EcoRV, liberando um fragmento de 0.65Kb (MORIKAMI & NAKAMURA, 1987b), conforme indicado na Figura 15.

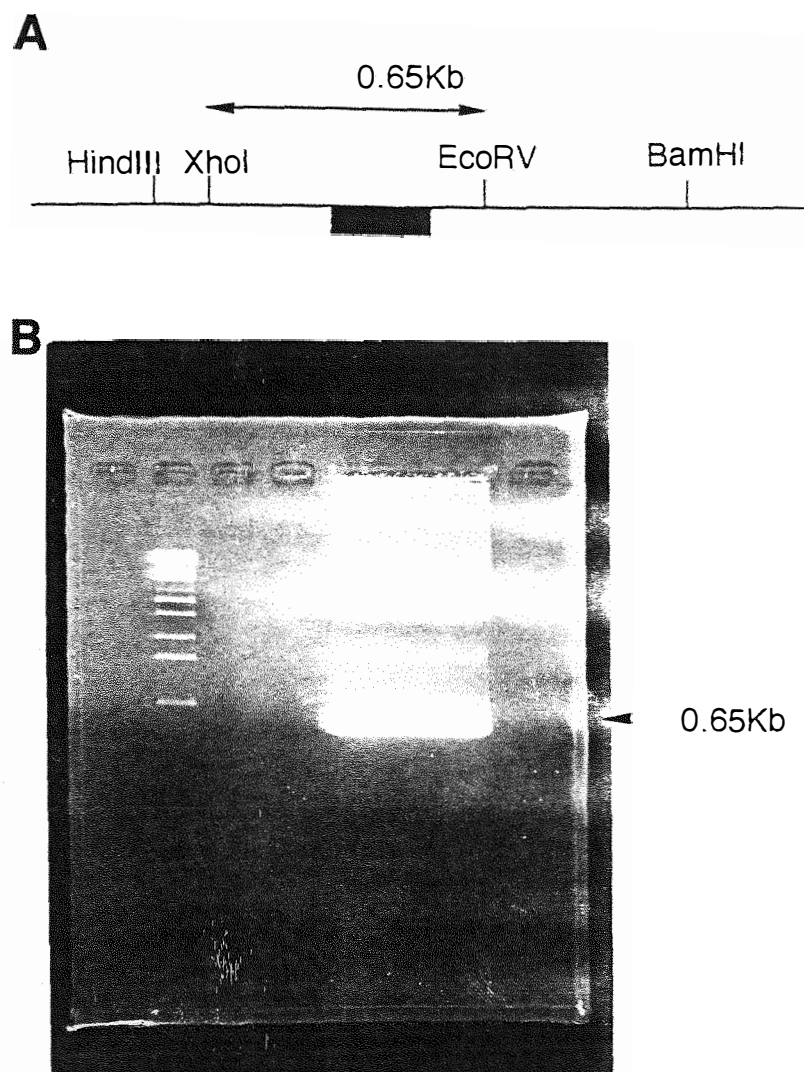


FIGURA 15- A- Detalhe da distribuição dos sítios de restrição no gene da subunidade 9 da ATPase. B- Fotografia da digestão do plasmídio pUC 118 pelas enzimas de restrição Xho I e Eco RV e liberação do fragmento de 0.65Kb. Gel de agarose S 2.0%.

O gene para apocitocromo b (cob) de *B. vulgaris* foi liberado do plasmídio pUC 118 pela digestão com a enzima de restrição Eco RI, liberando um fragmento de 0.70Kb (SENDÁ, dados não publicados), conforme indicado na Figura 16.

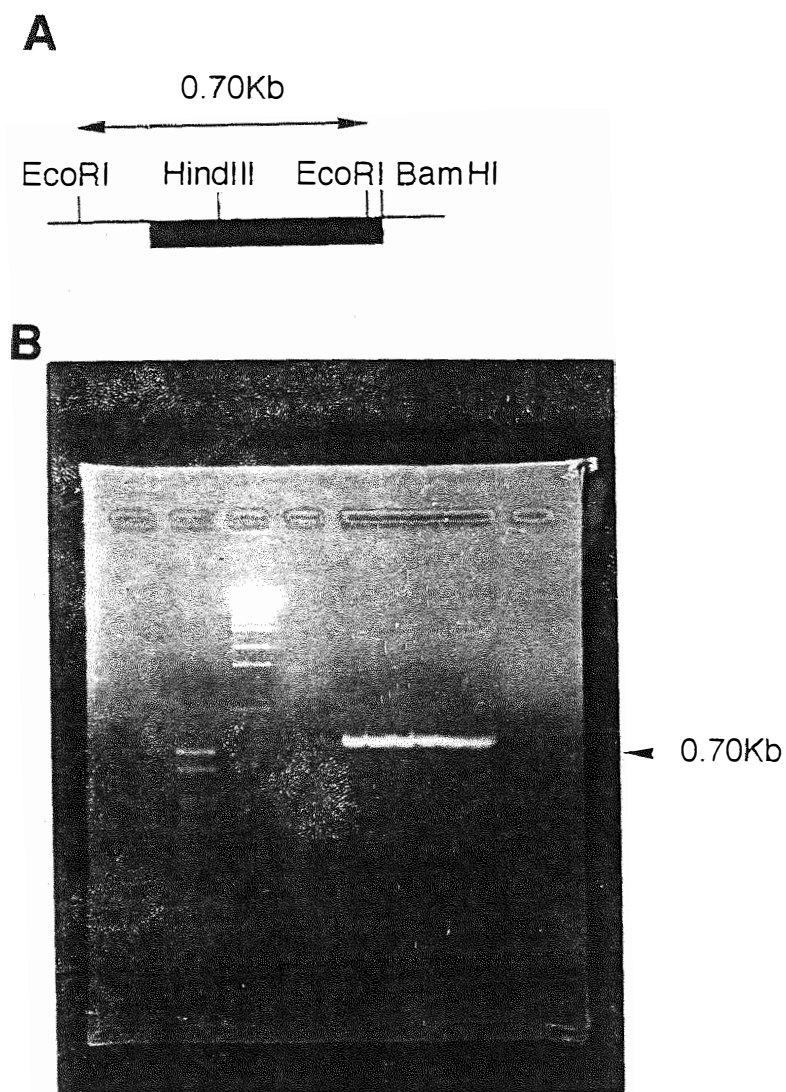


FIGURA 16- A - Detalhe da distribuição dos sítios de restrição no gene para (cob). B-Fotografia da digestão do plasmídio pUC 118 pela enzima de restrição Eco RI. Gel de agarose S 2.0%.

O gene para rrn 18S (rDNA) de *B. vulgaris* foi liberado do plasmídio pUC 118 pela digestão com a enzima de restrição Xho I e EcoRI, liberando um fragmento de 1.20Kb (SENDA, dados não publicados), conforme indicado na Figura 17.

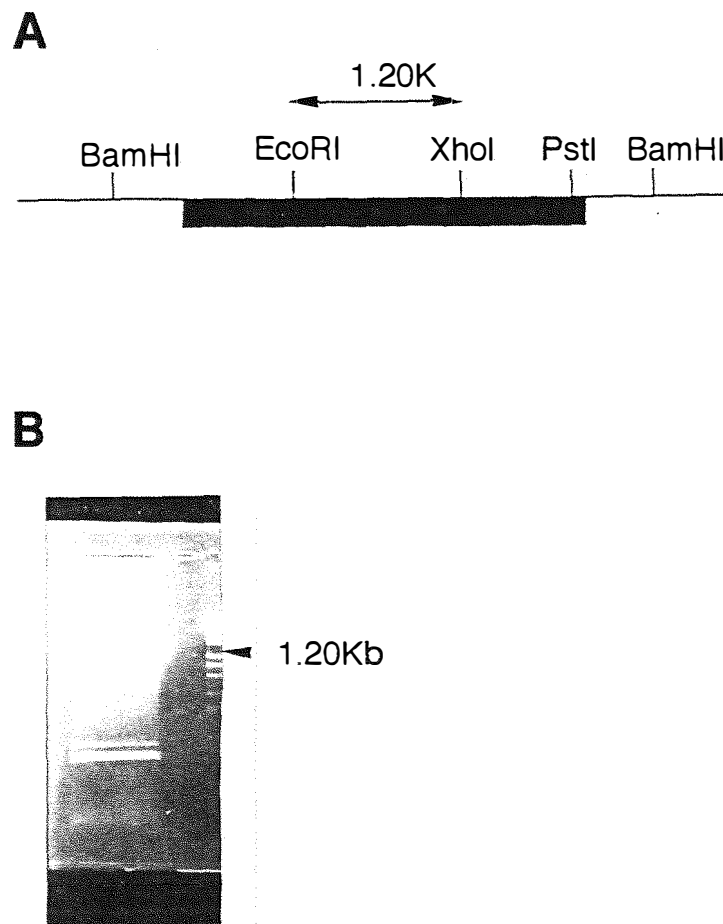


FIGURA 17- A - Detalhe da distribuição dos sítios de restrição no gene para rrn 18S. B - Fotografia da digestão do plasmídio pUC 118 pela enzima de restrição Xho I e EcoRI. Gel de agarose S 1.0%.

3.11- PRODUÇÃO DO “SIZE MARKER”

Em todas as corridas de eletroforese, foi utilizado o DNA do vírus lâmbda, sendo digerido pela enzima de restrição Sty I.

Solução:

- Tampão K
- 50mM Tris-HCl
20mM EDTA
5mM 2-mercapto-etanol
0.2M NaCl
0.25M NaCl

Procedimento:

Em um Eppendorf de 1ml de volume, adicionaram-se 43 μ l de água bidestilada, deionizada e autoclavada, e 5 μ l de tampão K previamente homogeneizado onde então adicionou-se 1 μ l do DNA do vírus em solução de 10 DO (densidade optica), que representam 50 μ g/ μ l e 1 μ l da enzima Sty I. Após homogeneizado, foi levado ao banho Maria a 37°C por 19 horas, e fez-se em seguida a precipitação com etanol (item 3-3), sendo o volume final ajustado para 200ng/ml. A Figura 18 apresenta o padrão obtido pela enzima Sty I.

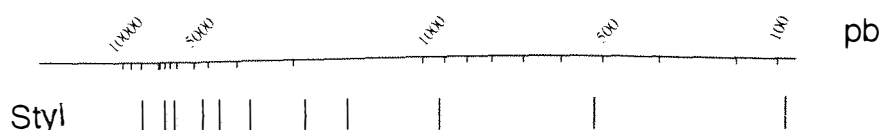


FIGURA 18- Padrão de digestão do DNA do vírus lâmbda por Sty I.

No caso específico do gene para cob, foi utilizado o plasmídeo pBR322 digerido por Hpa II como indicado na Figura 19.

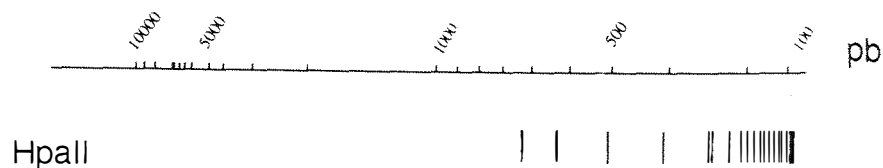


FIGURA 19- Padrão de digestão do plasmídeo pBR322 por HpaII.

As enzimas de restrição EcoRI, EcoRV, HindIII, BamHI, BglI, StyI e HpaII (em 10 unidades/ μ l), e XbaI, PstI e XhoI (em 12 unidades/ μ l) foram utilizadas conforme instruções do fabricante "Takara® Biomedicals".

3.12- ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES

A análise de similaridade foi conduzida no programa de computador "Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System" (NTSYS-pc) versão 1.70, com a utilização dos coeficientes de Jaccard e Dice, onde cada linhagem ou espécie de beterraba açucareira (Tipo ou Táxon) foi denominada Unidade Taxonômica Operacional (OTU). Os dendrogramas foram construídos através da análise de agrupamento pelo Método não Ponderado de Agrupamento Baseado nas Médias Aritiméticas (UPGMA) (Unweighted pair-group method using an arithmetic average) (NEI, 1978).

Procedimento:

Uma vez obtidos os padrões de bandas revelados por hibridação com as sondas de DNA, foram construídas as Tabelas 1 a 6, onde são apresentados os tamanhos dos fragmentos em Kb (kilo bases) obtidos para cada uma das enzimas de restrição, Eco RI, Bam HI e Hind III, discriminando-se os dados de mtDNA e DNA total.

Para a análise no programa de computador NTSYS, foram construídas matrizes (não apresentadas) com os dados qualitativos (tamanho dos fragmentos em Kb), atribuindo-se valor igual a um, para presença da banda e valor zero, para ausência da mesma. A partir destas foram construídas as Tabelas 7 a 24, utilizando-se os coeficientes de Jaccard e Dice. Os coeficientes podem ser facilmente visualizados conforme análise do Quadro 4.

| | | A | |
|---|----------|----------|----------|
| | | Presença | Ausência |
| B | Presença | a | b |
| | Ausência | c | d |

QUADRO 4- **a** representa a coincidência positiva em ambas as amostras **A** e **B**, **b** indica presença da banda em **B** e ausência em **A**, **c** indica presença da banda em **A** e ausência em **B** e **d** ausência em ambas (BUSSAB et al., 1990).

Os dendrogramas foram construídos com os dados das Tabelas 7 a 24, através da opção "SAHM clustering".

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Tanto o coeficiente de Jaccard como o de Dice (este último sendo coincidente ao coeficiente de Sorenson) não considera a coincidência negativa, representada por d no Quadro 4, sendo portanto enquadrados nos Coeficientes de Concordâncias Positivas, derivados do conceito de Distância euclídeana média. Desta forma, para valores baixos próximos de zero, tem-se uma distância maior entre os materiais analisados e para valores próximos de um, maior similaridade. São portanto, coeficientes de similaridade. A aplicação do coeficiente de posição de correlação de Spearman (Spearman's Coefficient of Rank Correlation) entre os coeficientes de Jaccard e Dice revelou correlação máxima (=1), sendo que a diferença entre ambos está nos valores de similaridade nas Tabelas 7 a 24, onde o coeficiente de Dice apresenta valores sempre maiores. Isto ocorre pelo fato deste coeficiente ponderar o dobro do valor para a , no Quadro 4 (BUSSAB et al, 1990).

A análise de agrupamento foi realizada pelo método de UPGMA (item 3-12), do qual resultaram os dendrogramas das Figuras 20 a 37.

Numa primeira análise dos dendrogramas, pode-se observar que as plantas da seção *Patellares* apresentam maior autapomorfia (item 2-5) em relação às plantas pertencentes a outras seções. Deste modo, as espécies *B. webbiana* (F) e *B. patellaris* (G) permanecem sempre agrupadas e isoladas das outras plantas com um valor de similaridade mínimo igual a 0.2500 (Tabela 9) e máximo de

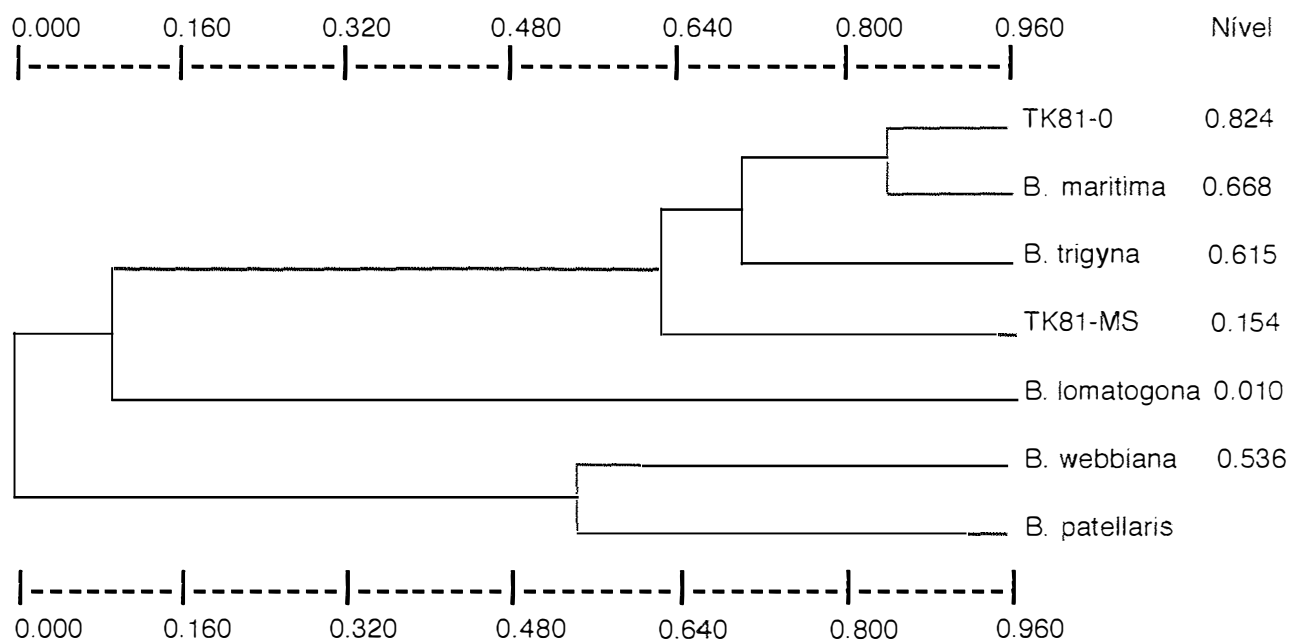


FIGURA 20- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA/Eco RI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.6666 | - | | | | | |
| C | 0.8235 | 0.6363 | - | | | | |
| D | 0.1250 | 0.1081 | 0.1562 | - | | | |
| E | 0.6000 | 0.5416 | 0.7368 | 0.2258 | - | | |
| F | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0476 | 0.0256 | - | |
| G | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0250 | 0.0000 | 0.5357 | - |

TABELA 7- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Jaccard para os dados de mtDNA/EcoRI.

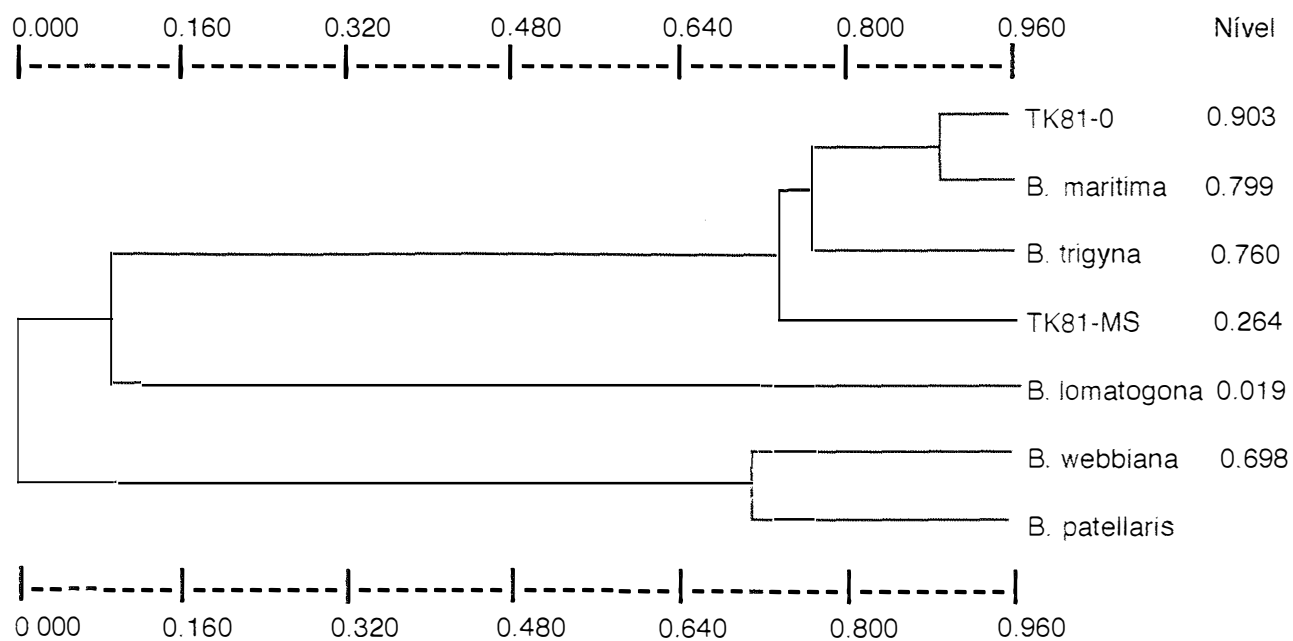


FIGURA 21- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mtDNA/Eco RI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.8000 | - | | | | | |
| C | 0.9032 | 0.7777 | - | | | | |
| D | 0.2222 | 0.1951 | 0.2702 | - | | | |
| E | 0.7500 | 0.7027 | 0.8484 | 0.3684 | - | | |
| F | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0909 | 0.0500 | - | |
| G | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0487 | 0.0000 | 0.6976 | - |

TABELA 8- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Dice para os dados de mtDNA/ EcoRI.

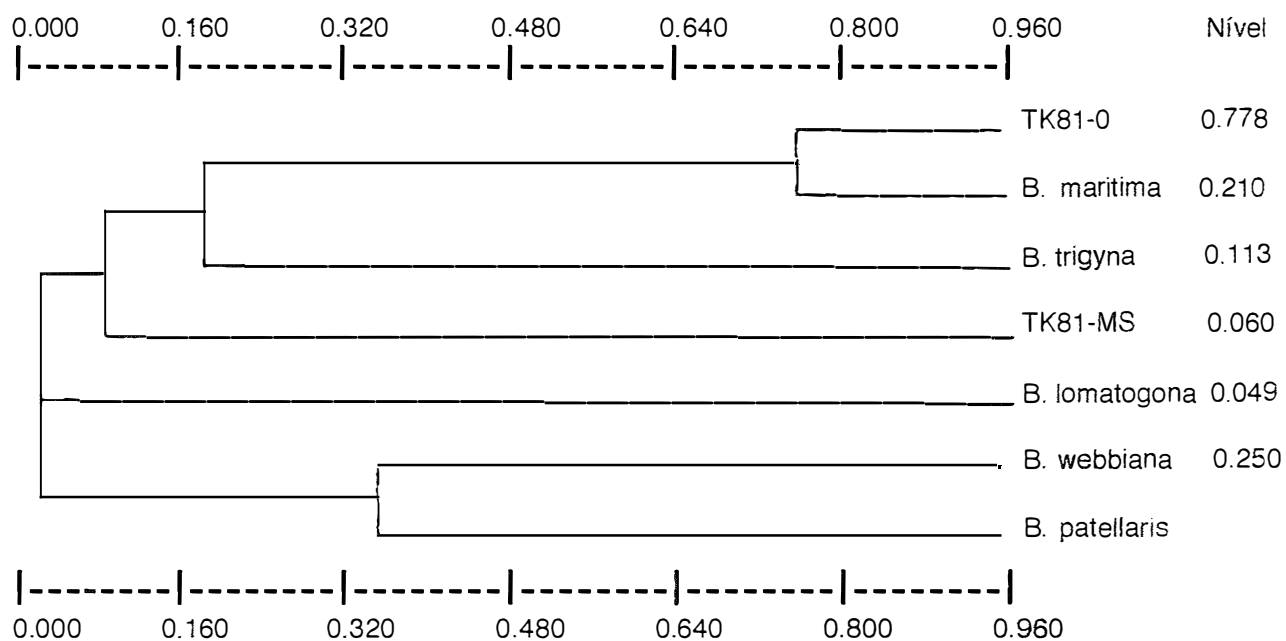


FIGURA 22- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA/Bam HI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.1379 | - | | | | | |
| C | 0.7777 | 0.1000 | - | | | | |
| D | 0.0400 | 0.0238 | 0.0833 | - | | | |
| E | 0.1818 | 0.1025 | 0.2380 | 0.0833 | - | | |
| F | 0.7142 | 0.0322 | 0.0714 | 0.0416 | 0.0416 | - | |
| G | 0.0500 | 0.0270 | 0.0500 | 0.0689 | 0.3333 | 0.2500 | - |

TABELA 9- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Jaccard para os dados de mtDNA/ Bam HI.

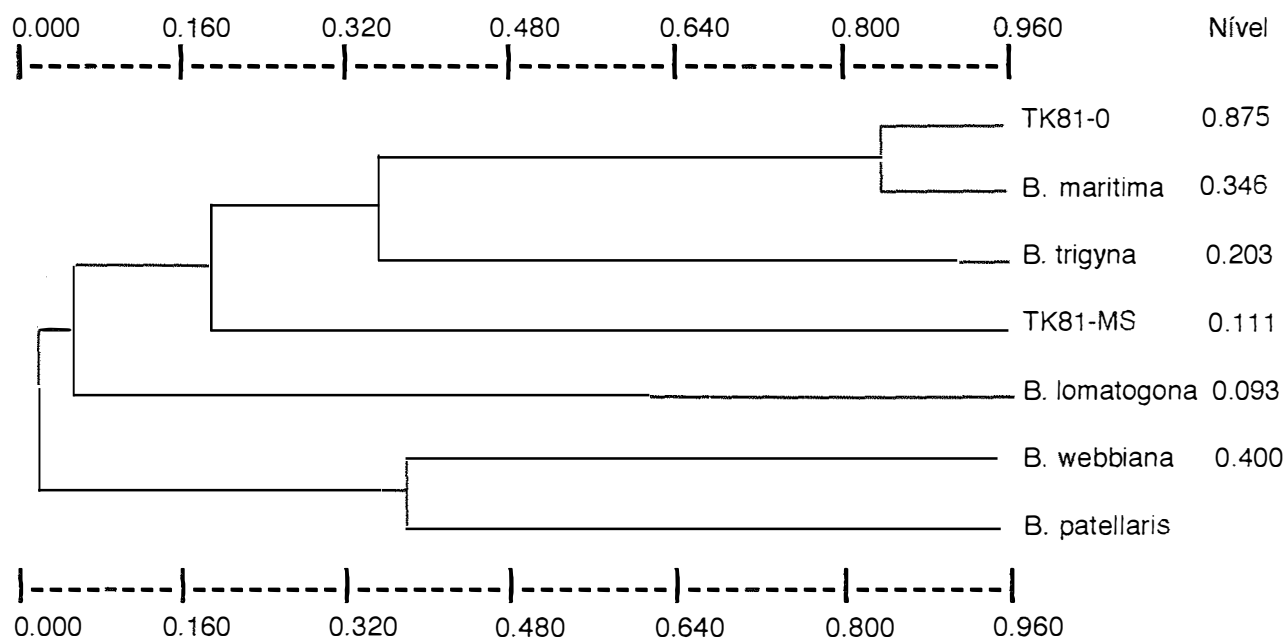


FIGURA 23- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mtDNA/Bam HI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.2424 | - | | | | | |
| C | 0.8750 | 0.1818 | - | | | | |
| D | 0.0769 | 0.0465 | 0.1538 | - | | | |
| E | 0.3076 | 0.1860 | 0.3846 | 0.1666 | - | | |
| F | 0.1333 | 0.0625 | 0.1333 | 0.0800 | 0.0800 | - | |
| G | 0.9523 | 0.0526 | 0.0952 | 0.1290 | 0.0645 | 0.4000 | - |

TABELA 10- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Dice para os dados de mtDNA/ Bam HI.

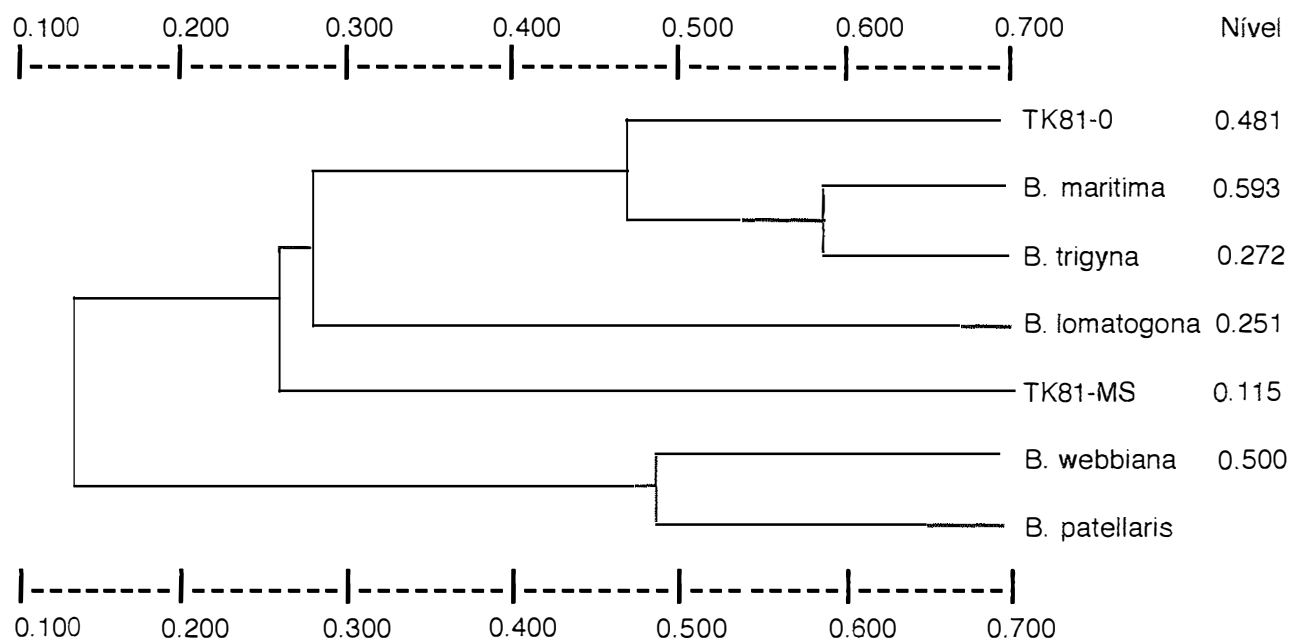


FIGURA 24- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA/Hind III.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.2727 | - | | | | | |
| C | 0.5294 | 0.2432 | - | | | | |
| D | 0.3023 | 0.2195 | 0.2777 | - | | | |
| E | 0.4324 | 0.2702 | 0.5925 | 0.2368 | - | | |
| F | 0.1555 | 0.0454 | 0.2000 | 0.0952 | 0.1621 | - | |
| G | 0.9433 | 0.0833 | 0.1162 | 0.0833 | 0.1136 | 0.5000 | - |

TABELA 11- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Jaccard para os dados de mtDNA/ Hind III.

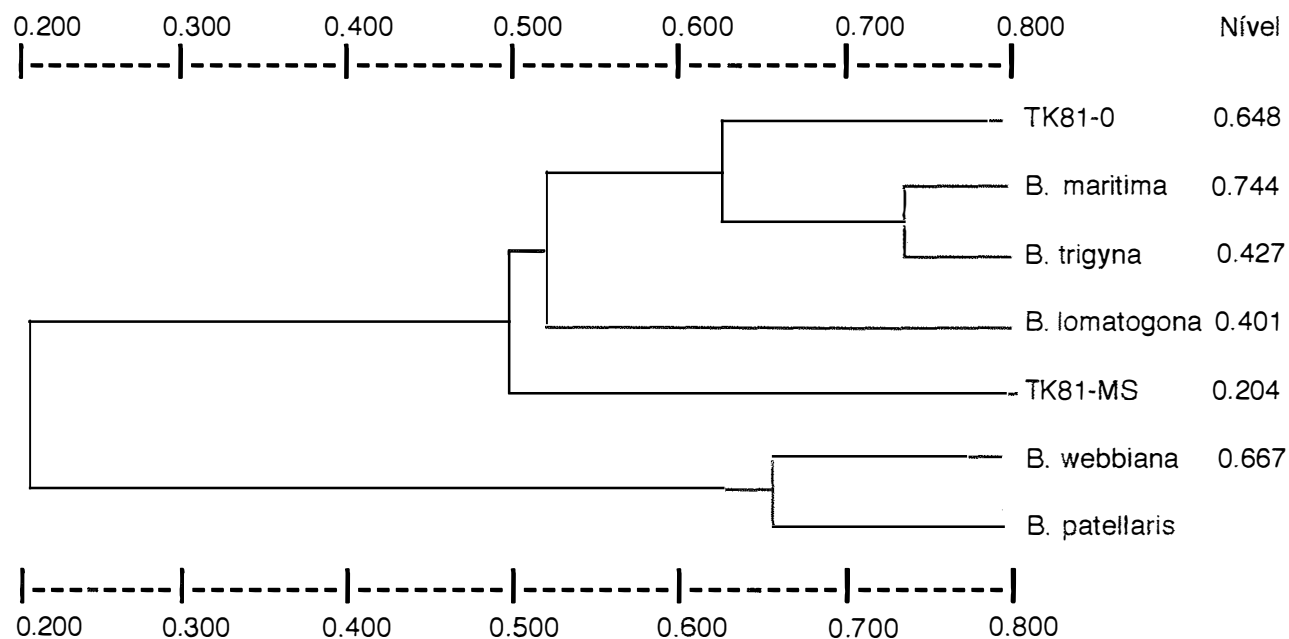


FIGURA 25- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mtDNA/Hind III.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.4285 | - | | | | | |
| C | 0.6923 | 0.3913 | - | | | | |
| D | 0.4642 | 0.3600 | 0.4347 | - | | | |
| E | 0.6037 | 0.4255 | 0.7441 | 0.3829 | - | | |
| F | 0.2692 | 0.0869 | 0.3333 | 0.1739 | 0.2790 | - | |
| G | 0.1724 | 0.1538 | 0.2083 | 0.1538 | 0.2040 | 0.6666 | - |

TABELA 12- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Dice para os dados de mtDNA/ Hind III.

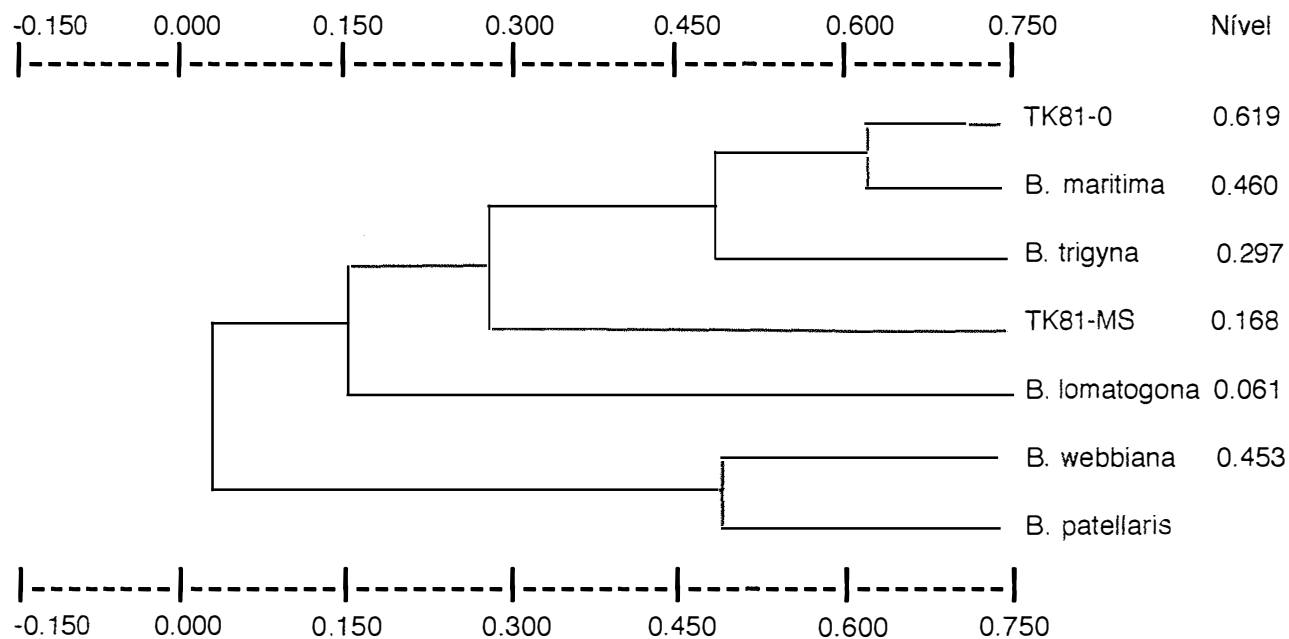


FIGURA 26- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.3195 | - | | | | | |
| C | 0.6190 | 0.2967 | - | | | | |
| D | 0.1881 | 0.1147 | 0.1827 | - | | | |
| E | 0.3902 | 0.2745 | 0.5294 | 0.1844 | - | | |
| F | 0.0816 | 0.0252 | 0.0909 | 0.0654 | 0.0800 | - | |
| G | 0.0550 | 0.0396 | 0.0606 | 0.0603 | 0.0540 | 0.4533 | - |

TABELA 13- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Jaccard para todos os dados de mtDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.

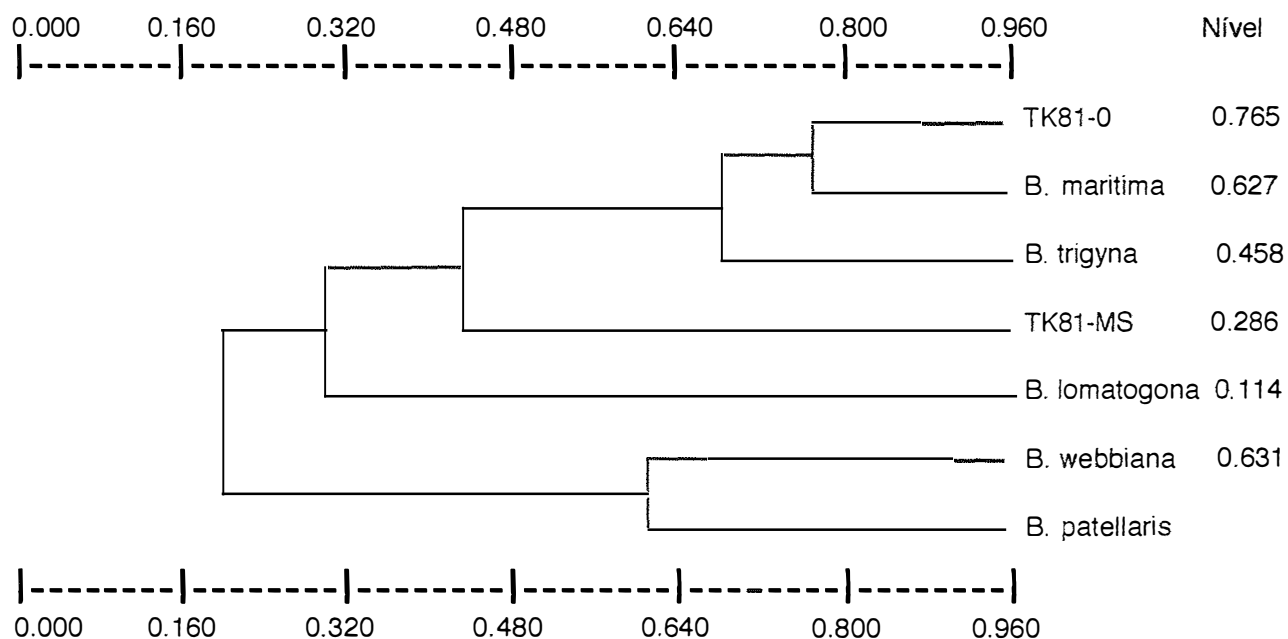


FIGURA 27- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mtDNA/Eco RI, Hind III e Bam III.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.4843 | - | | | | | |
| C | 0.7647 | 0.4576 | - | | | | |
| D | 0.3166 | 0.2058 | 0.3090 | - | | | |
| E | 0.5614 | 0.4307 | 0.6923 | 0.3114 | - | | |
| F | 0.1495 | 0.0487 | 0.1649 | 0.1217 | 0.1467 | - | |
| G | 0.1034 | 0.0757 | 0.1132 | 0.1129 | 0.1016 | 0.6306 | - |

TABELA 14- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Dice para todos os dados de mtDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.

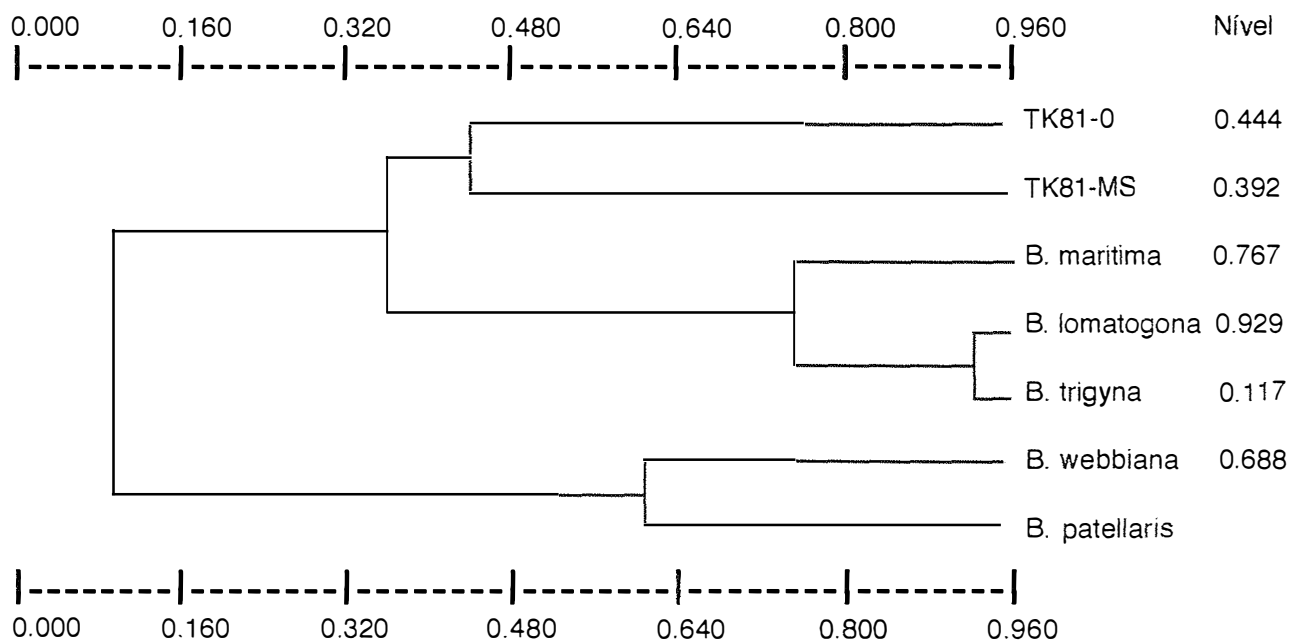


FIGURA 28- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de tDNA/Eco RI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.2608 | - | | | | | |
| C | 0.2000 | 0.1363 | - | | | | |
| D | 0.4000 | 0.1153 | 0.4117 | - | | | |
| E | 0.2500 | 0.1304 | 0.4000 | 0.3888 | - | | |
| F | 0.1666 | 0.1600 | 0.4117 | 0.2727 | 0.3157 | - | |
| G | 0.2272 | 0.2173 | 0.4375 | 0.2857 | 0.3333 | 0.5882 | - |

TABELA 15- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Jaccard para os dados de tDNA/ Bam HI.

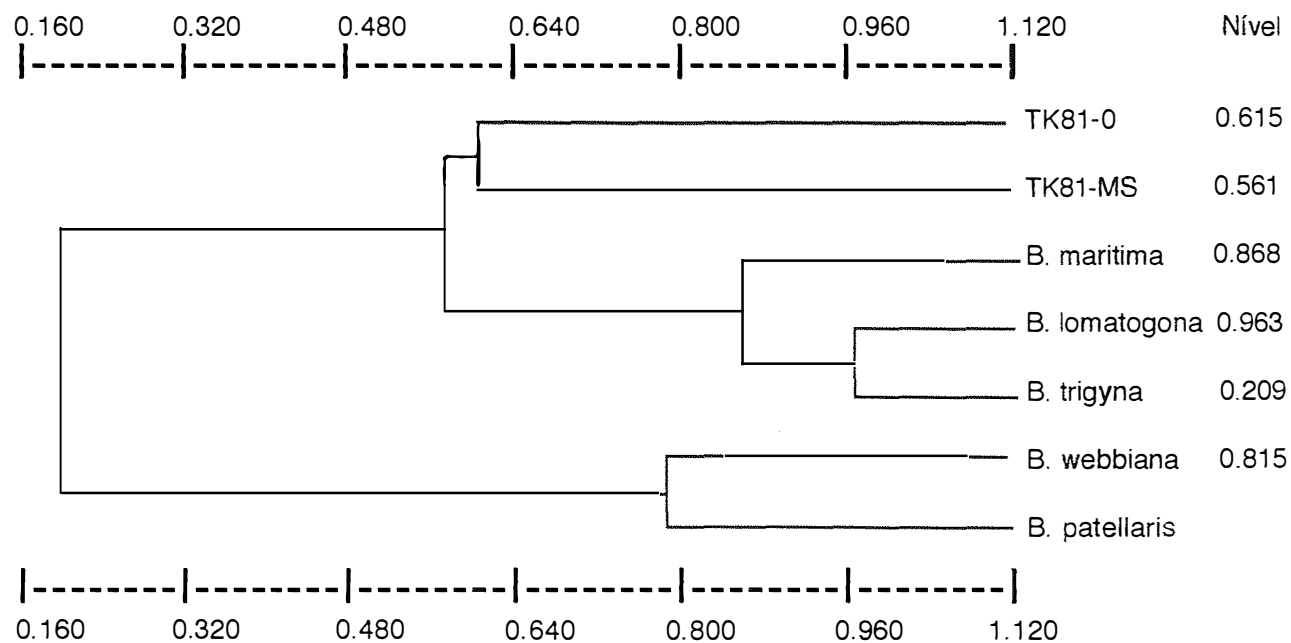


FIGURA 29- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de tDNA/Eco RI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.6153 | - | | | | | |
| C | 0.6666 | 0.5714 | - | | | | |
| D | 0.5600 | 0.4827 | 0.8888 | - | | | |
| E | 0.5833 | 0.5000 | 0.8461 | 0.9629 | - | | |
| F | 0.1538 | 0.2666 | 0.2142 | 0.2068 | 0.2142 | - | |
| G | 0.1739 | 0.1481 | 0.2400 | 0.2307 | 0.2400 | 0.8148 | - |

TABELA 16- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Dice para os dados de tDNA/ EcoRI.

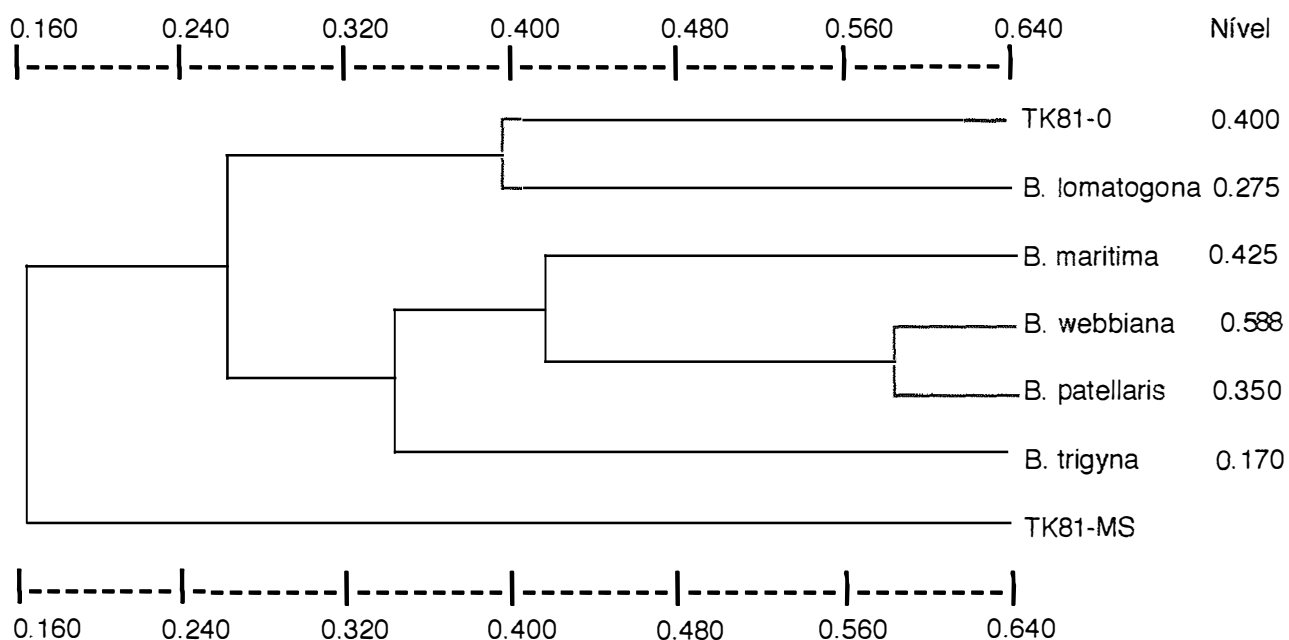


FIGURA 30- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de tDNA/Bam HI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.2608 | - | | | | | |
| C | 0.2000 | 0.1363 | - | | | | |
| D | 0.4000 | 0.1153 | 0.4117 | - | | | |
| E | 0.2500 | 0.1304 | 0.4000 | 0.3888 | - | | |
| F | 0.1666 | 0.1600 | 0.4117 | 0.2727 | 0.3157 | - | |
| G | 0.2272 | 0.2173 | 0.4375 | 0.2857 | 0.3333 | 0.5882 | - |

TABELA 17- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Jaccard para os dados de tDNA/ Bam HI.

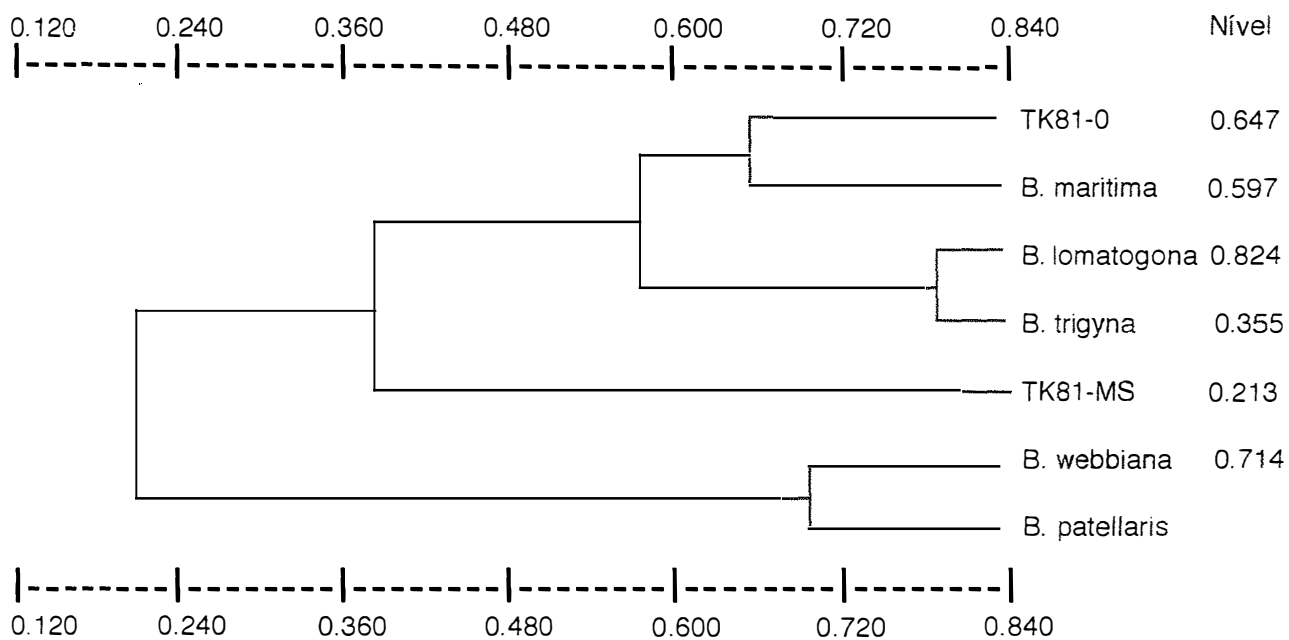


FIGURA 32- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de tDNA/Hind III.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.3636 | - | | | | | |
| C | 0.6470 | 0.4000 | - | | | | |
| D | 0.5500 | 0.2916 | 0.6111 | - | | | |
| E | 0.5789 | 0.3636 | 0.6470 | 0.8235 | - | | |
| F | 0.2272 | 0.1739 | 0.2500 | 0.2173 | 0.2272 | - | |
| G | 0.2272 | 0.1739 | 0.1947 | 0.2173 | 0.2272 | 0.7142 | - |

TABELA 19- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Jaccard para os dados de tDNA/ Hind III.

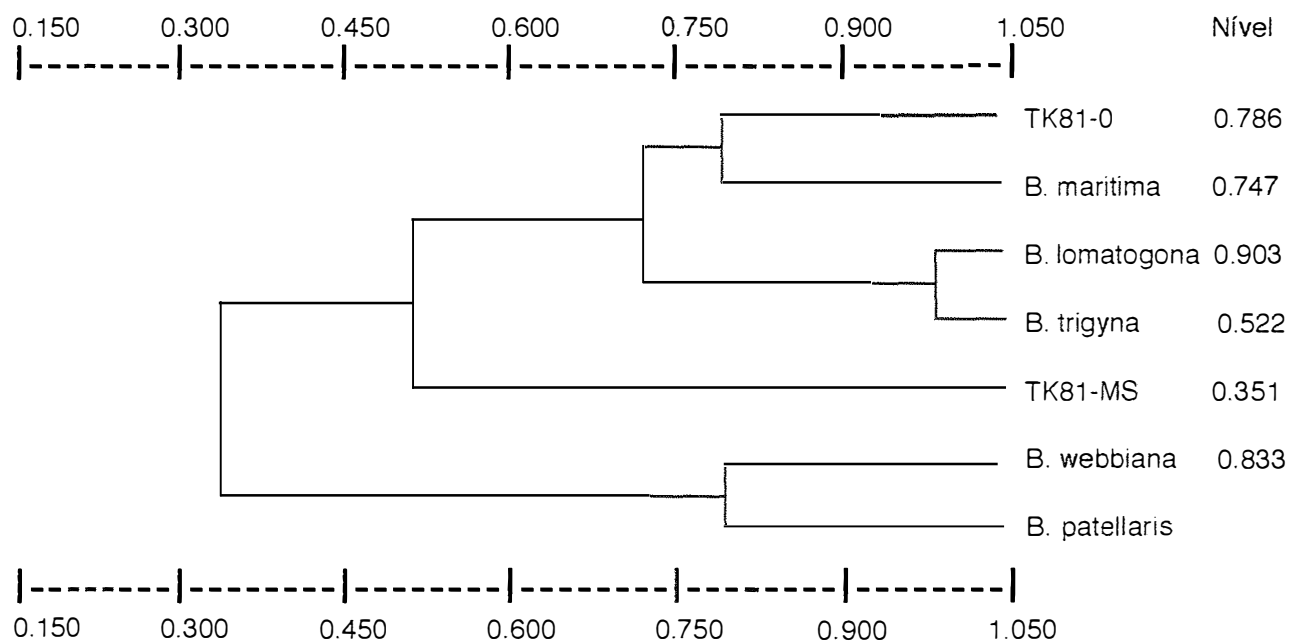


FIGURA 33- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de tDNA/Hind III.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.5333 | - | | | | | |
| C | 0.7857 | 0.5714 | - | | | | |
| D | 0.7096 | 0.4516 | 0.7586 | - | | | |
| E | 0.7333 | 0.5333 | 0.7857 | 0.9032 | - | | |
| F | 0.3703 | 0.2962 | 0.4000 | 0.3571 | 0.3703 | - | |
| G | 0.3703 | 0.2962 | 0.3200 | 0.3571 | 0.3703 | 0.8333 | - |

TABELA 20- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Dice para os dados de tDNA/ Hind III.

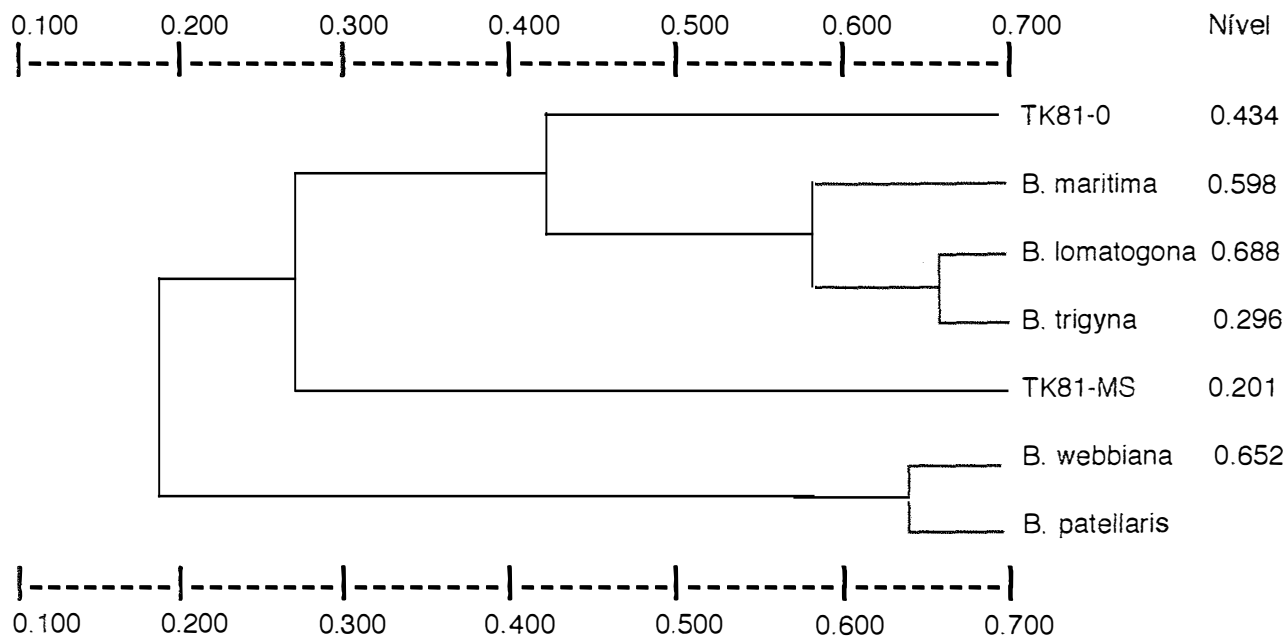


FIGURA 34- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de tDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.3593 | - | | | | | |
| C | 0.4444 | 0.3174 | - | | | | |
| D | 0.4482 | 0.2361 | 0.6000 | - | | | |
| E | 0.4107 | 0.2727 | 0.5957 | 0.6875 | - | | |
| F | 0.1571 | 0.1621 | 0.2419 | 0.2028 | 0.2187 | - | |
| G | 0.1846 | 0.1549 | 0.2372 | 0.2153 | 0.2333 | 0.6521 | - |

TABELA 21- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Jaccard para todos os dados de tDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.

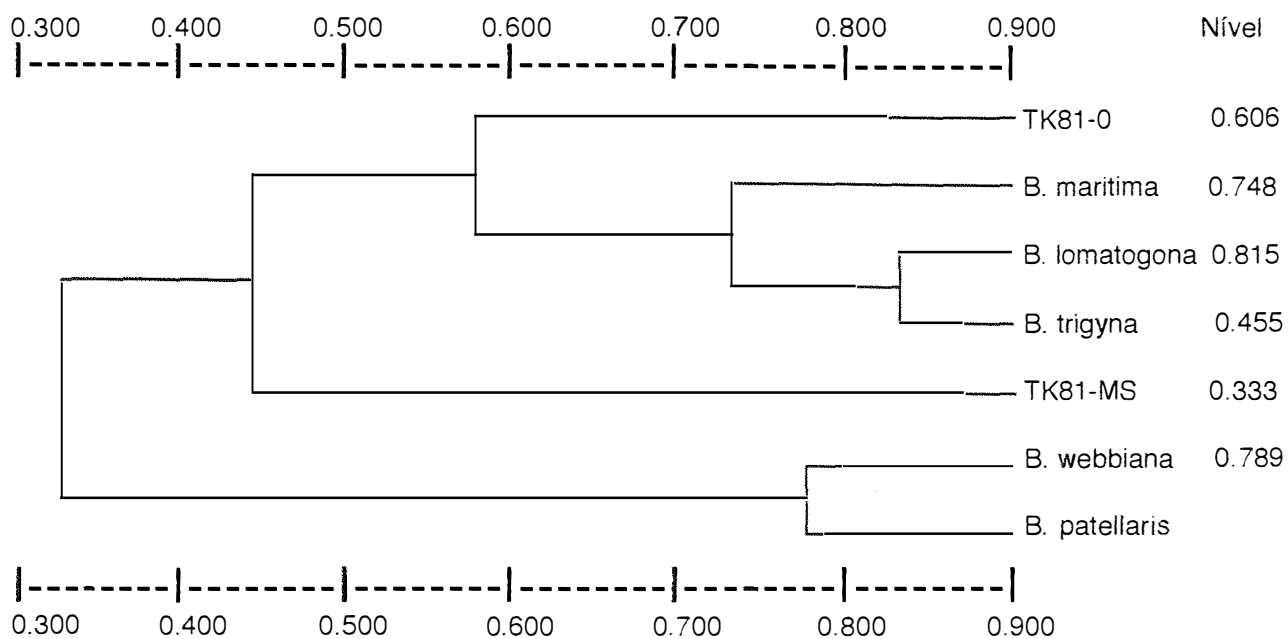


FIGURA 35- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de tDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.5287 | - | | | | | |
| C | 0.6153 | 0.4819 | - | | | | |
| D | 0.6190 | 0.3820 | 0.7500 | - | | | |
| E | 0.5822 | 0.4285 | 0.7466 | 0.8148 | - | | |
| F | 0.2716 | 0.2790 | 0.3896 | 0.3373 | 0.3589 | - | |
| G | 0.3116 | 0.2682 | 0.3835 | 0.3544 | 0.3783 | 0.7894 | - |

TABELA 22- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Dice para os dados de tDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.

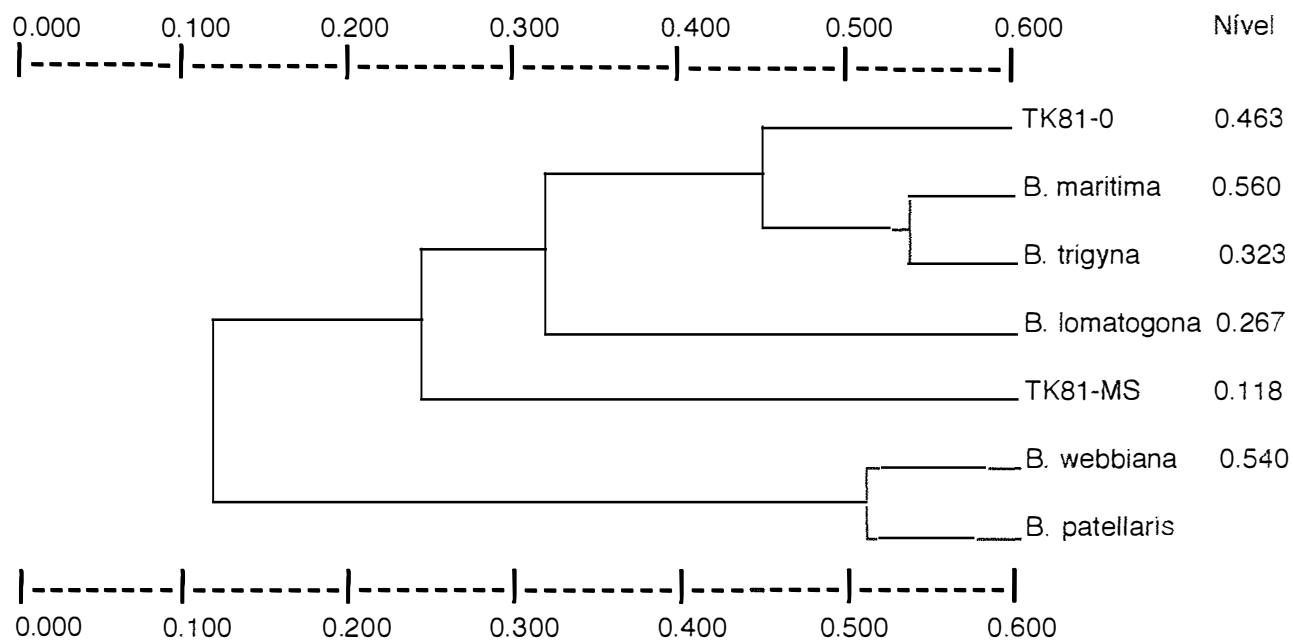


FIGURA 36- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Jaccard com os dados de mtDNA e tDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.3333 | - | | | | | |
| C | 0.5294 | 0.2993 | - | | | | |
| D | 0.2839 | 0.1616 | 0.3333 | - | | | |
| E | 0.3971 | 0.2732 | 0.5603 | 0.3529 | - | | |
| F | 0.1162 | 0.0808 | 0.1578 | 0.1222 | 0.1369 | - | |
| G | 0.1067 | 0.0841 | 0.1312 | 0.1189 | 0.1200 | 0.5403 | - |

TABELA 23- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Jaccard para os dados de mtDNA e tDNA/ Eco RI, Hind III e Bam HI.

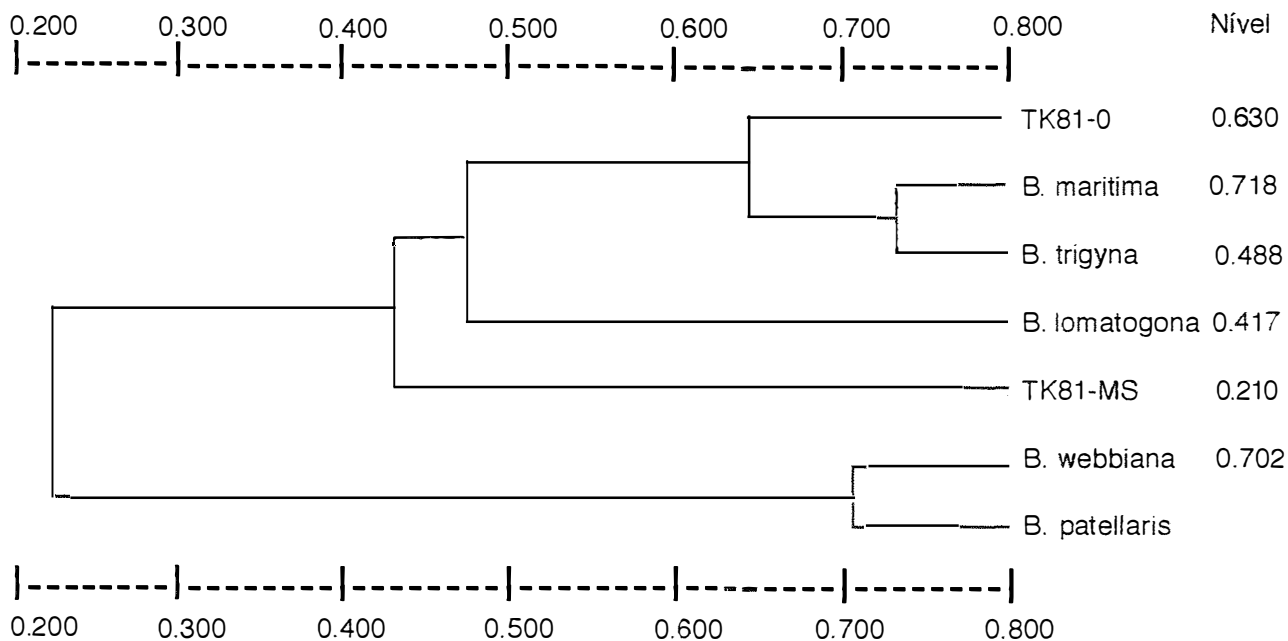


FIGURA 37- Dendrograma construído pelo método de UPGMA e coeficiente de Dice com os dados de mt DNA e tDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.

| OTUs | A | B | C | D | E | F | G |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| A | - | | | | | | |
| B | 0.5000 | - | | | | | |
| C | 0.6923 | 0.4607 | - | | | | |
| D | 0.4423 | 0.2782 | 0.5000 | - | | | |
| E | 0.5685 | 0.4292 | 0.7182 | 0.5217 | - | | |
| F | 0.2083 | 0.1495 | 0.2727 | 0.2178 | 0.2408 | - | |
| G | 0.1928 | 0.1552 | 0.2320 | 0.2125 | 0.2142 | 0.7015 | - |

TABELA 24- Valores de similaridade obtidos pelo coeficiente de Dice para os dados de mtDNA e tDNA/Eco RI, Hind III e Bam HI.

0.5357 (Tabela 7), referentes à digestão do mtDNA pelas enzimas de restrição BamHI e EcoRI, respectivamente.

Quando analisado o tDNA, estes valores são de 0.5882 (Tabela 17) e 0.7142 (Tabela 19). A variação entre a similaridade máxima e mínima é maior para os dados do mtDNA, revelando uma possível variação maior nos sítios de restrição do mtDNA em relação ao tDNA. No entanto, o maior valor de similaridade para os dados de mtDNA foi mostrado pela enzima de restrição EcoRI e para o tDNA foi pela enzima HindIII. Sendo assim, pode-se supor que os sítios de restrição para a enzima EcoRI, presentes no mtDNA, apresentam maior conservação em relação aos sítios das enzimas BamHI e HindIII, e para o tDNA esta conservação seria maior para os sítios de HindIII. Isto sugere um caráter sinapomórfico (item 2-5) para estes sítios de restrição da enzima EcoRI no mtDNA, o mesmo ocorrendo para os sítios de restrição de HindIII em relação ao tDNA.

Estas enzimas de restrição são freqüentemente utilizadas nos estudos do gênero *Beta* por apresentarem maior quantidade de fragmentos polimórficos, como mostrado por MIKAMI et alii(1984), KINOSHITA (1990), SCHMIDT et alii (1991), SENDA et alii (1993) e outros, que trazem maior segurança nas afirmações anteriores.

Com base nestes resultados, constata-se que as plantas apresentaram-se mais próximas entre si e distantes geneticamente em relação às plantas de outras espécies (Figuras 24, 25 e 30 a 37). Um modo de se compreender a divergência genética da seção *Patellares* é pela análise de sua distribuição geográfica, estando restrita às costas portuguesa e africana e ao sul da Espanha (Figura 38), sendo que as outras espécies estão geograficamente distribuídas na Europa Central (CURTIS, 1968) .

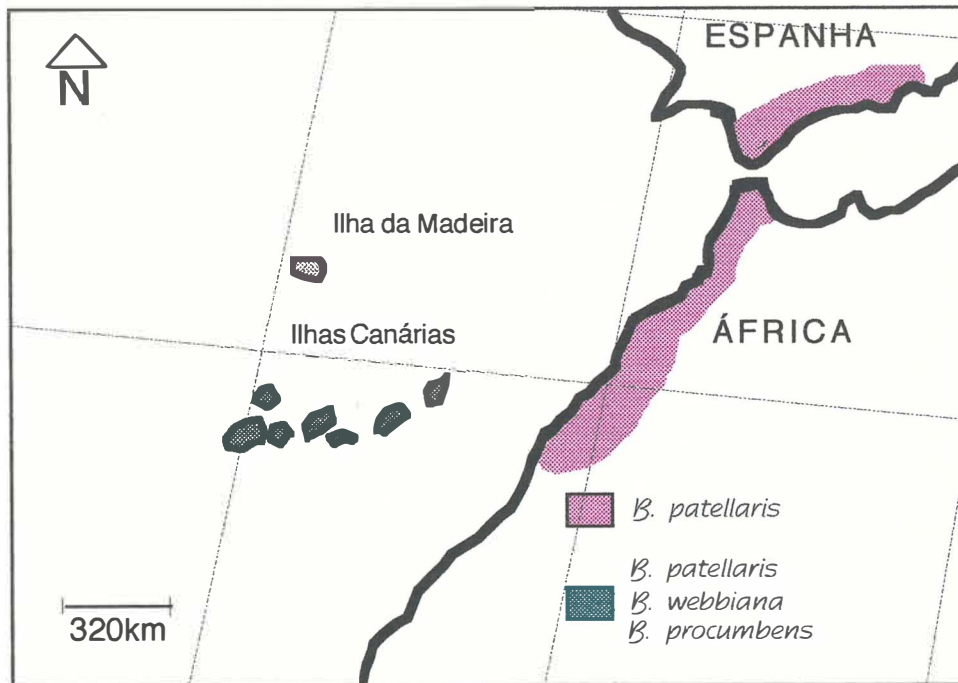


FIGURA 38- Distribuição geográfica da seção *Patellares* (CURTIS, 1968).

Pela constatação desta divergência genética, FORD-LLOYD & WILLIAMS (1975) passaram a identificar esta seção como um novo gênero chamado *Patellifolia*, sendo também a nova identificação destacada por BOCK (1986).

O resultado da hibridação do gene *cob* (item 3-10) com o mtDNA digerido pela enzima de restrição *EcoRI*, também ilustra a divergência genética entre as plantas da seção *Patellares* em relação às plantas das outras seções, (Figura 39).

A dificuldade de se obterem híbridos entre as espécies da seção *Patellares* e a espécie *B. vulgaris* também evidencia tal distância genética (item 2-2) (VAN GEYT et alii, 1990). Para se resolver este problema em programas de melhoramento, utilizam-se como ponte, plantas da espécie *B. maritima* (C) que apresentam certa compatibilidade quanto ao pareamento cromossômico e também ocorre, conjuntamente às espécies da seção *Patellares*, de forma natural, nas ilhas Canárias, região sul da Espanha (CURTIS, 1968; FORD-LLOYD & WILLIAMS, 1975).

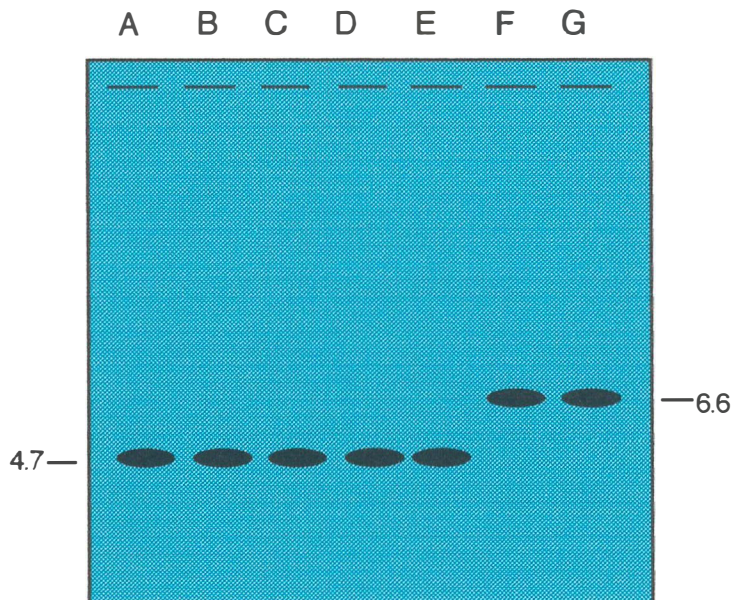


FIGURA 39- Padrão de eletroforese obtido por hibridação de mtDNA/EcoRI hibridizado com gene *cob*, onde A = TK81-0, B = TK81-MS, C = *B. maritima*, D = *B. lomatogona*, E = *B. trigyna*, F = *B. webbiana* e G = *B. patellaris* (Tabelas 1 e 4).

No entanto, neste estudo, valores altos de similaridade entre plantas da seção *Patellares* e a planta da espécie *B. maritima* só foram mostrados pela digestão do tDNA pela enzima de restrição BamHI, com valor igual a 0.5833 e 0.6086 (Tabela 18) referentes ao coeficiente de Dice, como apresentados nas Figuras 30 e 31.

Em relação à planta macho-estéril, TK81-MS (B), as plantas da seção *Patellares* apresentaram os maiores valores de similaridade, tanto para mtDNA como para tDNA, quando foram submetidos à digestão pela enzima de restrição HindIII, sugerindo uma maior conservação dos sítios de restrição para esta enzima.

Foram detectados fragmentos comuns entre estas plantas, como no exemplo da digestão de tDNA/BamHI e hibridado com o gene *cob*, (Tabela 5), que revelou um fragmento de 20.0kb (Figura 40).

Este mesmo fragmento não foi revelado quando se utilizou o mtDNA hibridado com o mesmo gene, sugerindo uma natureza cloroplastidial ou nuclear.

Em estudos realizados com *B. vulgaris* cms (TK81-MS) por MIKAMI (1985) não foram revelados fragmentos deste tamanho, tanto em mtDNA quanto em cpDNA, quando submetidos à digestão pela enzima de restrição BamHI. Deste modo, pode-se inferir uma natureza nuclear para este fragmento.

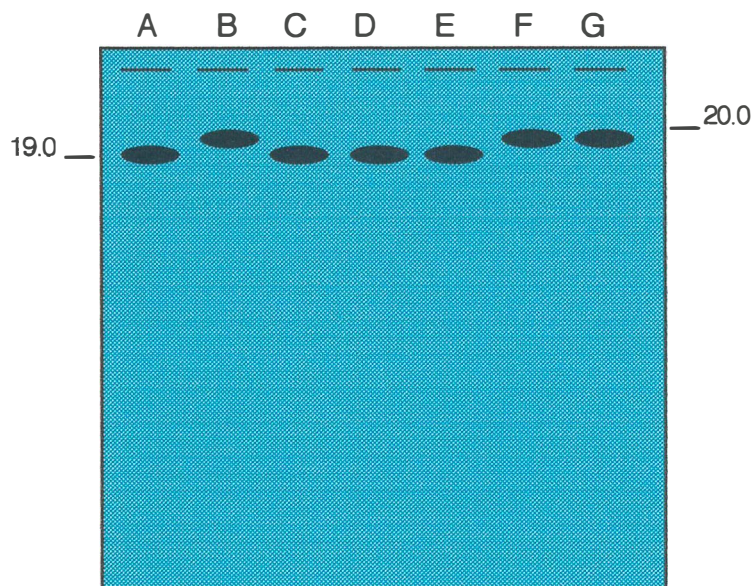


FIGURA 40- Padrão de eletroforese obtido por hibridação de tDNA/BamHI com o gene cob. Presença de fragmento de 20.0kb comum entre a planta cms e as plantas da seção *Patellares* onde A = TK81-0, B = TK81-MS, C = *B. maritima*, D = *B. lomatogona*, E = *B. trigyna*, F = *B. webbiana* e G = *B. patellaris* (fragmentos em kb, Tabela 5).

As plantas da seção *Corollinae*, *B. lomatogona* (D) e *B. trigyna* (E), apresentaram o maior valor de similaridade para a digestão do mtDNA com a enzima de restrição HindIII, assumindo valor de 0.2368 (Tabela 11), indicando uma possível conservação do sítio de restrição para esta enzima. A distinção das plantas desta seção em relação às outras foi possível através da hibridação do tDNA digerido pela enzima de restrição EcoRI com a sonda de DNA para o gene F₁-ATPase subunidade 9, como ilustrado na Figura 41.

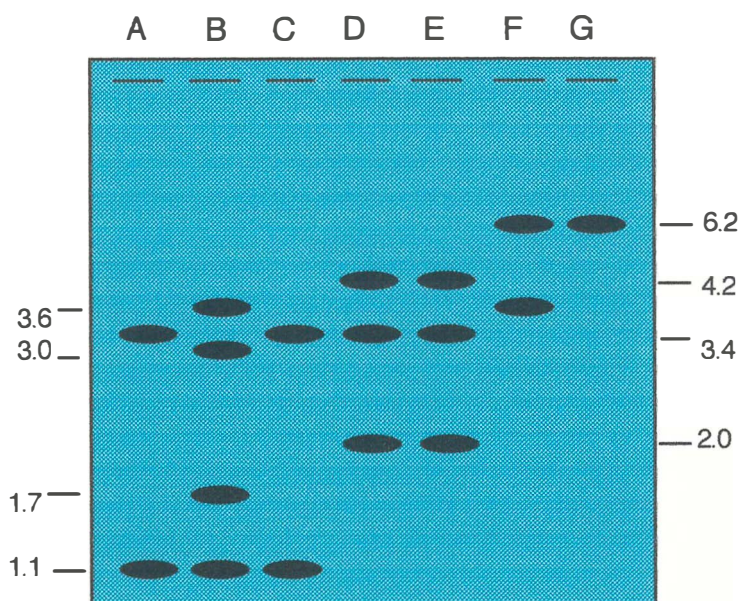


FIGURA 41- Padrão de eletroforese obtido por hibridação de tDNA/EcoRI com o gene para F-ATPase subunidade 9, sendo possível a identificação das plantas da seção *Corollinae* através das bandas de 4.2, 3.4 e 2.0kb, onde A = TK81-0, B = TK81-MS, C = *B. maritima*, D = *B. lomatogona*, E = *B. trigyna*, F = *B. webbiana* e G = *B. patellaris* (fragmentos em kb, Tabela 4).

Pela análise dos dendogramas, as plantas da seção *Corollinae* são mais aparentadas quanto ao tDNA do que em relação ao mtDNA, como indicado nas Figuras 28, 29 e 32 a 37. Os valores de similaridade para os dados de tDNA, entre as duas plantas desta seção, foram cerca de três vezes maiores que os de mtDNA. Ao se unirem os dados da digestão do mtDNA, obtidos pelas três enzimas de restrição (Figuras 26 e 27), observa-se um distanciamento dos tipos mitocondriais, revelando pouca conservação dos sítios de restrição destas enzimas e um baixo grau de sinapomorfia (item 2-5).

Para o tDNA, o efeito de união dos dados é oposto ao ocorrido para o mtDNA; as plantas aparecem mais próximas identificando a seção *Corollinae*

(Figuras 34 e 35). Já para os dendrogramas construídos pela soma de todos os dados, pode-se notar um novo distanciamento entre as plantas, (Figuras 36 e 37).

Como nenhuma espécie da seção em discussão tem interesse para a agricultura, e as publicações com estas espécies se limitam ao relato de resultados da hibridação com plantas da espécie *B. vulgaris* (BOCK, 1986), torna-se difícil, por exemplo, a interpretação dos resultados quanto à influência que o DNA cloroplastidial (ctDNA) poderia estar exercendo nos dados de tDNA.

Através da sonda de DNA para o gene F₁-ATPase subunidade a, foi detectado um fragmento comum à planta TK81-MS, como ilustrado na Figura 42. Não foi possível, no presente estudo, uma análise mais aprofundada quanto a natureza deste fragmento.

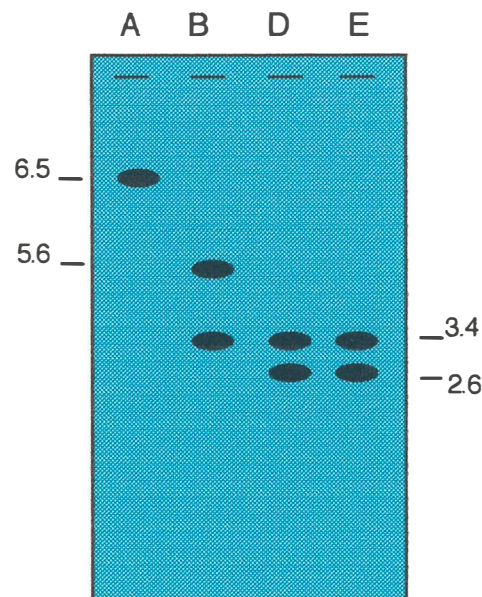


FIGURA 42- Padrão de eletroforese obtido por hibridação de mtDNA/BamHI hibridizado como gene para F₁-ATPase subunidade a, com a presença de um fragmento de 3.4kb comum à planta cms e as plantas da seção *Corollinae*, onde: **A**= TK81-0, **B**= TK81-MS, **D**= *B. lomatogona*, **E**= *B. trigyna* (fragmentos em kb, Tabela 2).

As plantas da espécie *B. vulgaris* utilizadas neste estudo são isonucleares. Sendo assim, as diferenças encontradas no tDNA, para os sítios de restrição das três enzimas, devem-se a variações no mtDNA e ctDNA (MIKAMI et alii, 1984; KINOSHITA, 1990; SENDA et alii, 1993).

Na análise dos dendrogramas do mtDNA, pode-se ver claramente a proximidade genética entre as plantas das espécies *B. vulgaris* (TK81-O) e *B. maritima*, (Figuras 20 a 27, 36 e 37).

Em estudos realizados por FORD-LLOYD & WILLIAMS em 1975, é claramente estabelecida a relação evolutiva entre as espécies *B. maritima* e *B. vulgaris*, que teriam evoluído de uma ancestral comum cuja forma seria muito próxima da espécie *B. maritima* atual. Com a espécie *B. maritima* evoluindo diretamente desta ancestral (simplesiomorfia) e a espécie *B. vulgaris* evoluindo a partir de uma espécie intermediária qual seja *B. provulgaris* (sinapomorfia), fica estabelecida uma relação evolutiva entre estes tipos mitocondriais.

A maior similaridade no mtDNA foi revelada nos sítios de restrição para a enzima de restrição EcoRI, com valor de 0.8235 (Tabela 7) mostrando serem estes os sítios mais conservados entre as três enzimas utilizadas. As plantas (TK81-O) e *B. maritima* apresentaram-se como um grupo monofilético para o mtDNA digerido pela enzima de restrição EcoRI e BamHI, e para o tDNA quando submetido à digestão com a enzima HindIII.

O comportamento da planta da espécie *B. vulgaris* (TK81-MS) foi mais imprevisível, ora se aproximando dos membros da seção *Corollinae* (Figuras 20, 21, 22 e 23) ou então da seção *Patellares* (Figuras 24 e 25). Em ambas as situações, a planta (TK81-O) formou grupos polifiléticos com as plantas destas outras duas seções. Estas associações são conseqüências de rearranjos causados no mtDNA, analisados por ATLAN & COUVET (1993).

Para estes autores, o mtDNA de plantas estaria organizado em um cromossomo circular acompanhado de outras moléculas menores que conteriam parte do genoma mitocondrial, chamadas moléculas subgenômicas. A molécula circular principal é encontrada com freqüência em plantas, mas em geral esta molécula é normalmente interpretada como sendo o resultado da interação das moléculas subgenômicas menores, mais propriamente do que uma entidade física bem definida (ATLAN & COUVET, 1993).

ATLAN & COUVET (1993) também observaram que parece existir um sistema ativo de recombinação mitocondrial como observado em experimentos com fusão de protoplastos, onde há uma intensa recombinação de moléculas subgenômicas com o DNA circular principal. Muitas destas recombinações ocorreriam em sítios específicos, além da recombinação observada normalmente em genes duplicados. Existem diversas pequenas seqüências, diretas (5'--->3') ou invertidas (3'--->5'), de DNA variando de 100 a 1000 bases que definiriam os locais de recombinação originando novas moléculas circulares principais. Esta dinâmica pode ser ilustrada pelos estudos realizados por KUBO et alii em 1991, com linhagens de plantas da espécie *B. vulgaris* (I-12CMS2), considerada muito próxima geneticamente da linhagem (TK81-MS) (Figura 43).

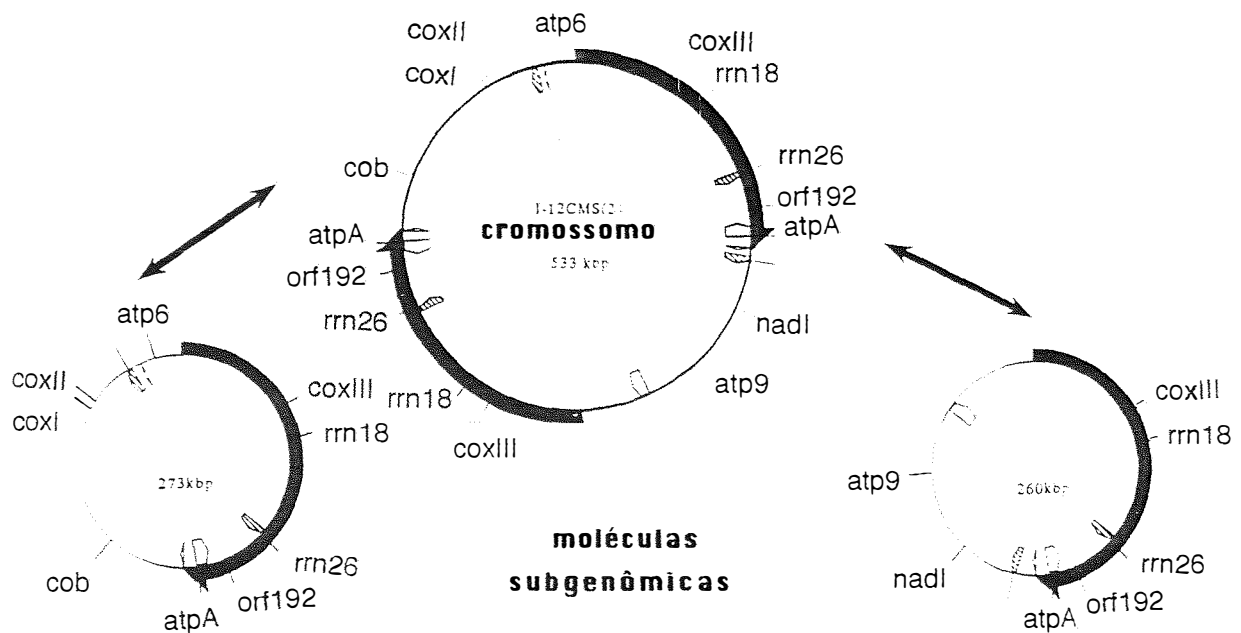


FIGURA 43- Dinâmica do mtDNA em *B. vulgaris* linhagem (I-12CMS(2)) representando a formação do cromossomo principal resultante da interação de duas moléculas subgenômicas. A seta maior indica uma grande seqüência repetida envolvendo vários genes e os pequenos pentágonos e triângulos, seqüências menores (KUBO et alii, 1991).

Os rearranjos que ocorrem por recombinação acarretam mudanças na organização dos genes com ou sem deleções e duplicações (ATLAN & COUVET, 1993). Para se estudar estes rearranjos, alguns autores se utilizam a análise filogenética que passou a ser um instrumento importante no estudo de tipos citoplasmáticos diferentes, como em ¹Palmer et alii (1990) que, com estudos em espécies da seção *Brassicae*, demonstraram que os rearranjos mitocondriais acompanhavam a filogenia entre estas espécies (citado por ATLAN & COUVET, 1993); como se observa também nos estudos da evolução do mtDNA em milho por SMALL et alii(1989) e JUNG et alii(1993), e nos estudos no gênero *Beta*. Resultados destes rearranjos, especificamente em plantas (TK81-MS), foram demonstrados por SENDA et alii (1993).

Ao se construir um único dendrograma baseado nos dados das três enzimas, tem-se para o mtDNA, que as plantas da seção *Vulgares* (TK81-O) e *B. maritima* comportaram-se como um grupo monofilético (Figuras 25 e 26), apresentando valores de similaridade iguais a 0.6190 (Tabela 13) e 0.7647 (Tabela 14) referentes aos coeficientes de Jaccard e Dice, respectivamente. As plantas da seção *Patellares* também apresentaram-se como um grupo monofilético, só que de maneira mais consistente, como ilustrado nas Figuras 26, 27, 34, 35, 36 e 37.

¹PALMER, J. D.; MAKAROFF, C. A.; APEL, I. J.; SHIRZADEGAN, M.. Fluid structure of mitochondrial genome: evolutionary and functional implications, In Molecular Evolution. edited by Clegg, M. T. and O' Brien, A. R. Liss. New York, 85-96. 1990.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em estudos conduzidos por PALMER e HERBON em 1986, 1987 e 1988, a comparação final dos padrões obtidos por enzimas de restrição, na análise de ctDNA e mtDNA em espécies do gênero *Brassica*, ilustra as diferenças evolutivas dos dois tipos de organelas, que diferem quanto ao tempo e ao modo no processo de evolução. O ctDNA foi considerado mais homogêneo em relação a suas variações baseadas em deleções e inversões. Já o mtDNA apresentou bastante heterogeneidade causada por mudanças estruturais com deleções, inversões, duplicações e inversões múltiplas.

Segundo PALMER (1992), o mtDNA possui pouca variação dos sítios de restrição, que permita a realização de estudos filogenéticos interespecíficos. O problema é que ao se trabalhar com taxas superiores, o número de variações dos sítios de restrição é confundido com o grande número de rearranjos do mtDNA, sendo as inversões um outro problema, que mesmo em pequeno número, seriam suficientes para impossibilitar o estudo por mapas de restrição.

Uma aplicação razoável do mtDNA em estudos sistemáticos é a análise das seqüências de nucleotídeos de certos genes. Esta seqüência primária varia mais lentamente em mtDNA do que em ctDNA e o número de mutações silenciosas por substituição de bases sinônimas também é menor em mtDNA. Isto viabiliza estudos que levam em consideração grandes períodos evolutivos na ordem de 100 myr (PALMER, 1992 ; CROZIER, 1990).

PALMER (1992) diz também que a escolha dos genes a serem estudados deve ser feita com cautela. Assim, por exemplo, os genes para as subunidades 8 e 9 da F₁-ATPase, para NAD desidrogenase subunidade 3, e para três proteínas ribossômicas são pequenos demais para reterem informação suficiente. Outros como para NAD desidrogenase subunidades 1, 4 e 5, juntamente com o gene para citocromo oxidase subunidade II (coxII) apresentam introns, apesar de possuírem tamanho suficiente para reter informações importantes. Para PALMER (1992), os

genes que possuem boas características de análise são:

- NAD desidrogenase subunidade II.
- Citocromo oxidase subunidades I e III.
- F₁-ATP sintetase subunidade a (alfa).
- rDNA subunidades 18 e 26S.

Mesmo para genes mitocondriais considerados com boas características, alguns cuidados devem ser tomados, pois podem ser confundidos com genes quiméricos ou pseudogenes. Isto ocorre principalmente em estudos baseados em RAPD (PALMER, 1992).

São muitos os trabalhos na literatura que se utilizam de padrões de mtDNA obtidos por enzimas de restrição e que não fazem referência ao método de análise utilizado, como: CHOWDHURY & SMITH (1988); TERACHI & TSUNEWAKI (1986); GRABAU et alii (1992), e outros.

5- CONCLUSÕES.

Pelos resultados obtidos no presente estudo pôde-se concluir que:

1- Apesar de resultarem em valores de similaridade distintos, a utilização dos coeficientes de Jaccard e Dice originaram o mesmo padrão de dendrogramas, o que nos permite afirmar que somente a utilização de um deles é suficiente para se agruparem, de maneira segura, as plantas analisadas.

2- As plantas da seção *Patellares* apresentaram grande divergência genética em relação às outras plantas, tanto para a análise do mtDNA como para tDNA, quando submetidos à digestão com as três enzimas de restrição EcoRI, BamHI e HindIII.

3- A seção *Corollinae*, representada pelas plantas da espécies *B. lomatogona* e *B. trigyna*, não apresentou boas respostas às enzimas e sondas utilizadas. Mostrou um comportamento imprevisível e distinto do já previsto para as espécies desta seção.

4- De modo geral, o comportamento das plantas utilizadas na análise foi concordante com o previsto para o gênero *Beta*, baseado em dados morfológicos (Cronquist, 1988) e biogeográficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABE, J. & TSUDA, C. Distorted segregation in the backcrossed progeny between *Beta vulgaris* L. and *Beta macrocarpa* Guss. **Japanese Journal of Breeding**, Tokio, 38: 309-18, 1988.
- AHLFELD, H. The sugar market: heading for a boom? **F. O. Lichts International Sugar and Sweetner Report**, 122 (8): 121-7, 1990.
- ALBANI, D.; ROBOT, L. S.; DONALDSON, P. E.; ALTOSAAR, I.; ARNISON, P. G.; FABIJANSKI, S. F. Characterization of a pollen-specific gene family from *Brassica napus* Which is activated during early microspore development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, 15: 605-22, 1990.
- AMARAL, J. D. **Sistemática**. In: A Beterraba Sacarina. Coleção Técnica Agrária, Porto, 1978, 606p.
- ARTSCHWAGER, E. Development of flowers and seed in the sugar beet. **Journal of Rgriculture Research**, Washington, 34(1): 1-25, 1927.
- ATLAN, A. & COUVET, D. A model simulating the dynamics of plant mitochondrial genomes. **Genetics**, Princeton, 135: 213-22, 1993.
- AX, P. **The Phylogenetic System**. The systematization of organisms on the basis of their phylogenesis. London, Wiley, 1987, 340p.

- BEDINGER, P. The Remarkable Biology of Pollen. **Plant Cell**, Baltimore, 4(8): 879-87, 1992.
- BIANCHI, A. **Male sterility and plant breeding**. Eucarpia 5th Cong Milano, 335-45, 1968.
- BOCK, T. S. M. The Genus Beta: Domestication, Taxonomy and Interespecific Hybridization for Plant Breeding. **Acta Horticulturae**, The Hague, 182: 335-43, 1986.
- BONAVENT, J. F.; BESSONE, L.; GENY, A.; BERVILLE, A. A possible origin for the sugar beet cytoplasmic male sterility source Owen. **Genome**, Ottawa, 32: 323-27, 1989.
- BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à análise de agrupamento**. Associação Brasileira de Estatística. ABE 9º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, 1990, 155p.
- BUTTLER, P. K. Variation in wild population of annual beet (*Beta*, *Chenopodiaceae*). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, 128: 123-36, 1977.
- CHOWDHURY, M. K. U. & SMITH, R. L. Mitochondrial DNA variation in pearl millet and related species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York 76 (1): 25-32, 1988.

CLEGG, M. T.; BROWN, A. H. D.; WHITFIELD, P. R. Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley: implications for genetic conservation. **Genetical Resource**, London, 43(3): 339-43, 1984.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York, Botanical Garden, 1988, 555p.

CROZIER, R. H. From population genetics to phylogeny: use and limits of mitochondrial DNA. **Australian Systematic Botany**, Albert, 3(1): 111-24, 1990.

DE BOCK, G., C., T., S., M. & LEKKERKERKER, B. Crosses between *Beta vulgaris* and *Beta lomatogona* F.et M. **Euphytica**, Wageningen, 25: 539-47, 1976.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. **Phytochemistry Bulletin**, New York, 19: 11-5, 1987.

EBE, N. Study of mitochondrial genome structure in S-2 cytoplasmic male sterile line of sugar beet. Sapporo, 1992. 46p (Master Course Hokkaido University Japan).

FEHR, W. R. **Role of Plant Breeding in Agriculture**. In: Principles of Cultivar Development. New York, Macmillan Publishing Company, 1987, 536p.

FINK, W. L. Microcomputers and Phylogenetic Analysis. **Science**, Lancaster, 234: 1135-9, 1986.

FISCHER, H. E. Origin of the 'Weisse Schlesische Rübe' (white Silesian beet) and resynthesis of sugar beet. **Euphytica**, Wageningen, 41: 75- 80, 1989.

- FORD-LLOYD, B. V.; WILLIAMS, J. T. A revision of *Beta* section *Vulgares* (Chenopodiaceae), with new light on the origin of cultivated beets. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, 7 1: 89-102, 1975.
- FRITZSCHE, K.; METZLAFF, M.; MELZER, R.; HAGEMANN, R. Comparative restriction endonuclease analysis and molecular cloning of plastid DNAs from wild species and cultivated varieties of the genus *Beta* (L). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 74: 589-94, 1987.
- GIFFORD, E. M. & FOSTER, A. S. **Morphology and evolution of vascular plants**. 3^a ed. New York, Freeman, 1989. 626p.
- GOTTSCHALK, W. & KAUL, M. L. H. The genetic control of microsporogenesis in higher plants. **Nucleus**, Paris 17(3): 133-66, 1974.
- GOTTSCHALK, W. & KAUL, M. L. H. Asynapsis and Desynapsis in Flowering Plants. **Nucleus**, Paris(1- 2): 1-15, 1980.
- GRABAU, E. A.; DAVIS, W. H.; PHELPS, N. D.; GENGENBACH, B. G. Classification of soybean cultivars based on mitochondrial DNA restriction fragments length polymorphisms. **Crop Science**, Madison, 32(1): 271-4, 1992.
- HANSON, M. R. & FOLKERTS, O. Structure and Function of the Higher Plant Mitochondrial genomes. **International Review of Cytology**, New York, 141: 129-73, 1992.
- HARVEY, M. J. & MUEHLBAUER, F. J. Variability for restriction fragment lengths and phylogenies in lentil. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 77: 839-43, 1989.

- HENNIG, W. Phylogenetic Systematics. **Annual Review of Entomology**, 10: 97-116, 1965.
- HIESEL, R.; SCHOBEL, W.; BRENNICKE, A. The cytochrome oxidase subunit I and subunit III genes in *Oenothera* mitochondria are transcribed from identical promoter sequences. **Embo Journal**, Oxford, 6: 29-34, 1987.
- JONHS. C.; LU, M.; MACKENZIE, S.A. Mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in cytoplasmic male sterile bean plants. **Plant Cell**, Baltimore, 4(4): 435-49, 1992.
- JUNG, C.; PILLEN, K.; FRESE, L.; FÄHR, S.; MELCHINGER, A. E. Phylogenetic relationships between cultivated and wild species of the genus *Beta* revealed by DNA "fingerprinting". **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 86: 446-57, 1993.
- KAUL, M. L. H. **Monographs on Theoretical and Applied Genetics**, 10. Male sterility in higher plants. Berlin, Springer-Verlag, 1988, 1005p.
- KINOSHITA, T. Genetical studies on the male sterility of sugarbeets (*Beta vulgaris*) and its related species. **Journal of the Faculty of Agriculture**. Hokkaido University, Sapporo, 56: 435-541, 1971.
- KINOSHITA, T. Citoplasmic Engineering on the Male Sterility of Sugar Beet. **Nucleus**, Paris, 33: 44-56, 1990.

KOLODNER, R. & TEWARI, K. K. Physicochemical Characterization of Mitochondrial DNA from Pea Leaves. **Proceeding of National Academy Sciences USA**, 69 (7): 1830-4, 1972.

KOLTUNOW, A. M.; TRUETTNER, J.; COX, K. H.; WALLROTH, M.; GOLDBERG, R. B. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. **Plant Cell**, Baltimore, 2 (12): 1201-24, 1990.

KUBO, T.; SATO, H.; MIKAMI, T.; KINOSHITA, T. Physical map of mitochondrial genome from sugar beet. **Sugar Beet Research Bulletin**, Tokyo, 33: 111-9, 1991.

LANGE, W. & DE BOCK, T. S. M. The diploidised meiosis of tetraploide *Beta macrocarpa* and its possible application in breeding sugar beet. **Plant Breeding**, Berlin, 103: 196-206, 1989.

LAUGHNAN, J. R. & GABAY-LAUGHNAN, S. Cytoplasmic male sterility in maize. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, 17: 27-48, 1983.

LEBEDINSKY, B. N.; Beet Breeding Work in the U.S.S.R. **Facts About Sugar**, New York, 32(11): 431- 2, 1937.

MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M.; GIL, P.; CAPEL, J.; SOMERVILLE, C. R. Mutation at the arabidopsis CHM locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. **Plant Cell**, Baltimore, 4(8): 889-99, 1992.

MIKAMI, T. Molecular heterogeneity in mitochondrial and chloroplast DNAs from normal and male sterile cytoplasm in sugar beets. **Current Genetics**, Berlin, 8: 319-22, 1984.

- KOLODNER, R. & TEWARI, K. K. Physicochemical Characterization of Mitochondrial DNA from Pea Leaves. **Proceeding of National Academy Sciences USA**, 69 (7): 1830-4, 1972.
- KOLTUNOW, A. M.; TRUETTNER, J.; COX, K. H.; WALLROTH, M.; GOLDBERG, R. B. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. **Plant Cell**, Baltimore, 2 (12): 1201-24, 1990.
- KUBO, T.; SATO, H.; MIKAMI, T.; KINOSHITA, T. Physical map of mitochondrial genome from sugar beet. **Sugar Beet Research Bulletin**, Tokyo, 33: 111-9, 1991.
- LANGE, W. & DE BOCK, T. S. M. The diploidised meiosis of tetraploide *Beta macrocarpa* and its possible application in breeding sugar beet. **Plant Breeding**, Berlin, 103: 196-206, 1989.
- LAUGHNAN, J. R. & GABAY-LAUGHNAN, S. Cytoplasmic male sterility in maize. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, 17: 27-48, 1983.
- LEBEDINSKY, B. N.; Beet Breeding Work in the U.S.S.R. **Facts About Sugar**, New York, 32(11): 431- 2, 1937.
- MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M.; GIL, P.; CAPEL, J.; SOMERVILLE, C. R. Mutation at the arabidopsis CHM locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. **Plant Cell**, Baltimore, 4(8): 889-99, 1992.
- MIKAMI, T. Molecular heterogeneity in mitochondrial and chloroplast DNAs from normal and male sterile cytoplasm in sugar beets. **Current Genetics**, Berlin, 8: 319-22, 1984.

- MORIKAMI, A. & NAKAMURA, K. Structure and expression of pea mitochondrial F1-ATPase A-subunit gene and its pseudogene involved in homologous recombination. **Journal of Biochemistry**, New York, 101: 967-76, 1987a.
- MORIKAMI, A. & NAKAMURA, K. The pea mitochondrial ATPase subunit 9 gene is located upstream of the ATPase A-subunit gene. **Nucleic Acids Research**, London, 15 (11): 4692, 1987b.
- NAWA, S.; SANO, Y.; FUJII, T. Organization of mitochondrial DNA from the male sterile cytoplasm of rice. **Annual Report National Institute of Genetics**, 36: 30-1, 1986.
- NAWA, S.; SANO, Y.; YAMADA, M. FUJII, T. Cloning of the plastids in cytoplasmic male sterile rice and changes of organization of mitochondrial and nuclear DNA in cytoplasmic reversion. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, 62: 301-14. 1987.
- NEI, M. & LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceeding of the National Academy Science, USA**, 76(10): 5269-73, 1979.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and geneetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Washington, 89: 583 90, 1978.
- OWEN, F. V. Inheritance of cross- and self-sterility and self-fertility in *Beta vulgaris*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, (64) 12: 679-99, 1942.

- PALMER, J. D. e HERBON, L. A. Tricircular mitochondrial genomes of *Brassica* and *Raphanus*: reversal of repeat configurations by inversion. **Nucleic Acids Resource**, London, 14: 9755-64, 1986.
- PALMER, J. D. e HERBON, L. A. Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. **Current Genetics**, Berlin, 11: 565-70, 1987.
- PALMER, J. D. e HERBON, L. A. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. **Journal of Molecular Evolution**, New York, 28: 87-97, 1988.
- PALMER, J. D. **Mitochondrial DNA in Plant Systematics**: Applications and Limitations, in *Molecular Systematics of Plants*. Chapman and Hall. 434p, 1992.
- POWLING, A. Restriction Endonuclease Analysis of Mitochondrial DNA from Sugar beet whit Normal and Male-Sterile Cytoplasms. **Heredity**, London 49(1): 117-20, 1982.
- REAMON-RAMOS, S. M. & WRICKE, G. A full set of monosomic addition lines in *Beta vulgaris* from *Beta webbiana*: morphology and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 84: 411-8. 1992.
- RIGBY, P. W.; DIECKMANN, M.; RHODES, C.; BERG, P. Labeling Deoxyribonucleic Acid to High Specific Activity in Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I. **Journal of Molecular Biology**, London, 113: 237-51. 1977.

- SAKAMOTO, W.; MOMOSE, M.; TSUTSUMI, N.; TANO, S.; YAMAGUCHI, H.
Analysis of homology of small plasmid-like mitochondrial DNAs in the different cytoplasmic male sterile strains in rice. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, 64: 49-56. 1989.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.
- SCHMIDT, T.; JUNG, C.; METZLAFF, M. Distribution and evolution of two satellite DNAs in the genus *Beta*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 82: 793-9, 1991.
- SCHUSTER, W. & BRENNICKE, A. Nucleotide sequence of the *Oenothera* ATPase subunit-6 gene. **Nucleic Acids Research**, London, 15: 9092. 1987.
- SENDA, M.; HARADA T.; MIKAMI, T.; KINOSHITA, T. Genomic organization and sequence analysis of the cytochrome oxidase subunit II gene from normal and male-sterile mitochondria in sugar beet. **Current Genetics**, Berlin, 19: 175-81, 1991.
- SENDA, M.; MIKAMI, T.; KINOSHITA, T. The sugar beet mitochondrial gene for the ATPase alpha-subunit: sequence, transcription and rearrangements in cytoplasmic male-sterile plants. **Current Genetics**, Berlin, 24: 164-70.
- SHINAKAI, T.; VANG, Z. Q.; YAMADA, Y. Properties of the circular plasmid-like DNA B1 from mitochondria of cytoplasmic male-sterile rice. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, 28: 1243-51, 1987.

- SHINAKAI, T.; & YAMADA, Y. Properties of the circular plasmid-like DNA, B4, from mitochondria of cytoplasmic male-sterile rice. **Current Genetics**, Berlin, 13: 441-3, 1988.
- SOUTHERN, E. M. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragmented by Gel Electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, 98: 503-17, 1975.
- STEEL, R. G.; TORRIE, J. H. Enumeration data II: Contingency Tables. In: **Principles and procedures of statistics, a biometrical approach**, 2^a ed. N.Y., 1987, 633p.
- SUGIURA, M. & KUSUDA, J. Molecular cloning of tobacco chloroplast ribosomal RNA genes. **Molecular and General Genetics**, Berlin, 172: 137-41, 1979.
- TERACHI, T. & TSUNEWAKI, K. The molecular basis of genetic diversity among cytoplasm of Triticum and Aegilops. 5 Mitochondrial genome diversity among Aegilops species having identical chloroplast genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, 73(3): 175-81, 1986.
- TWELL, D.; WING, R. A.; YAMAGUCHI, J; McCORMICK, S. Isolation and expression of anther-specific gene from tomato. **Molecular and General Genetics**, Berlin, 217: 240-507, 1989.
- VAN GEYT, J. P. C.; LANGE, W.; OLEO, M. & DE BOCK, Th., S., M. Natural variation within the genus *Beta* and its possible use for breeding sugar beet: A review. **Euphytica**, Wageningen, 49: 57-76, 1990.

- WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis**. Sunderland, Sinauer, 1990. 375p.
- WORMKE, H. E. & OVERMAN, M. A. Cytoplasmic male sterility in sorghum. 1
Callose behavior in fertile and sterile anthers. **Journal of Heredity**,
Washington, 63: 103-8, 1972.
- WORRALL, D.; HIRD, D. L.; HODGE, R.; PAUL, W.; DRAPER, J.; SCOTT, R.
Premature Dissolution of the Microsporocyte Callose Wall Causes Male
Sterility in Transgenic Tobacco. **Plant Cell**, Baltimore, 4(7): 759-71, 1992.

TABELA 1- Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do mtDNA com a enzima de restrição EcoRI e revelados através de hibridação com as sondas indicadas.

| | ENZIMA | | EcoRI | | mtDNA | | |
|--------|--------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
| SONDAS | | | | | | | |
| cob | - | - | - | - | - | 6.6 | 6.6 |
| | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | - | - |
| coxIII | - | - | - | - | - | 8.1 | - |
| | - | - | - | - | - | 7.0 | 7.0 |
| | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | - | - |
| | - | - | - | - | - | 2.3 | 2.3 |
| | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 1.9 | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | 1.2 |
| rrn18S | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | - | - |
| | - | - | - | - | - | 14.7 | 14.7 |
| ATP9 | 12.7 | 12.7 | 12.7 | - | - | - | - |
| | - | - | - | 11.0 | 11.0 | - | - |
| | - | - | - | - | 5.6 | - | - |
| | - | - | - | 4.2 | 4.2 | 4.2 | - |
| ATP6 | - | 4.0 | - | - | - | - | - |
| | 3.4 | 3.4 | 3.4 | - | 3.4 | - | - |
| | - | - | - | 2.8 | - | 2.8 | 2.8 |
| | - | - | - | - | - | 8.1 | - |
| | - | - | - | - | - | 7.0 | 7.0 |
| | 5.2 | 5.2 | 5.2 | - | 5.2 | - | - |
| | - | - | 3.9 | 3.9 | 3.9 | - | - |
| | 2.8 | 2.8 | - | - | - | - | - |
| ATPa | - | - | - | - | - | 2.3 | 2.3 |
| | - | - | - | - | - | 2.1 | - |
| | - | - | - | - | - | - | 2.0 |
| | 1.9 | 1.9 | 1.9 | - | 1.9 | - | - |
| | - | - | - | 1.4 | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 1.2 | 1.2 |
| | 1.0 | 1.0 | 1.0 | - | 1.0 | - | - |
| | - | - | - | - | - | 9.0 | - |
| | - | - | - | - | - | 7.0 | 7.0 |
| | - | - | - | 6.4 | - | - | - |
| - | - | - | - | - | 5.8 | 5.8 | |
| - | 5.1 | - | - | 5.1 | - | - | |
| - | - | - | 3.8 | - | - | - | |
| - | 3.0 | - | - | - | - | - | |
| - | - | 2.6 | - | - | - | - | |
| - | - | - | - | - | 2.5 | 2.5 | |
| - | - | - | - | - | 2.1 | - | |

Continuação da Tabela 1.

| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
|--------|--------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| SONDAS | | | | | | | |
| | - | - | - | - | - | - | 2.0 |
| | - | 1.9 | 1.9 | - | 1.9 | - | - |
| | - | 1.8 | - | - | - | - | - |
| | - | - | 1.7 | - | 1.7 | - | - |
| ATPb | - | - | - | - | - | 9.0 | - |
| | - | - | - | - | - | 7.0 | 7.0 |
| | - | - | - | - | - | 5.8 | 5.8 |
| | 5.0 | 5.0 | 5.0 | - | 5.0 | - | - |
| | 4.0 | - | 4.0 | - | 4.0 | - | - |
| | - | 3.5 | - | - | - | - | - |
| | - | 2.8 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 2.4 | 2.4 |
| | - | - | - | - | - | 2.1 | - |
| | - | - | - | - | - | - | 2.0 |
| | 1.9 | 1.9 | 1.9 | - | 1.9 | - | - |
| | - | 1.8 | - | 1.8 | - | - | - |
| | 1.5 | 1.5 | 1.5 | - | 1.5 | - | - |

Continuação da Tabela 2.

| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
|--------|--------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| SONDAS | | | | | | | |
| | - | - | - | - | - | 15.0 | 15.0 |
| | - | 8.6 | - | - | - | - | - |
| | - | 7.8 | - | - | - | - | - |
| 6.5 | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | 6.2 |
| | - | 5.6 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - |
| | - | 3.4 | 3.4 | 3.4 | 3.4 | - | - |
| | - | - | 2.8 | - | - | - | - |
| | - | - | - | 2.6 | 2.6 | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | 1.3 |
| | - | - | 1.2 | - | - | - | - |
| | - | - | 0.7 | - | - | - | - |
| | - | - | 0.5 | - | - | - | - |
| ATPb | - | - | - | - | - | - | 24.0 |
| | - | - | - | - | - | 20.0 | - |
| 17.0 | 17.0 | 17.0 | 17.0 | - | 17.0 | - | - |
| | - | - | - | 15.0 | - | - | 15.0 |
| | - | - | - | - | - | 14.0 | - |
| 12.0 | 12.0 | 12.0 | 12.0 | - | - | - | - |
| | - | 7.8 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | 6.0 |
| | - | 5.6 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 5.4 | - |
| | - | - | - | 4.5 | - | - | - |
| | - | - | - | 4.2 | 4.2 | - | - |

TABELA 3- Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do mtDNA com a enzima de restrição HindIII e revelados através de hibridação com as sondas indicadas.

| | ENZIMA HindIII | | mtDNA | | | | |
|--------|----------------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
| SONDAS | | | | | | | |
| cob | - | 4.0 | - | - | - | - | - |
| | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 2.3 |
| | - | - | - | - | - | 2.2 | 2.2 |
| | 1.8 | - | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 1.8 |
| | - | - | - | - | - | 1.0 | 1.0 |
| | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | - | - |
| coxIII | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | - | - |
| | - | 7.4 | - | - | - | - | - |
| | - | 6.9 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | 6.4 |
| | - | - | - | 5.6 | 5.6 | - | - |
| | - | 5.4 | - | - | - | - | 5.4 |
| | - | - | - | - | - | 5.0 | - |
| | 4.2 | - | 4.2 | 4.2 | - | - | - |
| | 3.6 | - | 3.6 | 3.6 | - | 3.6 | - |
| | - | 2.6 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | 2.2 |
| | - | - | - | - | - | 1.9 | - |
| | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 |
| | - | - | - | - | - | 1.2 | 1.2 |
| 0.68 | 0.68 | 0.68 | 0.68 | 0.68 | - | - | |
| - | 0.6 | - | 0.6 | 0.6 | - | - | |
| rrn18S | - | - | - | - | - | 6.8 | 6.8 |
| | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | - | - |
| ATP9 | - | - | - | 20.0 | - | - | - |
| | - | - | 14.0 | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | 11.0 | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | 8.8 |
| | - | - | 7.8 | - | - | - | - |
| | 7.6 | - | - | - | - | - | - |
| | 7.4 | 7.4 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 6.8 | 6.8 |
| | - | - | - | - | - | - | - |
| | 4.0 | - | 4.0 | - | 4.0 | - | - |
| | - | 3.0 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | 2.8 |
| | - | - | - | 1.8 | - | - | 1.8 |
| - | - | - | 1.6 | - | - | - | |
| 1.4 | - | 1.4 | - | - | - | - | |

Continuação da Tabela 3.

| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
|--------|--------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| SONDAS | | | | | | | |
| | - | 1.3 | - | - | - | - | - |
| | 0.4 | - | - | - | - | - | - |
| ATP6 | - | - | - | - | - | - | 6.8 |
| | - | 5.4 | - | - | 5.4 | - | - |
| | - | 4.2 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 2.4 | 2.4 |
| | 20.0 | - | 20.0 | - | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| | 1.4 | 1.4 | 1.4 | - | 1.4 | 1.4 | 1.4 |
| | - | - | - | 1.1 | - | - | - |
| | 1.0 | 1.0 | 1.0 | - | 1.0 | - | - |
| ATPa | 5.8 | 5.8 | - | 5.8 | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 5.4 | - |
| | - | - | - | - | - | 5.3 | - |
| | 5.0 | 5.0 | - | - | - | - | - |
| | 4.2 | - | - | - | - | - | - |
| | 3.7 | - | 3.7 | - | 3.7 | 3.7 | - |
| | 3.4 | - | - | 3.4 | - | - | - |
| | 2.7 | 2.7 | - | 2.7 | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 2.5 | - |
| | - | - | - | - | - | 1.7 | - |
| | 1.4 | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | 1.0 | - | - |
| | - | - | - | - | 0.6 | - | - |
| ATPb | 10.2 | - | - | - | - | - | - |
| | 5.0 | - | - | - | - | - | - |
| | 4.7 | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 4.4 | 4.4 |
| | - | 4.2 | - | - | - | - | - |
| | 4.0 | - | - | - | 4.0 | - | - |
| | - | 3.7 | - | - | - | - | - |
| | - | - | 3.3 | - | - | - | - |
| | - | - | - | 2.6 | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 2.4 | 2.4 |
| | 1.9 | - | - | - | - | - | - |
| | - | 1.8 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | 1.7 | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 1.4 | - |
| | - | - | - | - | - | 1.3 | 1.3 |
| | 1.1 | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | 1.0 | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 0.9 | 0.9 |
| | 0.7 | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | 0.64 | - | - | - |

TABELA 4- Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do tDNA com a enzima de restrição EcoRI e revelados através de hibridação com as sondas indicadas.

| | ENZIMA | | Eco RI | | tDNA | | |
|--------|--------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
| SONDAS | | | | | | | |
| cob | - | - | - | - | - | 6.6 | 6.6 |
| | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | 4.7 | - | - |
| coxIII | - | - | - | - | - | 7.0 | 7.0 |
| | 4.6 | 4.6 | 4.6 | 4.6 | 4.6 | - | - |
| rrn18S | 12.4 | 12.4 | 12.4 | 12.4 | 12.4 | 12.4 | 12.4 |
| | 3.4 | 3.4 | 3.4 | 3.4 | 3.4 | 3.4 | 3.4 |
| ATP9 | - | - | - | - | - | 6.2 | 6.2 |
| | - | - | - | 4.6 | 4.6 | - | - |
| | - | 4.2 | - | - | - | 4.2 | - |
| | 3.6 | - | 3.6 | 3.6 | 3.6 | - | - |
| | - | 3.4 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 3.0 | 3.0 |
| | - | - | - | 2.0 | 2.0 | - | - |
| | - | 1.7 | - | - | - | - | - |
| ATP6 | 1.1 | 1.1 | - | - | - | - | - |
| | 4.3 | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | 40 | 40 | 40 | - | - |
| | - | 30 | - | - | 30 | 30 | - |
| | - | - | - | - | - | 2.6 | 2.6 |
| | - | - | - | - | - | 2.2 | 2.2 |
| | - | 2.1 | 2.1 | 2.1 | 2.1 | - | - |
| | - | - | - | - | - | 6.2 | 6.2 |
| ATPa | - | - | - | - | - | 5.6 | 5.6 |
| | 4.8 | 4.8 | 4.8 | 4.8 | 4.8 | - | - |
| | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | - | - |
| | - | - | - | - | - | 4.2 | - |
| | 3.8 | 3.8 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 3.5 | - |
| | - | - | 2.9 | 2.9 | - | - | - |
| | - | - | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.7 |
| ATPb | - | 2.6 | - | - | - | - | - |
| | 2.5 | - | 2.5 | 2.5 | 2.5 | - | - |

TABELA 5- Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do tDNA com a enzima de restrição BamHI e revelados através de hibridação com as sondas indicadas.

| | ENZIMA Bam HI tDNA | | | | | | |
|--------|--------------------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
| SONDAS | | | | | | | |
| cob | - | 20.0 | - | - | - | 20.0 | 20.0 |
| | 19.0 | - | 19.0 | 19.0 | 19.0 | 19.0 | 19.0 |
| coxIII | 8.3 | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | 7.9 | - | - | - |
| | - | - | - | 7.0 | - | - | - |
| | - | 6.6 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | 6.4 | - | - |
| | - | - | - | - | 6.2 | - | - |
| | - | - | 4.6 | - | - | 4.6 | 4.6 |
| rrn18S | 6.4 | 6.4 | 6.4 | 6.4 | 6.4 | 6.4 | 6.4 |
| | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.1 | 4.1 |
| ATP9 | - | - | 19.0 | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 17.0 | 17.0 |
| | - | 16.0 | - | - | - | - | - |
| | 11.0 | - | - | 11.0 | 11.0 | - | - |
| | - | - | - | - | - | 5.2 | - |
| ATP6 | 4.2 | 4.2 | - | - | - | - | 4.2 |
| | - | - | - | - | - | - | 3.9 |
| | - | 3.4 | - | - | - | - | - |
| | 27.0 | - | - | 27.0 | - | - | - |
| | 24.0 | - | - | 24.0 | - | - | - |
| | 17.0 | - | - | - | - | - | - |
| | 14.0 | - | - | 14.0 | - | - | - |
| | - | - | - | - | 16.0 | - | - |
| | - | - | - | - | - | 11.0 | - |
| | - | - | - | - | - | - | 10.0 |
| | - | - | - | 7.7 | - | - | - |
| | - | 7.0 | - | - | - | - | - |
| ATPa | - | - | - | - | - | 5.4 | - |
| | - | 4.0 | - | - | - | - | - |
| | 8.8 | 8.8 | 8.8 | 8.8 | 8.8 | 8.8 | 8.8 |
| | - | 4.8 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - |

Continuação da Tabela 5

| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
|------|--------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| | 3.6 | 3.6 | - | - | - | - | - |
| | 3.1 | - | - | - | - | - | - |
| ATPb | - | - | - | - | 6.2 | 6.2 | 6.2 |
| | - | - | 5.6 | 5.6 | 5.6 | 5.6 | 5.6 |
| | 5.0 | - | - | - | - | - | - |
| | - | 4.6 | 4.6 | 4.6 | 4.6 | 4.6 | 4.6 |
| | 4.2 | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 3.9 | - |
| | - | - | - | 2.9 | - | 2.9 | 2.9 |
| | - | 2.8 | - | - | - | - | - |

TABELA 6- Relação do tamanho dos fragmentos em kilobases, obtidos pela digestão do tDNA com a enzima de restrição HindIII e revelados através de hibridação com as sondas indicadas.

| | ENZIMA | | Hind III | | tDNA | | |
|--------|--------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
| SONDAS | | | | | | | |
| cob | - | 2.7 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 2.3 | 2.3 |
| | 2.0 | - | 2.0 | 2.0 | 2.0 | - | - |
| | - | - | - | - | - | 1.8 | 1.8 |
| | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | - | - |
| | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | - | - |
| coxIII | - | - | - | 5.8 | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | 5.4 |
| | - | 5.0 | - | - | 5.0 | - | - |
| | - | - | - | 4.2 | - | - | - |
| | - | - | 3.8 | - | - | 3.8 | - |
| | 3.6 | - | - | - | - | - | - |
| rrn18S | 7.2 | 7.2 | 7.2 | 7.2 | 7.2 | 7.2 | 7.2 |
| | - | - | - | - | - | 6.8 | 6.8 |
| | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | 3.9 | - | - |
| ATP9 | 13.0 | - | 13.0 | 13.0 | 13.0 | - | - |
| | - | 7.4 | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | 7.0 | 7.0 |
| | - | - | - | 5.4 | 5.4 | - | - |
| ATP6 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | - | - | - | - |
| | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| | 2.3 | - | - | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 2.3 |
| | - | - | 1.3 | - | - | - | - |
| | - | 1.2 | - | - | - | - | - |
| | - | 0.8 | - | - | - | - | - |
| ATPa | - | 0.7 | - | - | - | - | - |
| | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |
| | - | - | - | - | - | 6.0 | 6.0 |
| | - | - | 3.8 | 3.8 | 3.8 | - | - |
| | 3.5 | - | - | - | - | - | - |
| | - | 2.7 | - | - | - | - | - |

Continuação da Tabela 6.

| | TK81-0 | TK81-MS | B. marit. | B. lomat. | B. trigyna | B. webb. | B. patellar. |
|--------|--------|---------|-----------|-----------|------------|----------|--------------|
| SONDAS | | | | | | | |
| ATPb | 5.4 | 5.4 | 5.4 | 5.4 | 5.4 | 5.4 | 5.4 |
| | - | - | - | - | - | 5.0 | - |
| | 3.0 | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | 2.7 | 2.7 | - | - |
| | - | 2.6 | - | - | - | - | - |