

**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

**Tipagem molecular e evolução do gênero *Paracoccidioides***

**Marcus de Melo Teixeira**

**Brasília - DF**

**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Medicina**

**Março/2008**

**Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular**

**Tipagem molecular e evolução do gênero *Paracoccidioides***

**Dissertação de mestrado desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular, UnB e apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas - Patologia Molecular.**

**Orientado: Marcus de Melo Teixeira  
Orientadora: Maria Sueli Soares Felipe**

**Brasília Março/2008**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha família que me ampara durante a minha caminhada pela vida, especialmente à minha mãe Luzia Fádía, meu pai Cecílio, minhas avós Cota e Cidália (*in memorium*), meus avôs Teo e João Mário (*in memorium*), minha madrinha Nadia e minha namorada Amanda que sempre estiveram comigo nos melhores e piores momentos de minha vida acadêmica.

### *Frases de Charles Darwin*

"Um homem que ousa desperdiçar uma hora ainda não descobriu o valor da vida."

"Um homem da ciência não deve ter desejos, nem afeições, somente um mero coração de pedra."

"Na sobrevivência dos indivíduos e raças favorecidas, durante a luta constante e recorrente pela existência, vemos uma forma poderosa e incessante de seleção."

"Não consigo me convencer de que um Deus caridoso e onipotente teria propositalmente criado vespas parasitas com a intenção expressa de alimentá-las dentro de corpos vivos de lagartas."

"Para ser um bom observador é preciso ser um bom teórico."

## **Agradecimentos**

Agradeço a toda minha família pelo apoio e por me amparar sempre quando foi preciso

Agradeço em especial a minha orientadora Maria Sueli Felipe pelos seus conselhos não só durante as discussões experimentais mais sim os conselhos que sempre foram guardados como lição de vida. Agradeço todo apoio as minhas idéias que sempre as acatou com maior carinho. Agradeço a ela todo o tempo que passamos juntos trabalhando não importando o dia, até cedendo seu tempo de descanso para dedicar toda sua atenção. Sem ela nada disto teria sido realizado.

Aos professores do nosso laboratório de Biologia Molecular: Marcelo Brígido, Andréa Maranhão, Fernando Araripe, Lídia Pepe, Ildinete Pereira, por sempre atenderem a qualquer dúvida e compartilharem de momentos de descontração durante os momentos livres.

Agradeço a todos os meus colegas de grupo: Larissa, Simoneide, Hugo, André Amaral, Alice, Viviane Furlan, Lorena, Maria José e também todos aqueles estudantes de iniciação científica que estão começando sua vida na pesquisa em nosso laboratório

Obrigada a D. Fátima e D. Ivanildes por sempre serem atenciosas e amigas em nosso dia-a dia

Meu agradecimento especial aos órgãos financiadores de nosso fomento para a pesquisa CNPq/MCT/FAP-DF

## Resumo

A PCM é uma micose sistêmica que ocorre em vários países da América Latina, principalmente Brasil, Venezuela e Colômbia e, afeta principalmente indivíduos da população rural. Estudos de variabilidade genética de isolados do *Paracoccidioides brasiliensis*, utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares, já mostraram uma alta variabilidade genética deste patógeno. O isolado Pb01, em especial, diverge das 3 espécies filogenéticas identificadas previamente (S1, PS2, PS3) e sua classificação taxonômica dentro do gênero *Paracoccidioides* ainda permanece não definida. Neste trabalho, foram identificados mais 16 isolados que apresentaram um genótipo semelhante ao Pb01, por análise de um marcador molecular presente no *ítron1* do gene *hsp70*, os quais foram denominados “*Pb01-like*”. Utilizando a metodologia do reconhecimento de espécies filogenéticas pela concordância genealógica (GCPSR), este trabalho teve como objetivo investigar a existência de um grupo sistematicamente significativo que abrigasse estes isolados do tipo “*Pb01-like*”, em uma amostragem total de 88 isolados. Para análise filogenética foram utilizados os métodos de máxima parcimônia e análise de Bayes de 13 *loci* polimórficos, tanto individuais ou concatenados, o que permitiu agrupar estes isolados “*Pb01-like*” em um grupo filogenético separado das 3 espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3. Foi detectado um alto número de polimorfismos fixados entre os dois grupos geneticamente isolados, o que sugere um bloqueio do fluxo gênico entre eles. O evento de especiação do grupo filogenético “*Pb01-like*” é simpátrico uma vez que compartilha algumas regiões geográficas das outras 3 espécies filogenéticas. Os dois grupos, “*Pb01-like*” e S1,PS2,PS3, são altamente divergentes e o tempo médio estimado de isolamento genético entre eles foi de 19 milhões de anos atrás. A análise de recombinação possibilitou detectar que o evento de recombinação ocorre dentro das duas populações de forma separada, o que é compatível com o isolamento reprodutivo. De acordo com o critério do método de reconhecimento de espécies filogenéticas pela concordância genealógica (GCPSR) o grupo “*Pb01-like*” pode ser considerado uma nova espécie filogenética, diferente das três espécies filogenéticas previamente mencionadas (Matute *et al.*, 2006), uma vez que o clado correspondente aos isolados “*Pb01-like*” aparece fortemente sustentado nas genealogias geradas a partir dos dados de polimorfismo de 13 *loci* analisados, tanto simples como concatenados, com valores de probabilidade

posterior (1.0) e “bootstrap” (100%) altamente significantes. Análise sobre características morfológicas, possibilidade de cruzamento genético, características fenotípicas e da doença (PCM), utilizando isolados representativos dos 2 grupos, se encontram em andamento. Se forem confirmadas as características exclusivas e específicas para cada grupo aqui identificado, em conjunto com os dados de filogenia molecular, isto sustentaria fortemente a descrição formal de uma nova espécie para o gênero *Paracoccidioides*. e devido a grande relevância deste patógeno na área médica na América Latina seria importante nomear o clado “*Pb01-like*”. Uma nova nomenclatura pode facilitar a comunicação entre médicos patologistas e pesquisadores da área. Para a espécie filogenética correspondente aos isolados “*Pb01-like*” sugere-se a descrição formal de uma nova espécie: *Paracoccidioides lutzii*, em tributo ao médico micologista Adolpho Lutz, que foi o pioneiro a descrever o fungo patogênico humano *P. brasiliensis* há exatamente 100 anos atrás (1908).

## Abstract

Paracoccidioidomycosis is a systemic illness with an area of occurrence covering most of Latin America, with highest prevalence in Brazil, Venezuela and Colombia, and that affects mainly individuals living in the countryside. Studies on difference isolates of the causative agent, *Paracoccidioides brasiliensis*, have revealed a great degree of genetic variability in this pathogen. The Pb01 isolate, in particular, differs from the three previously described phylogenetic species (S1, PS2 and PS3; Matute *et al.*, 2006) and its taxonomic classification in the genus *Paracoccidioides* remains undefined. In the present work, sixteen isolates genotypically similar to Pb01 have been identified by analysis of a molecular marker from the first intron of the *hsp70* gene; these isolates have been dubbed 'Pb01-like'. Using the method of recognition of phylogenetic species by genealogic concordance (GCPSR), this work aimed at looking into the existence of a systematically significant group of 'Pb01-like' isolates from a total of 88 samples. For phylogenetic analysis the methods of maximal likelihood and Bayesian analysis were applied to thirteen polymorphic regions, including individual and concatenated loci. This allowed the grouping of the 'Pb01-like' isolates in a phylogenetic group distinct from S1, PS2 and PS3. A high number of fixed polymorphisms was identified between the 'Pb01-like' cluster and that composed of the other three species, which suggests a blockage of all genetic flow between them. The speciation event that defined the new phylogenetic group is sympatric relative to S1 and PS2. The group that includes S1, PS2 and PS3 and the 'Pb01-like' cluster are highly divergent and have been genetically isolated for about 19 million years. Recombination analysis revealed that recombination events occur independently inside the two groups, which suggests reproductive isolation. In keeping with GCPSR, the 'Pb01-like group' can be considered a new phylogenetic species distinct from the other three, since the clade corresponding to 'Pb01-like' isolates is strongly supported by all pedigrees independently generated from polymorphism data of the thirteen loci, with values of posterior probability (1.0) and of bootstrap agreement (100%) highly significant. Further analysis of morphological, phenotypical and pathogenic profiles, and of the possibility of mating, is under way for isolates representative of all species. If exclusive and specific characteristics are identified for the 'Pb01-like' group, this would justify, in



conjunction with molecular phylogeny data, the formal description of a new species for the genus *Paracoccidioides*, which would be accompanied by a renaming of the group, in the light of the medical relevance of this pathogen in Latin America. A new nomenclature would obviously ease information exchange among pathologists and researchers. We suggest formally to name the phylogenetic species encompassing the 'Pb01-like' clade as *Paracoccidioides lutzii*, as a tribute to medical mycologist Adolpho Lutz, who first described human pathogen *P. brasiliensis* exactly one hundred years ago.

# Índice

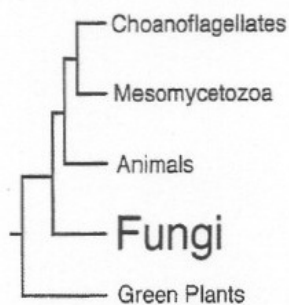
<b>Agradecimentos</b> .....	5
<b>Resumo</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	8
<b>1) Introdução</b> .....	12
O reino <i>Fungi</i> .....	12
<i>Ascomycota</i> .....	14
Reprodução em fungos.....	17
Recombinação sexual em fungos.....	20
Definição de espécies em fungos.....	21
Detecção de espécie morfológica.....	22
Detecção de espécie biológica.....	22
Detecção de espécie filogenética.....	24
Paracoccidioides brasiliensis e a doença Paracoccidioidomicose (PCM).....	26
Avanços moleculares em <i>P. brasiliensis</i> .....	28
Habitat e nicho ecológico de <i>P. brasiliensis</i> .....	30
Estudos genéticos em <i>P. brasiliensis</i> .....	32
Diversidade genética em <i>P. brasiliensis</i> .....	33
<b>2) Objetivos</b> .....	36
Objetivos específicos.....	36
<b>3) Justificativa</b> .....	37
<b>4) Materiais e Métodos</b> .....	38
Cultivo de isolados de <i>P. brasiliensis</i> e extração de DNA.....	38
Identificação de isolados com genótipo “ <i>Pb01-like</i> ” através do marcador molecular PLMMT1/HSPMMT1.....	38
Amplificação por PCR e sequenciamento dos 13 <i>loci</i> nucleares para os 17 isolados “ <i>Pb01-like</i> ”.....	42
Análise filogenética.....	47
Detecção de recombinação.....	51
<b>5) Resultados</b> .....	52
Análise dos isolados para o marcador molecular <i>hsp70</i> e amplificação dos 13 <i>loci</i> polimórficos.....	53
Análise de polimorfismo dos 13 <i>loci</i> gênicos.....	54

Análise filogenética dos loci individuais para os dois conjuntos de dados.....	57
Análise filogenética dos loci concatenados para os dois conjuntos de dados.....	65
Análise da relação filogenética dos grupos “ <i>Pb01-like</i> ”, S1, PS2, PS3 com os demais membros da família <i>Ajellomycetacea</i> .....	72
Quantificação do tempo de divergência genética.....	72
Análise de recombinação genética intra e inter-grupos.....	74
<b>6) Discussão.....</b>	<b>76</b>
<b>7) Conclusões.....</b>	<b>87</b>
<b>8) Referências Bibliográficas.....</b>	<b>89</b>
<b>9) Anexos.....</b>	<b>105</b>
Anexo 1.....	105
Anexo 2.....	145
Trabalhos submetidos como co-autor.....	156

## Introdução

### O reino *Fungi*

O reino fungi possui uma ampla distribuição global e interage das mais variadas formas com micro e macrorganismos. Variam de tamanho microscópico e unicelular até colônias multicelulares. Atualmente estão descritas cerca de 70.000 espécies, entretanto estima-se que possam existir cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos (Hawksworth, 1991; Hawksworth *et al.*, 1995). O reino tem origem monofilética e compartilha alguns grupos-irmãos de eucariotos; os animais divergiram dos fungos há cerca de 0.9 - 1.6 bilhões de anos atrás. O surgimento dos fungos ocorreu no período de escala de tempo geológico proterozóico tardio (900-570 milhões de anos atrás) e hoje constituem um grupo independente como são também os animais e plantas. O agrupamento de animais e fungos como grupos irmãos ainda é controverso, uma vez que resultados de análises filogenéticas de genes codantes ora suporta a associação ora não (Wang *et al.*, 1999; Loitynoja & Milinkovitch, 2001; Hedges *et al.*, 2004) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Árvore filogenética mostrando as relações dos fungos, animais e plantas, baseados em seqüências nucleotídicas das regiões nSSU e rDNA. (Extraído de “Assembling the Tree of Life”. Cracraft, J e M. J. Donoghue, pg 171-194, 2004. Oxford University Press.).

Os fungos são organismos heterotróficos como os animais. Desde leveduras unicelulares a longas hifas, os fungos são capazes de absorver moléculas simples e transformá-las em polímeros complexos como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Na natureza, à parte do fogo, quase todo carbono biológico é reciclado por microrganismos. Os fungos participam de muitas relações de simbiose, as mais comuns em nosso ambiente são: líquens em associação com algas e cianobactérias, fungos-micorrizas em associação com raízes de plantas e no interior de plantas como fungos endofíticos. Quase um quarto de todos os fungos descritos ocorre na forma de líquens, sendo este último o de vida menos complexa (Brodo *et al.*, 2001). Quase todas as espécies de plantas

estão associadas com micorrizas, constituindo-se em um bom indicador fóssil e filogenético de que as primeiras plantas terrestres já possuíam fungos rizomas (Smith & Read, 1997).

A diversidade de adaptação dos fungos permitiu a colonização de ambientes mais complexos tais como os animais, rompendo as barreiras imunológicas e criando micro-ambientes propícios para sua perpetuação (Romani *et al.*, 2003). A associação de plantas com os fungos endofíticos aprimorou a adaptação das plantas ao ambiente (Clay, 2001). A relação de simbiose com animais varia desde associações com pequenas formigas e outros insetos até intestinos de animais ruminantes e herbívoros (Blackwell, 2000). Além disto, muitos insetos são capazes de ocupar novos *habitats* devido à interação com leveduras intestinais que dispõem de enzimas digestivas permitindo a sobrevivência destes insetos (Suh *et al.*, 2003).

Os fungos também são conhecidos como parasitas. O espalhamento de patógenos de plantas como a ferrugem do arroz está associado ao transporte intercontinental de fungos. Este transporte trans-oceânico e trans-continental se deve a eventos de dispersão principalmente de esporos desses patógenos por tempestades de ventos (Kellogg & Griffin, 2006). Além das plantas, os fungos possuem a capacidade de causar doenças em humanos podendo até levar a morte. Os casos mais graves de infecções sistêmicas ocorrem preferencialmente em indivíduos com imunidade deprimida e dentre os principais patógenos destacam-se: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Os fungos podem se acasalar e através do processo da meiose gerar sua progênie, a qual possui genótipos recombinantes, ou então utilizar o evento de mitose para a geração de uma progênie clonal com genótipos idênticos (Alexopoulos *et al.*, 1996) formando esporos. Estes possuem a capacidade de dispersão tanto em curtas distâncias como migração intercontinental, resistindo às condições ambientais adversas. Os fungos buscam parceiros, estabelecendo comunicação com outros indivíduos via sinalização de ferormônios, podendo variar de compostos orgânicos, produzidos por indivíduos dos filos *Chytridiomycota* e *Zygomycota*, até oligopeptídeos produzidos por *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Os esporos podem tanto germinar para produzir uma hifa ou germinar por brotamento gerando leveduras.

Dentro do reino monofilético dos fungos, cinco grandes filos importantes são geralmente encontrados: *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota*, *Chytridiomycota* e *Glomeromycota*. Análises de nSSU e rDNA mostram que os filos *Ascomycota*,

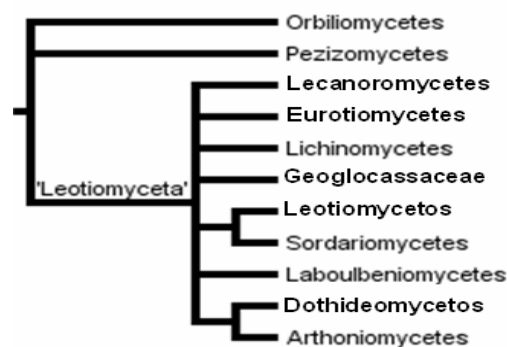
*Basidiomycota* e *Glomeromycota* são monofiléticos (possui um único ancestral comum), porém os filos *Zigomycota* e *Chytridiomycota* não são facilmente definidos quanto a sua monofilia (possui mais de um ancestral comum). Estudos recentes utilizando as seqüências nucleotídicas de seis genes nucleares de 200 espécies de fungos mostraram que o filo *Chytridiomycota* é polifilético. A sua semelhança com formas flageladas aquáticas simples sugere que estes sejam o ancestral direto dos fungos acompanhado da perda do flagelo que coincidiu com o mecanismo de dispersão de esporos (zoósporos) (James *et al.*, 2006). Os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* compartilham características morfológicas e fisiológicas comuns como, por exemplo, septos espaçados regularmente em suas hifas, oligopeptídeos como ferormônios sexuais e durante o acasalamento e a fusão nuclear, surgem núcleos dissimilares pareados na hifa acasalada (dicácion).

### ***Ascomycota***

Os ascomicetos ou “fungos de saco” (ascus, saco; mycetos, fungi) formam o maior grupo existente, possuindo aproximadamente 45.000 espécies sexuadas e/ou assexuadas. Os ascomicetos incluem muito dos fungos conhecidos que fazem parte do cotidiano de nossa civilização, tanto na alimentação como na medicina. São organismos modelo para o estudo de mecanismos moleculares de células eucarióticas nos quais os maiores avanços na ciência vêm ocorrendo. Alguns exemplos destes fungos incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (levedura comercial usada em processos fermentativos), *Penicilium chrysogenum* (produtor do antibiótico penicilina), *Tolypocladium inflatum* (produtor da droga imunossupressora ciclosporina A usada em transplantes), e *Neurospora crassa* (organismo-modelo por possuir uma genética bem dominada, mecanismos de reprodução bem conhecidos e por ter ciclo de vida haplóide). Muitos indivíduos membros dos ascomicetos podem causar doenças em humanos e em outros organismos de importância ecológica e econômica. Dentro deste grupo destacam-se os fungos *Aspergillus flavus* (fitopatógeno do amendoim, produtor da aflotoxina, agente carcinogênico natural para o homem), a *Candida albicans* (patógeno humano e agente etiológico da candidíase), *Pneumocystis carinii* (causador da pneumonia em pessoas imunocomprometidas), e *Magnaporthe grisea* (causadora da doença do arroz denominada de brusone).

Os ascomicetos são considerados um “grupo-irmão” dos basidiomicetos e estudos de filogenia molecular mostram que ambos compartilham um ancestral muito mais recente do que quando comparado com outros filos, como os zigomicetos e chytridiomicetos. A comparação de genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs) e genes da família das

RNA polimerases, especialmente a RNA polimerase II subunidade B, sustentam a monofilia do filo *Ascomycota*, o qual possui três subfilos: *Taphrinomytina* (Arquiascomicetos), *Saccharomicotina* (Hemiascomicetos) e *Pezizomicotina* (Euascomicetos) (Barbee & Taylor 1993, Lutzoni *et al.*, 2001, Barbee & Taylor 2006). O subfilo *Pezizomicotina* é o maior contendo mais de 90% dos membros dos ascomicetos, sendo que mais de 32.000 espécies já foram descritas (Kirk *et al.*, 2001). A classificação dos ascomicetos produtores de esporocarpos era antes baseada em variadas interpretações de morfologia e desenvolvimento da ascomata (esporocarpos) e o asco (meiosporângia). Alguns estudos revelam que a presença da apoteca é uma característica plesiomórfica (característica herdada) do subfilo *Pezizomicotina*. Dentro deste subfilo, baseado em características morfológicas e desenvolvimento da ascomata e do asco, quatro principais classes foram definidas: Discomicetos, Pirenomicetos, Plectomicetos e Loculoascomicetos (revisado em Alexopoulos *et al.*, 1996). No entanto, a análise filogenética de cinco “*loci*” nucleares rejeita esta classificação e sustenta a existência de pelo menos 10 cladoss reconhecidos: Pezizomicetos, Orbiliomicetos e Artroniomicetos, Dothideomicetos, Laboulbeniomicetos, Lecanoromicetos, Eurotiomicetos, Lichinomicetos, Leotiomicetos e Sordariomicetos e Geoglossaceae. O grupo dos Geoglossaceae foi adicionado ao clado dos Leotiomicetos, porém esta classificação ainda é controversa. (Stapafora *et al.*, 2006). (Figura 2).



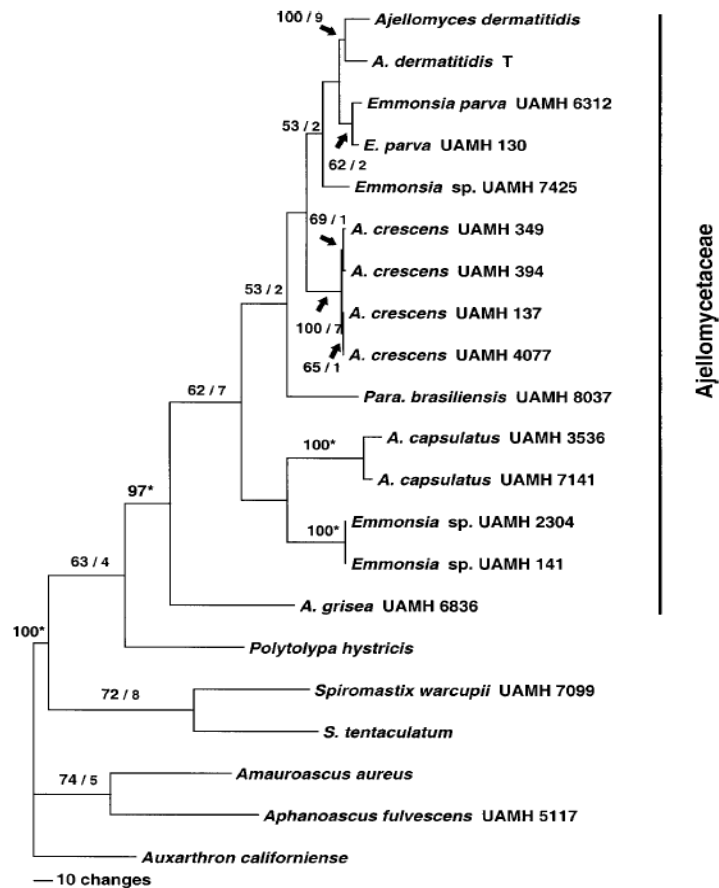
**Figura 2.** Representação da última classificação sistemática do Subfilo Pezizomicotina através da reconstrução filogenética (máxima parcimônia com peso e máxima verossimilhança) de cinco genes nucleares proposta por Stapafora *et al.*, 2006.

A classe dos eurotiomicetos, pertencente à superclasse Leotiomiceta, é caracterizada por possuir dois cladoss importantes: as subclasses Eurotiomicetidae e Caetotiriomicetidae. A grande maioria dos Pezizomicotina patógenos humanos são

Eurotiomicetos, particularmente os da ordem Eurotiales, Onygenales e Caetotyriales. Devido à ampla importância da sua contribuição para pesquisa básica e saúde pública, vários projetos genoma vêm focando em espécies de Onigenales (*Histoplasma capsulatum*) e Eurotiales (*Aspergillus fumigatus*) (Geiser *et al.*, 2006). Os *Onigenales* constituem um grupo monofilético dentro dos ascomicetos, incluindo espécies com a ascomata do tipo gimnoteca ou cleistoteca, asco evanescente, ascósporos unicelulares e aleurioconídios ou artroconídios anamorfos. Dentro dos *Onigenales* encontra-se a família *Onigenaceae* que inclui espécies com ascósporos ranhurados e anamorfos. Estudos filogenéticos de genes nucleares realizados com 61 taxons *Onigenales* mostraram que esta família possui clados não correspondentes às famílias previamente descritas com dados de estudos de ecologia, sistemática molecular e morfologia (Currah, 1997 e Sugiyama *et al.*, 1999). Um clado distinto da família *Onygenaceae* (**Figura 2**) foi encontrado incluindo os gêneros *Ajellomyces* (indica a forma sexuada destes fungos - como *Blastomyces* e *Histoplasma*) *Emmonsia* e *Paracoccidioides*. Os membros deste clado são fungos saprófitas, dimórficos e patogênicos associados a vertebrados, distintos por sua ascomata globosa com acessórios em espiral, ascósporos achatados nos pólos e falta de atividade queratinolítica. Baseado em dados moleculares, morfológicos e similaridades fisiológicas, Untereiner *et al.*, 2004 descreveram uma nova família, *Ajellomycetaceae* (**Figura 3**). Estudos filogenéticos avaliando as relações de *Lacazia loboi* com os outros membros da família *Ajellomycetaceae* mostraram que esta espécie está contida dentro desta família e que é o grupo-irmão de *P. brasiliensis* (Herr *et al.*, 2001; Untereiner *et al.*, 2004).

Dentro desta família, o gênero *Paracoccidioides* merece extrema atenção quanto a sua representatividade e relevância na saúde pública na América Latina, por causar a micose sistêmica de maior frequência nesta região, sendo a espécie *P. brasiliensis* o objeto de estudo desta dissertação de mestrado.





**Figura 3.** Relações filogenéticas da família Ajellomycetaceae deduzida pelos dados de seqüências combinadas referente às regiões ITS, LSU parcial e seqüências de rDNA. Esta árvore de máxima parcimônia foi gerada a partir de uma análise heurística de 1149 pb para 21 taxons (CI = 0.654, RI = 0.632). Os valores de “bootstrap” maiores que 50% calculados de 1000 randomizações são dispostos em cima dos ramos ou nas linhas diagonais dos ramos. O táxon designado grupo externo foi *Auxarthron californiense*. (extraído de Untereiner *et al.*, 2004).

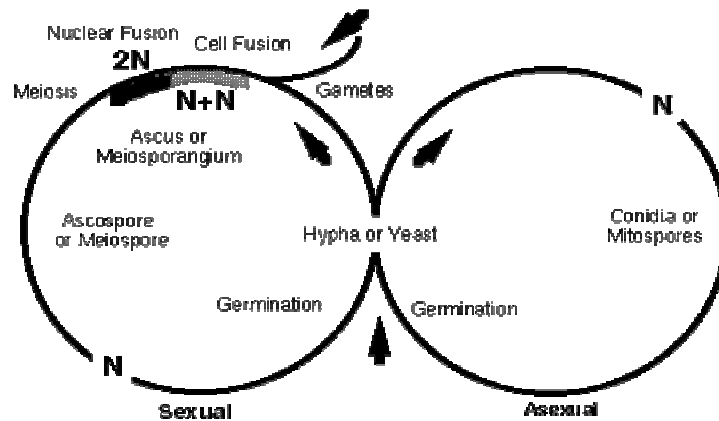
### Reprodução em fungos

As espécies sexuadas são caracterizadas pela produção de meiosporos (ascósporos) que ficam alojados em células na forma de saco (asco). Os ascos são constituídos por ascósporos (esporos sexuais) decorrentes da fusão de dois núcleos haplóides (cariogamia). O núcleo diplóide sofre redução meiotica e dá origem a 4 núcleos haplóides. Cada núcleo haplóide, por sua vez, sofre uma mitose resultando em 8 núcleos haplóides que são posteriormente empacotados dando origem aos ascósporos. Os ascósporos são formados dentro dos ascos pelo sistema de empacotamento de membranas, caráter único compartilhado pelos ascomicetos. O duplo sistema de membranas empacota cada núcleo

com seu citoplasma e organelas adjacentes e fornece o local para a formação da parede do ascósporo. Estas membranas são aparentemente derivadas da membrana plasmática do asco na maioria das espécies filamentosas, e da membrana nuclear na maioria das leveduras (Wu e Kimbrough, 1992; Raju, 1992).

Dentro do grupo dos ascomicetos, existem duas principais formas celulares: espécies que formam micélio ou filamentos, frequentemente ramificados designados de hifas e a levedura. A hifa exibe um crescimento atípico e nos ascomicetos elas são compartimentalizadas em septos espaçados, originados pelo crescimento centrípeto da parede celular. Os septos são relativamente simples em sua morfologia e possuem poros que permitem conectividade citoplasmática entre os compartimentos da hifa. A segunda mais importante forma de crescimento encontrada nos ascomicetos é a levedura, uma célula simples que se multiplica por brotamento. Ambos, micélio e levedura, têm parede celular constituída por proporções variadas de quitina e  $\beta$  ou  $\alpha$ -glucana (Wessels, 1994). Muitas espécies de ascomicetos são dimórficas, transitando entre a fase filamentosa e a leveduriforme, como por exemplo, os fungos *C. albicans*, *C. immitis*, *Coccidioides posadasii*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* e *Penicillium marneffeii*. Espécies diplóides são também observadas entre os ascomicetos como, por exemplo, o fungo dimórfico patogênico *C. albicans* ou espécies que possuem estágios em seu ciclo de vida diplóide como, por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* entre outros. É importante notar que as características morfológicas da hifa ou da levedura são consideradas relevantes para definir as relações taxonômicas entre as várias espécies; mais recentemente os dados moleculares de seqüências gênicas corroboram, reforçam e em muitos casos eliminam possíveis dúvidas de taxonomia que não podem ser resolvidas apenas por caracteres morfológicos, fisiológicos e/ou comportamento de reprodução.

Os fungos possuem mais de uma opção reprodutiva, fenômeno este intitulado de pleomorfia (Sugiyama, 1987). É mais comum nos ascomicetos podendo produzir esporos tanto assexuadamente (conídios ou mitósporos) ou sexuadamente (ascósporos ou meiospóros) (**Figura 4**). Muitas espécies são capazes de reproduzir somente por ascósporos e muitas outras se reproduzem somente via produção de conídios. O ascósporo é modelado dentro do asco com nove células da parede celular. Os conídios contêm núcleo mitótico, e sua parede celular é uma extensão ou modificação da parede de uma hifa ou levedura pré-existente.



**Figura 4.** Representação esquemática das formas de reprodução em fungos. No processo assexuado células especializadas são envolvidas na produção de conídios ou mitósporos resultantes de eventos mitóticos. No processo sexuado existe a necessidade de existir fungos de tipos sexuais diferentes. Neste caso ocorre a fusão das células e núcleos, acompanhado por etapas de mitose e meiose para a produção dos meiospores ou ascósporo. Figura extraída de <http://plantbio.berkeley.edu/~taylor/>.

Nos ascomicetos, o conídio pode ser produzido por uma hifa especializada (hifa conidiogênica) que pode variar de estruturas sutilmente diferenciadas do micélio (*Geotrichum candidum*, Cole, 1976) a hifas elaboradas, que formam verdadeiros ramos de conídios ornamentados (*Aspergillus niger*, Anderson & Smith, 1971). A classificação de uma nova espécie no grupo dos ascomicetos é baseada em características de reprodução sexual, e por isto espécies que se reproduzem somente assexuadamente têm sido problemáticas para serem integradas dentro da classificação dos ascomicetos. Esse sistema de classificação de fungos vem sendo complementado e aprimorado após o desenvolvimento de ferramentas moleculares, área esta denominada de filogenia molecular, onde espécies sexuadas ou assexuadas podem ser posicionadas em um sistema comum de classificação, baseado na comparação de seqüências nucleotídicas distribuídas em seus genomas (Taylor, 1995; Taylor *et al.*, 2000).

Ascósporos e conídios são propágulos capazes de dispersar e colonizar um substrato ou hospedeiro adequado. Os ascósporos podem ser ejetados do asco resultante de uma erupção extremamente forte ou podem ser passivamente liberados pela quebra mecânica da parede do asco. Os conídios podem ser produzidos em uma massa seca e dispersos pelo vento ou serem produzidos em meio aquoso ou viscoso e dispersos pela água ou por artrópodes. Na maioria das espécies de ascomicetos ambos os conídios e ascósporos são

capazes de germinar e dar origem a um micélio haplóide. Os ascomicetos podem ser homotáticos (capazes de realizar auto-fecundação) ou heterotáticos (necessitam de duas formas sexuais para fecundação). Os mecanismos moleculares da regulação genética da expressão do sexo e do acasalamento são entendidos em vários membros dos ascomicetos, como a levedura de brotamento (*Saccharomyces cerevisiae*), levedura de fissão (*Schizosaccharomyces pombe*) e *Neurospora crassa*. Estes fungos possuem dois sexos e o acasalamento é coordenado por ferormônios oligopeptídicos. Em espécies de leveduras, células individuais leveduriformes de sexos opostos (a e  $\alpha$ ) funcionam como gametângias e se fundem para formação do zigoto, o qual se torna um asco após a cariogamia e meiose. Nas espécies filamentosas, a gametângia-fêmea (ascogônia) é produzida e fertilizada tanto pela gametângia-macho ou por conídios que funcionam como espermatíde. Neste último exemplo, a fusão citoplasmática (plasmogamia) não deve ser imediatamente acompanhada da cariogamia, levando a uma pequena fase onde dois núcleos diferentes ocupam o mesmo segmento de hifa. Esta hifa dicariótica pode ser protegida e nutrida por hifas haplóides diferenciadas, formando o corpo de frutificação. Os sacos são produzidos a partir da hifa dicariótica originada da reprodução sexuada. Em alguns casos o asco pode ser semi-aberto por uma “tampa” nos quais os ascósporos são liberados. Há casos em que o asco não é semi-aberto então os ascósporos são liberados através de poros ou fendas apicais.

### **Recombinação sexual em fungos**

O evento de recombinação relatado em fungos é causado, na maioria das vezes, pela reprodução sexuada em seu ciclo de vida. A detecção da ocorrência de recombinação pode ser identificada por análise de filogenia molecular, onde espécies posicionadas em clados divergentes surgem devido a processos evolutivos de seleção natural e especiação, o que pode acarretar severas mudanças de fenótipos entre estas espécies, tais como estratégias de adaptação, virulência, patogenicidade, entre outros. Dois núcleos haplóides de isolados sexuais diferentes unem-se para formação do núcleo diplóide (zigoto). O zigoto se divide por meiose e produz novas células haplóides. A recombinação genética ocorre durante a divisão meiótica do zigoto, em que parte das cromátides (e os genes que eles carregam) de um cromossomo do par são substituídos por partes das cromátides do cromossomo do outro componente.

A recombinação sexual dentro das espécies dos microrganismos patogênicos também pode ser detectada pela presença de fatores de transcrição ( $\alpha$ -box e HMG) que

determinam o sexo e controlam a síntese de ferormônios, responsáveis pelo acasalamento dos fungos, como em *N. crassa* (Glass *et al.*, 1990), *S. pombe* (Fukui *et al.*, 1986) *S. cerevisiae* (Wilkinson & Pringle, 1974). Os ferormônios sexuais também já foram identificados e purificados em fungos patogênicos como *C. neoformans* (Kwon-Chung *et al.*, 1992.), *C. albicans* (Bennett *et al.*, 2003) e *H. capsulatum* (Bubnick & Smulian, 2007). Estes fungos também são capazes de se reproduzirem sexuadamente *in culture* e seus fatores transcricionais,  $\alpha$ -box e HMG, também já foram identificados. Em fungos heterotáticos, uma célula normalmente carrega no locus MAT um dos dois tipos de alelos que codificam para estes dois diferentes fatores de transcrição (Fraser *et al.*, 2007). A presença destas seqüências responsáveis pela sexualidade (no locus MAT) no genoma de fungos indica fortes evidências de reprodução sexuada também nas espécies de *C. immitis* e *posadasii* onde este evento nunca foi demonstrado *in vitro* ou observado *in vivo* (Fraser *et al.*, 2007). Recentemente, o nosso grupo identificou no genoma do isolado Pb3 ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis.1/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.1/MultiHome.html)) e também no transcriptoma do isolado Pb01 (Felipe *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005) as seqüências gênicas que codificam os fatores transcricionais  $\alpha$ -box e HMG bem como as proteínas que participam do ciclo sexual já descritos em outros fungos, como por exemplo, receptores dos ferormônios, moléculas de processamento de ferormônios e outros (Teixeira *et al.*, trabalho em andamento).

Outra maneira de se gerar recombinação em fungos é através da parasexualidade que complementa a reprodução sexuada e assexuada em fungos como *A. nidulans*, *M. grisea* e *Rhynchosporium secalis* (Zeigler *et al.*, 1997; Newman & Owen, 1985; Pontecorvo *et al.*, 1953). Este processo envolve a anastomose da hifa haplóide, formação do heterocário, acompanhado pela cariogamia, resultando em um núcleo diplóide. Após o *crossing-over* mitótico, o núcleo diplóide instável começa perder seus cromossomos aleatoriamente e retorna ao seu estado haplóide por sucessivas divisões mitóticas, resultando eventualmente em célula haplóide geneticamente diferente daquela que lhe deu origem (Becker *et al.*, 2006).

### **Definição de espécie em fungos**

O conceito de definição de espécie evolutiva resume-se em “... *a single lineage of ancestor-descendent populations which maintains its identity from other such lineages and which has its own evolutionary tendencies and historical fate*” (definido por Willey, 1978).

O conceito de espécie morfológica (CEM), espécie biológica (CEB) e espécie filogenética (CEF) foram introduzidos para impor critérios específicos no reconhecimento de espécies evolutivas. Nenhum método de reconhecimento de uma nova espécie detecta o exato momento em que indivíduos de uma espécie ancestral se decompõem em espécies progênie, pois muito tempo pode ter passado antes que alterações na morfologia, nos padrões de acasalamento ou nas seqüências de DNA ocorram e possam ser reconhecidas na espécie progênie. Nos fungos, as análises filogenéticas de seqüências de nucleotídeos polimórficos são as que mais se aproximam dos métodos de reconhecimento de espécies e são também concordantes com o conceito de espécie evolutiva. O reconhecimento de espécie através de filogenia molecular se tornou um método de análise bastante difundido, pois alterações nas seqüências de nucleotídeos em diferentes *loci* podem ser detectadas antes mesmo que ocorram mudanças morfológicas ou nos padrões de acasalamento (Taylor *et al.*, 2000); que, de fato começam a ocorrer assim que uma progênie de uma espécie evolutiva surge a partir de um ancestral.

### **Detecção de espécie morfológica**

A descrição da maioria das espécies de fungos até hoje, cerca de 70.000, tem sido feita pela identificação de caracteres morfológicos ou fenotípicos, tais como: crescimento em diferentes temperaturas, produção de metabólitos específicos ou a presença de pigmentos, entre outros. Ao reconhecer uma única espécie morfológica não se sabe ao certo quantas espécies evolutivas podem estar presentes dentro do grupo de indivíduos que apresentam determinada característica morfológica analisada e que foi utilizada para descrever a espécie. O estado dos caracteres morfológicos é compartilhado entre as espécies ou possuem uma extensa sobreposição, o que dificulta a sua utilização para a identificação de novas espécies (Steenkamp *et al.*, 2002; Chaverri *et al.*, 2003).

### **Detecção de espécie biológica**

O conceito de espécie biológica foi descrito por Mayr (1940) como sendo “... *groups of actually or potentially interbreeding natural populations which are reproductively isolated from other such groups*”. A primeira aplicação clássica deste conceito em fungos foi com a espécie *Monília sitophila*, definida como espécie baseado em critérios morfológicos, cujos isolados quando submetidos aos testes de acasalamento, davam origem a três grupos reprodutivamente isolados: *Neurospora crassa*, *N. sitophila* e *N. tetrasperma*. Brasier, 1987 listou mais de 40 casos de espécies morfológicas que

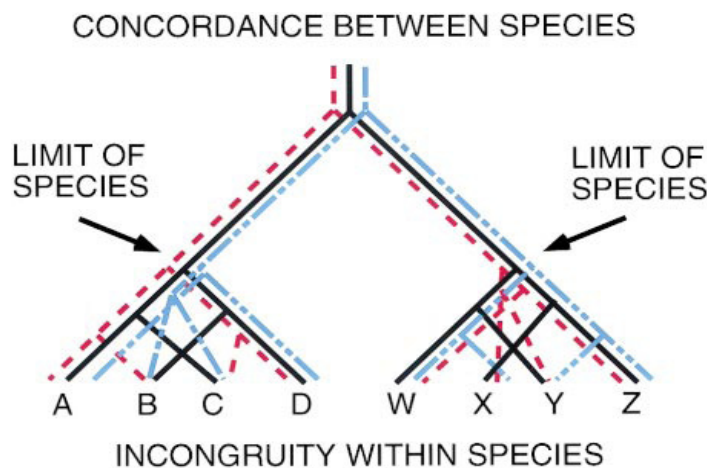
abrigavam mais de uma espécie biológica, geneticamente isolada. A técnica de reconhecimento de espécie biológica pode ser utilizada em fungos apenas para espécies que são compatíveis para o acasalamento. No caso de fungos que não possuem meiosporos, os testes de acasalamento não são possíveis de serem realizados experimentalmente e isso se estende a cerca de 20% das espécies do reino Fungi (Reynolds, 1993). Outros fungos são homotálicos (são auto-férteis, possuem os dois tipos sexuais) e neste caso os meiosporos produzidos não terão um padrão de herança detectável. Nestes fungos, somente a presença de meiosporos não é suficiente para deduzir se ocorre o acasalamento, necessitando-se de marcadores genéticos para assegurar que a progênie possui dois genitores distintos. Além disto, outros fungos heterotálicos que não podem ser manipulados em meios de cultivo para acasalamento “*in vitro*” ou não podem ser cultiváveis, impossibilitam a aplicação das técnicas de reconhecimento de espécies biológicas. Um exemplo deste caso é o basidiomiceto *Pleurotus ostratus*, no qual foram identificados oito grupos interestéreis ou espécies biológicas. Através de análise filogenética de regiões ribossomais repetitivas de indivíduos de cada uma destas espécies biológicas foi demonstrado que três de oito delas continham mais de uma espécie filogenética (Vilgalys & Sun, 1994; Zervakis *et al.*, 2004).

Dentro dos ascomicetos o modelo mais estudado é o do gênero *Neurospora*, devido a sua vasta coleção de 4.500 isolados armazenados no “Fungal Genetics Stock Center” onde os tipos sexuais foram identificados e os cruzamentos intraespecíficos realizados (Perkins & Turner, 1988; Turner *et al.*, 2001). Muitas são as evidências de que a aplicação da técnica de reconhecimento de espécies biológicas em *Neurospora* mascara a existência de grupos geneticamente isolados. Indivíduos de *N. intermédia* e *N. cassa* necessitam de maior número de cruzamentos para se obter novos isolados, pois nem todos os membros destas espécies são capazes de se acasalarem. Estudos filogenéticos realizados com espécies do gênero *Neurospora* sugerem que o complexo da espécie biológica *Neurospora discreta* possui uma grande variedade de espécies filogenéticas (Dettman *et al.*, 2003a). Ao analisar três *loci* microssatélites de 73 indivíduos deste complexo, os autores sugeriram a existência de sete espécies filogenéticas (Dettman *et al.*, 2006). O reconhecimento de espécies biológicas por testes de intercruzamentos não é capaz de distinguir o real fluxo gênico na natureza, não sendo surpresa encontrar espécies biológicas que possuem mais de um grupo geneticamente isolado.

## Detecção de espécie filogenética

Harrington & Rizzo, 1999 definem o método de reconhecimento de espécies filogenéticas como sendo “... *the smallest aggregation of populations with a common lineage that share a unique, diagnosable phenotypic characters*”. Uma grande quantidade de estudos englobando os três métodos de detecção de espécies demonstrou que o reconhecimento de espécies filogenéticas através da concordância genealógica (GCPSR) é bem aceito e se tornou muito comum entre os micologistas. Esta técnica oferece muitas vantagens para quem enfrenta problemas como populações morfologicamente homogêneas ou quando não há conhecimento suficiente a respeito da existência de reprodução sexuada do microrganismo.

De acordo com o método de GCPSR, diferentes *loci* gênicos apresentarão diferentes genealogias dentro da mesma espécie devido à existência do processo de recombinação gênica. Entretanto, entre duas espécies diversas as genealogias para os diferentes *loci* serão concordantes devido aos processos de deriva e de isolamento genético. Pode-se observar este fenômeno na **figura 5** onde duas espécies são identificadas pela concordância genealógica coincidente para os três *loci* gênicos (linhas azul, vermelha e preta, cada uma representando um *locus* gênico). É possível notar que os ramos que separam a espécie formada pelos táxons A, B, C, D e a espécie formada pelos táxons W, X, Y, Z são concordantes para as três genealogias gênicas. Deve-se ressaltar que dentro de cada espécie ocorre um conflito entre os ramos gerados decorrente da recombinação entre os táxons da mesma espécie.



**Figura 5.** Análise simultânea de três genealogias gênicas mostrando como ocorre a transição de concordância entre os dois ramos para a discordância (incompatibilidade) entre os táxons das duas diferentes espécies (extraído de Taylor et al., 2000).



A detecção destes ramos comuns entre árvores gênicas é a chave para identificação de espécies filogenéticas. A perda de um polimorfismo ancestral devido à deriva genética resulta em novas espécies divergentes. Estas passam por estágios de polifilia (grupo onde o táxon possui vários ancestrais comuns), parafilia (grupo que possui um ancestral comum, mas não exclui táxons de diferente ancestralidade) levando a uma eventual monofilia (táxon que possui um único ancestral comum) (Avice & Ball, 1990). Muitos são os exemplos da aplicação deste método para descrever o limite entre espécies tanto para fungos mitospóricos quanto meiospóricos.

O patógeno humano *C. immitis* representa um exemplo de definição de espécies filogenéticas geograficamente distintas. Através da análise de 12 *loci* nucleares (cinco descritos por Koufopanou *et al.*, 1997 e sete descritos por Fisher *et al.*, 2000) de isolados de *C. immitis* (isolados californianos) e *Coccidioides posadasii* (isolados não-californianos) mostraram um alto grau de isolamento genético. O status de nova espécie foi concedido ao grupo não-californiano devido aos cumprimentos dos critérios de concordância entre as genealogias geradas a partir de *loci* únicos e não discordância entre os clados observados nas genealogias gênicas simples, quando comparado com a genealogia gerada pelos *loci* agrupados. O tempo do isolamento genético entre as duas espécies é muito longo variando de 11 – 12.8 milhões de anos atrás e são geograficamente distintas. (Koufopanou *et al.*, 1997; Fisher *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2002).

O fungo dimórfico patogênico *H. capsulatum* possui uma ampla distribuição geográfica abrangendo todos os continentes. Baseado em dados morfológicos e de patogenicidade o gênero *Histoplasma* consiste em três variedades *H. capsulatum* (Hc) var. *capsulatum*, *Hc* var. *duboisii* e *Hc* var. *farciminosum* (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Rippon, 1988). Através de estudos de concordância genealógica de quatro regiões gênicas nucleares foi possível observar a existência de oito clados geneticamente isolados (Kasuga *et al.*, 1999), sendo sete deles geograficamente separadas (Kasuga *et al.*, 2003).

Estudos filogenéticos do fitopatógeno *Magnaphorthe grisea* (causador da doença brusone em arroz e também capaz de infectar cerca de 50 outras espécies de gramíneas) foram realizados por utilização de marcadores moleculares do tipo RFLP e seqüenciamento de *loci* gênicos, além de testes de cruzamentos entre diferentes isolados. Os resultados mostraram que isolados de *M. grisea* - patógeno de *Digitaria ssp* se agrupavam separadamente dos isolados de *M. grisea* - patógeno de *Oryza sativa* e outras gramíneas (Borromeo *et al.*, 1993; Burtling *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 2000; Couch & Kohn, 2002).

Através da análise de concordância genealógica de três regiões gênicas nucleares de isolados de *M. grisea*, obtidos de vários tipos de gramíneas, foi possível determinar a existência de duas espécies filogenéticas altamente divergentes. Os fungos isolados de *Digitaria* se agrupavam em clados distintos dos isolados de outras gramíneas e dos isolados do arroz. Os autores denominaram de *M. oryzae* o patógeno de *Oryza sativa* e outras gramíneas, devido à: **1)** esta espécie estar representada por clados monofiléticos distintos; **2)** aparecimento de um único polimorfismo conservado entre as espécies preponderando a fixação das diferenças nucleotídicas; **3)** associação a diferentes tipos de hospedeiros; **4)** são reprodutivamente separados (Couch & Kohn, 2002).

Outro caso relatado foi o do fungo *Metharhizium anisopliae*, patógeno de insetos, utilizado para o controle biológico de pragas agrícolas. Ao analisar 6 regiões gênicas em um conjunto de 14 isolados da região de Ontário – Canadá foi identificado a presença de 2 grupos geneticamente isolados com características fenotípicas diferentes. Um grupo possui capacidade de crescer em baixa temperatura (8°C) e o outro cresce em temperatura elevada (37°C). Estes resultados mostram o evento de especiação simpátrica com alto grau de recombinação e diferenças fenotípicas dentro dos grupos identificados (Bidochka *et al.*, 2005).

### ***Paracoccidioides brasiliensis* e a doença Paracoccidioidomicose (PCM)**

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico causador da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica que atinge principalmente trabalhadores rurais que convivem diretamente com o solo em áreas rurais ou de desmatamento. A doença foi primeiramente relatada por Adolf Lutz, em 1908, em dois pacientes internados em São Paulo (Lutz, 1908). Afonso Splendore, em 1912, foi responsável pelo isolamento do fungo classificando-o como *Zymonema brasiliensis*, denominação que perdurou até 1930, quando foi criado o gênero *Paracoccidioides*. Este patógeno apresenta-se como levedura a 37°C no hospedeiro e à temperatura ambiente (22 à 25°C) na forma de micélio. As colônias leveduriformes macroscopicamente são caracterizadas por serem enrugadas e de coloração creme sendo usualmente ovaladas ou alongadas. A característica microscópica mais marcante e singular da levedura de *P. brasiliensis* é a presença de múltiplos brotamentos periféricos da célula-mãe, parecendo roda-de-leme, utilizada no diagnóstico histopatológico. A fase miceliana é caracterizada por produzir colônias brancas, pequenas e irregulares cobertas por um micélio aéreo. Um pigmento marrom pode ser produzido por alguns isolados, sua hifa é delgada e septada e a

única estrutura observada é o clamidósporo. Sob condições de estresse nutricional, o micélio origina vários tipos de propágulos como artroconídios ou conídios de célula-única (Bustamante-Simon *et al.*, 1985 e San-Blas, 1991). Estes propágulos uninucleados podem originar micélios multinucleados ou células leveduriformes com múltiplos brotamentos, dependendo da temperatura em que se encontram. A inalação dos propágulos por via aérea em modelos animais (camundongos) causa uma doença crônica e progressiva (McEwen *et al.*, 1987), podendo também induzir a fibrose pulmonar como observado em humanos (Restrepo *et al.*, 1992). Especula-se que este possa ser o modo de infecção pelos humanos.

A infecção nos humanos pode originar a forma assintomática ou ativa da doença, causando infecção primária no tecido pulmonar podendo se disseminar para outros órgãos e tecidos. A PCM ocorre em indivíduos imuno-competentes e geralmente mais freqüentes em homens. Existem duas principais formas da doença, a aguda ou subaguda (PCM juvenil) e a crônica (PCM adulta), entretanto a apresentação e o curso da doença variam caso a caso (Brummer *et al.*, 1993 e Franco, 1994). O tipo adulto da doença, o qual representa mais de 90% dos casos, ocorre principalmente em homens adultos, é lento podendo levar de meses até anos para se instalar, afeta primariamente o epitélio pulmonar, causando problemas no funcionamento do pulmão. Subsequentemente, a doença pode disseminar para outros órgãos e tecidos, gerando lesões secundárias na mucosa, pele, linfonodos, fígado, baço e glândulas adrenais. A forma juvenil da PCM é de evolução rápida (semanas a meses) sendo que a mais severa pode gerar taxa de mortalidade significativa por afetar o sistema reticuloendotelial e disfunção da medula-óssea. Independente do órgão envolvido, a PCM usualmente leva a formação de seqüelas fibrosas. A PCM predomina em adultos do sexo masculino (80 - 90% dos casos), independentemente do grau de exposição de homens e mulheres nas áreas endêmicas (Restrepo *et al.*, 1984). Foi mostrado que o hormônio feminino  $\beta$ -estradiol bloqueia a transformação *in vitro* do micélio ou conídios de *P. brasiliensis* para levedura sugerindo que o hormônio possui efeito protetor contra o patógeno (Restrepo *et al.*, 1984; Salazar *et al.*, 1988).

A PCM é caracterizada por ser uma doença de perfil granulomatosa sendo esta a lesão resultante da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígenos do agente infeccioso, o que permite a contenção do patógeno e impede assim a sua disseminação pelo organismo (Romani, 1997). Plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos estão presentes no granuloma (de Brito & Franco, 1994), entretanto, a principal célula presente é o macrófago, que possui como principal função a liberação de substâncias microbicidas (óxido nítrico, radicais superóxido e peróxido de hidrogênio). A apresentação de antígenos e recrutamento

dos linfócitos T para a produção de citocinas varia de acordo com a susceptibilidade do hospedeiro (Calish & Kashino, 1998). O padrão de citocinas varia muito dependendo do tipo da PCM (crônica ou aguda). A atividade de linfócitos T e a resposta granulomatosa são características da forma localizada da infecção, enquanto que na forma disseminada não se observa a formação de granuloma epitelióide. Indivíduos sadios sensibilizados por *P. brasiliensis* demonstram uma produção substancial de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10, enquanto pacientes que desenvolveram a doença apresentam níveis baixos de IL-2 e IFN- $\gamma$  e níveis elevados de IL-10 (Bernard *et al.*, 2001). Trabalhos avaliando os níveis de citocinas liberadas em soro de pacientes com PCM crônica apresentavam altos níveis de IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-2 e pequena produção de IFN- $\gamma$ . (Fornari *et al.*, 2001). Os dados relatados acima sugerem que a resposta imunológica celular, caracterizada pela produção de citocinas de resposta tipo Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-12) é o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*. Este fungo pode apresentar-se como um patógeno intracelular facultativo, capaz de sobreviver e multiplicar no interior de células epiteliais e de macrófagos murinos e humanos não ativados (Brummer *et al.*, 1989; Moscardi-Bacchi *et al.*, 1994), sendo que a resposta imune celular e a formação do granuloma propiciam uma resposta protetora máxima (migração, diferenciação e ativação de macrófagos) contra o patógeno (Rumbley & Philips, 1999).

### **Avanços moleculares em *P. brasiliensis***

A mudança fenotípica de hifas de um fungo que vive no ambiente para levedura, forma patogênica, não resulta somente em alterações morfológicas em alterações moleculares resultantes de uma re-programação gênica para permitir a sua adaptação e sobrevivência (Felipe *et al.*, 2005). Uma característica marcante de patógenos dimórficos é a correlação dos altos níveis de  $\alpha$ -(1,3)-glucana na parede celular com a capacidade de virulência de cada fungo (Hogan & Klein, 1994; Nemecek *et al.*, 2006). Além disto, ocorre também alteração na composição lipídica da membrana plasmática da célula provocando um remodelamento e reorganização da membrana (Maresca & Kobayashi, 2000).

Análise *in silico* do transcriptoma de *P. brasiliensis* revelaram a presença de vários genes ortólogos envolvidos em virulência, quando comparado com outros patógenos como, por exemplo, genes codificadores de enzimas do ciclo do glioxilato, síntese de parede celular, genes envolvidos em processos de detoxificação celular e fatores secretados (Tavares *et al.*, 2005). Com o desenvolvimento do projeto “Genoma funcional diferencial

do *P. brasiliensis*” do isolado Pb01 foi possível identificar 6.022 EST’s (“Expressed Sequence Tag”) do qual destas 69,4% mostraram similaridade com seqüências já descritas de outros fungos. Foram identificados 328 genes diferencialmente expressos durante a fase de transição de micélio para levedura, sendo destes 58 expressos na fase miceliana e 270 na fase leveduriforme. Os genes regulados positivamente foram identificados como participantes do ciclo celular, resposta ao estresse, resistência a drogas e vias de sinalização, demonstrando o mecanismo de reprogramação gênica que o fungo sofre na transição dimórfica. (Felipe *et al.*, 2003, Felipe *et al.*, 2005). Através de análise do transcriptoma do isolado Pb01 foi possível identificar várias cascatas de sinalização celular, sendo as mais importantes: 1) MAPKinases envolvidas em integridade celular; 2) via AMPc/PKA responsável pela regulação do desenvolvimento celular e virulência fúngica; 3) Ras-GTPases permitindo a interação das vias MAPKinases e AMPc/PKA; 4) via cálcio-calmodulina-calcineurina que controla a sobrevivência dos fungos em condições de estresse oxidativo e/ou térmico e 5) via TOR que por sua vez controla crescimento e proliferação celular (Fernandes *et al.*, 2005). Recentemente foram identificados em *P. brasiliensis* os genes *ras1* e *ras2* codificadores para duas proteínas diferentes, porém com alto grau de identidade entre si. Fernandes *et al.*, 2008 sugerem que estes genes estejam envolvidos no dimorfismo, resposta ao choque térmico e na interação de *P. brasiliensis* com a célula hospedeira. Estudos do transcriptoma das células de levedura do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* permitiram a identificação de 4.692 genes expressos, entre eles genes homólogos de virulência em *C. albicans*. Também foi avaliada a expressão de genes expressos por PCR em tempo real, durante a transição de levedura para micélio e de micélio para levedura. Genes como hidrofobina, isocitrato liase e malato desidrogenase possuíam altos níveis de mRNA durante a fase miceliana enquanto genes como ubiquitina, delta-9 desaturase, hsp70, hsp82 e hsp 104 possuíam altos níveis de expressão durante a fase leveduriforme (Goldman *et al.*, 2003). Trabalhos realizados utilizando as técnicas de microarranjos de cDNA possibilitaram avaliar a resposta transcricional do fungo ao ambiente de macrófagos peritoniais murinos. Entre 1152 genes analisados, 152 foram diferencialmente transcritos, sendo estes responsáveis por suprir limitações de glicose e aminoácidos dentro da célula hospedeira, construção de parede celular e estresse oxidativo (Tavares *et al.*, 2007). Em paralelo, Silva *et al.*, 2007 avaliaram o perfil da resposta gênica dos macrófagos peritoniais (hospedeiro) infectados por *P. brasiliensis*. Foi observado um aumento de moléculas pró-inflamatórias codificadoras de proteínas de membrana, metaloproteinases envolvidas na adesão/fagocitose do fungo. Além disso, foi observado um

aumento na transcrição de genes apoptóticos induzido em macrófagos após 24h de infecção.

Em *P. brasiliensis*, proteínas envolvidas na interação e adesão do fungo às células do hospedeiro têm sido associadas com a virulência e patogenicidade, como a glicoproteína 43kDa (gp43) (Puccia *et al.*, 1986), uma adesina de 30 kDa (Andreotti *et al.*, 2005) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Barbosa *et al.*, 2006), entre outras. A proteína Gp43 é produzida e secretada pelo fungo, além de ser a molécula mais abundante em sobrenadante de culturas leveduriformes de *P. brasiliensis* (Stambuk *et al.*, 1988). Esta proteína já foi isolada, caracterizada e é usada para diagnóstico sorológico em paciente com a PCM (Cisalpino *et al.*, 1996; Taborda & Camargo, 1993). Estudos comparando seqüências do gene codificador da Gp43 mostraram uma alta variabilidade genética entre isolados de *P. brasiliensis*, porém o epítipo de reconhecimento de células T de camundongos se mantém inalterado (Moraes *et al.*, 2000). Além disto, estudos filogenéticos mostram que a alta variabilidade genética detectada nas seqüências do gene gp43 de diferentes isolados deste patógeno pode ser utilizada como um bom marcador evolutivo das espécies filogenéticas já descritas (Matute *et al.*, 2006). Os genomas dos isolados Pb01, Pb18 e Pb3 estão no momento sendo seqüenciados pelo Broad Institute – USA em colaboração com os grupos que trabalham com este patógeno e dados relevantes da biologia deste fungo estão emergindo em grande velocidade.

### **Habitat e nicho ecológico de *P. brasiliensis***

O fungo *P. brasiliensis* é encontrado geograficamente na América Latina, estendendo do México até o extremo sul da Argentina. Apresenta-se como saprófita, vivendo no solo junto com matéria orgânica em decomposição. O micélio emite propágulos infecciosos na forma de artroconídios ou aleuroconídios que são dispersos pelo vento e conseqüentemente, se inalado, pode levar a PCM (Restrepo, 1985). O fungo já foi também isolado de tatus (*Dasytus novemcinctus* – Brasil e *Cabassous centralis* – Colômbia) que habitam regiões onde a PCM é endêmica e estes animais são reconhecidos hoje com reservatórios naturais do fungo (Bagagli *et al.*, 1998, Bagagli *et al.*, 2003; Corredor *et al.*, 2005). Além disso, *P. brasiliensis* também foi encontrado em cães da raça dobermann onde foi constatado provocar a PCM (Ono *et al.*, 2001). Não existe correlação entre a variabilidade genética de diferentes isolados de *P. brasiliensis* e infecção preferencial de um determinado hospedeiro, homem e/ou tatu, uma vez que estes isolados apresentam o

mesmo genótipo (Bagagli *et al.*, 1998). Estudos comparando regiões parciais do gene da gp43 sugerem que múltiplas infecções possam ocorrer no mesmo animal (Sano *et al.*, 1999). Bagagli *et al.*, 2006 sugerem que a re-infecção de animais com diferentes isolados e em diferentes tempos pode contribuir com a reprodução sexuada, uma vez que o micro-ambiente do tatu pode favorecer o encontro de tipos sexuais diferentes do fungo. Os tatus são membros pertencentes à ordem *Xenarthra* e sua existência na América do Sul está estimada em 65 milhões de anos. A família *Dasypodidae*, correspondente aos tatus, e os fungos pertencentes à família *Ajellomycetaceae* são organismos que co-habitaram as mesmas áreas continentais cerca de 10-20 milhões de anos passados e provavelmente co-evoluíram ao longo deste período. *C. immitis* também foi isolado de tatus na região nordeste do Brasil e evidências moleculares sugerem que este patógeno foi introduzido na América do Sul recentemente pela migração humana. (Fisher *et al.*, 2001; Eulálio *et al.*, 2001). Evidências moleculares sugerem que *P. brasiliensis* e outros fungos dimórficos como *B. dermatitides*, *C. immitis* e *H. capsulatum*, pertencentes à família *Onygenaceae*, surgiram cerca de 150 milhões de anos atrás (Bagagli *et al.*, 2006). A ecologia de *P. brasiliensis* e sua relação com diversos hospedeiros estão diretamente envolvidas com a história evolutiva do fungo uma vez que o processo de co-habitação com estes hospedeiros favorecem a manutenção da espécie (Bagagli *et al.*, 2006). Observou-se também que *P. brasiliensis* pode ser encontrado em fezes de morcegos frutíferos *Artibeus lituratus* (Greer & Bolamos, 1977), em mamíferos encontrados mortos em rodovias (linfonôdos, baço, pulmão, glândulas adrenais e rins de preá selvagem - *Cavia aperea*), em pulmão e fígado de ouriço-cacheiro (*Sphiggurus spinosus*), em pulmão de furão (*Gallictis vittata*) e mão - pelada (*Procyon cancrivorus*), indicando a variedade de hospedeiros deste fungo, principalmente em áreas endêmicas (Costa *et al.*, 1995; Richini-Pereira *et al.*, 2007). Recentemente testes sorológicos em duas populações de primatas revelaram que estes animais entraram em contato com o patógeno *P. brasiliensis* em algum momento da vida. (Corte *et al.*, 2007). Estudos realizados com animais infectados capturados na região de Botucatu-SP mostraram que os tatus infectados foram encontrados em áreas úmidas, de vegetação perturbada como em plantações de *Pinnus*, em altitudes médias de 800m e perto de fontes de água (Bagagli *et al.*, 2003). Teraçoli *et al.*, 2007 mostraram que a presença de água constitui um fator limitante para o crescimento deste patógeno enquanto que a presença de elevadas taxas de alumínio no solo e baixos níveis de bases saturadas impediram o crescimento do fungo nesse tipo de solo. Além disso, *P. brasiliensis* foi capaz de crescer em solo tanto arenoso quanto argiloso. Alguns autores especulam que o *P.*

*brasiliensis* possui como reservatório natural animais heterotérmicos (peixes, anfíbios, moluscos e etc...) que vivem em contato com água. As aves aquáticas, ao ingerirem estes animais, iriam defecar o fungo que entraria em contato com o solo, iniciando a produção de estruturas dispersivas podendo contaminar tanto humanos quanto animais (Conti-Diaz & Rilla, 1989).

### **Estudos genéticos em *P. brasiliensis***

Trabalhos utilizando a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis – PFGE) permitiram a estimativa do número dos cromossomos deste patógeno. Montoya *et al.*, 1997 e Montoya *et al.*, 1999 mostraram que isolados clínicos apresentam variabilidade tanto no número de bandas (variou entre 4-5) como no tamanho molecular das bandas cromossomais (a maior banda é  $\geq 10$  Mpb até a menor de 3.2 Mpb). Entre os isolados ambientais analisados não foi detectado variação no número de bandas (todas tinham 5 bandas no gel de PFGE) e nem no tamanho das respectivas bandas cromossomais. Quando se comparou o perfil de bandas entre os isolados clínicos e ambientais observou-se que os tamanhos moleculares das 5 bandas eram similares, com exceção da quarta banda de 8.8 Mpb do isolado clínico que passou para 7.2 Mpb nos isolados ambientais.

O tamanho molecular estimado do genoma do fungo *P. brasiliensis* varia entre 23 e 31Mpb (Cano *et al.*, 1998) dependendo do isolado analisado. Esta estimativa está dentro da faixa de tamanho do genoma de outros fungos patogênicos como *C. immitis* (29Mb) (Pan & Cole, 1993) e *H. capsulatum* (30Mb) (Carr & Shearer, 1998). Entretanto, Cano *et al.*, 1998 e Feitosa *et al.*, 2003 analisaram o tamanho do genoma de isolados de *P. brasiliensis* pela técnica de microfluorometria. Os dados revelaram que alguns deles apresentavam um tamanho de genoma de 46-61Mb, ou seja, duas vezes maior do que o tamanho estimado em trabalhos anteriores, sugerindo então a possibilidade do fungo ser diplóide, mas não descartando a possibilidade de haver isolados haplóides ou aneuplóides. O *P. brasiliensis* é multinucleado na forma leveduriforme. A determinação do tamanho do genoma por microfluorometria em microrganismos no qual a ploidia ainda não se encontra definida pode levar a conclusões errôneas devido aos limites impostos na separação de cromossomos homólogos e também por variações no número de núcleos por células (Torres-Guerrero, 1999).



A padronização de protocolos utilizando citometria de fluxo para estudos de quantificação do conteúdo nuclear de células uninucleadas de *P. brasiliensis* foi de extrema significância para estudos de ploidia deste patógeno. Almeida *et al.*, 2007 ao avaliarem o tamanho do genoma de células uninucleares de leveduras de 10 isolados de *P. brasiliensis*, previamente caracterizados como membros de três diferentes espécies filogenéticas (Matute *et al.*, 2006a), mostraram que o tamanho do genoma variava de 26-35 Mb. Estes mesmos autores determinaram que todos os isolados analisados eram haplóides, utilizando a razão entre a fluorescência emitida pelo conteúdo uninuclear de DNA e o tamanho em quilobases do genoma haplóide do fungo (previamente determinado por eletroforese de campo pulsado por Feitosa *et al.*, 2003). Foi também avaliada a variabilidade inter-individual do gene *gp43* entre quatro isolados de *P. brasiliensis*, não se detectando variação entre os isolados analisados, o que indica a presença de um único alelo deste gene, reforçando assim o perfil haplóide dos isolados analisados (Almeida *et al.*, 2007). A variação nos tamanhos dos genomas haplóides (26-35 Mb ) é provavelmente devido a grande variabilidade genética entre os isolados de *P. brasiliensis*, em decorrência dos processos evolutivos sofridos por esta espécie que podem acarretar grandes inserções/deleções de nucleotídeos dentro dos genomas dos isolados que estão em constante processo de recombinação em sua população na natureza.

### **Diversidade genética em *P. brasiliensis***

O modo que fungos se reproduzem (clonal ou recombinação) vem sendo discutido por muitos autores como sendo um importante processo para especiação (Maynard Smith & Szathmary 1995; Coyne & Orr 2004). Tanto os organismos clonais como também aqueles que são capazes de se recombinar estarão aptos a formarem novas espécies, porém organismos que recombinam farão isto mais eficientemente, pois respondem mais rápido aos processos da seleção natural, além de apresentarem mais variedades fenotípicas (Goddard *et al.*, 2005). A especiação não envolve somente a divergência, mas também a sua manutenção, particularmente quando a nova espécie derivada coexiste com a anterior no mesmo *habitat*.

Estudos de variabilidade genética deste patógeno, iniciados em 1995, e utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD (Soares *et al.*, 1995; Molinari- Madlum *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2003) RFLP (Nino-Vega *et al.*, 2000) cariotipagem (Montoya *et al.*, 1997; Montoya *et al.*, 1999; Cano *et al.*, 1998) microsatélite (Nascimento



de “*bootstrap*” e probabilidade posterior (estes dois parâmetros refletem a confiabilidade e a força da existência dos diferentes grupos). Os ramos com valores de “*bootstrap*” inferiores a 70% e com valores de probabilidade posterior <0.95 não foram considerados por não obedecerem ao critério de concordância genealógica e de não-discordância (GCPSR – genealogical concordance phylogenetic species recognition). A estrutura topológica da árvore se divide em dois ramos, subdividindo a população em três espécies filogenéticas (Matute *et al.*, 2006).

Estudos filogenéticos analisando 21 isolados de *P. brasiliensis* (14 previamente identificados como S1 e PS3 por Matute *et al.*, 2006) em 21 loci polimórficos revelaram a existência de um isolado atípico que apresenta alta variabilidade genética quando comparados com os demais 20 isolados; isolado Pb01 (Carrero *et al.*, *in press*). O Pb01 se separa de todos isolados analisados em 19 loci além de se separar das três espécies filogenéticas descritas por Matute *et al.*, 2006. Estes resultados levaram os grupos que trabalham com variabilidade genética e evolução deste patógeno a especularem se o isolado Pb01 poderia representar uma nova espécie filogenética, porém para que isso seja válido deveria ser demonstrada a existência de outros isolados que se agrupam com o Pb01. Estudos anteriores utilizando a técnica de RAPD já mostravam que o isolado Pb01 se agrupava com outros isolados e que existia a possibilidade de encontrar outros indivíduos na natureza com o mesmo perfil genético (Soares *et al.*, 1995; Molinari-Madlum *et al.*, 1999).

A espécie *P. brasiliensis* foi considerada uma única espécie morfológica até meados de 2000 (Moraes *et al.*, 2000) já que ainda não foi isolada a forma teleomórfica. Também não foi relatada a existência de reprodução sexuada, o que inviabiliza a aplicação do método de reconhecimento de espécie biológica e/ou morfológica para este fungo. Estudos utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, mostraram a existência de isolados genotipicamente semelhantes ao Pb01 indicando a possibilidade de haver um grupo geneticamente isolado na natureza, que englobe o isolado Pb01 e que seja distinto das três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*, descritas por Matute *et al.*, 2006. Para isto a identificação de isolados “*Pb01-like*” é de extrema relevância para rastrear este grupo visando formalizar um possível evento de especiação.

## Objetivos

Investigar a possível existência de uma nova espécie filogenética de *P. brasiliensis* que agrupe o isolado Pb01 com outros isolados provenientes da América Latina, pelo método de GCPSR (“*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*”).

### Objetivos específicos

- 1) Desenvolver um marcador molecular (gene *hsp70*) para possibilitar a identificação de isolados de *P. brasiliensis* que compartilhem o mesmo INDEL presente no *íntron* 1 do gene *hsp70*, aqui denominados “*Pb01 – like*”;
- 2) Avaliar o padrão de amplificação por PCR da região do promotor e *íntron* 1 do gene *hsp70*, em duas coleções de isolados utilizadas em trabalhos anteriores (Soares *et al.*, 1995, Molinari-Madlum *et al.*, 1999, Hahn *et al.*, 2002 e Hahn *et al.*, 2003) provenientes das regiões Norte, Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, além de outros países como Peru, Uruguai, Equador e Venezuela com a finalidade de identificar os indivíduos “*Pb01 – like*”;
- 3) Amplificar por PCR e sequenciar 13 regiões gênicas, potencialmente correspondentes às seqüências polimórficas, de 17 isolados “*Pb01 – like*” identificados conforme descrito no item 2;
- 4) Avaliar o grau de divergência entre o grupo “*Pb01-like*” e o grupo de isolados composto pelas três espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 (Matute *et al.*, 2006), utilizando o *software* DNAsp v 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2006);
- 5) Realizar as análises de filogenia molecular para os 13 *loci* polimórficos investigados pelos métodos de máxima parcimônia (PAUP versão 4.0b.10a; D.L. Swofford 2000) e análise de Bayes (Mr.Bayes versão 3.1.2 Huelsenbeck, J. P. 2000);
- 6) Calcular a tempo estimado do isolamento genético entre o grupo de isolados “*Pb01-like*” e o grupo de isolados composto pelas três espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3, conforme proposto por Ney M., (1987);
- 7) Analisar possíveis eventos de recombinação entre os dois grupos genéticos isolados identificados neste trabalho, por análise de decomposição de árvores utilizando os dois conjuntos de dados de seqüências dos 13 *loci* (Splitstree4 v4.8 Huson & Bryant, 2006).

## Justificativa

A PCM é a micose sistêmica de maior relevância na América Latina que afeta uma grande parcela da população rural no Brasil, Colômbia e Venezuela. O isolado Pb01 de *P. brasiliensis* foi obtido de um paciente com PCM crônica na cidade de Goiânia sendo este um dos isolados bastante estudados até hoje em números de trabalhos publicados na literatura. Entretanto, não é certa ainda sua classificação taxonômica dentro do gênero *Paracoccidioides* em relação às espécies filogenéticas já descritas para o *P. brasiliensis* (Matute *et al.*, 2006, Carrero *et al.*, *in press*). Este trabalho visa à identificação de isolados genotipicamente similares ao isolado Pb01, uma vez que este isolado apresenta um genótipo diferente das três espécies crípticas descritas em *P. brasiliensis* (Carrero *et al.*, *in press*). Populações de fungos geneticamente distintas tendem a apresentar diferentes tipos de resposta ao hospedeiro, além de características fenotípicas exclusivas e particulares como diferentes níveis de virulência, resistência a fungicidas, diferentes taxas de proliferação do patógeno, entre outras. Os estudos e a identificação destas populações geneticamente diferentes dentro do gênero *Paracoccidioides* possibilitam a associação de diferentes fenótipos a estes grupos geneticamente isolados. Em adição, a localização das variações genotípicas dentro dos grupos de *P. brasiliensis* viabiliza o desenvolvimento de diagnóstico diferencial para estes grupos geneticamente distintos, além da grande contribuição aos estudos epidemiológicos, ecológicos e filogeográficos deste patógeno humano.

## **Materiais e Métodos**

### **Cultivo de isolados de *P. brasiliensis* e extração de DNA**

Os isolados de *P. brasiliensis* foram mantidos em meio semi-sólido Fava-Netto (Fava-Netto, 1969), repicados a cada sete dias no caso de leveduras e incubados a 37°C. O procedimento experimental para extração de DNA genômico foi baseado no método descrito por Raeder & Broda (1985). Resumidamente, as células de levedura foram maceradas com pistilo e nitrogênio líquido em almofariz de porcelana até obtenção de um pó fino. Esse pó foi transferido para tubo de 2mL (cerca de 50mg de micélio por tubo) e ressuspensionado em 500µL de tampão de extração. Essa suspensão foi misturada com agitação forte por 15 minutos, e em seguida foram adicionados 500µL de clorofane. Misturou-se vigorosamente, e centrifugou-se por 1 hora a 12.000g. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e tratada com RNase A numa concentração final de 100µg/ml por 15 minutos em banho a 37°C. Após esse tratamento, adicionou-se igual volume de clorofórmio, misturou-se vigorosamente e centrifugou-se a 12.000g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, foram adicionados 0,5V de isopropanol e a solução foi centrifugada a 12.000g, por 20 minutos a 4°C. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em volume apropriado de água destilada.

### **Identificação de isolados com genótipo "Pb01 – like" através do marcador molecular PLMMT1/HSPMMT1**

Foram analisados por PCR 51 isolados de *P. brasiliensis* utilizados em trabalhos anteriores de variabilidade genética utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD. (Hahn *et al.*, 2002; Hanh *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 1995; Molinari-Madlum *et al.*, 1999) inclusive o isolado 7455, que já tinha sido mostrado pertencer ao mesmo grupo do isolado Pb01 por RAPD (**Tabela 1**). Estes isolados são provenientes das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte do Brasil além de outros países como Peru, Uruguai, Equador e Venezuela. Para a identificação dos isolados "Pb01-like" foi realizada a amplificação das duas regiões, 5'UTR e íntron 1, do gene que codifica a proteína Hsp70, utilizando oligonucleotídeos que se anelam em uma região de INDEL exclusivo ao isolado Pb01 (Teixeira *et al.*, 2005; Carrero *et al.* in press). As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25µl consistindo de: tampão *Taq* Pol 1X; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM; dNTP 50µM; oligonucleotídeos HPSMMT1 (5' AACCAACCCCCTCTGTCTTG 3') e PLMMT1 (5'

GAAATGGGTGGCAGTATGGG 3') 0,5µM de cada um; 80ng de DNA genômico; 1 U de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot). Os ciclos da PCR foram: pré-desnaturação de dois minutos a 94°C; amplificação em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 60°C por 30 segundos e extensão final de 68°C por 1 minuto. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8% e os isolados PCR positivos para o compartilhamento do INDEL presente no *íntron* 1 do gene *hsp70* foram denominados de “*Pb01-like*”.

**Tabela 1:** Descrição do isolado, forma e local de coleta do isolado e resultado quanto a presença (+) ou não (-) do amplicon gerado a partir do conjunto marcador molecular específico do gene *hsp70* para o isolado de *P. brasiliensis* Pb01

Isolado	Forma/Local de isolamento	Positivo (+) ou negativo (-) para reação de PCR com marcador <i>hsp70</i>
Pb01	PCM Crônica/Goiás - Brasil	+
3171	-:-	+
6810	-:-	+
7455	PCM Crônica/Guaiaquil – Equador	+
769	PCM Crônica/Roraima -Brasil	+
717	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
133	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
Raj-2	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
189	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
218	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
206	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
84	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
61	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
57	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
694	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
397	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
351	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	+
SN	PCM /São Paulo Brazil	-
JT-2	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	-
JOA	PCM / Minas Gerais - Brasil	-
1087	PCM Crônica/Rio Grande do Sul - Brasil	-
JT-5	PCM Crônica/Minas Gerais - Brasil	-
JT-4	PCM Crônica/Minas Gerais - Brasil	-
689	-:-	-
686	PCM Crônica/Rio Grande do Sul - Brasil	-
53	-:-	-
52	-:-	-
333	PCM / Lima - Peru	-
113	PCM Crônica/São Paulo - Brasil	-
5979	-:-	-
135	PCM Crônica/Goiás - Brasil	-
Givaldo	-:-	-
1430	PCM Crônica/Rio Grande do Sul - Brasil	-
16	-:-	-
662	PCM Crônica/Guaiaquil – Equador	-
306	PCM /Trujillo - Argentina	-
728	-:-	-
369	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	-
339	PCM /Brasil	-
73	-/Antioquia - Colômbia	-
JT-1	PCM Crônica/Minas Gerais - Brasil	-
YRJ	PCM sub-aguda/ Mato-grosso - Brasil	-
283	PCM Crônica/Mato-grosso - Brasil	-
Pingüim	Fezes de Pingüim - Uruguai	-
262	Ração de cão/ Minas Gerais - Brasil	-

\*(-) Dado faltante

**Tabela 2.** Dados de descrição, país e/ou estado de isolamento, origem e referência da utilização de 88 isolados de *P. brasiliensis* utilizados para análise filogenética pelos métodos de análise de parcimônia e análise de Bayes.

Isolado*	Descrição original do Isolado	País e/ou estado de isolamento	Origem	Referência <sup>1 2</sup>
Pb01	Pb01	Brasil, Goiás	Clínico	Neste trabalho, Carrero <i>et al.</i> in press
7455	7455	Equador,Guayaquil	Clínico	Neste trabalho
3171	3171	-	-	Neste trabalho
6810	6810	-	-	Neste trabalho
133	133	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
84	84	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
769	769	Brasil, Roraima	Clínico	Neste trabalho
717	717	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
RAJ-2	RAJ-2	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
189	189	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
61	61	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
218	218	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
206	206	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
694	694	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
397	397	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
57	57	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
351	351	Brasil, Mato Grosso	Clínico	Neste trabalho
P1	P1	Paraguai	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
P2	P2	Paraguai	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
A8	A8	Argentina	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
A7	A7	Argentina, Misiones	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
A6	A6	Argentina, Misiones	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
A5	A5	Argentina,Chaco	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
A4	A4	Argentina,Chaco	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
A3	A3	Argentina,Chaco	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
A2	A2	Argentina,Chaco	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
A1	A1	Argentina,Chaco	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
PE1	Pb10	Peru	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
U1	U1	Antartida	Fezes ( <i>pygoscelis</i> )	Matute <i>et al.</i> 2006.
V6	Pb15	Venezuela	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
V5	Pb381	Venezuela	-	Matute <i>et al.</i> 2006.
V4	Pb304	Venezuela, Barinas	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
V3	Pb305	Venezuela, Caracas	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press, Neste trabalho **
V2	Pb2	Venezuela, Caracas	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
V1	Pb300	Venezuela, Miranda	Solo	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
C21	CIB40392/DASYPUS	Colômbia, Caldas	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
C20	Pb73	Colômbia, Antioquia	-	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
C19	CIB44197	Colômbia, Caldas	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006.
C18	P151	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C17	P206	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C16	H47	Colômbia, Arauca	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C15	H45	Colômbia, Cundinamarca	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C14	H31	Colômbia, Boyaca	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C13	76533	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C12	P161	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C11	P46	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C10	P72	Colômbia, Córdoba	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C9	P68	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C8	P202	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C7	P204	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C6	P196/HIGUITA	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
C5	P141	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C4	ATCC60855P163	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C3	P163	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C2	P159	Colômbia, Antioquia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
C1	P149	Colômbia	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
B26	Pb3	Brasil, São Paulo	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006 Neste trabalho
B25	Pb8	Brasil, São Paulo	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
B24	Pb6	Brasil, Paraná	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
B23	Pb4	Brasil, São Paulo	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006, Neste trabalho
B22	Pb14	Brasil, São Paulo	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.



B21	Pb11	Brasil, Paraná	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
B20	Pb9	Brasil, São Paulo	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
B19	Pb13	Brasil, Goiás	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
B18	Pb339	Brasil	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
B17	Pb18	Brasil, São Paulo	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
B16	14121	Brasil, Rio de Janeiro	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
B15	BT84	Brasil, São Paulo	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006.
B14	BT60	Brasil, São Paulo	Clínico	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
B13	Uberlândia	Brasil, Minas Gerais	Ração de Cães	Matute <i>et al.</i> 2006.
B12	IBIA	Brasil, Minas Gerais	Solo	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
B11	TATU	Brasil, Pará	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006.
B10	T15LN1	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006.
B9	T13LN1	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
B8	T5LN1	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006.
B7	T10B1	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006.
B6	T9B1	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006.
B5	T8B1	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
B4	T7B6	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
B3	T4B14	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006.
B2	T3B6	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006.
B1	T1F1	Brasil, São Paulo	Tatu	Matute <i>et al.</i> 2006, Carrero <i>et al.</i> in press
Pb 309	Pb 309	Venezuela	Clínico	Carrero <i>et al.</i> in press
Pb 307	Pb 307	Venezuela	Clínico	Carrero <i>et al.</i> in press
Pb 1684	Pb 1684	Brasil	Clínico	Carrero <i>et al.</i> in press
BT	BT	Brasil	Clínico	Carrero <i>et al.</i> in press
Pb 135	Pb 135	Brasil	Clínico	Carrero <i>et al.</i> in press
ESLAVA	ESLAVA	Colômbia, Antioquia	Clinico	Carrero <i>et al.</i> in press

\*Os isolados destacados em vermelho foram utilizados para gerar 13 fragmentos gênicos (esquematizados na **Figura7**) para serem analisados filogeneticamente em conjunto com isolados utilizados em trabalhos anteriores (Matute *et al.*, 2006 e Carrero *et al.*, in press)

\*\* Os isolados Pb2, Pb3 e Pb4 foram utilizados para gerar dados de seqüências gênicas para os 5 *loci* do conjunto 2 e dados afim de representar o grupo filogenético PS2

<sup>1</sup> As sequencias de oito regiões gênicas dos 65 isolados utilizadas no trabalho de Matute *et al.*, (2006) foram utilizadas para gerar matrizes de seqüências (**Tabela 3**), juntamente com as sequencias geradas para o isolados “Pb01-like” depositadas no banco de dados *GenBank* (*gp43* promotor-exon 1 DQ003984-DQ004048, *gp43* exon 2 DQ003724- DQ003788, *fsk* exon 2 DQ003919-DQ003983, *fsk* exon 3 DQ003854-DQ003918, *adenyl ribosylation factor (arf)* DQ004049-DQ004113, *chs2* promotor-exon1 DQ004114-DQ004178, *chs2* exons 2-4 DQ004179-DQ004243,  $\alpha$ -tubulina DQ003789-DQ003853.)

<sup>2</sup> As sequencias de cinco regiões gênicas dos 21 isolados utilizadas no trabalho de Carrero *et al.*, in press foram utilizadas para gerar matrizes de seqüências (**Tabela 3**), juntamente com as sequencias geradas para o isolados “Pb01-like” depositadas no banco de dados *GenBank* (*hyd* 5’UTR EF672155 - EF672175, *hyd* 3’UTR EF672134 - EF672154, *hsp70* EF672113 - EF672133, *kex* EF672176 - EF672196, e ITS EU118540-EU118561)

## Amplificação por PCR e sequenciamento dos 13 *loci* nucleares para os 17 isolados “Pb01-like”.

Foram adotados 13 *loci* de 9 genes nucleares previamente descritos em *P. brasiliensis*, (Tabela 3) para amplificação nos 17 isolados “Pb01-like”. Destes 13 *loci*, 8 deles (*gp43* Promotor-Exon1, *gp43* Exon2, Glucana Sintase Exon2, Glucana Sintase Exon 3, ADP-Fator de Ribosilação Exons 2-3, Quitina sintase II Promotor-Exon1, Quitina sintase II Exons 2-4 e Alfa tubulina) já tinham sido utilizados no trabalho de Matute *et al.*, 2006 e os outros 5 (Hidrofobina 5’ UTR, Hidrofobina 3’ UTR, Hsp70, Kex e ITS ) utilizados no trabalho de Carrero *et al.*, *in press*. As análises foram divididas em dois conjuntos de dados pelo fato de que o laboratório não dispunha do DNA de todos isolados utilizados por Matute *et al.*, 2006 para serem utilizados na amplificação e sequenciamento das 5 regiões utilizadas por Carrero *et al.*, *in press*. Se isto fosse possível os dados corresponderiam a apenas um conjunto totalizando 88 isolados amplificados pelas 13 regiões gênicas. Por outro lado, a formação de dois grupos de análises (8 *loci* analisados por Matute *et al.*, 2006 e 5 *loci* analisados por Carrero *et al.*, *in press*) proporciona um aumento da robustez da técnica de GCPSR, uma vez que aumenta o número de *loci* (2 conjuntos) a serem concordantes quanto à divisão gerada dentro do filograma entre os isolados do grupo “Pb01-like” e demais isolados de *P. brasiliensis*.

**Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados para amplificar das 13 regiões gênicas indicadas na tabela, para todos os 17 isolados “Pb01-like”.**

Conjunto1				
Sequências*	Oligonucleotídeos (senso) 5’→	Oligonucleotídeos (anti-senso) ←3’	Tm (°C)	Referência
<i>gp43 Promotor-exon1</i>	GAATTCCCAGTTGAAAAAATG	TATTGCTGATCCTGCTTGAC	48,0	Cisalpino <i>et al.</i> , 1996
<i>gp43 exon2</i>	CCAGGAGGCGTGCAGGTGTCCC	GCCCCCTCCGTCTTCCATGTCC	51,5	Cisalpino <i>et al.</i> , 1996
<i>Glucana Sintase exon2</i>	TCCGAGTACGAGAGAGTCCGC	CCATCACCGATCCTATTTTGCC	51,6	Pereira <i>et al.</i> , 2000
<i>Glucana Sintase exon 3</i>	TGGCATTTCGATGTCTCAGC	CTAATAGTCTTCCCCAAAC	53,0	Pereira <i>et al.</i> , 2000
<i>ADP-Fator de Ribosilação exons 3</i>	TTCATGGTTGGCCTCGATGTGCC	GAGCCTCGACGACACGGTCACGATC	50,5	Kasuga <i>et al.</i> , 2002
<i>Quitina sintase II Promotor-exon1</i>	GCAACTCTACCCAGAGCAAGC	GGGTTCAGGTCTTGGGCTAC	51,6	Niño-Vega <i>et al.</i> , 2004
<i>Quitina sintase II exons 2-4</i>	CTTAACGGTGCCTTCTTTGCGG	GTGAAAGTATTGTTGCCAGCG	57,0	Niño-Vega <i>et al.</i> , 2004
<i>Alfa tubulina</i>	CTGGGAGGTATGATAACTGTC	CGTCGGGCTATTGAGTTAAG	48,0	Kasuga <i>et al.</i> , 2002
Conjunto2				
Sequências**	Oligonucleotídeos (senso) 5’→	Oligonucleotídeos (anti senso) ←3’	Tm (°C)	Referencia
<i>Hidrofobina</i>	ATCATCAACAAGCATCAGTAC	CCGCTCGAGGGTGTGCGATTGGGCATT	52,0	Andrade <i>et al.</i> , 2002

5'UTR		TAC		
<i>Hidrofobina</i>	GATAGCTACTCATGTTTTTC	CTAAAGGAAAGTTAAGAAGC	50,0	Andrade <i>et al.</i> , 2002
3'UTR				
<i>Hsp 70</i>	AACCAACCCCTCTGTCTTG	TACCCTGTTCGTTGGCAATG	60,0	Da Silva <i>et al.</i> , 1999
<i>Kex</i>	GTCACTAAGGAGCTGTTGG	GAGTTGCCAGTCGATGAAC	52,0	Venâncio <i>et al.</i> , 2003
<i>ITS</i>	TCGACTCGGGCACGAGCATA	TGCCCGTGAGGGTCAGAGTA	57,0	Redecker <i>et al.</i> , 1997

\* Os oitos pares de seqüências dos oligonucleotídeos “*foward e reverse*” foram os mesmos utilizados para amplificação dos oitos fragmentos gênicos de Matute *et al.*, 2006.

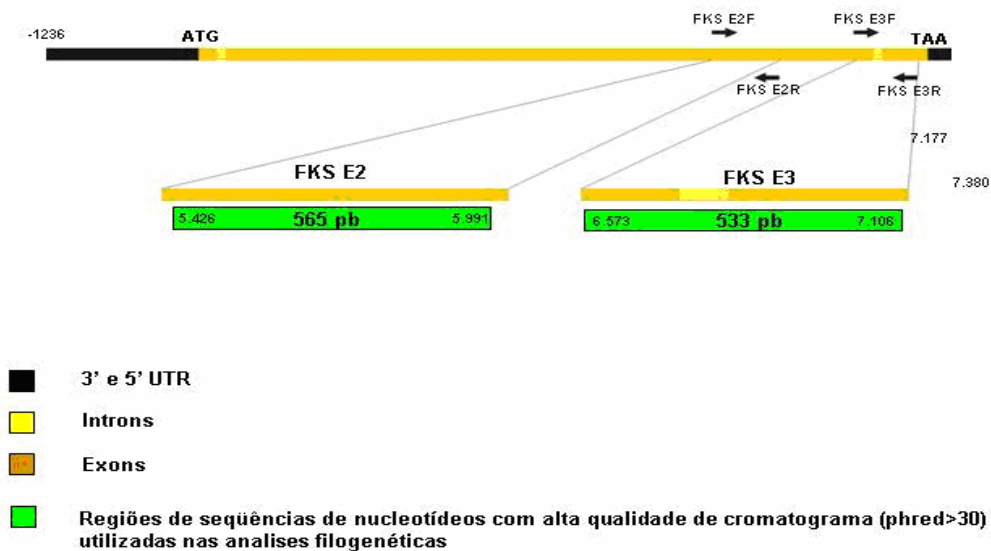
\*\* Os cinco pares de seqüências dos oligonucleotídeos “*foward e reverse*” foram os mesmos utilizados para amplificação dos cinco fragmentos gênicos de Carrero *et al.*, *in press*.

Os oligonucleotídeos utilizados para as amplificações foram os mesmos utilizados pelos autores nos trabalhos anteriores (Matute *et al.*, 2006; Carrero *et al.*, *in press*), ver **Tabela 3**. Excepcionalmente, o oligonucleotídeo senso usado na amplificação da região do promotor do gene gp43 foi re-desenhado e re-sintetizado (5' TCGATGATCGACTTTCTCCTGATG 3') já que uma parte do o DNA dos isolados “*Pb01-like*” não geravam produto de PCR amplificado. A região utilizada para amplificação, onde cada par de oligos foi desenhado, bem como o tamanho do fragmento de PCR gerado estão mostradas na **figura 7**. As reações de amplificação foram realizadas em duplicatas e em volumes de 50 µl utilizando 25 µl de PCR Fidelity PCR Master Mix 2X (USB), 0,2µM de cada oligonucleotídeo (oligonucleotídeo senso e anti-senso) e água q.s.p 50ul. Os ciclos da PCR foram: pré-desnaturação de dois minutos a 94°C; amplificação em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica por 30 segundos e extensão final de 68°C por 1 minuto A temperatura de anelamento foi ajustada para cada par de oligonucleotídeo (**ver Tabela 3**).

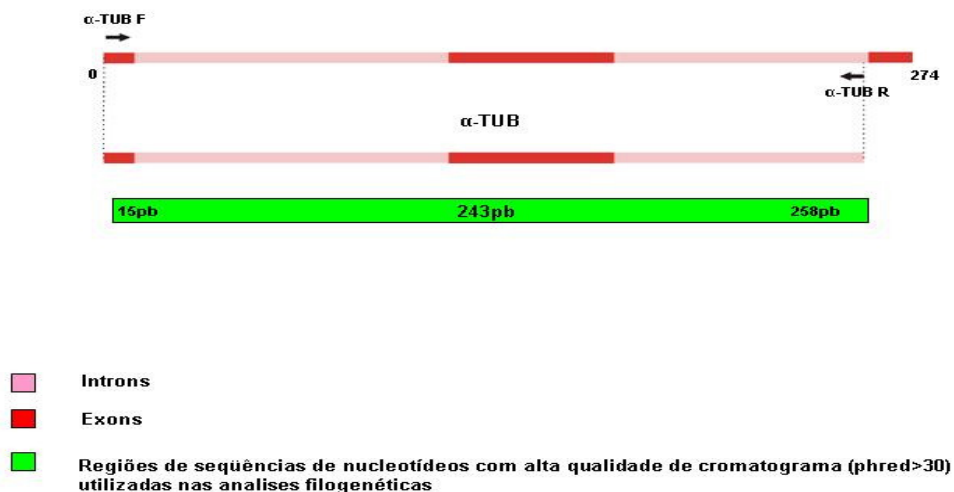
Para a região do exon 2 do gene gp43 os ciclos foram constituídos de pré-desnaturação de dois minutos a 94°C; amplificação em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento inicial de 70°C por 30 segundos e extensão final de 68°C por 1 minuto. A temperatura de anelamento foi reduzida em um grau a cada dois ciclos (*touchdown*). Os produtos de PCR amplificados foram analisados em gel de agarose 0.8% e a qualidade do fragmento amplificado foi analisada, avaliando-se a integridade do amplicom. Os produtos amplificados foram submetidos à purificação para retirada da enzima, dNTP's não incorporados, oligonucleotídeos e sais em excesso utilizando os kits PCR Ilustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Os produtos da PCR purificados foram quantificados em gel de agarose 0.8% pelo marcador de massa

molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen). As 220 seqüências nucleotídicas amplificadas foram determinadas por sequenciamento automático em capilar (MegaBACE 500) utilizando DYEnamic ET dye terminator kit (GE Healthcare). Os fragmentos foram seqüenciados em ambas as fitas a fim de se obter a melhor qualidade da seqüência do amplicom ( $phred > 30$ ). As seqüências foram inicialmente alinhadas utilizando o software BioEdit (Hall, 1999) através do algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e então manualmente editadas para corrigir eventuais bases mal alinhadas pelo programa. O programa DNASp v. 4.0.6 (Rozas *et al.*, 2003) foi utilizado para calcular o número médio de substituições nucleotídicas entre isolados (Dxy) e o número médio de substituições nucleotídicas entre duas populações (Da) (Nei M., 1987).

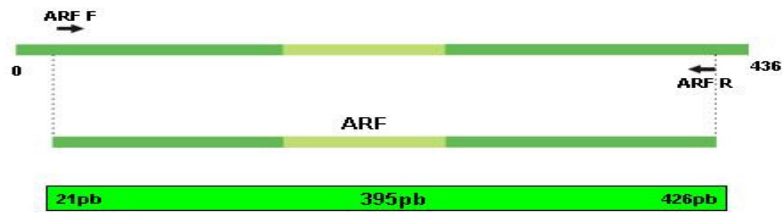
### FKS – glucana sintase – exon 2 e exon 3, amplificados separadamente.



### $\alpha$ -TUB – $\alpha$ -tubulina exons 2-3

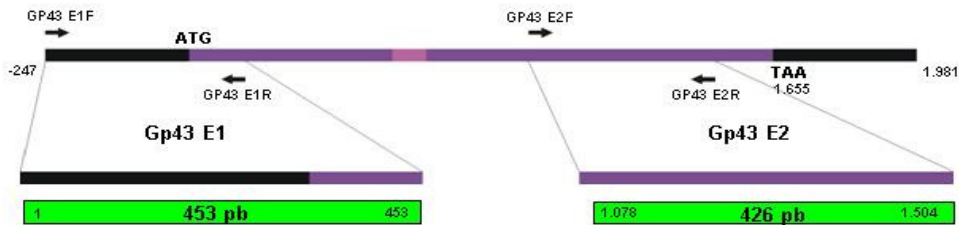


### ARF – fator de ribosilação exons 2-3



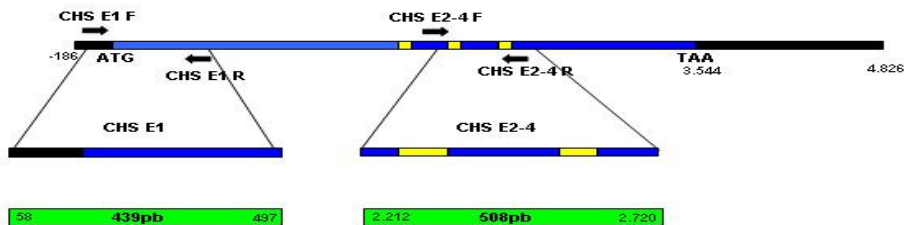
- Introns
- Exons
- Regiões de seqüências de nucleotídeos com alta qualidade de cromatograma (phred>30) utilizadas nas análises filogenéticas

### GP43 – gp43 promotor-exon1 e exon2, amplificados separadamente.



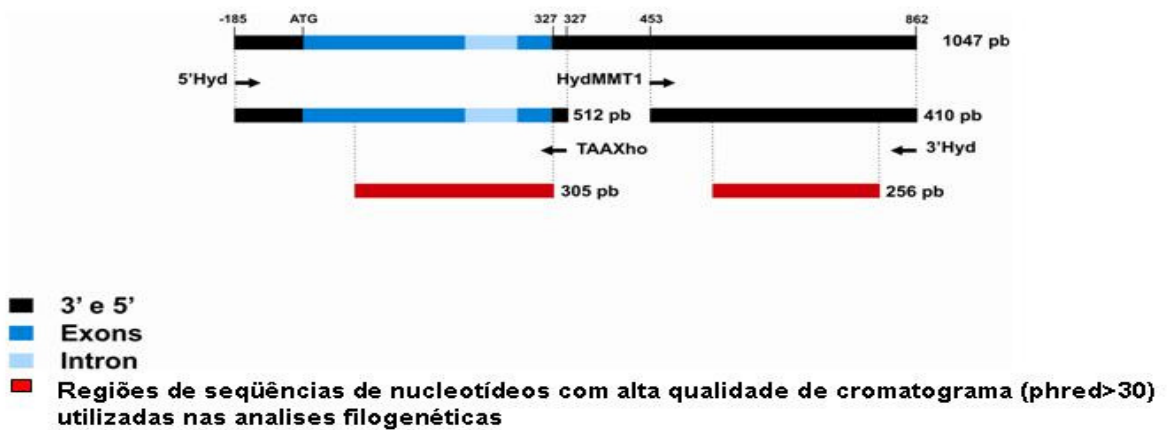
- 3' e 5' UTR
- Introns
- Exons
- Regiões de seqüências de nucleotídeos com alta qualidade de cromatograma (phred>30) utilizadas nas análises filogenéticas

### CHS – quitina sintase – exon 1 e exon 2-4, amplificados separadamente.

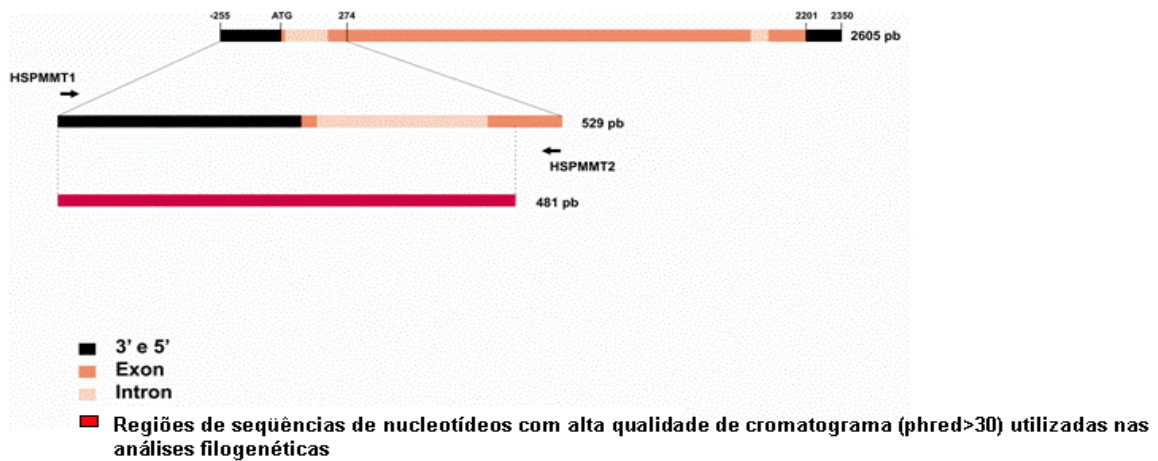


- 3' e 5' UTR
- Introns
- Exons
- Regiões de seqüências de nucleotídeos com alta qualidade de cromatograma (phred>30) utilizadas nas análises filogenéticas

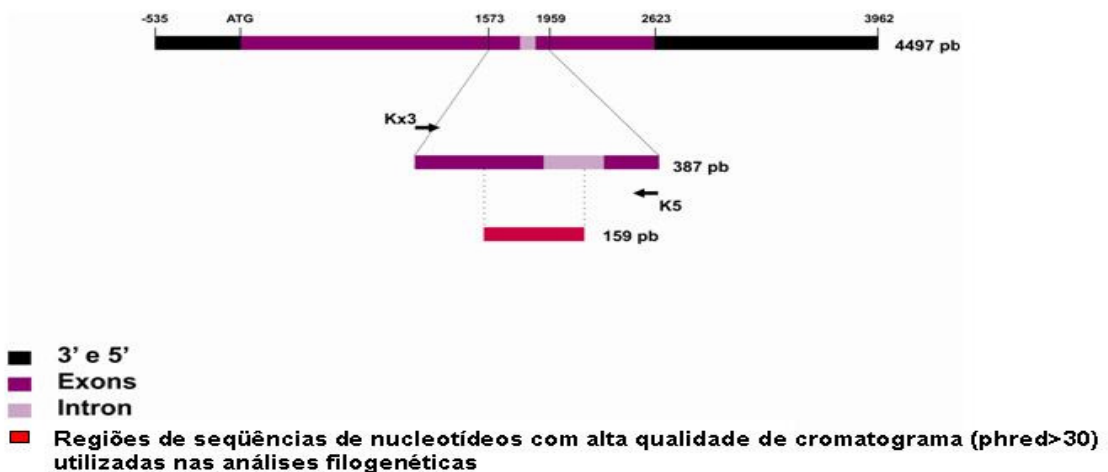
## HYD – hidrofobina – 5'UTR-*intron*1 e 3'UTR, amplificados separadamente



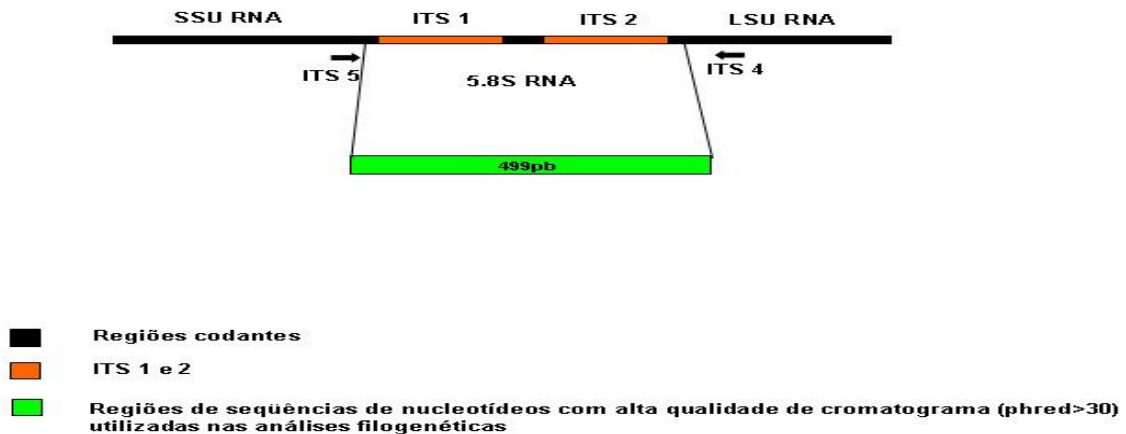
## HSP70 – hsp70 5'UTR e íntron1



## KEX – *kex* íntron 1



## ITS1/2 + 5.8S



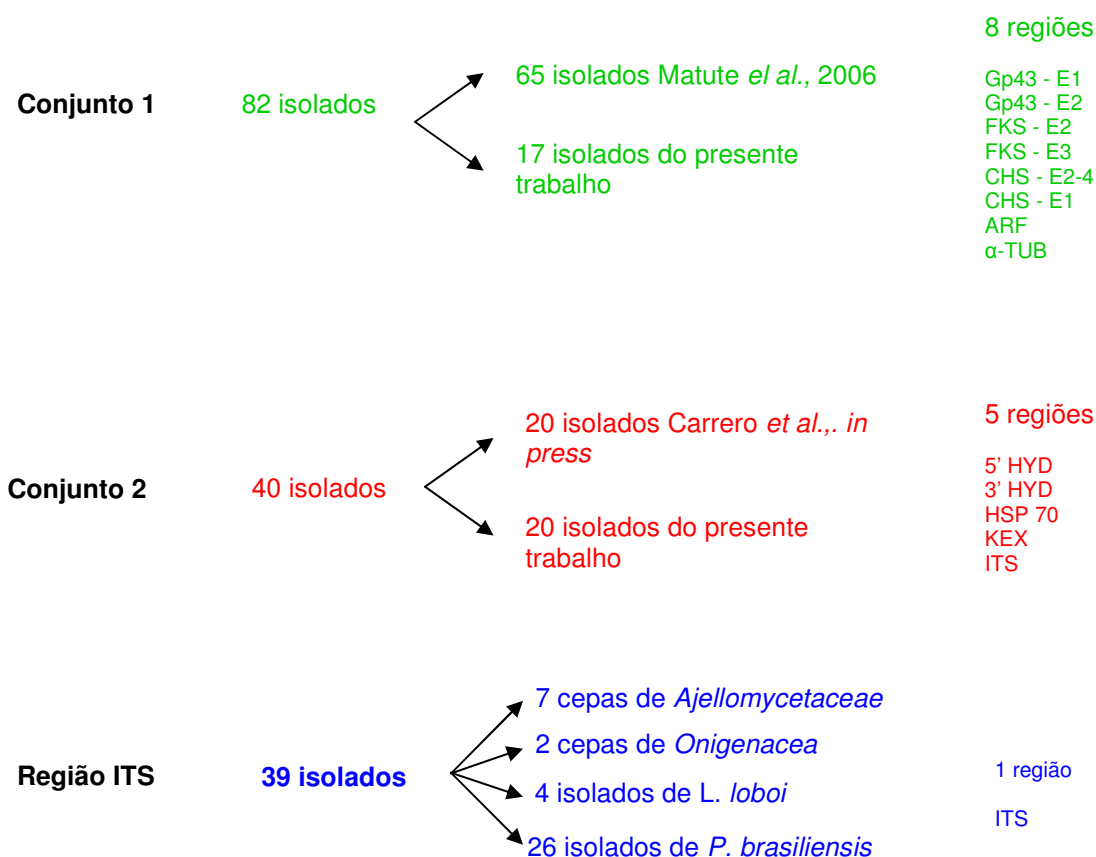
**Figura 7.** Regiões de anelamento dos oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados para amplificar os 13 *loci* polimórficos utilizados para construção das árvores filogenéticas: Glucana Sintase-Exon2 e Glucana Sintase-Exon3;  $\alpha$ -tubulina Exons 2-3; ADP-Fator de Ribosilação Exons 2-3; gp43 Promotor-Exon1 e gp43 Exon2; Quitina sintase II Promotor-Exon1 e Quitina sintase II Exons 2-4 (estes 8 *loci* constituem os fragmentos utilizados no conjunto 1 de análise); Hidrofobina 5'UTR - intron 1e Hidrofobina 3'UTR; hsp 70 3'UTR – Intron1; kex intron1; ITS1/2 (estes 5 *loci* constituem os fragmentos utilizados no conjunto 2 de análise).

### Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada utilizando os dois conjuntos de dados de seqüências de regiões gênicas. Além disto, a seqüência da região ITS, também utilizada no conjunto 2 de análise filogenética, incluiu os demais membros da família *Ajellomycetaceae*, conforme mostrado na **figura 7**. O **conjunto 1** de dados corresponde a 8 *loci* gênicos amplificados e sequenciados a partir dos DNAs dos **65 isolados** analisados anteriormente (Matute *et al.*, 2006) adicionado destes mesmos fragmentos amplificados e sequenciados a partir dos DNAs dos **17 isolados** “*Pb01-like*”, totalizando uma amostragem de **82 isolados** de *P. brasiliensis*.

O **conjunto 2** de dados corresponde a 5 *loci* gênicos onde foram utilizadas as seqüências de DNA de **20 isolados** de *P. brasiliensis* previamente depositadas por Carrero *et al.*, *in press*, além dos **17 isolados** “*Pb01-like*”. Para este grupo de análise foram adicionados mais **3 isolados** (Pb2, Pb3 e Pb4), representantes do grupo PS2 descrito por Matute *et al.*, 2006, gerando um número total de **40 isolados** de *P. brasiliensis*.

Para a análise da **região ITS** foram utilizadas as seqüências de representantes de todos os membros da família *Ajellomycetaceae* (*Histoplasma ssp*, *Blastomyces dermatitides*, *Emonsia ssp*, *Lacazia loboi*) e como grupo externo as duas espécies descritas de *Coccidioides*, além de outros **26 isolados** de *P. brasiliensis* incluindo os isolados “*Pb01-like*” totalizando **39 taxons**. Esta análise teve como objetivo investigar a distribuição filogenética do grupo “*Pb01-like*” em relação aos outros isolados de *P. brasiliensis*, o seu grupo irmão *L. loboi* e os demais membros da família *Ajellomycetacea*.



**Figura 8.** Quadro esquemático mostrando os dois conjuntos de dados e região ITS utilizados para análise filogenética. O esquema mostra o número de isolados utilizados, referências de trabalhos já publicados que utilizaram estes isolados e os *loci* utilizados na análise filogenética deste trabalho. O número de acesso de cada seqüência das regiões ITS e nome de cada espécie estão listados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Descrição da espécie, do isolados e/ou País de origem e número de acesso utilizados para gerar dados informacionais de fragmentos da região ITS para análise filogenética pelos métodos de análise de parcimônia e análise de Bayes.

Espécie	Isolado	Número de acesso
<i>P. brasiliensis</i>	Pb2	AY374338
<i>P. brasiliensis</i>	Pb3	-
<i>P. brasiliensis</i>	Pb4	AY374336
<i>P. brasiliensis</i>	Pb Pingüim	AY631235.1



<i>P. brasiliensis</i>	Pb T8B1	EU118561
<i>P. brasiliensis</i>	Pb T7F6	EU118560
<i>P. brasiliensis</i>	T13LN11	EU118548
<i>P. brasiliensis</i>	Pb305	EU118554
<i>P. brasiliensis</i>	Pb300	EU118553
<i>P. brasiliensis</i>	Pb Bt60	EU118549
<i>P. brasiliensis</i>	Pb73	EU118546
<i>P. brasiliensis</i>	Pb 339	EU118547
<i>P. brasiliensis</i>	Pb IBIA	EU118545
<i>P. brasiliensis</i>	Pb ESLAVA	EU118543
<i>P. brasiliensis</i>	Pb DASYPUS	EU118542
<i>P. brasiliensis</i>	AF092903	-
<i>P. brasiliensis</i>	IFM 54648	AB304443
<i>P. brasiliensis</i>	7455	-
<i>P. brasiliensis</i>	769	-
<i>P. brasiliensis</i>	206	-
<i>P. brasiliensis</i>	57	-
<i>P. brasiliensis</i>	133	-
<i>P. brasiliensis</i>	717	-
<i>P. brasiliensis</i>	Pb01	AF092903
<i>P. brasiliensis</i>	Pb6810	-
<i>L. loboi</i>	121752	AF322182
<i>L. loboi</i>	24	-
<i>L. loboi</i>	28	-
<i>L. loboi</i>	37	-
<i>Coccidioides posadasii</i>	IFM 54195	AB023290
<i>Coccidioides immitis</i>	IFM 50992	AB232894
<i>E. parva</i>	UAMH 134	AF038326
<i>E. crescens</i>	UAMH 132	AF038351
<i>A. dermatitides</i>	ATCC60915	AF322388
<i>A. dermatitides</i>	-	U18364
<i>A. capsulatus</i>	EH315	AB071828
<i>A. capsulatus_var.duboisii</i>	ATCC32281	AF322386
<i>A. capsulatus_var.farciminosus</i>	ATCC58332	AF322387

\* (-) números de acesso no GenBank em fase de submissão

As análises filogenéticas foram realizadas nos dois conjuntos de dados para cada *loci* separadamente. Além disto, cada um dos conjuntos de dados (1 e 2) foram submetidos à análise filogenética utilizando os 8 *loci* concatenados do conjunto 1 e os 5 *loci* concatenados do conjunto 2 de dados de seqüências gênicas. As análises filogenéticas foram realizadas através da análise de máxima parcimônia e Bayesiana a fim de determinar a possível existência de grupos com estrutura taxonômica significativa dentro da espécie *P. brasiliensis*.

A **análise da máxima parcimônia** é baseada no princípio da homologia, ou seja, se dois táxons compartilham uma característica é porque esta foi herdada do último ancestral comum a ambos. Dependendo do caso, as análises de parcimônia podem gerar mais de uma árvore. Neste caso deve-se optar pela árvore consenso que é gerada pela “média” entre as árvores mais parcimoniosas obtidas. O fenômeno de homoplasia é

interpretado com sendo o caráter que é compartilhado por dois táxons, mas que não foi herdado do ancestral comum a ambos. A estimativa do **índice de consistência (IC)** procura avaliar justamente o grau de homoplasia de uma árvore filogenética, isto é, nos casos em que a mudança de um estado de caráter aparece uma única vez na topologia, o IC será igual a 1,0 significando que provavelmente aquela árvore está isenta de viés causado pela homoplasia. **Um IC acima de 0,75 é bem aceito hoje em dia para que haja confiança quanto à topologia da árvore.** Os ramos gerados pela análise de máxima parcimônia são passíveis de serem avaliados por valores de “*bootstrap*”. Os valores de “*bootstrap*” são gerados através de re-amostragens da matriz nucleotídica utilizada para se chegar a árvore mais parcimoniosa. As análises de máxima parcimônia foram realizadas pelo software PAUP 4.0 (PAUP versão 4.0b.10a; D.L. Swofford 2000). A árvore inicial foi obtida através da busca heurística devido ao elevado número de táxons. A busca heurística avalia as árvores, escolhendo caminhos que contém a árvore de menor *score*. Durante a busca heurística, diferentes rearranjos podem ser feitos para aumentar a chance de cobrir toda a distribuição espacial das árvores. Os “*gaps*” foram tratados como dados perdidos. Para representar a confiança de cada ramo gerado pelas análises, os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de uma busca heurística e o rearranjo dos galhos foi feito através da técnica de “*tree bisection and reconnection*” (TBR). **Os caracteres foram re-amostrados em 1000 repetições (“*bootstrap*”)** a fim de determinar a consistência dos ramos. Os ramos que permanecem sempre juntos nas novas topologias simuladas receberam um valor de 100% do *bootstrap* na árvore inicial gerada. Para a análise de GCPSR são aceitos valores de “*bootstrap*”  $\geq 70\%$  (Hillis & Bull, 1993)

A **análise Bayesiana** aplicada à filogenia é uma das técnicas de análise filogenética mais bem aceita atualmente. Esta técnica baseia-se nos parâmetros qualitativos chamados de **probabilidade posterior** que é estimada em um modelo evolutivo previamente selecionado. A probabilidade posterior é dada pelo valor de verossimilhança multiplicada pela probabilidade *a priori* desta hipótese. Este valor pode ser interpretado como a probabilidade da árvore filogenética estar correta. As relações evolutivas entre grupos estudados geneticamente distintos são estimadas por estes valores. O método numérico mais utilizado para estimar os valores de probabilidade posterior é o algoritmo da Cadeia de Markov Monte Carlo acoplado ao algoritmo Metropolis (MCMC). A análise Bayesiana é constituída por picos e vales de árvores contendo valores de verossimilhança, que são coletadas a cada geração de análise. As árvores com valores de verossimilhança

situados nos picos de cada geração são considerados satisfatórios, enquanto as árvores com valores de verossimilhança que são coletados nos vales são dispensáveis para o cálculo final da árvore mais provável. O método MCMC permite que a busca dos valores sub-ótimos de verossimilhança de cada geração sejam coletados nos picos e que alguns vales sejam ocasionalmente evitados, reduzindo assim o aprisionamento da busca num desses vales evitando que falseie o resultado final após o número de gerações solicitado. A análise de Bayes foi realizada utilizando-se o software Mr. Bayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). As cadeias de Markov Monte Carlo foram iniciadas a partir de uma árvore aleatória e processadas por 1.000.000 de gerações e amostras de cada ciclo de 100 gerações foram coletadas, sendo que as 25% piores amostras coletadas foram descartadas (“*burn-in*”) e as amostras remanescentes foram utilizadas para determinar as distribuições dos valores de probabilidade posterior. Todos os valores de Log-Verossimilhança foram plotados contra seu respectivo número da geração coletada. Para reforçar as análises, cada locus foi analisado independentemente pelo menos em duplicata. Os valores de Log-Verossimilhança e a árvore consenso foram comparados em cada corrida para verificar se convergiam em árvores filogenéticas coincidentes e por fim os valores de probabilidade posterior foram estimados. Os valores de probabilidade posterior  $\geq 0,95$  são considerados satisfatórios e significativos para a análise de GCPSR (Rannala & Yang, 1996).

O melhor modelo evolutivo para cada análise filogenética realizada neste trabalho foi estimado pelo *software* MrModeltest2 (Nylander, 2004). Este *software* promove a busca do melhor modelo para avaliar a substituição de nucleotídeos em uma determinada seqüência gênica. Além disso, o *software* é capaz de gerar um arquivo de saída com os resultados obtidos contendo os comandos necessários para operar tanto o *software* PAUP 4.0 como também o Mr.Bayes3.1. As árvores filogenéticas foram construídas com auxílio do *software* Treeview e FigTree 1.0.

### **Detecção de recombinação**

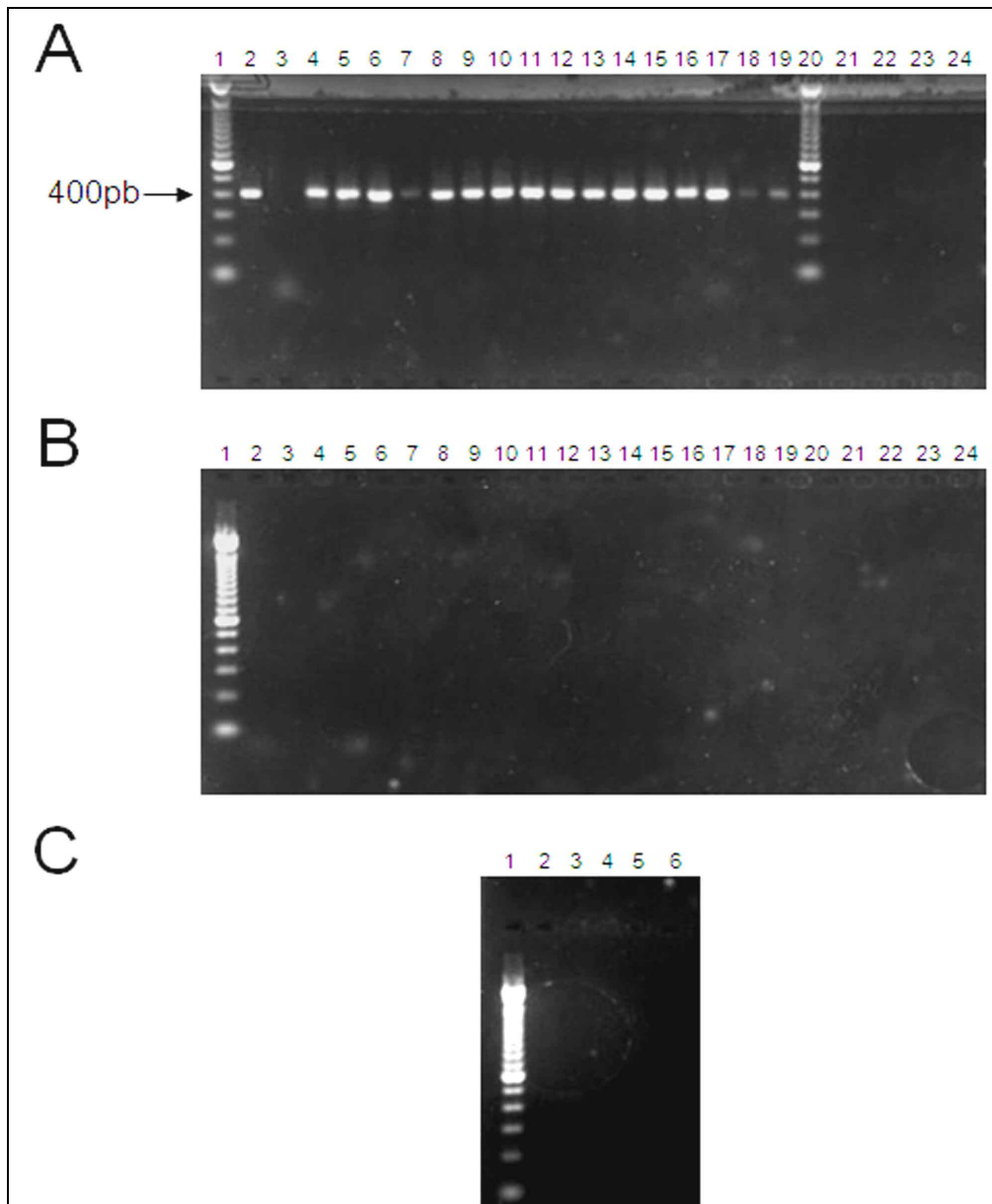
A detecção de recombinação também pode ser avaliada pelo método de decomposição (*Split decomposition method*) (Bandelt & Dress, 1992) utilizado para visualizar incompatibilidades geradas pelo evento de recombinação aplicados no *software* (Splitstrees4 v4.8) a partir de métodos de distância gerados pelo PAUP 4.0( Kimura-3-parâmetros) (Kimura, 1981). Este programa permite ao usuário criar redes evolutivas independentes mostrando se existe a possibilidade de compatibilidade entre as redes

observadas. A presença de redes de recombinação pode ser detectada por interligações geradas entre os membros dos grupos geneticamente isolados na análise. Cada grupo isolado terá um ramo independente, mostrando que este determinado grupo não possui nenhum tipo de compartilhamento genético entre os grupos. As análises foram realizadas em ambos os grupos a fim de avaliar a possibilidade de recombinação intra e inter-grupos definidos.

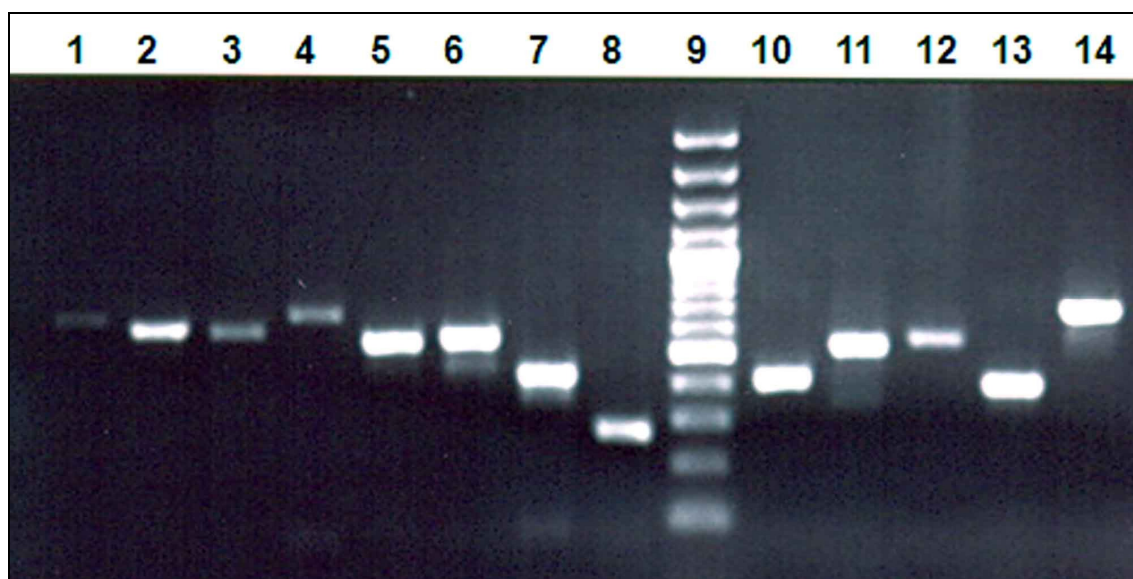
## Resultados

### Análise dos isolados para o marcador molecular *hsp70* e amplificação dos 13 loci polimórficos

Dos 51 isolados analisados para o marcador molecular específico *hsp70*, 17 deles incluindo o Pb01 foram positivos para a reação de PCR mostrando a presença e compartilhamento do INDEL na região do *íntron 1* deste gene. Os 17 isolados que tiveram o fragmento de 400pb amplificado foram intitulados “*Pb01 like*”, sendo eles: Pb01, 3171, 6810, 7455, 769, 717, 133, RAJ-2, 189, 218, 206, 84, 61, 57, 694, 397, 351 (**Figura 9**). Todos estes isolados denominados “*Pb01-like*” foram submetidos a amplificação dos 13 loci: *gp43* Promotor-exon1, *gp43* exon2, Glucana Sintase exon2, Glucana Sintase exon 3, ARF-Fator de Ribosilação exons 2-3, Quitina sintase II Promotor-exon1, Quitina sintase II exons 2-4,  $\alpha$ -tubulina (8 loci correspondentes ao conjunto 1 de dados), Hidrofobina 5’UTR, Hidrofobina 3’-UTR, *hsp 70* 5’-UTR e *íntron1*, *kex íntron 2* e ITS1/2 (5 loci correspondentes ao conjunto 2 de dados). Todos os fragmentos foram obtidos com sucesso, exceto o isolado 697, para o qual não foi possível amplificar o locus *gp43* – éxon 2. A seqüência desta região para o isolado 697 foi considerada como dado perdido na análise filogenética, tanto para a análise de máxima parcimônia como Bayesiana. Para exemplificar, os 13 amplicons gerados para o isolado Pb01 estão mostrados na **Figura 10**.



**Figura 9.** Amplificação da região do INDEL do gene *hsp70* para determinação dos isolados “*Pb01-like*” de 55 isolados de *P. brasiliensis*. O gel de agarose 0.8% mostra o resultado da PCR utilizando-se os oligonucleotídeos PLMMT1 e HSPMMT1. **A)** poços 1 – 24: marcador de massa molecular de 100pb, 01 , controle (-), 3171, 6810, 7455, 769, 717, 133, raj-2, 189, 218, 206, 84, 61, 57, 694, 397, 351, Marcador 100pb, SN, JT-2, JOA, 1087 e JT-5; **B)** poços 1 – 24: Marcador 100pb, JT-4, 689, 686, 52, 53, 333, 113, 5979, 135, Givaldo, 1430, 16, 662, 306, 728, 369, 339, 73, JT-1, YRJ, 283, Pinguim, **C)** poços 1 – 6: Marcador 100pb, 262, 265, 375, TATU, 9.



**Figura 10.** Análise em gel de agarose 0,8% dos produtos amplificados para os 13 *loci* gênicos do isolado Pb01: 1) glucana sintase exon2, 2) glucana sintase exon 3, 3) quitina sintase II Promotor-exon1, 4) quitina sintase II exons 2-4, 5) *gp43* promotor-exon1, 6) *gp43* exon2, 7) ARF-Fator de Ribosilação exons 2-3, 8)  $\alpha$ -tubulina, 9) marcador de massa molecular 100pb, 10) hidrofobina 3'UTR, 11) hidrofobina 5'UTR, 12) *hsp* 70 5' UTR e íntron1, 13) *kex* intron 2 e 14) ITS1/2 + 5,8S.

### **Análise de polimorfismo dos 13 *loci* gênicos**

As seqüências obtidas pelo sequenciamento automático dos 17 isolados “*Pb01-like*” para os 13 *loci*, geradas neste trabalho, estão em fase de depósito no GenBank. Ambas as fitas do DNA de cada fragmento gênico amplificado foram seqüenciadas, sendo consideradas as seqüências com qualidade de phred $\geq$ 30. As seqüências foram alinhadas gerando matrizes nucleotídicas individuais para cada *locus* analisado. Os pontos polimórficos encontrados para os 13 *loci* analisados neste presente trabalho estão representados no **anexo 1** (conjunto 1 de análise) e **anexo 2** (conjunto 2 de análise). Estes dados individuais de polimorfismo para cada *locus* gênico foram utilizados, em separado, para a análise filogenética, conforme será mostrado neste trabalho. Além disto, os *loci* tanto do conjunto 1 como do conjunto 2 foram concatenados, em separado, para avaliar se o padrão de identificação dos grupos geneticamente isolados seriam condizentes com as análises de *locus* simples, parâmetros estes indispensáveis e essenciais para o reconhecimento de espécies filogenéticas.

O conjunto 1 de análise constituído pelos 8 *loci* concatenados totalizou 3.565 nucleotídeos e mostrou que 308 bases nucleotídicas são polimórficas (8,63%). Destes, 223 são parcimônia-informativos e 85 parcimônia-não informativos. O conjunto 2 de dados gerou um total de 1.662 nucleotídeos analisados, dos quais 183 foram variáveis (11,01%)

(**Tabela 5**). Destes, 69 são parcimônia-informativos e 114 parcimônia não-informativos. O software PAUP 4.0 separa automaticamente os polimorfismos parcimônia-informativos para a análise de máxima parcimônia, sendo estes os responsáveis pelo sinal filogenético.

Altos percentuais de bases polimórficas também foram encontrados em outras espécies fúngicas de alta diversidade genética, como no caso de espécies crípticas (Couch & Kohn, 2002; O'Donnell *et al.*, 2004). Longos trechos de INDEL foram observados em ambos os conjuntos de dados de seqüências.

No **conjunto 1** foi observado para o *locus* ARF- Fator de ribosilação, um INDEL de 8 pb, fixado entre os isolados do grupo “*Pb01-like*” e as espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3. Na região do promotor do gene *gp43* foi observado um INDEL de 17pb, também fixado entre os isolados do grupo “*Pb01-like*” e espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3. Entretanto, o isolado 133 não apresenta para este *locus gp43* polimorfismo compatível com o grupo “*Pb01-like*”, compartilhando o polimorfismo desta região apenas com os isolados do grupo PS2. Um INDEL de 8pb encontrado no *locus gp43*-promotor-exon1 é exclusivo do isolado A1, previamente relatado por Matute *et al.* (2006) (**ver anexo 1 – loci ARF e gp43-promotor-exon1**).

No **conjunto 2**, a região do íntron1 do gene *hsp70* possui quatro seqüências de INDEL (12, 6, 23 e 3pb) fixados entre o grupo “*Pb01-like*” e demais isolados. É possível observar também, nesta região, um microssatélite (TC)<sub>n</sub> que nos isolados de *P. brasiliensis* é fixado em 5 repetições, enquanto que nos isolados do grupo “*Pb01-like*” esse microssatélite pode variar de 14 a 17 repetições TC dependendo do isolado (**Ver Anexo2 - íntron1 do gene hsp70**). As seqüências de INDEL encontradas em ambas as análises e o número de repetições da região de microssatélite foram fixados em ambos os grupos de isolados geneticamente distintos. É importante ressaltar que foi observada baixa freqüência de compartilhamento de polimorfismos entre os grupos “*Pb01-like*” e espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3, porém a fixação dos polimorfismos observados foi preponderante entre estes dois grupos.

A região mais polimórfica para o conjunto 1 foi o promotor e éxon1 do gene *gp43* ( $\pi=0,03978$ ) e para o conjunto 2 foi a região do gene da *hsp70* ( $\pi= 0,02788$ ). Para as duas regiões analisadas do gene *gp43* para os 82 isolados de *P. brasiliensis* foram obtidos 880 nucleotídeos, dos quais 681 são correspondentes a regiões codantes. Esta região foi a de maior incidência de substituições não-sinônimas, gerando modificação na seqüência da proteína, chegando a 32 resíduos de aminoácidos alterados de 227 analisados (14,1%), o que demonstra a alta variabilidade de isoformas para este exoantígeno.

**Tabela 5.** Avaliação geral do polimorfismo detectado nos dois conjuntos de dados analisados.

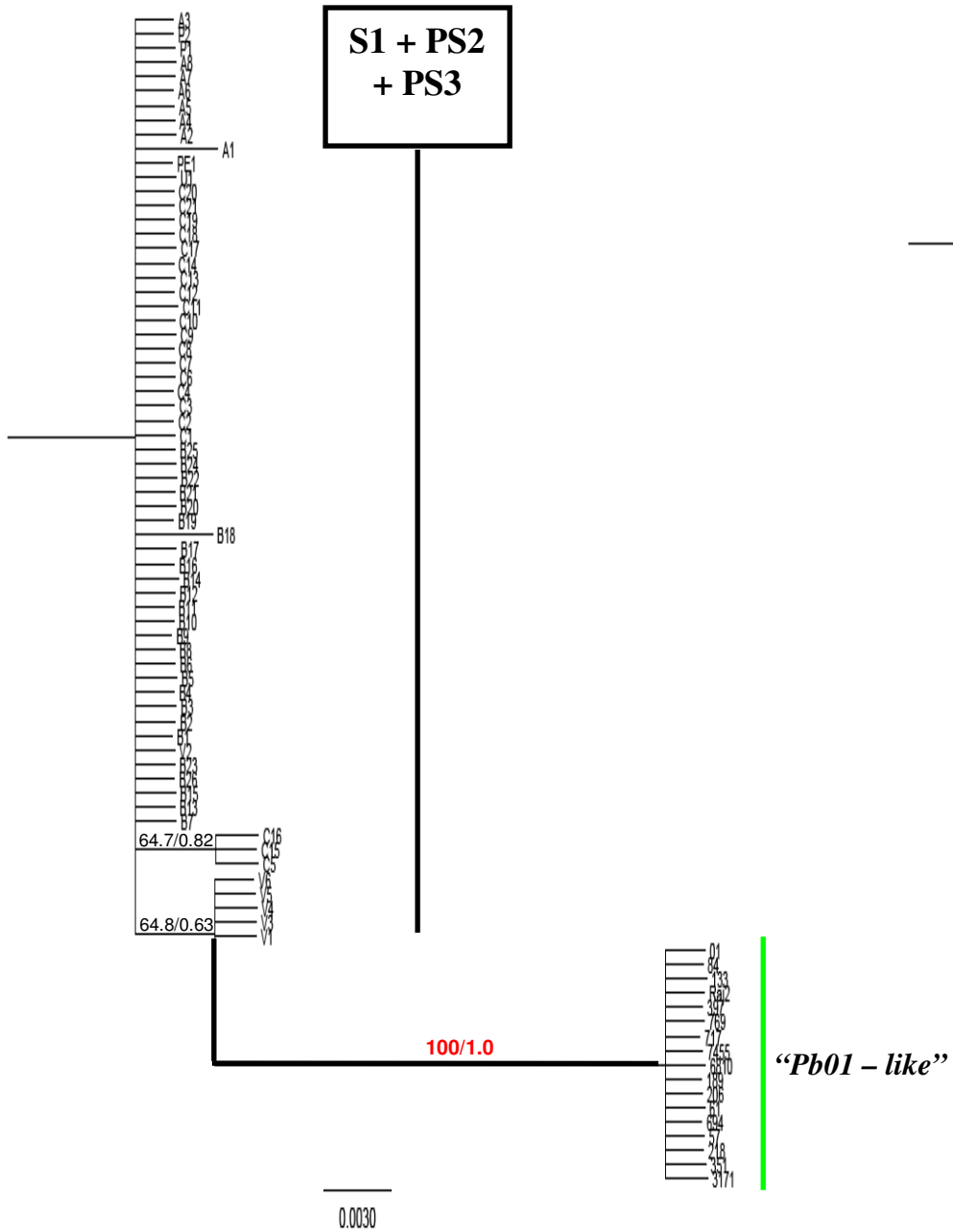
<b>Conjunto 1</b>				
<i>Locus</i>	Total de nucleotídeos analisados	Sítios Parcimônia-informativos	Número de sítios polimórficos	Polimorfismos fixados entre isolados “ <i>Pb01-like</i> ” e demais isolados
<i>alfa tubulina</i>	243	18	26	14
<i>ADP-Fator de Ribisilação</i>	396	15	29	18
<i>quitina sintase II Promotor-exon1</i>	508	21	37	11
<i>quitina sintase II exons 2-4</i>	438	23	22	14
<i>glucana sintase exon2</i>	566	12	14	11
<i>glucana sintase exon 3</i>	534	19	21	14
<i>gp43 Promotor-exon1</i>	453	54	91	69
<i>gp43 exon2</i>	427	61	68	42
<b>Total</b>	3565	223	308	193
<b>Conjunto 2</b>				
<i>hidrofobina 3'UTR</i>	208	11	20	8
<i>hidrofobina 5'UTR</i>	346	15	16	12
<i>hsp 70</i>	399	20	110	91
<i>kex</i>	210	13	20	15
<i>ITS</i>	499	10	17	11
<b>Total</b>	1662	69	183	137



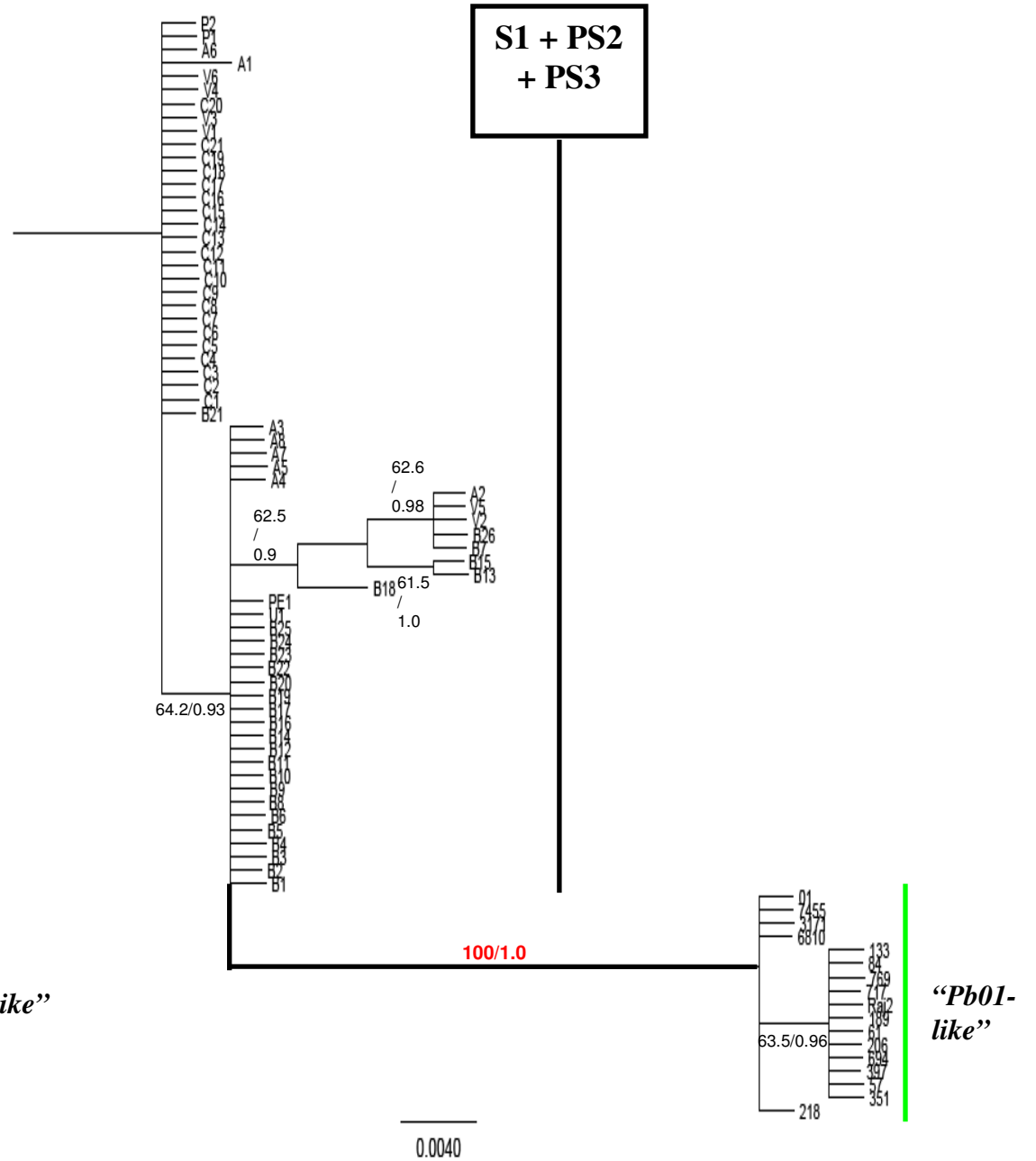
## Reconstrução filogenética e identificação de espécies

### Análise filogenética dos *loci* individuais para os dois conjuntos de dados

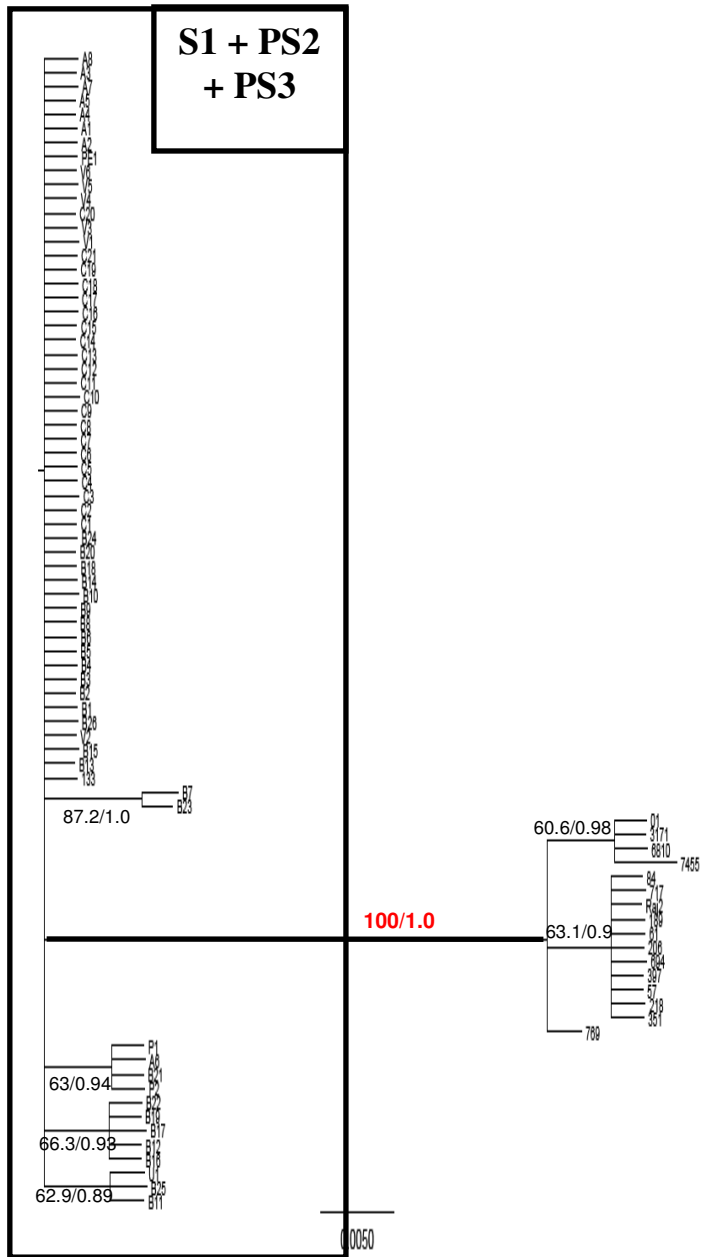
A genealogia de cada um dos 13 *loci* individuais analisados está representada pelas respectivas árvores-consenso, as quais foram resultantes de 1.000.000 de randomizações individuais a partir de uma árvore inicial gerada pela análise de *Bayes* (ver **Figuras 11A – 11H e 12A – 12E**). A topologia gerada a partir de cada locus analisado separadamente pelas análises de *Bayes* foram em sua grande maioria iguais (com exceção do *locus kex*) às topologias geradas pela análise de máxima parcimônia, assim os valores de “*bootstrap*” foram adicionados aos ramos das árvores das **figuras 11A – 11H e 12 A-C e 12E**. No *locus kex* a divisão entre representantes dos grupos filogenéticos de *P. brasiliensis* e “*Pb01-like*” se mantém conservada entre as análises de *Bayes* e máxima parcimônia, no entanto, uma divisão não significativa aparece dentro do clado correspondente às espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*. Esta divisão não ocorre nas análises de máxima parcimônia, mas é possível observá-la na análise de *Bayes*, porém com valores de probabilidade posterior não-significativos (<0,95) quanto ao suporte dos ramos criados (ver **figura 12D**). As escalas presentes em cada filograma são geradas pela proporção de sítios de nucleotídeos variáveis pelo total de nucleotídeos analisado. Pode-se observar que os isolados “*Pb01-like*” sempre se separam dos demais grupos que definem as três espécies filogenéticas descritas por Matute *et al.*(2006) em todos os *loci* analisados dos 2 conjuntos de dados (**Figura 11 A – H e Figura 12 A - E**). Por exemplo, para o caso do *locus* da  $\alpha$ -tubulina, observa-se que o grupo “*Pb01-like*” e o grupo filogenético PS1 provavelmente possuem um ancestral comum, pois se separam de um único ponto durante o processo evolutivo, quando a análise é feita para este *locus*. Os grupos filogenéticos S1, PS2 e PS3 se mantêm separados de forma consistente conforme descrito anteriormente por Matute *et al.* (2006), mesmo após a adição dos 17 isolados “*Pb01-like*”, o que indica que as análises realizadas neste trabalho refletiram o mesmo grau de agrupamento (ver **figuras 11E e 11H**). Foi possível observar no *locus hsp70*, do conjunto 2 de análise a presença de forma consistente da espécie filogenética PS2 (**figura 12C**). É importante ressaltar que o grupo “*Pb01-like*” se separa de todos os demais grupos anteriormente descritos e isto é fortemente reforçado pelos valores de “*bootstrap*”; após 1.000 experimentos “*in silico*” de randomizações para cada um dos 13 *locus* analisados verifica-se valores máximos (100%) de “*bootstrap*” para todas as árvores. Valores de “*bootstrap*” acima de 70% são considerados como critério de alta consistência e confiabilidade nas análises de máxima



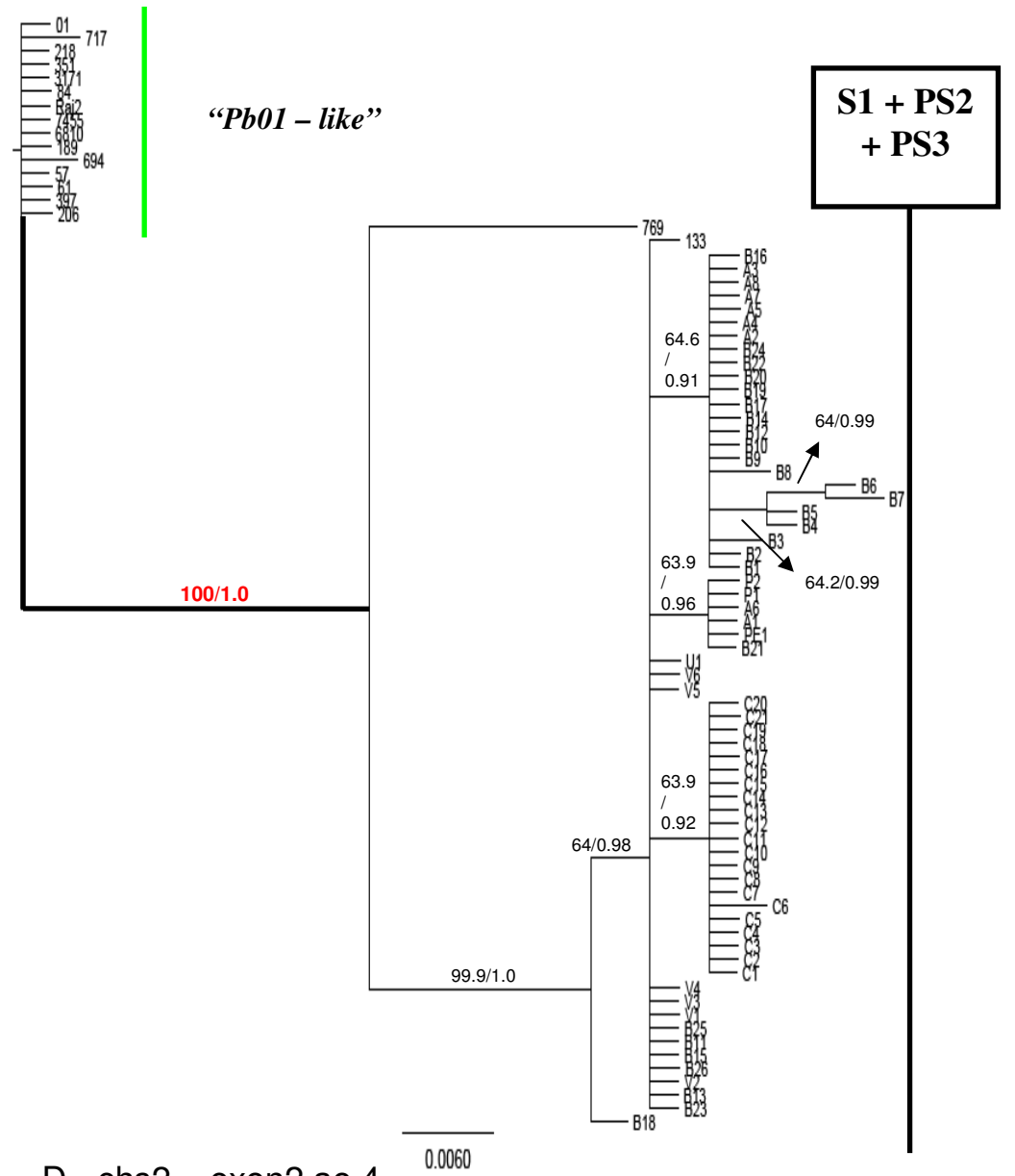
A - fks – exon2

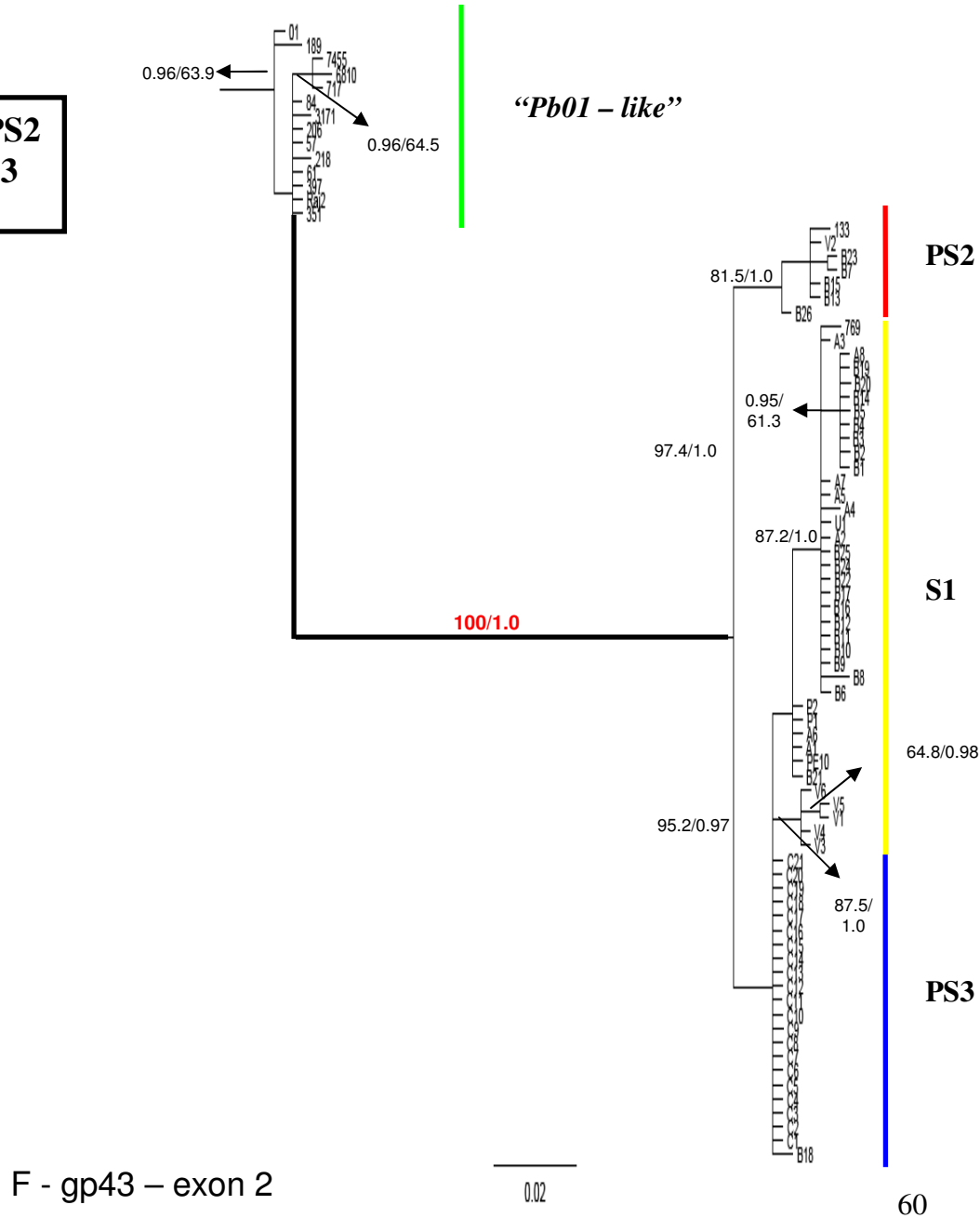
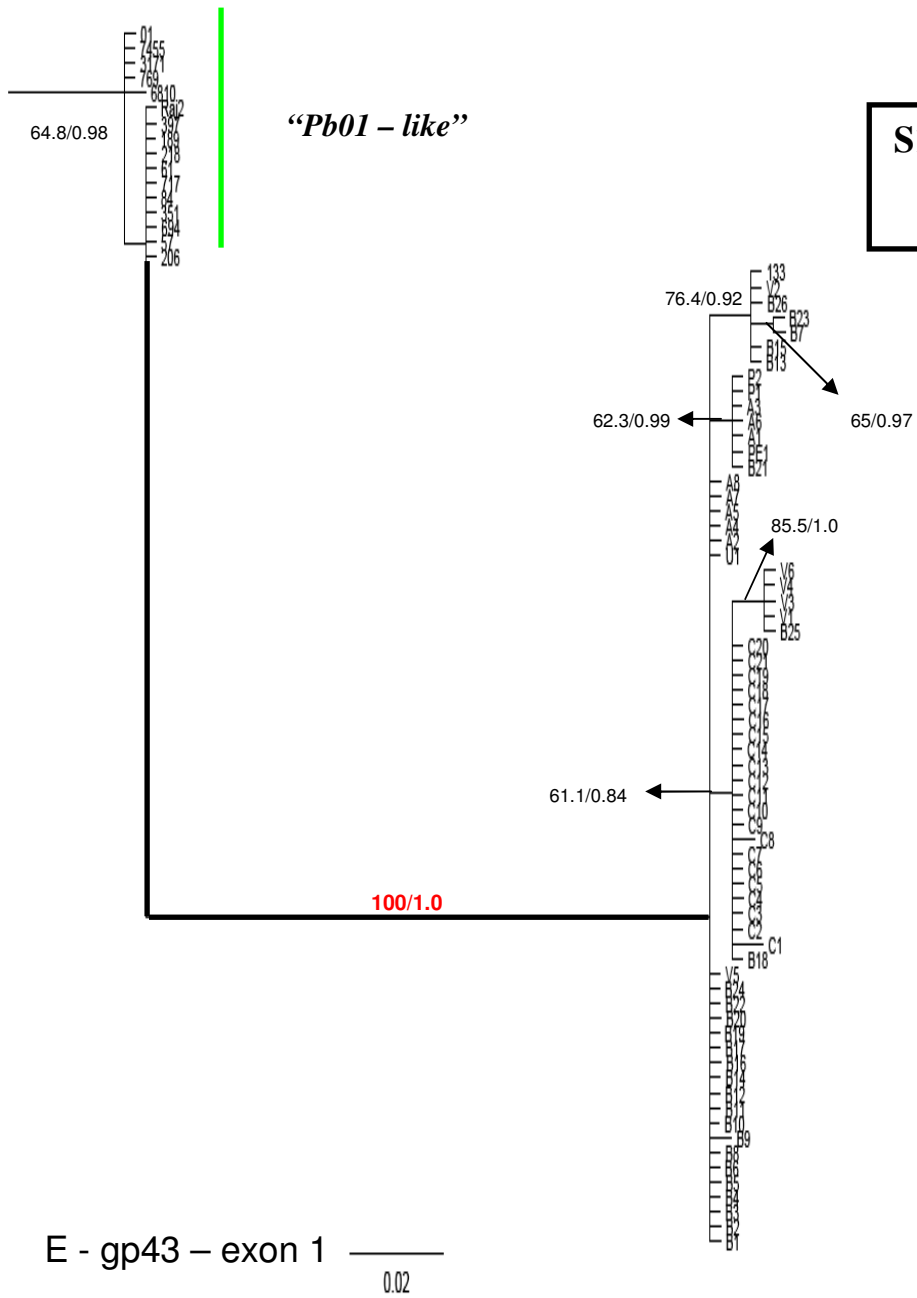


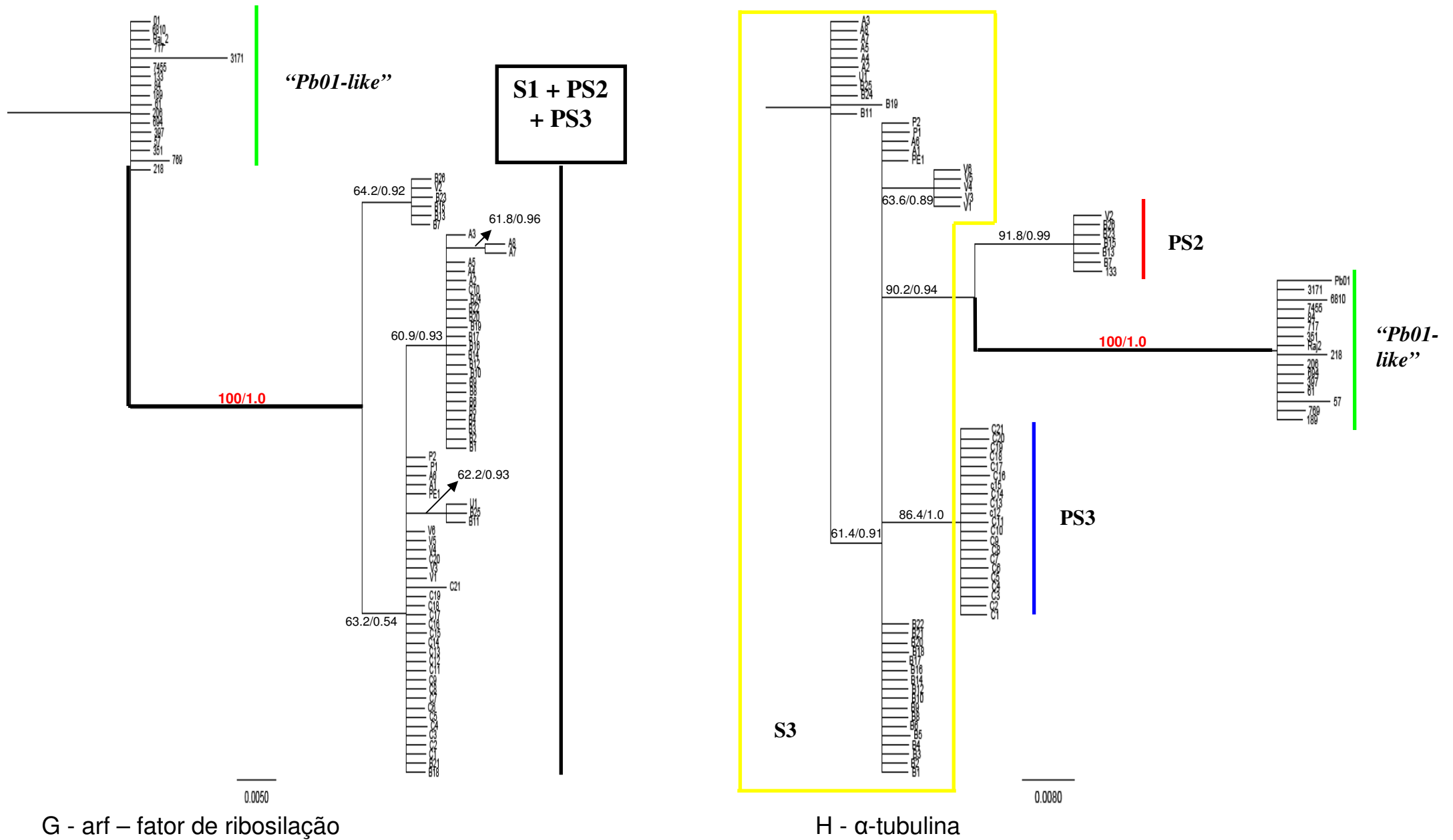
B - fks – exon3



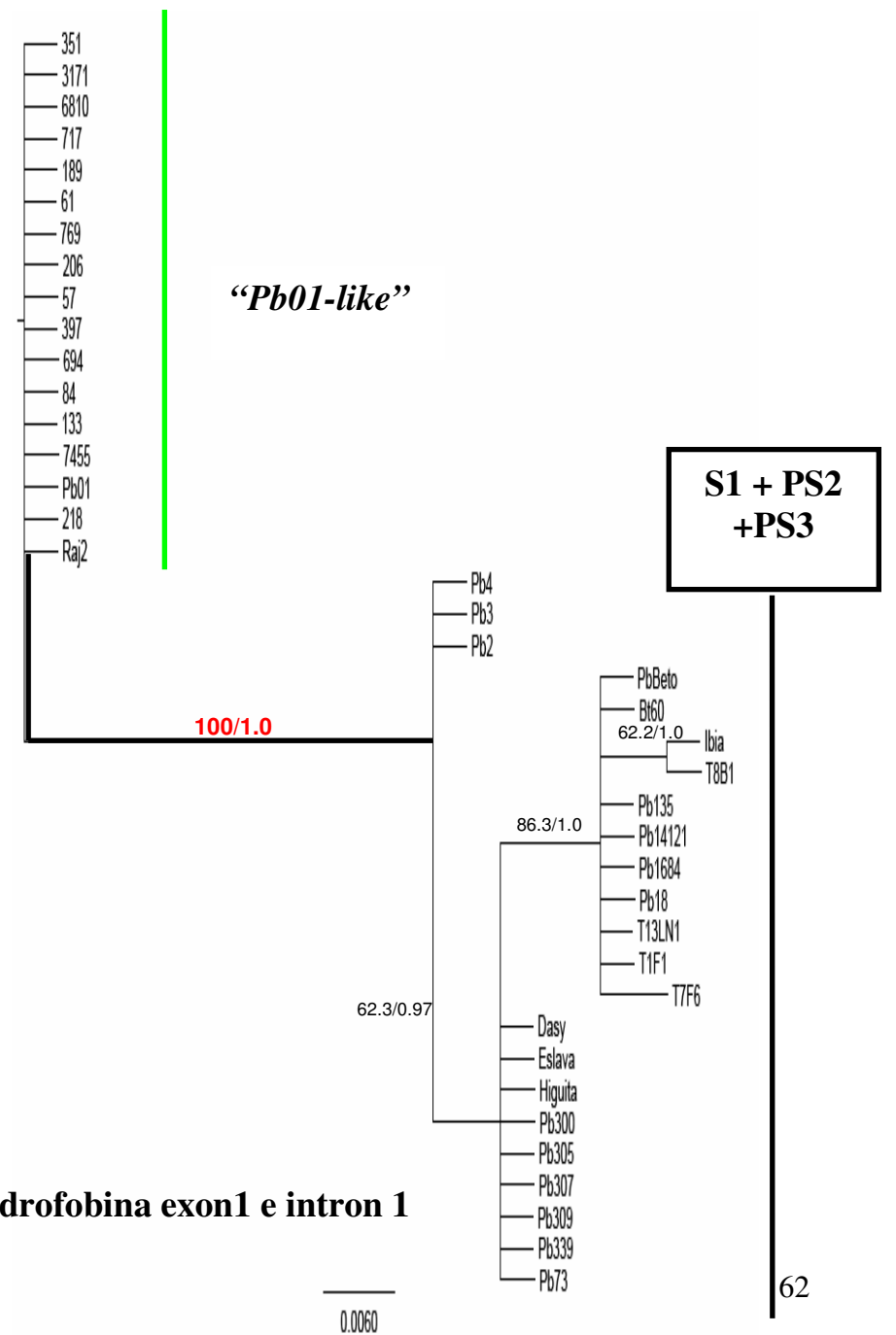
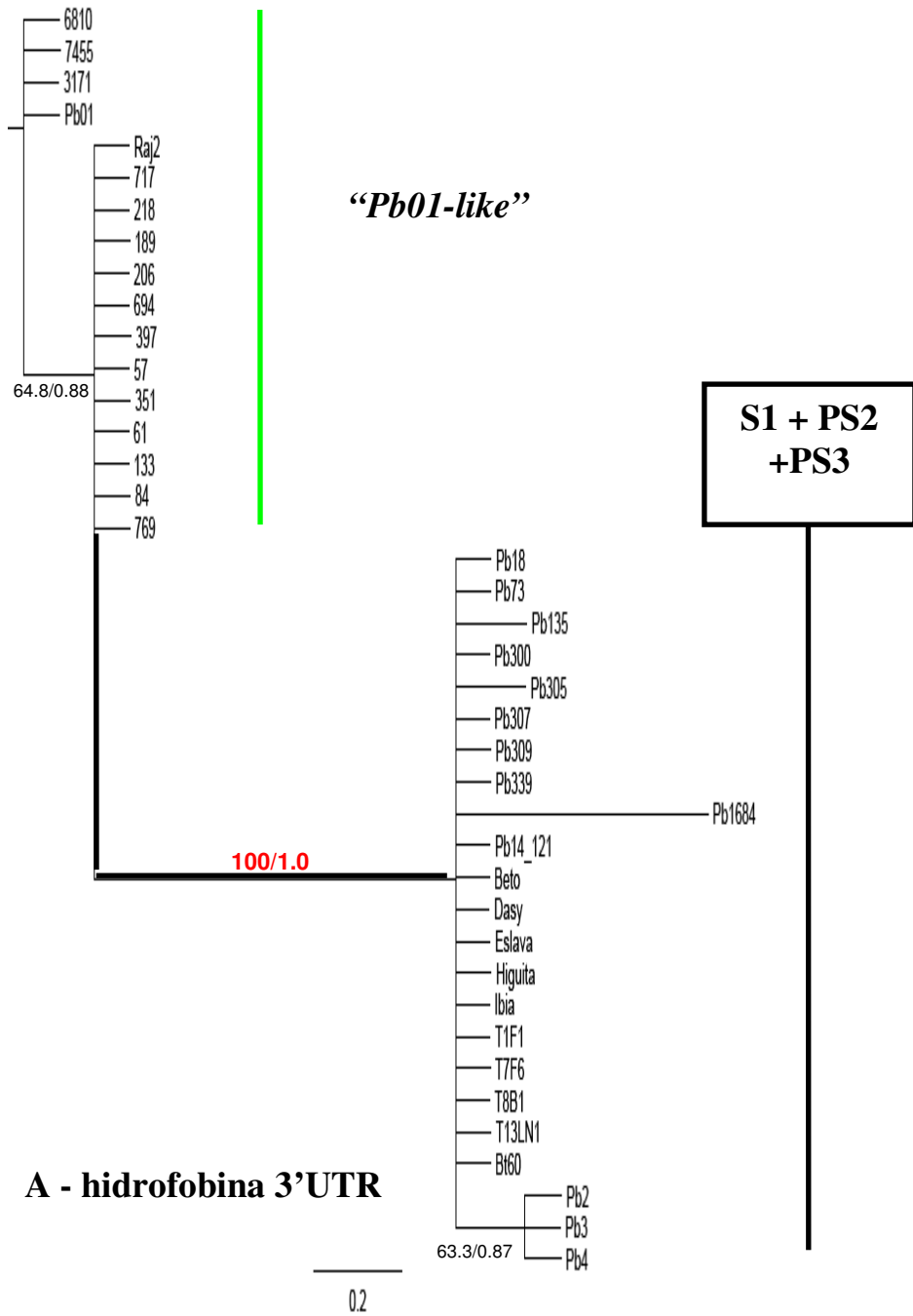
C - chs2 - exon1

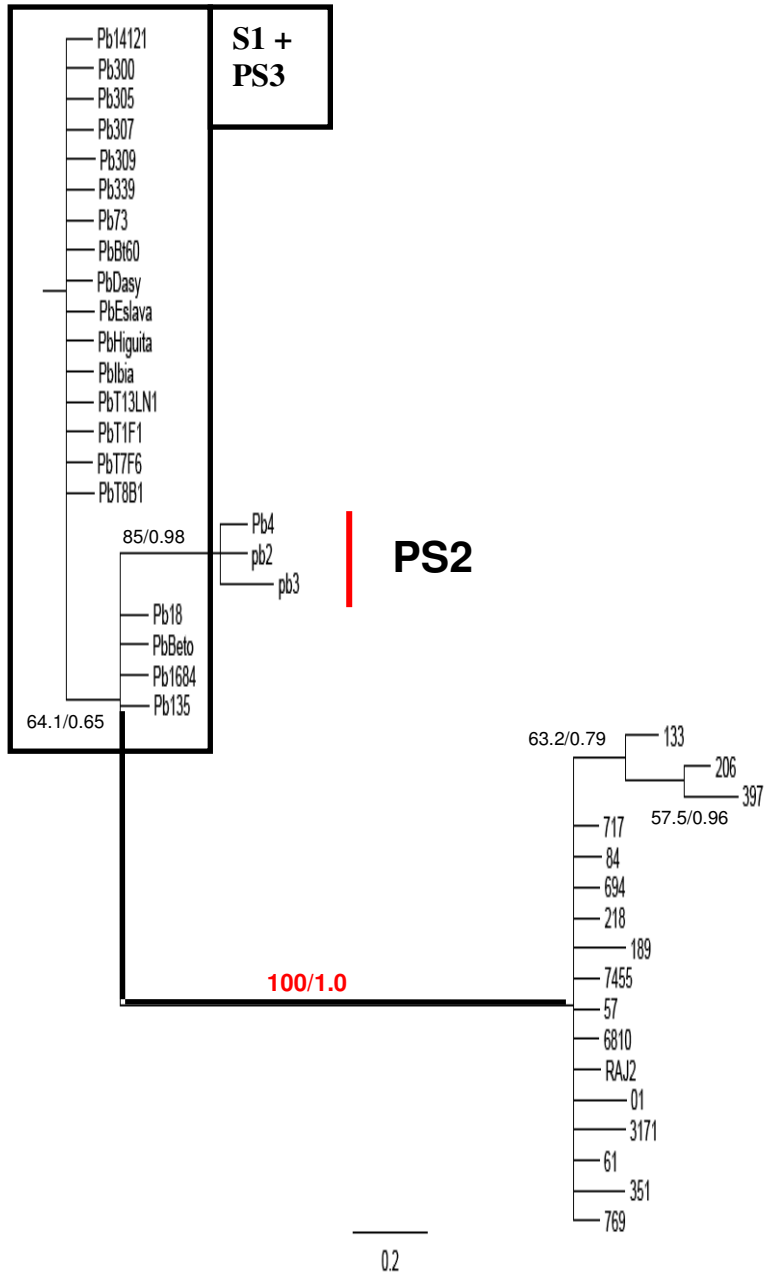




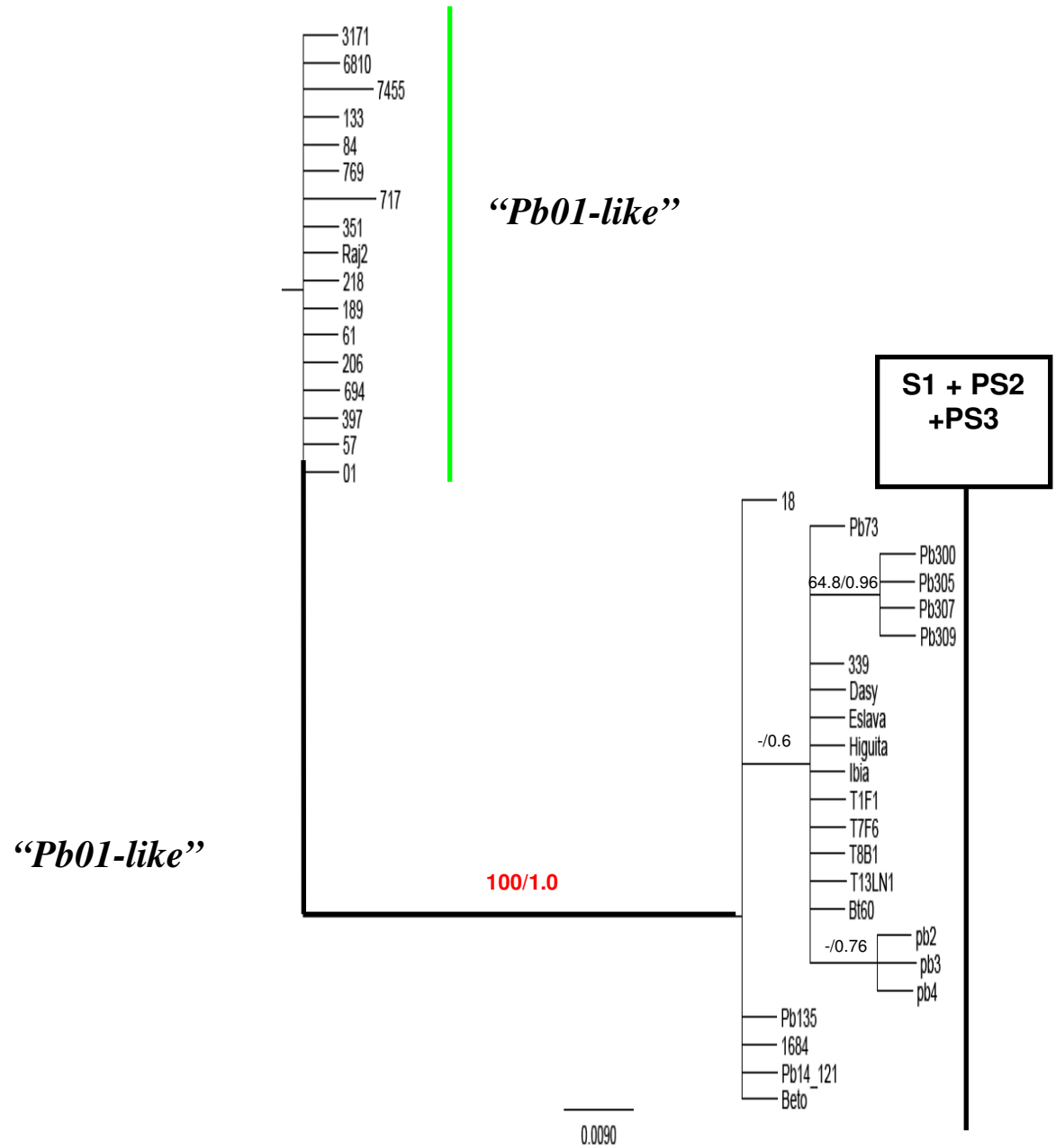


**Figura 11.** Genealogias individuais geradas pelos 8 loci gênicos estudados correspondentes ao conjunto de dados 1. Cada árvore foi analisada individualmente pelos métodos de máxima parcimônia e análise Bayesiana. A árvore gerada pela análise Bayesiana foi escolhida para representar os dados filogenéticos de cada locus, por mostrar em escala a razão de bases polimórficas/bases não-polimórficas. Os valores de *bootstrap* e probabilidade posterior foram adicionados aos ramos filogenéticos. As genealogias simples estão dispostas na seguinte ordem: A) *fkx*-exon2, B) *fkx*-exon3, C) *chs2*-exon1, D) *chs2*-exons2-4, E) *gp43*-promotor-exon1, F) *gp43*-exon2, G) *arf* e H)  $\alpha$ -tubulina.

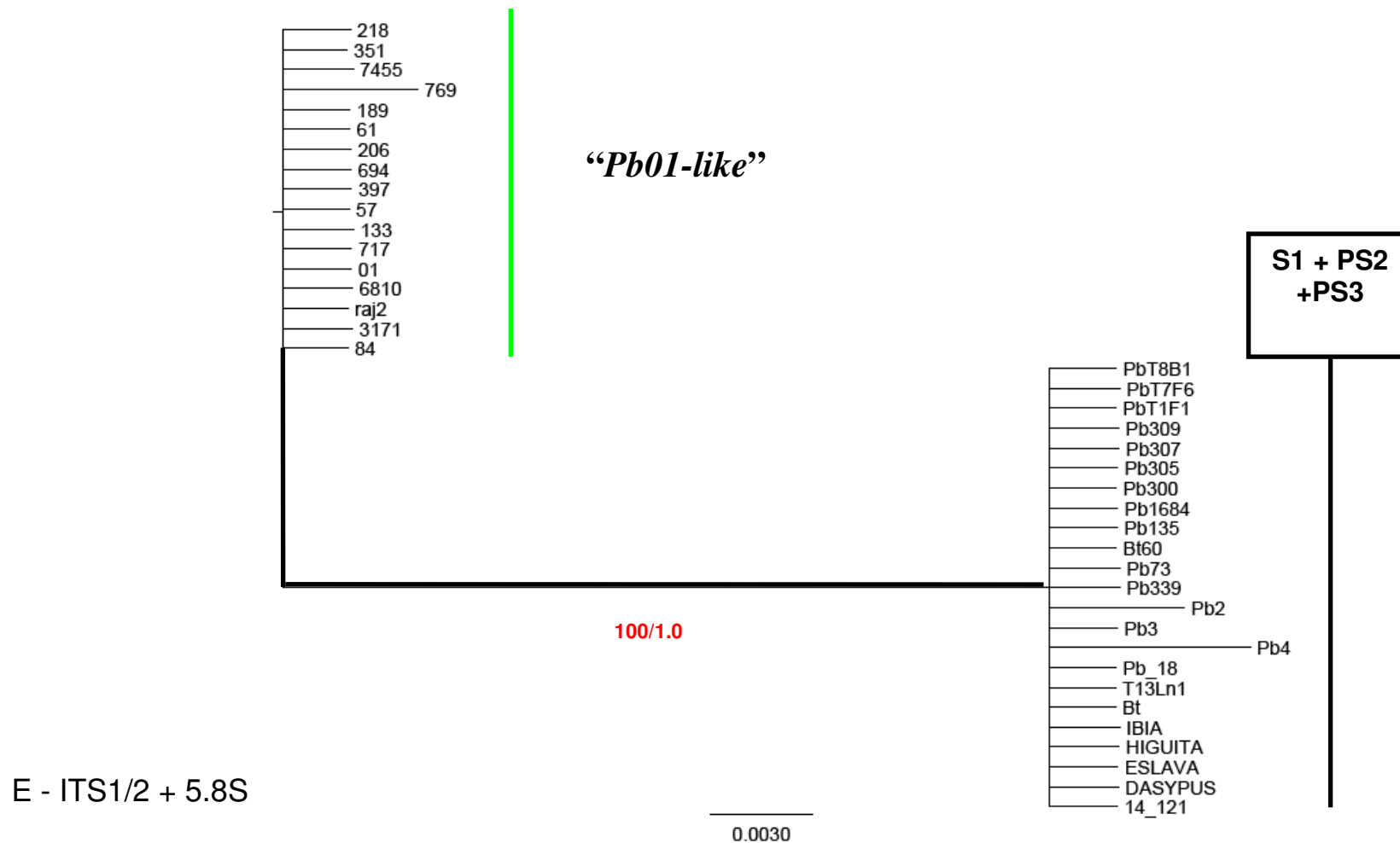




C - hsp70 5'UTR e intron1



D - kex intron 1



**Figura 12.** Genealogias individuais geradas pelos 5 loci gênicos estudados correspondentes ao conjunto2 de dados. Cada árvore foi analisada individualmente pelos métodos de máxima parcimônia e análise Bayesiana. A árvore gerada pela análise Bayesiana foi escolhida para representar os dados filogenéticos de cada *locus*, por mostrar em escala a razão de bases polimórficas/bases não-polimórficas. Os valores de “bootstrap” e probabilidade posterior foram adicionados aos ramos filogenéticos. As genealogias simples estão dispostas na seguinte ordem: A) hidrofobina 3’UTR, B) hidrofobina 5’UTR, C) hsp70 5’UTR e intron1, D)kex2 intron1 e E)ITS 1/2 +5.8S



parcimônia, para geração dos agrupamentos observados. O valor de probabilidade posterior é também uma forma indispensável para avaliar a alta consistência e confiabilidade dos ramos gerados pelas análises de *Bayes*. Valores de probabilidade posterior acima de 0,95 são considerados significativos para a existência do ramo filogenético. O ramo que separa os isolados “*Pb01-like*” dos demais grupos de isolados de *P. brasiliensis* previamente constatados por Matute *et al.* (2006), recebe os valores de 1,0 de probabilidade posterior e de 100% de “*bootstrap*” (**destacados em vermelho nas figuras 11A – 11H e 12A – 12E**) para todos os *loci* analisados, mostrando a consistência e confiabilidade destes ramos. Nas genealogias geradas a partir dos dados do conjunto 1, os isolados 133 e 769 alternam entre os grupos filogenéticos “*Pb01-like*” e as três espécies filogenéticas descritas por Matute *et al.* (2006). É possível observar que o isolado 133 se agrupa no clado dos isolados “*Pb01-like*” nos 3 *loci fks-E2, fks-E3 e arf* (**ver figuras 11A, 11B e 11G**), enquanto que nos 5 *loci chs-E1, chs-E2-4, gp43-E1, gp43-E2 e  $\alpha$ -tubulina*, ele se mantém agrupado com isolados representantes das três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*, principalmente com o grupo PS2 (**ver figuras 11C, 11D, 11E, 11F e 11H**). Resultados semelhantes foram observados para o isolado 769, uma vez que nos *loci chs-E2-4 e gp43-E2* (**ver figuras 11D e 11F**) este isolado se agrupa com os isolados representantes das espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* o que não acontece nos *loci fks-E2, fks-E3, chs-E1, gp43-E1, arf e  $\alpha$ -tubulina* (**ver figuras 11A, 11B, 11C, 11E, 11G e 11H**). No conjunto 2 de análise deste trabalho, os isolados 133 e 769 se mantêm agrupados com os isolados do grupo “*Pb01-like*” em todas as 5 genealogias geradas. Desta forma, considerando a análise dos 2 conjuntos de dados para os isolados 133 e 769, dos 13 *loci* analisados eles se agrupam com o ramo “*Pb01-like*” em 8-9 deles, enquanto nos outros 4-5 *loci* eles se encontram agrupados com as três outras espécies filogenéticas descritas por Matute *et al.*, 2006.

### **Análise filogenética dos *loci* concatenados para os dois conjuntos de dados**

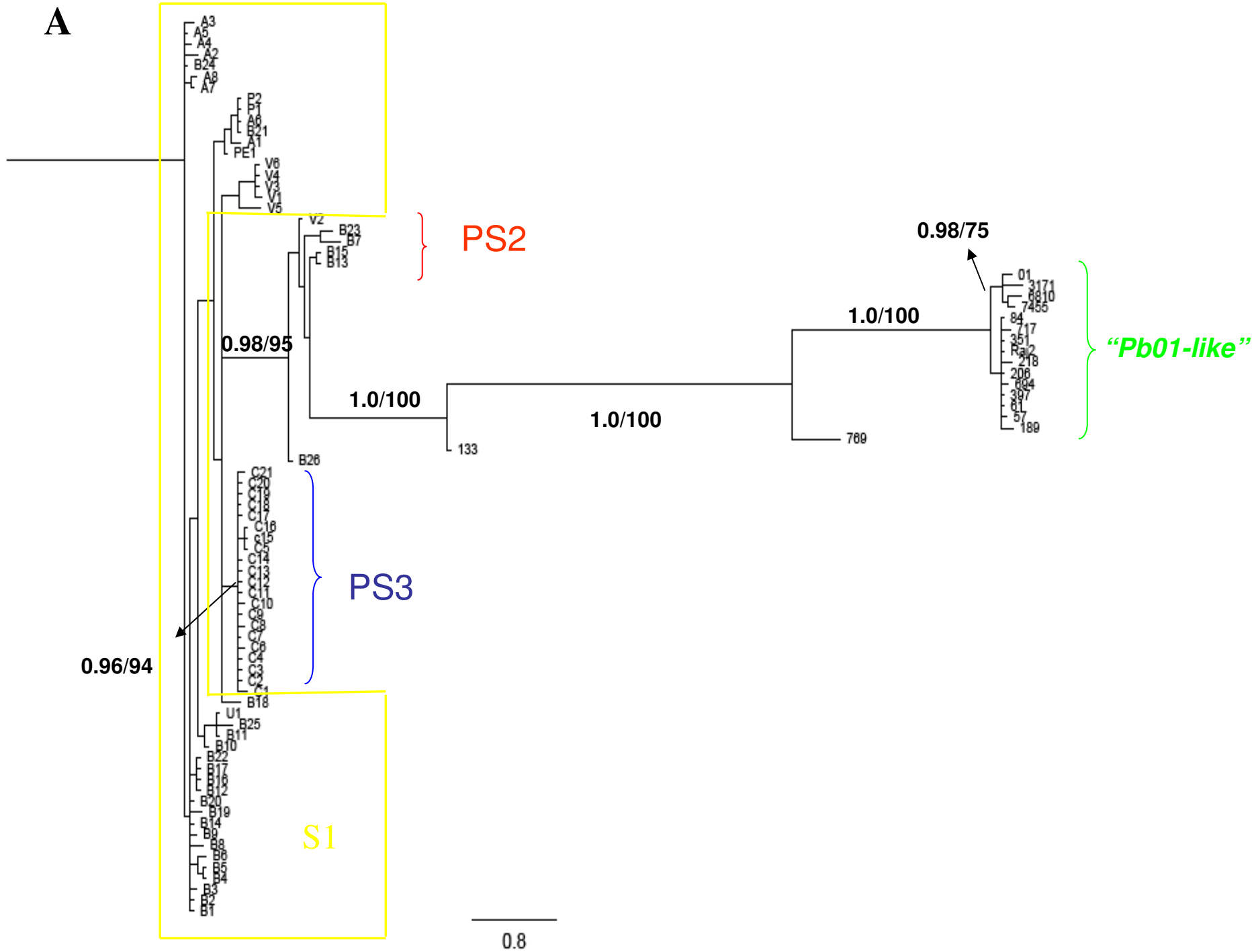
Os oito *loci* correspondentes ao conjunto 1 e os cinco *loci* correspondentes ao conjunto 2 de dados foram analisados de forma concatenada, em separado, por ambos os métodos de máxima parcimônia e de *Bayes*. Para o conjunto 1 de dados uma árvore consenso de máxima parcimônia de 352 passos foi gerada, com índice de consistência (IC) = 0,7727 e índice de homoplasia (HI) = 0,2273, indicando uma boa consistência da árvore mais parcimoniosa gerada. Na análise Bayesiana, o valor máximo do log de verossimilhança foi de 7218,19. A topologia gerada pela análise Bayesiana foi idêntica à máxima parcimônia já que as espécies e subgrupos foram mantidos inalterados. Dessa

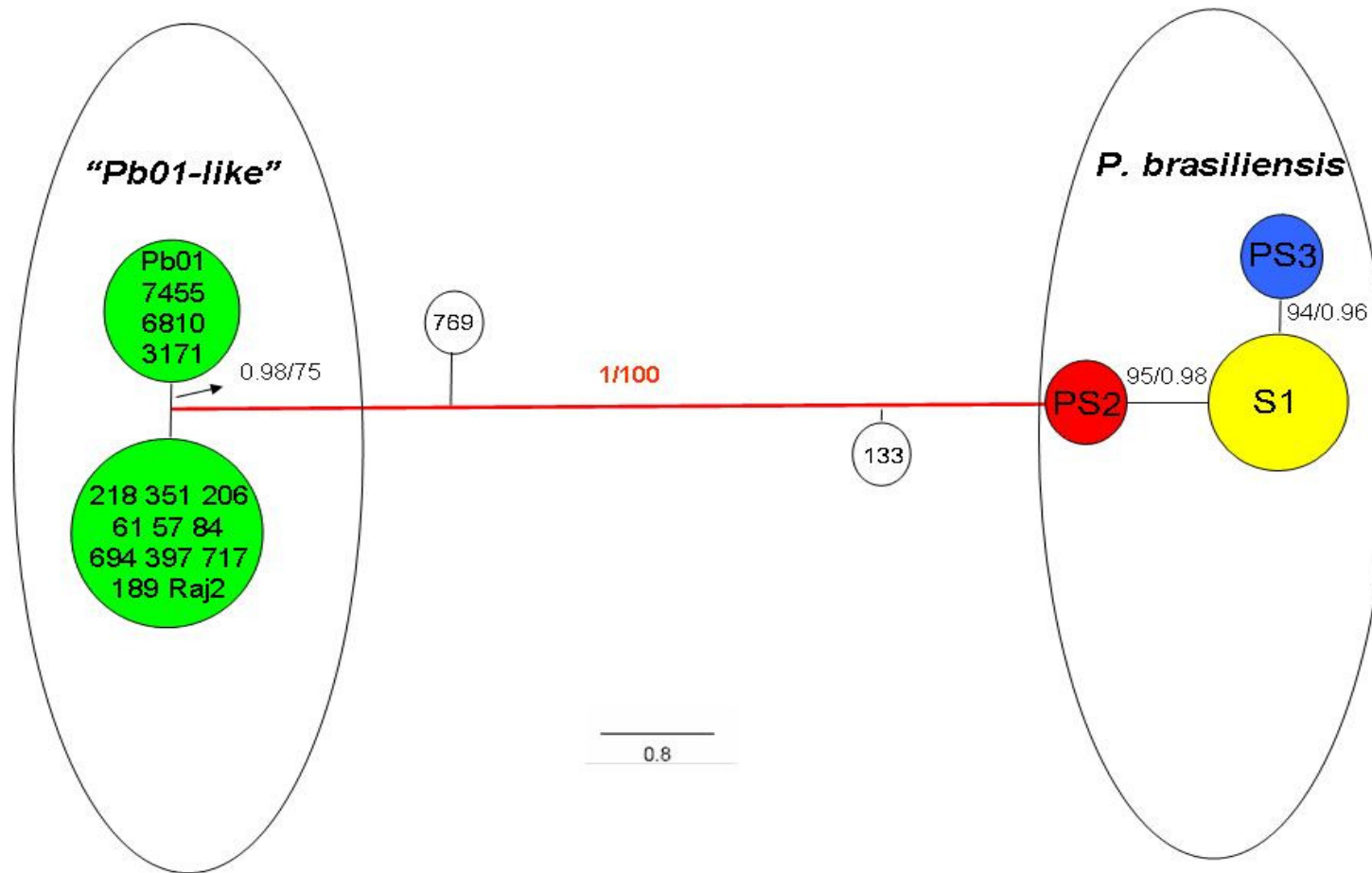
forma, optou-se então pela árvore gerada pela análise Bayesiana. Os valores de “*bootstrap*” foram adicionados aos valores de probabilidade posterior junto aos ramos filogenéticos. Ao avaliar a topologia gerada, dois principais grupos foram formados: **1)** um deles correspondente ao grupo de isolados “*Pb01-like*” e, **2)** o outro referente às três espécies filogenéticas propostas por Matute *et al.* (2006) (**Figura 13A**). Os grupos filogenéticos com valores de *bootstrap* < 70% e com probabilidade posterior < 0,95 não foram considerados para as análises de seqüências concatenadas. Estes valores são fundamentais para a consistência dos ramos filogenéticos que comportam as espécies reconhecidas pelo método de GCPSR. A grande distância filogenética entre estes grupos (**ver escala de 0,8 – Figura 13B**) pode ser observada pela escala da árvore filogenética que representa a proporção de sítios variáveis na análise.

A estrutura filogenética proposta por Matute *et al.* (2006) se manteve inalterada; a espécie S1 se mantém parafilética composta por subgrupos constituídos de valores não significativos de probabilidade posterior e *bootstrap*; a espécie considerada clonal PS3 se manteve monofilética sustentada por um ramo filogenético com valores de probabilidade posterior/*bootstrap* de 0,96/94, sendo também mantido nas genealogias correspondentes aos *loci gp43-E2* e  $\alpha$ -tubulina (**Fig11 F e 11H**). A espécie recombinante PS2 também se mantém estruturada nesta análise, com valores de probabilidade posterior/*bootstrap* de 0,98/95. PS2 apresenta as mesmas características nas análises dos *loci gp43-E2* e  $\alpha$ -tubulina (**Fig11 F e 11H**). Esta espécie foi inicialmente, considerada por Matute *et al.* (2006) como monofilética, mas ao serem acrescentados os isolados do grupo “*Pb01-like*”, por esse trabalho, este grupo se tornou parafilético (**Ver Figura 13**).

Interessantemente, o grupo correspondente aos isolados “*Pb01-like*” se mantém separado das espécies S1, PS2 e PS3 por um longo ramo monofilético fortemente reforçado por valores de probabilidade posterior e *bootstrap* (1,0/100). A **figura 13B** representa a árvore filogenética sem raiz gerada pela análise de Bayes onde fica totalmente evidente a grande distância genética entre os grupos “*Pb01-like*” e aquele correspondente às espécies S1, PS2 e PS3.

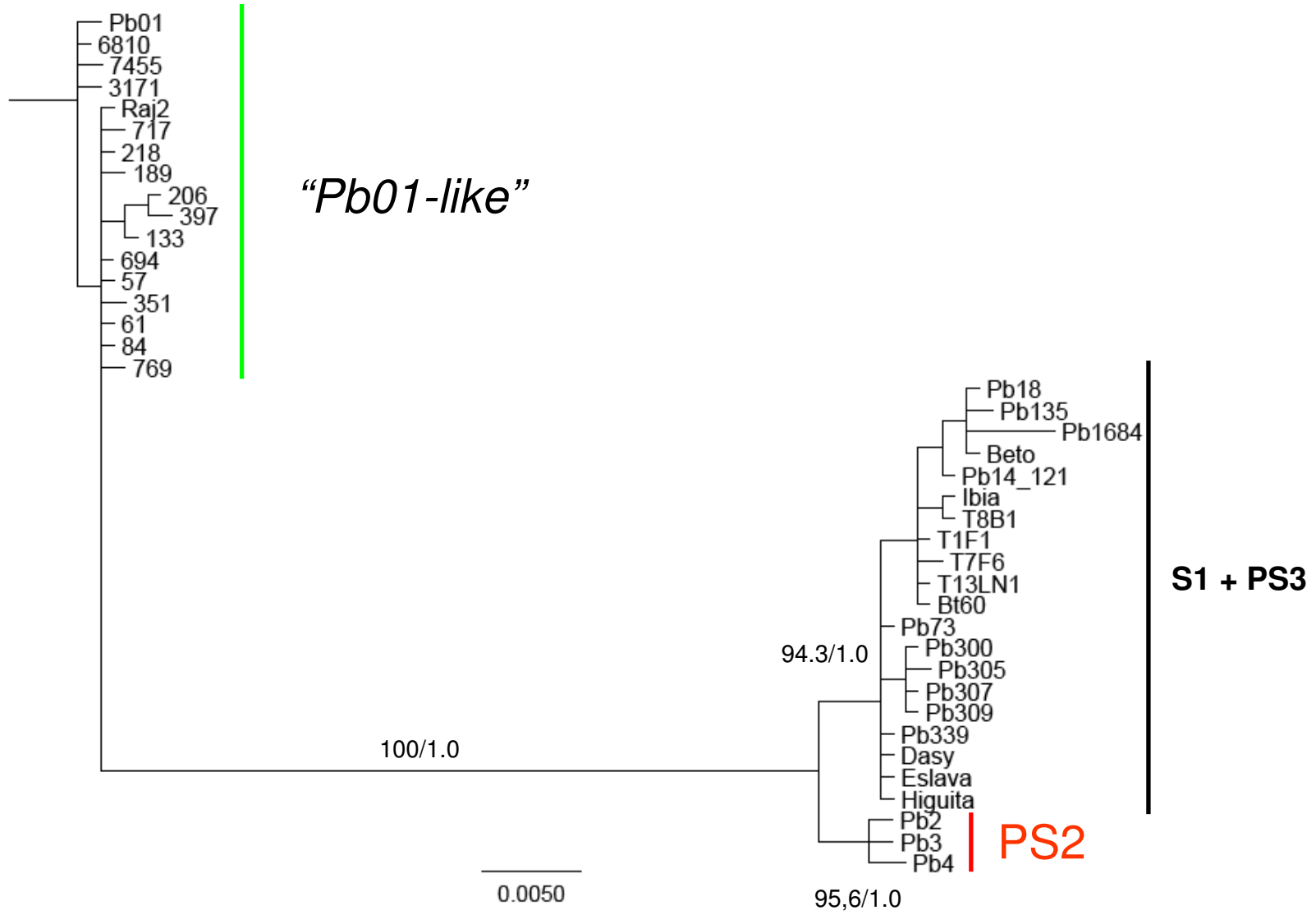
É importante enfatizar que os isolados 769 e 133 não se agrupam em nenhum dos grupos filogenéticos relatados nesta análise, sendo estes posicionados em regiões distintas ao longo do ramo filogenético que separa o grupo “*Pb01-like*” do grupo correspondente às espécies S1, PS2 e PS3. Isso se deve, provavelmente, ao compartilhamento de alelos destes isolados entre as espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 e o grupo “*Pb01-like*”, o que será discutido posteriormente.

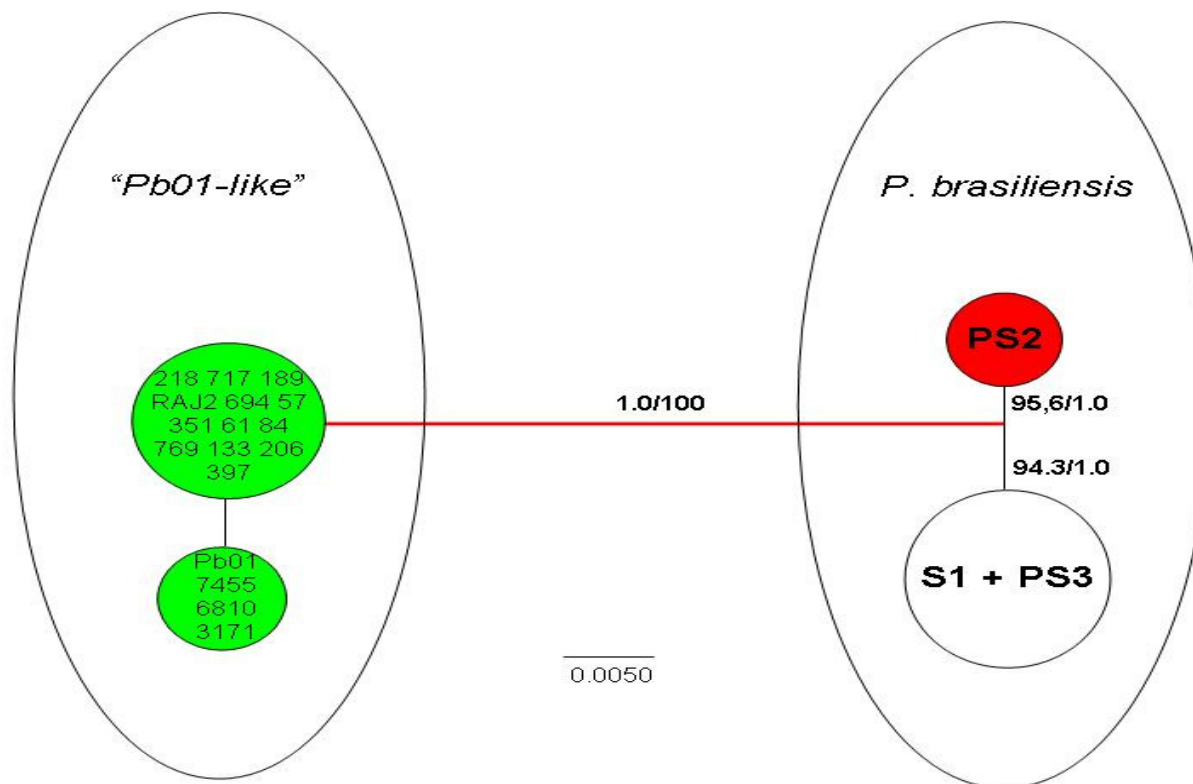


**B**

**Figura 13.** Análise filogenética gerada a partir de 8 *loci* concatenados de 3.565 nucleotídeos analisados e correspondentes ao conjunto 1 (*fks-E2*, *fks-E3*, *chs-E1*, *chs-E2* 4, *gp43-E1*, *gp43-E2*, *arf* e  $\alpha$ -*tubulina*). **A)** Árvore-consenso com raiz representando as relações filogenéticas dos isolados das 3 espécies filogenéticas descritas por Matute *et al.*, 2006 com os isolados representantes do grupo “*Pb01-like*”; **B)** Árvore-consenso sem raiz destacando a distância do ramo filogenético que separa as três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* do grupo “*Pb01-like*”. Os ramos filogenéticos com valores de *bootstrap* <70% e com valores de probabilidade posterior <0.95 (mais frequentes dentro dos grupos S1 e PS2) não foram mostrados por não satisfazerem o critério da concordância genealógica e a não-discordância genealógica, conforme já relatado por Matute *et al.*, 2006.

A



**B**

**Figura 14:** Análise filogenética gerada a partir de 5 loci concatenados de 3.565 nucleotídeos analisados e correspondentes ao conjunto 2 (hidrofobina 3'UTR, hidrofobina exon1 e intron 1, hsp70 5'UTR and intron1, kex intron 1 e ITS1/2 + 5.8S) **A)** Árvore-consenso com raiz representando as relações filogenéticas dos isolados das 3 espécies filogenéticas descritas por Matute et al., (2006) com os isolados representantes do grupo “Pb01-like”. **B)** Árvore-consenso sem raiz destacando a distância do ramo filogenético que separa as três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* do grupo “Pb01-like”. Os ramos filogenéticos com valores de *bootstrap* <70% e com valores de probabilidade posterior <0.95 (mais freqüentes dentro dos grupos S1 e PS2) não foram mostrados por não satisfazerem o critério da concordância genealógica e a não-discordância genealógica, conforme já relatado por Matute *et al.*, 2006.

Dentro do grupo de isolados “*Pb01-like*” observa-se uma divisão significativa entre isolados do estado do Mato Grosso (RAJ-2, 189, 351, 218, 61, 57, 84, 694, 397, 206 e 717) e aqueles obtidos do estado de Goiás e do Equador (Pb01, 7455 3171 e 6810) na análise concatenada do conjunto 1 de *loci* (ver **Figura 13**). Esta divisão não aparece significativa em nenhuma das 8 genealogias simples que fazem parte do conjunto 1, portanto, este clado não pode ser designado uma espécie filogenética distinta, mas provavelmente um subgrupo desta espécie filogenética (ver **Figura 11**).

O conjunto 2 de dados correspondente aos 5 *loci* analisados por Carrero *et al.*, *in press*, também foi analisado de forma concatenada, em separado, por ambos os métodos de máxima parcimônia e de Bayes. A análise de máxima parcimônia gerou uma árvore consenso com 99 passos, com índice de consistência (IC) = 0,9091 e índice de homoplasia (IH) = 0,0909. Na análise de Bayes o valor máximo do Log de verossimilhança foi de 2425,10. Como para o conjunto 1, as topologias observadas em ambas as análises filogenéticas foram idênticas, então optou-se por mostrar a árvore gerada pela análise Bayesiana.

A divisão detectada no conjunto 1 entre isolados “*Pb01-like*” e as espécies filogenéticas S1, PS2, PS3 foi também observada no conjunto 2 de análise, separando estes grupos por um ramo filogenético com valores máximos de probabilidade posterior e *bootstrap* 1,0/100 (**Figura 14A**). Quanto à distribuição filogenética proposta por Matute *et al.*, (2006) a única espécie filogenética que se mantém consistente no conjunto 2 de análise é a espécie PS2, sem se conseguir diferenciar as espécies S1 e PS3. A espécie PS2 representada pelos isolados Pb2, Pb3 e Pb4, aparece em um ramo monofilético com valores de probabilidade posterior e *bootstrap* consistentes de 1,0/95,6, (ver **Figura 14**). Este grupo também aparece na genealogia simples obtida através do *locus hsp70* (**figura 12C**).

Os isolados 769 e 133, que no conjunto 1 de análise não agruparam em nenhum dos grupos filogenéticos, no conjunto 2 agruparam junto aos demais isolados “*Pb01-like*”. Este agrupamento foi possível, pois estes dois isolados compartilham todos os polimorfismos analisados dos 5 *loci* com aqueles observados nos isolados do grupo “*Pb01-like*” (ver **anexo 2**). Ao se avaliar a árvore sem raiz correspondente ao conjunto 2 de análise é possível observar a grande distância filogenética do ramo que separa o grupo “*Pb01-like*” das espécies filogenéticas S1, PS2, PS3 (ver **escala de 0,005 – Figura 14B**).

De acordo com o critério de reconhecimento de espécies filogenéticas pela concordância genealógica, o grupo que contém os isolados “*Pb01-like*” pode ser considerado uma nova espécie filogenética uma vez que este grupo aparece distinto dos

demais em todas as 13 genealogias simples avaliadas e também nos dois conjuntos de dados concatenados.

### **Análise da relação filogenética dos grupos “Pb01-like”, S1, PS2, PS3 com os demais membros da família Ajellomycetaceae, utilizando a região ITS.**

As análises filogenéticas realizadas com os membros da família *Ajellomycetacea* (*Histoplasma ssp*, *Emmonsia ssp*, *Blastomyces dermatitidis* e *Lacazia loboi*) mostraram que a divisão detectada entre os isolados do grupo “Pb01-like” e isolados correspondentes ao grupo das espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 se manteve altamente suportados. Ao considerar as espécies de *Coccidioides* como grupo externo, foi possível notar que o clado “Pb01-like” aparece com valores de *bootstrap*/probabilidade posterior de 100/0.99 mostrando a robustez desta divisão filogenética criada (**Figura 15**). Como esperado, os isolados de *Lacazia loboi* compartilham um mesmo ancestral comum, mais uma vez demonstrando que *P. brasiliensis* e *L. loboi* formam grupos-irmão (Herr *et al.*, 2001). Esta espécie aparece nesta árvore altamente suportada por valores máximos de *bootstrap*/probabilidade posterior de 100/1.0.

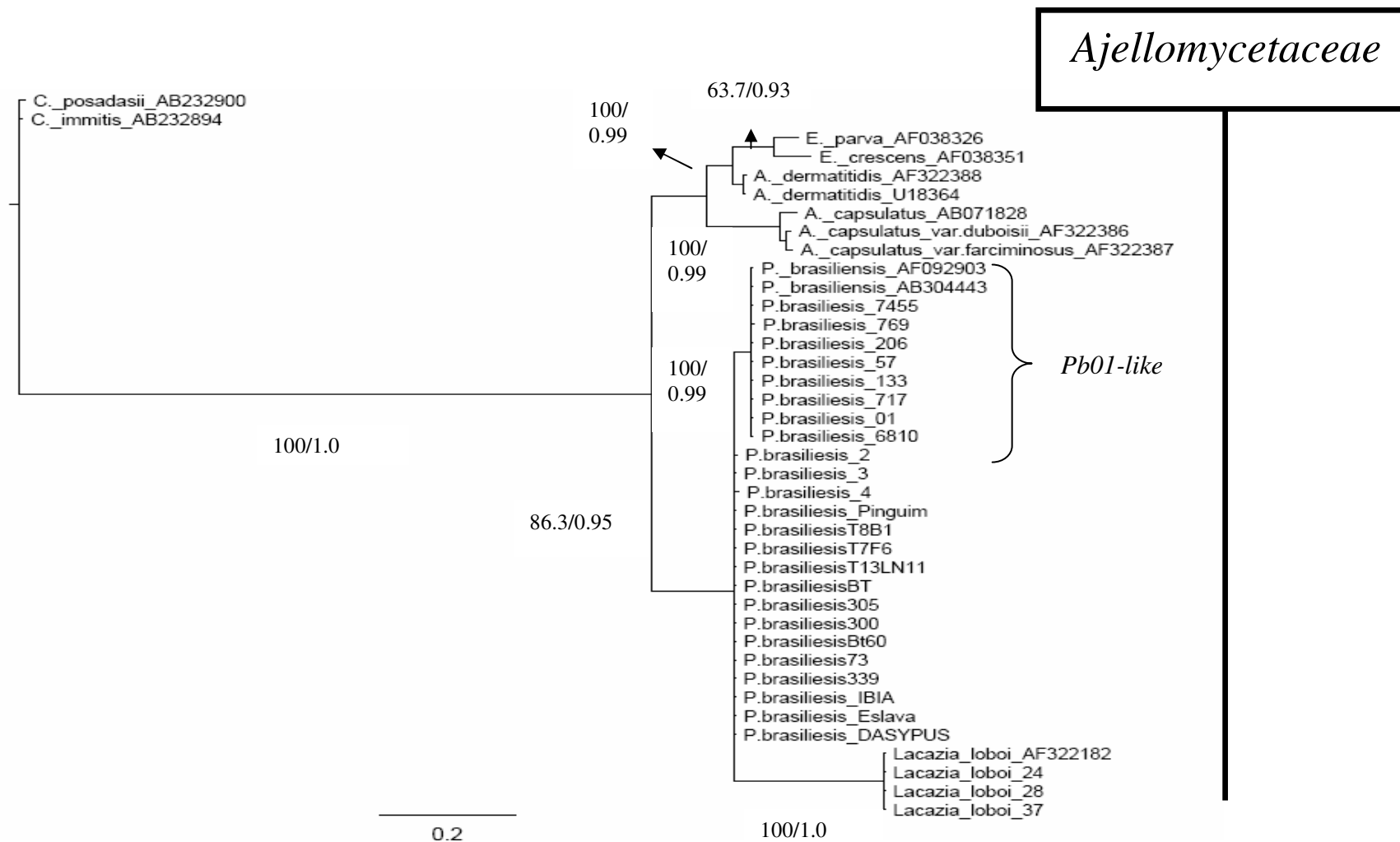
### **Quantificação do tempo de divergência genética**

Para acessar o tempo de isolamento genético entre as populações compostas pelas três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* (S1, PS2 e PS3) e a espécie filogenética composta pelos isolados *Pb01-like*, foi quantificada a amplitude da divergência entre os grupos distintos (DnaSP 4.10 Rozas *et al.*, 2006). A medida de divergência nucleotídica (dA) entre os dois grupos geneticamente distintos foi de  $37 \times 10^3$  para o conjunto 1 de análise (8 *loci*) e de  $41 \times 10^3$  para o conjunto 2 (5 *loci* incluindo, o ITS). De acordo com Nei, M. (1987) a taxa de substituição de nucleotídeos é constante por sítio analisado ( $\lambda$ ) e o tempo em que duas populações divergiram pode ser calculado por:

$$dA = 2 \lambda T$$

Neste trabalho, foi utilizada a mesma taxa de substituição que foi adotada para o gênero *Coccidioides* devido à proximidade genética entre as espécies fúngicas – *P. brasiliensis* e *Coccidioides*, logo o valor de ( $\lambda$ ) foi de  $10^{-9}$ /pb/ano (Koupopanou *et al.*, 1997; Fisher *et al.*, 2000). Baseado nestes dados, este evento de especiação entre os dois grupos, “Pb01-like” e espécies S1, PS2 e PS3, foi de 18 milhões de anos para o conjunto 1 e de 20 milhões de anos para o conjunto 2 de análise (média de 19 milhões de anos atrás).

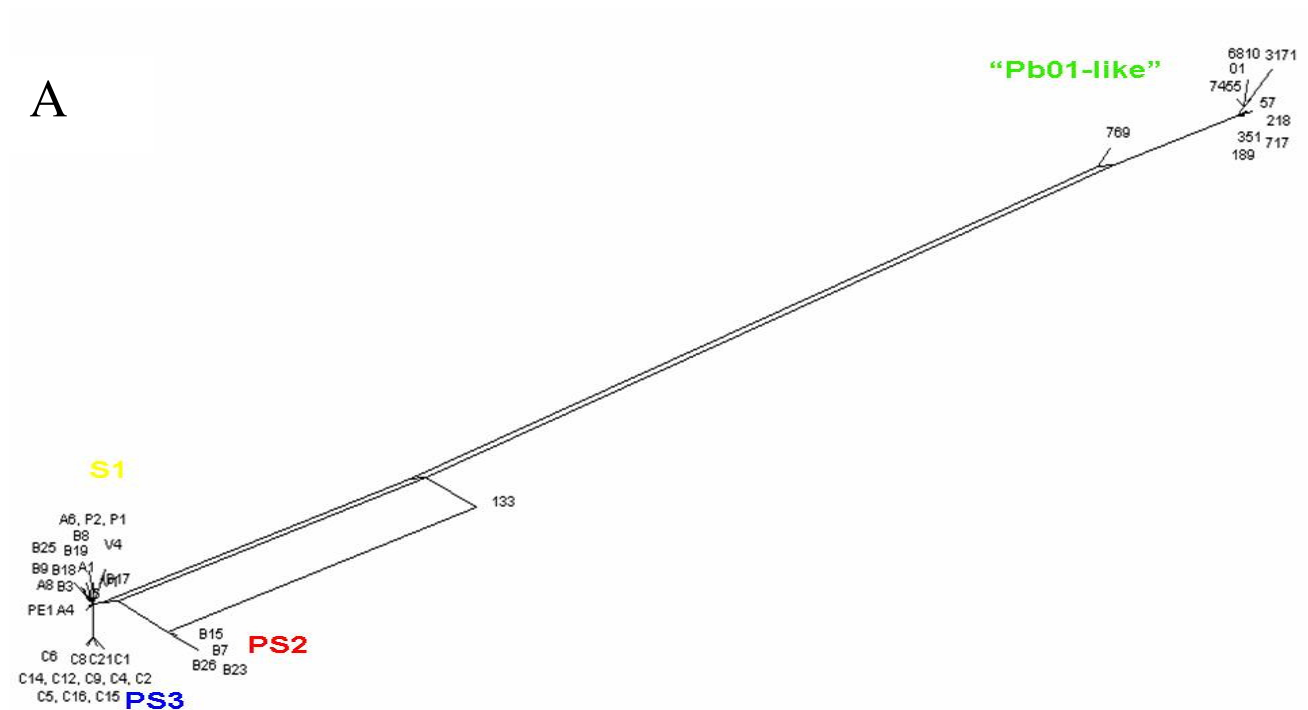




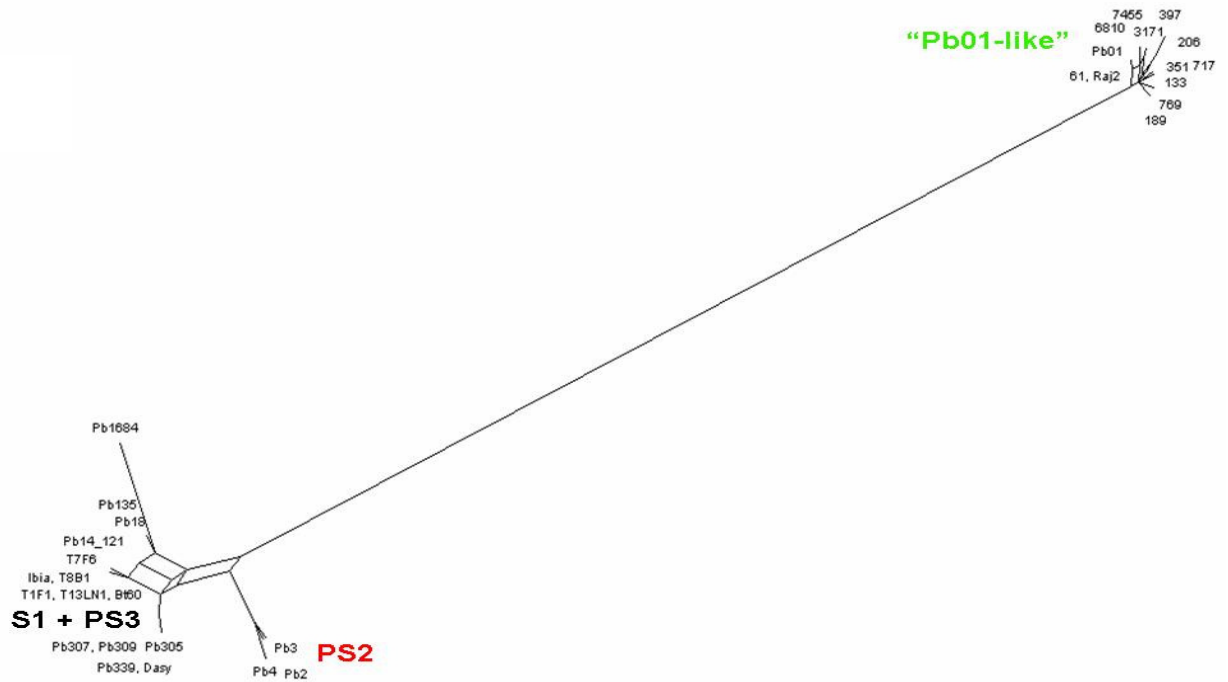
**Figura 15.** Relações filogenéticas da espécie *P. lutzii* com os demais membros da família *Ajellomycetaceae*. A árvore filogenética representada foi gerada a partir de análises de Bayes da região ITS 1/2 + 5,8S de 39 taxons, listados na **Tabela 4**. Valores de probabilidade posterior e “bootstrap” (máxima parcimônia) foram adicionados para representar os valores de confiabilidade de cada ramo.

### Análise de recombinação genética intra e inter-grupos.

A avaliação do processo de recombinação entre as espécies filogenéticas foi realizada pelo software Splitstrees 4.0 através das redes de recombinação que demonstram o intercâmbio gênico entre os isolados. Como é possível observar na **figura 16A**, correspondente aos dados do conjunto 1 de análise, os isolados do grupo “*Pb01-like*” estão em processo de recombinação distinto dos isolados representantes das espécies S1, PS2 e PS3. Nesta análise fica claro que: **1)** existe troca genética entre o isolado 769 e a espécie filogenética de *P. brasiliensis* S1; e **2)** existe compartilhamento de alelos entre o isolado 133 e a espécie filogenética PS2. No conjunto 2 de análise foi possível detectar redes de recombinação isoladas em ambos os grupos, sendo clara mais uma vez a ocorrência do evento de recombinação separadamente entre as espécies (**Figura 16B**).



B



**Figura 16.** Análise de decomposição das árvores filogenéticas para detecção de ocorrência de recombinação intra e inter-grupos. As observações de que múltiplos caminhos formam uma rede interconectada ligando os isolados analisados são consistentes com a ocorrência de recombinação. **A)** Análise dos 8 *loci* gênicos correspondentes ao conjunto 1 de dados; **B)** Análise dos 5 *loci* gênicos em conjunto referentes ao conjunto 2 de dados.

## Discussão

Polimorfismos compartilhados entre novas espécies divergentes, após a especiação, são gradualmente perdidos durante a deriva genética. As espécies passam por estágios de polifilia e parafilia chegando finalmente a monofilia recíproca (Avice & Ball 1990). Devido à aleatoriedade deste processo, cada locus irá perder polimorfismos ancestrais e se tornarão fixados para os polimorfismos derivados a uma constância diferente.

De acordo com os alinhamentos gerados pelos 13 *loci* polimórficos analisados, o grande número de polimorfismos fixados entre os grupos das espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* e o grupo de isolados “*Pb01-like*” são responsáveis pela monofilia encontrada entre estes dois grupos. Resultados semelhantes são encontrados entre as espécies de patógenos fúngicos de gramíneas *M. oryza* e *M. grisea*. Estes dois patógenos eram considerados como espécies únicas, porém análises filogenéticas de três loci gênicos revelaram a existência de dois clados geneticamente distintos e com habilidades distintas de infectar espécies diferentes de plantas. O grau de divergência entre as seqüências entre as espécies de *M. oryza* e *M. grisea* foi de 9,7% , sendo este valor aceito para distinção de espécies (Couch & Kohn 2002). Em nossa análise, do total de 3.565 nucleotídeos concatenados e analisados no conjunto 1, o grau de divergência entre as seqüências foi de 8,6% . Para o conjunto 2, do total de 1.662 nucleotídeos concatenados foram analisados gerando um grau de divergência de 11,0% (valor médio dos 2 conjuntos é de 9,8%). Estes valores são condizentes em nível de espécie quando comparados com outras espécies de fungo. Este mesmo fenômeno foi relatado entre as duas espécies de *Coccidioides*, *immitis* e *posadasii*, onde o grau de divergência de seqüências (1,4%) foram obtidos (Koufopanou *et al.*, 1997).

Foi possível notar um baixo índice de polimorfismo compartilhado entre o grupo “*Pb01-like*” e o grupo composto pelas 3 espécies filogenéticas descritas por Matute *et al.*, 2006. Para o conjunto 1, os polimorfismos compartilhados entre os dois grupos atingiram um percentual de 3,6% enquanto que no conjunto 2 esse valor atingiu 2,4%. Por outro lado existe um grande percentual de polimorfismos fixados em ambos os grupos (63% para o conjunto 1 e 75% para o conjunto 2 de dados). Estes resultados de polimorfismos indicam que provavelmente ocorreu um forte bloqueio do fluxo gênico entre estes grupos geneticamente distintos, o que evidencia incompatibilidade de cruzamento genético.

De acordo com todas as topologias individuais geradas pelos 13 loci gênicos neste trabalho, o gênero *Paracoccidioides* possui dois grupos altamente divergentes. A divisão monofilética criada nestas análises entre isolados “*Pb01-like*” e o grupo formado pelas espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 mostra que não se trata de evento de recombinação intra-locus e sim um processo de isolamento genético que é conservado ao longo do DNA entre os grupos isolados estudados (**figuras 11 e 12**). De acordo com o método de GCPSR, diferentes *loci* gênicos apresentarão diferentes genealogias dentro da espécie devido à existência do processo de recombinação entre os *loci* analisados, mas entre espécies diferentes as genealogias serão concordantes devido à deriva e isolamento genético. Se diferentes árvores gênicas são concordantes, elas possuem uma mesma topologia devido à fixação de *loci* polimórficos causada pelo isolamento genético. Quando os *loci* correspondentes aos dois grupos de dados de seqüência foram analisados em conjunto, o grupo de isolados “*Pb01-like*” se manteve monofilético, sustentado por valores máximos de *bootstrap* e probabilidade posterior (100/1.0) para ambos os conjuntos de análise (**Figuras 13 e 14**). De acordo com o critério do método de reconhecimento de espécies filogenéticas pela concordância genealógica (GCPSR) o grupo “*Pb01-like*” pode ser considerado uma nova espécie filogenética, diferente das três espécies filogenéticas previamente mencionadas (Matute *et al.*, 2006). Cada espécie pode ser considerada uma linhagem evolutiva independente, caso satisfaça os dois critérios estabelecidos pela metodologia de GCPSR: **1)** concordância genealógica: o clado deve estar presente na genealogia gerada pelos *loci* analisados em conjunto, fielmente sustentados **2)** não discordância genealógica: cada clado observado na árvore consenso dos *loci* analisados em conjunto deve ser sustentado em pelo menos uma genealogia simples, por valores de “*bootstrap*”  $\geq 70\%$  (Hillis & Bull, 1993) e valores de probabilidade posterior de  $\geq 0.95$  (Rannala & Yang, 1996). As análises realizadas neste trabalho demonstraram que estes dois critérios adotados pelo método de reconhecimento de espécie filogenética pela concordância genealógica estão fortemente presentes uma vez que: 1) o clado correspondente aos isolados “*Pb01-like*” aparece fortemente sustentado nas duas genealogias dos dados concatenados, para ambos os conjuntos de dados; 2) o ramo que agrupa a espécie (“*Pb01-like*”) é fortemente sustentado em todas as genealogias simples pelos valores de probabilidade posterior e “*bootstrap*” (probabilidade posterior - 1.0 e “*bootstrap*” - 100%).

Resultados semelhantes foram observados no gênero *Coccidioides* onde por meio de análise de GCPSR, de 12 (doze) *loci* nucleares e 9 (nove) regiões de microssatélites,

foram identificadas e nomeadas duas espécies distintas pela utilização dos mesmos critérios mencionados acima. Apesar de serem idênticas morfológicamente as duas espécies são alopátricas, ou seja, a espécie *Coccidioides immitis* é restrita na região de Baja, Califórnia e norte do México e a espécie *Coccidioides posadasii* possui uma distribuição geográfica mais ampla estendendo do estado americano do Texas até a Argentina (Koufopanou *et al.*, 1997; Fisher *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2002).

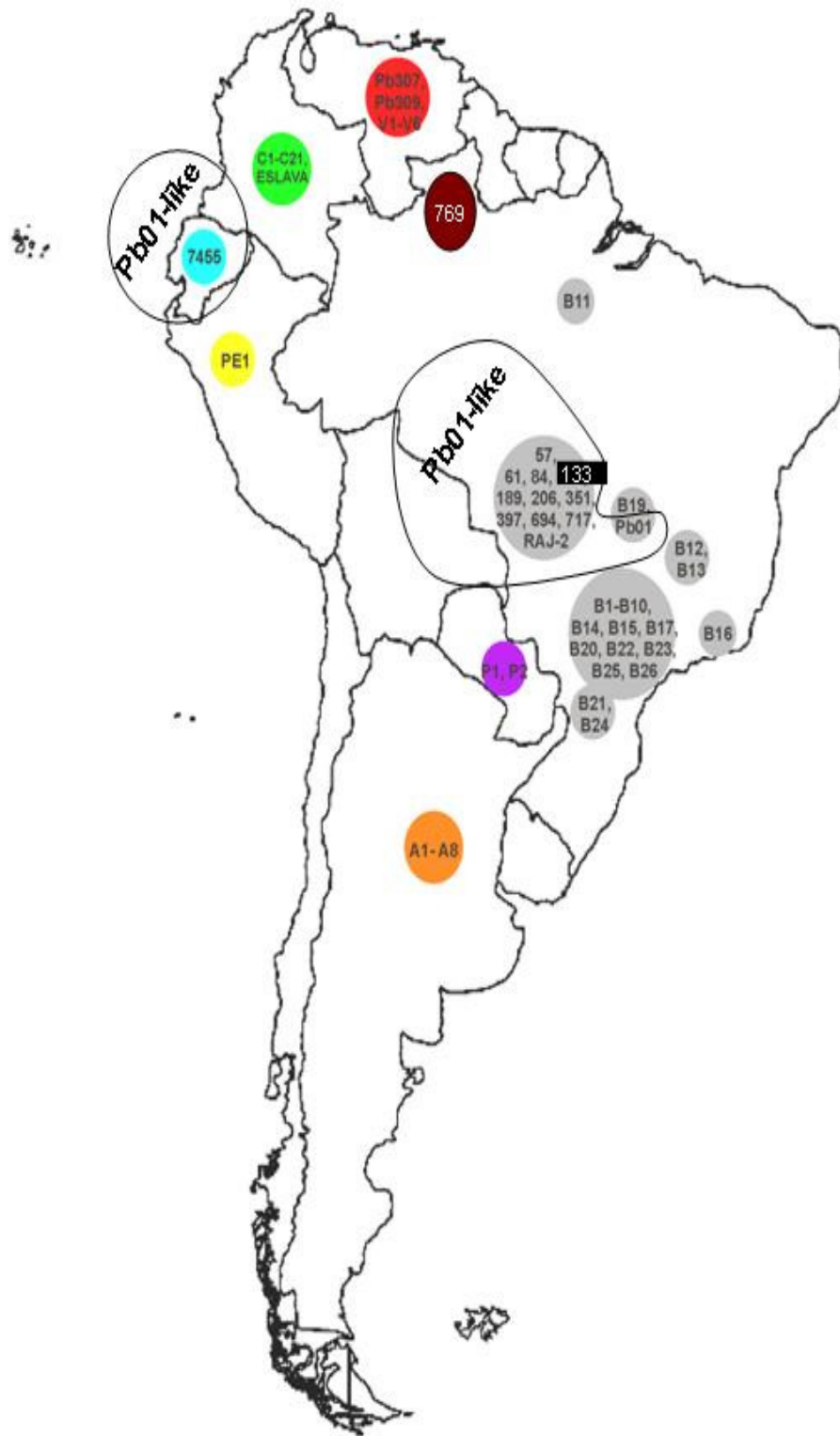
Outro evento de especiação em fungos patogênicos é o do gênero *Histoplasma*, que possui uma distribuição cosmopolita. Este fungo possui uma vantagem em relação aos sistemas de classificação sistemática em fungos por ter seu ciclo sexual conhecido, cruzamentos genéticos facilmente reprodutíveis e o estado teleomorfo bem definido (Kwon-Chung 1973). Através de testes de cruzamentos, morfologia e patogenicidade três variedades foram identificadas, as quais foram denominadas de: *capsulatum*, *duboisii* e *farcinosum* (Kwon-Chung, 1974 Kwon-Chung & Bennett, 1992; Rippon, 1998). Através de estudos de concordância genealógica de quatro regiões gênicas nucleares foi possível observar a existência de pelo menos oito espécies filogenéticas (Kasuga *et al.*, 1999), sendo sete deles geograficamente separadas (Kasuga *et al.*, 2003).

Pelos nossos dados, o grupo “*Pb01-like*” é restrito a área geográfica da região Centro-Oeste (especificamente os estados de Mato-Grosso e Goiás). O único isolado do grupo “*Pb01-like*” que se encontra fora da região Centro-Oeste é o isolado 7455, oriundo do Equador. Pode ser que este país também abrigue outros isolados membros da espécie filogenética “*Pb01-like*”, pois se sabe que já foram relatados inúmeros casos de PCM neste País (Ronquillo, 1983). Outra possibilidade para explicar este fato pode ser devido a migração humana pela América Latina, uma vez que a população rural que trabalha no campo tende a migrar de acordo com a disponibilidade de emprego no campo. Isso pode levar um indivíduo a contrair a PCM em um determinado local e realizar o tratamento e o isolado ser coletado em uma região onde não reflete o *habitat* do fungo. Este fenômeno de migração humana já foi relatado nas espécies de *Coccidioides* onde isolados de *C. posadasii* foram coletados na Califórnia, região esta exclusiva da espécie *C. immitis*, o que provavelmente ocorreu em função da grande migração humana na região entre o México e Estados Unidos (Koufopanou *et al.*, 1997).

O processo de genotipagem de diferentes isolados *P. brasiliensis* na América Latina ainda está sendo realizado, o que indica que outras populações geneticamente distintas além das 4 até aqui relatadas possam existir. Um forte candidato a uma nova espécie filogenética dentro do gênero *Paracoccidioides* é o isolado 4940 que inicialmente

fazia parte do quadro de isolados analisados por Carrero *et al.*, *in press*. Durante este trabalho, os autores encontraram extremas dificuldades para amplificar todos os 21 *loci* polimórficos utilizados. Neste sentido, ao se comparar a estrutura do gene 1,3- $\beta$ -glucana sintase entre os isolados de *P. brasiliensis*, o isolado Pb4940 não apresentava um íntron na porção 5' do gene. Além disso, foi possível observar duas substituições não-sinônimas na seqüência da proteína do isolado 4940 quando comparado com os demais isolados analisados (Okamoto *et al.*, 2006), incluindo o Pb01.

Conforme pode ser observado existe o compartilhamento geográfico dos grupos “Pb01-like” e os demais grupos filogenéticos reportados por Matute *et al.*, 2006 (**ver Tabela 1**). O evento de especiação que envolve os grupos filogenéticos “Pb01-like” e as espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* S1 e PS2 é simpátrico, uma vez que ambas as espécies compartilham o mesmo local geográfico, já que o isolado Pb01 e o B19 (grupo S1) são provenientes do estado de Goiás – Brasil (**Figura 17**). Hahn *et al.*, 2003 mostraram através de marcadores moleculares do tipo RAPD que isolados genotipicamente semelhantes ao Pb18 (grupo S1) originários de Mato-Grosso - Brasil compartilham o mesmo local geográfico de isolados do grupo “Pb01-like”. Isto fortemente sugere que o rompimento do fluxo gênico entre estes grupos não é dependente de barreira geográfica e sim provavelmente de características específicas de cada grupo como, por exemplo, hospedeiros preferenciais, acasalamento e nicho ecológico específico. É importante ressaltar que ainda não dispomos destas informações para o caso dos isolados analisados neste trabalho, ou seja, para nenhum dos dois grupos filogeneticamente distintos.



**Figura 17.** Distribuição geográfica dos 88 isolados de *P. brasiliensis* utilizados neste trabalho. As regiões geográficas coloridas identificam o local (País) de isolamento de cada um dos respectivos isolados. Vermelho – Venezuela, Cinza – Brasil, Alaranjado – Argentina, Roxo – Paraguai, Amarelo – Peru, Azul – Equador e verde – Colômbia. Os isolados 3171 e 6810 pertencentes ao grupo “*Pb01-like*” não possuem dados de local de isolamento. Os isolados 133 e 769, destacados em marrom, compartilham polimorfismos entre os dois grupos geneticamente distintos “*Pb01-like*” e PS2 + S1, respectivamente.



O evento de especiação simpátrica ocorre em menor frequência do que a especiação alopátrica, porém cada vez mais estudos de especiação mostram este acontecimento. Um exemplo claro de especiação simpátrica ocorreu com o fungo patogênico de insetos *Metarhizium anisopliae*. Duas populações encontradas nas regiões de Ontário, Canadá possuem diferenças na capacidade de crescer em meio de cultura à 8°C e 37°C. Análises de seis (6) *loci* nucleares demonstraram um alto grau de especiação nestas duas populações e, além disso, estes dois grupos estão em processos distintos de recombinação (Bidochka *et al.*, 2005). A especiação simpátrica difere da especiação alopátrica pelo fato que os intercruzamentos estão restritos à distância. Na especiação simpátrica o fluxo gênico não é interrompido por limitações geográficas mais sim por características biológicas exclusivas das espécies.

Sabemos que o *P. brasiliensis* possui pelo menos dois nichos ecológicos na natureza. O primeiro é em seu estado filamentosos, vivendo no solo de forma saprófita em meio à matéria orgânica em decomposição e o segundo vivendo em associação com animais na forma de levedura. Nunca foi observada uma correlação entre nicho ecológico e espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*. A associação de espécies filogenéticas a diferentes hospedeiros não deve ser excluído. Até hoje o fungo foi encontrado diretamente apenas em humanos, tatus e cães, porém indiretamente ( através de testes sorológicos e intradérmicos) *P. brasiliensis* já foi relatado em muitas espécies de animais tanto selvagens, como morcegos (*Artibeus lituratus* - Grose & Tamsitt 1965) e em primatas (Johnson & Lang, 1977; Corte *et al.*, 2007) como em animais domésticos, eqüinos (Conti-Diaz *et al.*, 1972) e bovinos (Gutierrez *et al.*, 1974). Nenhuma distinção filogenética foi observada até hoje entre isolados de tatus e humano uma vez que estes isolados possuem genótipos iguais. Este estudo abre caminhos para pesquisar possíveis nichos ecológicos específicos para estas espécies filogenéticas.

Atualmente, dos membros da família *Ajelomycetaceae*, somente os fungos *P. brasiliensis* e *L. loboi* não possuem teleomorfo definido, por outro lado *H. capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* são espécies cujo ciclo sexual é bem estabelecido e as estruturas relacionadas à reprodução sexuada são facilmente detectadas (Kwon-Chung 1973; McDonough e Lewis 1967). A análise filogenética da região ITS incluindo os membros da família *Ajelomycetaceae* (*Histoplasma ssp*, *Blastomyces dermatitidis* e *Emonnsia ssp*), além das espécies consideradas irmãs *P. brasiliensis* e *L. loboi* mostrou claramente a distribuição filogenética dos membros desta família. Ao considerar as espécies *C. immitis* e *C. posadasii* (família *Onygenaceae*) como grupo externo, os isolados representantes das

espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* e os isolados de *L. loboi* se agrupam com os demais membros da família (**Figura 15**). Até então nenhum trabalho havia relatado a classificação formal do fungo *L. loboi* como membro da família *Ajelomycetacea*. Untereiner *et al.*, 2004 propuseram a classificação deste clado, porém não incluíram nenhum isolado de *L. loboi*. Pela análise da região ITS, não foi possível distinguir as três espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3, provavelmente isto se deve a discreta variação nucleotídica encontrada nesta região gênica entre estas espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* S1, PS2 e PS3 (**ver anexo 2**).

A família *Ajelomycetacea* possui uma característica exclusiva por infectarem organismos vertebrados. A espécie *L. loboi* também possui esta característica uma vez que é capaz de infectar tanto homem quanto golfinhos no meio ambiente (Haubold *et al.*, 2000). A distribuição entre o grupo de isolados “*Pb01-like*” e os demais isolados representantes das três espécies filogenéticas descrita por Matute *et al.*, 2006 se manteve ao associar com os outros membros da família *Ajelomycetacea*. Pode-se notar que os 16 polimorfismos fixados na região ITS, para os dois grupos identificados neste trabalho, se mantem quando são analisados juntamente com outros membros da família, o que fortemente sustenta a distinção filogenética encontrada. É possível notar que os táxons irmãos *Lacazia loboi* e *Paracoccidioides ssp.* compartilham um mesmo ancestral comum, porém fica claro pelas análises filogenéticas da região ITS de que se trata de dois gêneros distintos.

Sabe-se que a espécie *Homo sapiens* surgiu a cerca de 400-200 mil anos atrás no continente da África, porém a colonização da América do Sul ocorreu somente há 14 mil anos atrás. Estudos moleculares dataram o surgimento da família *Onygenaceae* em 100 milhões de anos atrás (Berbee & Taylor, 2001). Entre seus membros desta família, como *C. immitis* e *H capsulatum* surgiram no período Mioceno, cerca de 23 - 5 milhões de anos atrás (Koupafanou *et al.*, 1997; Koupafanou *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2001 e Fisher *et al.*, 2002), período este em que a América do Norte ainda permanecia separada da América do Sul. Evidências de fósseis sugerem que os mamíferos pertencentes ao grupo Xenarthra, o qual se inclui a espécie *Dasybus novencinctus*, apareceram na América do Sul cerca de 65 milhões de anos atrás (Nowak, 1999). Bagagli *et al.*, 2006 sugerem a possibilidade que a associação entre tatus e o fungo *P. brasiliensis* se deu antes do surgimento do homem, porém não se exclui a possibilidade de que esta interação possa ter ocorrido recentemente devido a ação antropomórfica. De acordo com o presente trabalho, o tempo de isolamento reprodutivo entre o grupo formado pelas três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* (S1, PS2 e PS3) e a espécie filogenética correspondente ao grupo “*Pb01-like*” é de 18-20

milhões de anos atrás. Estes resultados mostram que o evento de especiação que separou a espécie correspondente aos isolados “*Pb01-like*” das 3 espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 foi muito antes do surgimento do homem nas Américas mostrando que este evento não dependeu da ação antrópica.

Tradicionalmente quase todas as espécies de fungos são reconhecidas por aspectos morfológicos e em menor frequência por métodos de isolamento reprodutivo. Quando espécies filogenéticas são detectadas torna-se possível buscar novos fenótipos que possam reforçar e correlacionar com grupos geneticamente isolados. Isso ocorreu com o fungo *Aspergillus flavus* onde pelos métodos de reconhecimento de espécies filogenéticas, a análise de 5 *loci* gênicos possibilitou identificar a presença de pelo menos 4 espécies filogenéticas (Geiser *et al.*, 1998). Estudos subsequentes relacionando dois destes grupos filogenéticos, geograficamente distintos, com dois caracteres fenotípicos (tamanho da esclerotina e produção de aflotoxina) mostraram uma correlação entre genótipo e fenótipo, reforçando a proposição de duas diferentes espécies filogenéticas (Geiser *et al.*, 2000). Em adição, a espécie morfológica *Ceratocystis fimbriata* foi separada em mais duas espécies dentro deste gênero, por análise de filogenia molecular e intercruzamentos. Para cada grupo geneticamente isolado foi possível atribuir um caractere fenotípico exclusivo como hospedeiro específico e diferente tamanho e forma dos meiosporos e mitóporos (estruturas reprodutivas). Para este gênero foram então descritas formalmente outras duas espécies: *C. plantani* para o grupo que hospeda a espécie de Plátanos e *C. cacaofunesta* para o grupo que hospeda a planta do Cacau (Engelbrecht & Harrington, 2005). A habilidade de se encontrar caracteres fenotípicos exclusivos entre espécies filogenéticas reforça o sinal evolutivo (Harrington & Rizzo, 1999).

Terçarioli *et al.*, (2007) estudaram a capacidade de crescimento de isolados representantes das espécies filogenéticas S1 e PS2 em ágar extrato de solo. Estes estudos demonstraram que todos os isolados, com exceção de T10 e Bt84 (ambos do grupo PS2), foram capazes de produzir artroconídios em larga escala em meio ágar extrato de solo. Em *P. brasiliensis* três principais caracteres fenotípicos foram identificados nos membros dos grupos geneticamente isolados “*Pb01-like*” e demais espécies filogenéticas (S1, PS2 e PS3). Hahn *et al.*, (2003) mostraram que os pacientes infectados por isolados do Mato-Grosso correspondentes ao grupo II (equivalentes ao grupo “*Pb01-like*” deste trabalho), respondiam bem à terapia com trimetopima-sulfametoxazol (960mg diários) enquanto que os pacientes infectados com isolados do grupo I (genótipo “*Pb01-non like*”) não respondiam ao tratamento com esta droga. Adicionalmente, um segundo caracter fenotípico

de atividade de urease pode ser observado entre os dois grupos identificados neste trabalho, isolados Pb01 (“*Pb01-like*”) e Pb18 (S1). O isolado Pb01 mostrou uma maior atividade da enzima urease do que o Pb18 (Tavares, A. - comunicação pessoal). Molinari-Madlum *et al.*, (1999) ao separar os grupos por marcadores moleculares do tipo RAPD, os isolados Pb01 e 7455 apresentaram um maior grau de virulência do que os isolados PbS, 662, Bt e 166. Neste trabalho, foi realizado o teste do marcador molecular para o gene *hsp70* para estes últimos 4 isolados, onde não foi detectada a amplificação do INDEL presente neste gene para o grupo “*Pb01-like*”. Estes dados mostram que os isolados do grupo “*Pb01-like*” possuem características fenotípicas exclusivas, o que também reforça ainda mais a proposta de reconhecimento de uma nova espécie filogenética.

A reprodução sexuada dentro das espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* se torna cada vez mais clara devido aos processos de recombinação gênica observado entre isolados de *P. brasiliensis*. Estudos realizados por Moraes *et al.*, (2000) consideraram *P. brasiliensis* um microrganismo clonal, porém Matute *et al.*, (2006) demonstraram através de análises de recombinação que em algum estágio do seu ciclo de vida o fungo possui uma fase sexuada. A presença de recombinação dentro dos clados correspondentes as espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* S1, PS2 e PS3 e do clado “*Pb01-like*”, realizado neste trabalho, foi evidente quando submetidos às análises pelo Splitstrees4.0 para o conjunto 2 de dados. As análises mostram que os dois grupos (“*Pb01-like*” e S1, PS2, PS3) estão em processos de recombinação distintos devido a presença de redes de recombinação presente em ambos os grupos separados (**ver Figura 16B**). No conjunto 1 de dados não foi possível detectar redes de recombinação entres estes dois grupos, porém foi possível mostrar que os isolados 769 e 133 apresentaram particularidades quando ao seu genótipo por dois motivos principais: **1)** os isolados 769 e 133 compartilham polimorfismos com ambas as espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* S1 e PS2, respectivamente (**ver anexo 1**); **2)** a análise de recombinação mostra claramente o compartilhamento de material genético destes isolados com as espécies filogenéticas S1 e PS2, devido à presença de redes que os interligam (**Figura 16A**). Com os dados de filogenia destes 2 isolados duas hipóteses para explicar sua existência são plausíveis: **1)** intercruzamento entre os dois principais grupos filogenéticos descritos neste trabalho, ou seja, estes dois isolados possuem genótipos híbridos; **2)** existe a possibilidade destes isolados representarem ancestrais do gênero *Paracoccidioides*, ou seja, ao colocarmos estes isolados na presença de um dos isolados dois principais grupos filogenéticos eles seriam capazes de se intercruzarem uma vez que compartilham material genético. Não podemos

assumir que estes dois isolados correspondem à espécie filogenética “*Pb01-like*”, pois seu posicionamento dentro da árvore filogenética gerada a partir do conjunto 1 não os agrupa em nenhum dos dois principais grupos filogenéticos descritos neste trabalho (**Figura 13**). Para a melhor compreensão deste evento de compartilhamento de material genético entre as duas populações necessita-se o domínio dos testes de acasalamento “*in vitro*” destes isolados. Análises filogenéticas de indivíduos correspondentes às espécies biológicas *N. crassa* e *N. intermédia* possibilitou observar que a maioria dos híbridos estudados pela concordância genealógica de 4 *loci* polimórficos se posicionavam em diferentes clados das espécies biológicas, e possivelmente formarão ainda novas espécies biológicas (Dettman *et al.*, 2003 a,b). O fenômeno de genótipos híbridos também está presente no gênero *Saccharomyces*, onde se postula que o surgimento do ancestral deste gênero ocorreu a partir da fusão de núcleos diferentes acompanhada da alopoliplidia (estado caracterizado pela posse de dois genomas dissimilares e derivados de duas ou mais espécies ancestrais) (Wolfe & Shields, 1997; Wong *et al.*, 2002). É possível que os isolados 133 e 769, analisados neste trabalho, sejam possíveis formas de surgimento de uma nova espécie, fruto do cruzamento de diferentes espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* (“*Pb01-like*” X S1 e/ou “*Pb01-like*” X PS2), sendo de extrema importância para a manutenção das espécies (Taylor *et al.*, 2007).

Apesar da reprodução sexuada em *P. brasiliensis* nunca ter sido observada “*in vitro*”, existem fortes indícios moleculares que evidenciam a existência do ciclo sexual dentro do gênero *Paracoccidioides*. Recentes estudos avaliando o *locus* MAT de cepas de espécies de *Histoplasma* e *Coccidioides* revelaram a presença dos dois idiomorfos (MAT 1.1 ( $\alpha$ -box) e MAT 1.2 (HMG)) necessários para que ocorra a reprodução sexuada nestes fungos patogênicos (Bubnick *et al.*, 2007; Fraser *et al.*, 2007). Para o gênero *Histoplasma* já se conhecia este processo através de testes de cruzamentos, porém somente evidências moleculares eram conhecidas para o gênero *Coccidioides* (Fisher *et al.*, 2000). A análise do transcriptoma do isolado Pb01 correspondente ao grupo “*Pb01-like*” (Felipe *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005) e de dados do genoma estrutural do isolado Pb3 de *P. brasiliensis* (PS2) ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis.1/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.1/MultiHome.html)) mostraram a presença de seqüências homólogas ao *H. capsulatum* do *locus* MAT1.1 (presente no Pb01) e MAT1.2 (presente no Pb3). O *locus* MAT foi demonstrado ser a principal característica para determinação do sexo em fungos, além de extremamente funcional para o diagnóstico de espécies evolutivas como no caso do gênero *Fusarium* (O’Donnell *et al.*, 2004). A presença dos genes HMG e  $\alpha$ -box em diferentes isolados de *P.*

*brasiliensis* reforçam ainda mais a existência de ciclo sexual neste fungo. Análises “*in silico*” do genoma estrutural de *A. fumigatus*, até então considerado um patógeno assexual, revelaram a presença de genes envolvidos no processo de reprodução sexuada. Genes como aqueles responsáveis pela síntese, processamento, via de sinalização a ferormônios sexuais, receptores de ferormônios (Pöggler, 2002) e idiomorfos MAT 1.1 e MAT 1.2 foram identificados, além de ter sido detectado o evento de recombinação entre isolados desta espécie (Paoletti *et al.*, 2005; Pringle *et al.*, 2005). Estes genes possuem alta homologia com aqueles envolvidos no ciclo sexual de *S. cerevisiae*, mostrando que *A. fumigatus* deve possuir ciclo sexual em algum estágio do seu ciclo de vida. Estes mesmos genes também estão presentes no genoma de *P. brasiliensis*, os quais podem promover o intercruzamento de isolados geneticamente compatíveis. Nosso grupo dispõe, no momento, de fortes evidências experimentais que sustentam a presença do ciclo sexual em *P. brasiliensis* (Teixeira *et al.*, *em andamento*).

## Conclusões

- 1- Foi identificado um INDEL presente na região do íntron1 do gene *hsp70* no isolado Pb01 do patógeno *P. brasiliensis*. Esta região foi utilizada em experimentos de PCR visando mapear outros isolados provenientes da América Latina e, que possuíam genótipos semelhantes, que aqui foram denominados “*Pb01-like*”;
- 2- O sequenciamento de 13 *loci* polimórficos de 88 isolados gerou os dados que foram utilizados em análise de filogenia molecular (GCPSR). Estes resultados mostraram que o clado geneticamente distinto, que abriga os isolados “*Pb01-like*”, correspondem a uma nova espécie filogenética de acordo com a metodologia de GCPSR, tanto por análise dos *loci* individuais como concatenados, além das outras 3 espécies filogenéticas já descritas para este patógeno (Matute *et al.*, 2006);
- 3- A grande divergência observada do novo clado provavelmente ocorre devido a grande quantidade de nucleotídeos fixados e acumulados entre os dois principais grupos geneticamente distintos, gerando um ramo monofilético fortemente sustentado pelos valores máximos (100%) de “*bootstrap*” (análise de máxima parcimônia) e pelos valores (1,0) de probabilidade posterior (análise de Bayes);
- 4- Os dados de polimorfismos indicam que provavelmente ocorreu um forte bloqueio do fluxo gênico entre estes dois grupos geneticamente distintos, o que evidencia incompatibilidade de cruzamento genético;
- 5- Além disto, a análise *in silico* dos dados de seqüências dos 13 *loci* para os 88 isolados deste patógeno evidenciou fortemente que os dois principais grupos filogeneticamente distintos estão em processo de recombinação de maneira separada, o que sugere isolamento reprodutivo entre os dois grupos;
- 6- A amplitude de divergência mostrou que o evento de especiação entre os dois grupos, “*Pb01-like*” e espécies S1, PS2 e PS3, ocorreu há cerca de 19 milhões de anos atrás;
- 7- Análise molecular utilizando marcadores do tipo RAPD mostram claramente a concordância entre as árvores geradas neste trabalho, separando os dois grupos e reforçando estes dados (Soares *et al.*, 1995; Molinari-Madlum *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2003);
- 8- Mesmo que espécies adicionais sejam descobertas em áreas geográficas pobremente amostradas neste trabalho como México, Uruguai, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e países da América Central, provavelmente não alterarão a estrutura

taxonômica apresentada neste trabalho, pois o ramo monofilético que agrupa os isolados “*Pb01-like*” é extremamente consistente pelas análises de filogenia;

- 9- Estes dados de filogenia molecular adicionados dos dados de morfologia, cruzamentos, características fenotípicas exclusivas específicas para cada um dos dois principais grupos aqui identificados, sustentariam fortemente a descrição formal de uma nova espécie para o gênero *Paracoccidioides*. Se isto se confirmar, e devido a grande importância deste patógeno na área médica na América Latina é importante nomear o clado “*Pb01-like*”. Uma nova nomenclatura pode facilitar a comunicação entre médicos patologistas e pesquisadores da área. Para a espécie filogenética correspondente aos isolados “*Pb01-like*” sugere-se a descrição formal de uma nova espécie: *Paracoccidioides lutzii*, em tributo ao médico micologista Adolfo Lutz, que foi o pioneiro a descrever o fungo patogênico humano *P. brasiliensis*.

## Perspectivas

- 1- Análise morfológica de isolados representativos dos grupos filogenéticos “*Pb01-like*”, S1, PS2 e PS3;
- 2- Identificação dos idiomórfos MAT 1.1 e MAT 1.2 em todos os isolados representativos dos grupos filogenéticos;
- 3- Avaliar a possibilidade de detectar estruturas compatíveis com a reprodução sexuada, tais como hifas espiraladas, cariogamia entre outras;
- 4- Identificar características fenotípicas exclusivas de isolados representativos de cada grupo filogenético;
- 5- Aumentar o número de isolados provenientes de países e/ou hospedeiros alternativos, não contemplado nesta análise.



## Referências Bibliográficas

- Alexopoulos, C.J., C.W.Mims., M. Blackwell. 1996. Introductory mycology. John Wiley and Sons, New York.
- Almeida, A.J., Matute, D.R., Carmona, J.A., Martins, M., Torres, I., McEwen, J.G., Restrepo, A., Leão, C., Ludovico, P. and Rodrigues, F. 2007. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. *Fungal Genet Biol.* 44: 25-31.
- Anderson, J.G. & Smith J.E. 1971. The production of conidiophores and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger* (microcycle conidiation). *J Gen Microbiol.* 69(2):185-97.
- Andreotti, P.F., Monteiro da Silva, J.L., Bailão, A.M., Soares, C.M., Benard, G., Soares, C.P., Mendes-Giannini, M.J. 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.*;7(5-6):875-81.
- Aspergillus fumigatus* Curr Genet. 42: 153–160
- Avise J.C., & Ball R.M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. In: Futuyama, D. and Antonovics, J. (eds) Oxford Surveys in Evolutionary Biology Vol. 7, pp. 45-67. Oxford University Press, New York.
- Bagagli, E., Bosco, S.M., Theodoro, R.C., Franco, M.. 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol.* 6(5):344-51.
- Bagagli, E., Franco, M., Bosco Sde, M., Hebler-Barbosa, F., Trinca, L.A., Montenegro, M.R. 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasybus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol.* ;41(3):217-23.
- Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K.I., Alquati, S., Miyaji, M., de Camargo, Z.P., Gomes, G.M., Franco, M. and Montenegro, M.R. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasybus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 58: 505-12.
- Barbee & Taylor. 2006. Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia* 98: 838-849.

- Barbosa, M.S., Bao, S.N., Andreotti, P.F., de Faria, F.P., Felipe, M.S., dos Santos F. L., Mendes-Giannini, M.J., Soares, C.M. 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun.* 74(1):382-9.
- Becker T. C. A., & De Castro-Prado M. A. Parasexuality in asexual development mutants of *Aspergillus nidulans*. *Biol Res* 39: 297-305
- Benard, G., Romano, C.C., Cacere, C.R., Juvenale, M., Mendes-Giannini, M.J. and Duarte, A.J. 2001. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 13: 248-52.
- Bennett R.J., Uhl M.A., Miller M.G., Johnson A.D. 2003. Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone. *Mol Cell Biol.* 23(22):8189-201
- Berbee, M.L. & J.W. Taylor. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Canadian Journal of Botany*, 1993. 71(8): p. 1114-1127.
- Bidochka, M. J., Small, C.N. and Spironello, M. 2005. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* *Environmental Microbiology*.7(9), 1361–1368
- Blackwell, M 2000. Perspective: Evolution: Terrestrial life-fungal from the start? *Science* 289:1884-1885
- Borromeo, E.S., Nelson R.J., Bonman J.M., Leung H.. 1993. Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice weed hosts. *Phytopathology* 83:393–399.
- Brodo, I.M.S. Duran Sharnoff, and S. Sharnoff. 2001. *Lichens of North America*. Yale University Press, New Haven, CT.
- Brummer, E., Castaneda, E. and Restrepo, A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 6: 89-117.
- Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A. and Stevens, D.A. 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun.* 57: 2289-94.

- Bubnick M. & Smulian, A. G. 2007. The MAT1 Locus of *Histoplasma capsulatum* Is Responsive in a Mating Type-Specific Manner\_ *Eukaryot Cell.*;6(4):616-21. Epub 2007 Feb 23.
- Bunting T.E., Plumley K.A., Clarke B.B., Hillman B.I. 1996. Identification of *Magnaporthe poae* by PCR and examination of its relationship to other fungi by analysis of their nuclear rDNA ITS-1 regions. *Phytopathology* 86: 398–404.
- Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. 1985. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*.;23(6):407-14
- Calich V.L., Kashino S.S. 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* ;31(5):615-23.
- Cano, M.I., Cisalpino, P.S., Galindo, I., Ramírez, J.L., Mortara, R.A., da Silveira, J.F. 1998. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 36(3):742-7
- Carr, J., & Shearer, G. Jr. 1998. Genome size, complexity, and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol.* Dec;180(24):6697-703.
- Chaverri P., Castlebury L.A., Samuels G.J., Geiser D.M. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol.* 27(2):302-13
- Cisalpine, P.S., Puccia, R., Yamauchi, L.M., Cano, M.I., da Silveira, J.F., Travassos, L.R. 1996. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem.* 23;271(8):4553-60.
- Clay, K. 2001. Symbiosis and the regulation of communities. *Am. Zool.* 41:810-824.
- Cole, C.T. 1976. Conidiogenesis in pathogenic hyphomycetes. I. *Sporothrix*, *Exophiala*, *Geotrichum* and *Microsporium*. *Sabouraudia*;14(1):81-98.
- Conti-díaz, I. A., Alvarez, B. J., Gezuele, E., Gonzalez Marini, H., Duarte, J., Falcon., J. 1972. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo*, v.14, pags.372-376,
- Conti-Díaz, I.A. & Rilla, F. - Hipótesis sobre el nicho ecológico de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. méd. Urug.*, 5: 97-103, 1989.

- Corredor, G.G., Peralta, L.A., Castaño, J.H., Zuluaga, J.S., Henao, B., Arango, M., Tabares, A.M., Matute, D.R., McEwen, J.G., Restrepo, A. 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol.* 43(3):275-80.
- Corte, A.C., Svoboda, W.K., Navarro, I.T., Freire, R.L., Malanski, L.S., Shiozawa, M.M., Ludwig, G., Aguiar, L.M., Passos, F.C., Maron, A., Camargo, Z.P., Itano, E.N., Ono, M.A. 2007. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia.* 164(5):225-8.
- Costa, E.O., Diniz, L.S., Netto, C.F., Arruda, C., Dagli, M.L. 1995. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *J Med Vet Mycol.* 33(1):39-42.
- Couch, B.C. & Kohn L. M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94(4), , pags. 683–693.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A.. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Cracraft, J e M. J. Donoghue. *Assembling the Tree of Life*”, pag. 171-194, 2004. Oxford University Press
- Currah R.S. 1997. Taxonomy of saprophytic and pathogenic fungi in the *Onygenales*. Annual Report of the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis. Chiba University: Japan. pags. 44–54.
- David M. Geiser, Joe W. Dorner, Bruce W. Horn and John W. Taylor. 2000. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 31: 169-179.
- De Brito, T. & Franco, M.F.1994. Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 36: 185-92.
- Dettman J.R., Jacobson D.J., Taylor J.W. 2003a. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* 57:2703–2720.
- Dettman, J.R., Jacobson, D. J. and Taylor, J W.. 2006. Multilocus sequence data reveal extensive phylogenetic species diversity within the *Neurospora discreta* complex. *Mycologia* 98(3): 436–446.

- Dettman, J.R., Jacobson, D.J. Turner, E., Pringle, A., Taylor, J.W. 2003b. Reproductive isolation and phylogenetic divergence in *Neurospora*: comparing methods of species recognition in a model eukaryote. *Evolution* 57:2721–2741
- Engelbrecht, C.J., & Harrington, T.C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia*. 2005 Jan-Feb;97(1):57-69
- Eulálio KD, de Macedo RL, Cavalcanti MA, Martins LM, Lazéra MS, Wanke B. 2001. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. *Mycopathologia*. 149(2):57-61
- Feitosa L.dos S., Cisalpino, P.S., dos Santos, M.R., Mortara, R.A., Barros, T.F., Morais, F.V., Puccia, R., da Silveira, J.F. and de Camargo, Z.P. 2003. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 39: 60-9.
- Felipe, M.S., Andrade, R.V., Arraes, F.B., Nicola, A.M., Maranhão, A.Q., Torres, F., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M.J., Campos, E.G., Moraes, L.M.P., Albuquerque, P., Tavares, A.H.F.P., Silva, S.S., Kyaw, C.M., Souza, D.P., PbGenome Network, Pereira, M., Jesuino, R.S.A., Andrade, E.V., Parente, J.A., Oliveira, G.S., Barbosa, M.S., Martins, N.F., Fachin, A.L., Cardoso, R.S., Passos, G.A.S., Almeida, N.F., Walter, M.E.M.T., Soares, C.M.A., Carvalho, M.J., Brigido, M.M., PbGenome Network. 2005. Transcriptional Profiles of the Human Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in Mycelium and Yeast Cells. *J Biol Chem*. 280: 24706–14.
- Felipe, M.S., Andrade, R.V., Petrofeza, S.S., Maranhão, A.Q., Torres, F.A., Albuquerque, P., Arraes, F.B., Arruda, M., Azevedo, M.O., Baptista, A.J., Bataus, L.A., Borges, C.L., Campos, E.G., Cruz, M.R., Daher, B.S., Dantas, A., Ferreira, M.A., Ghil, G.V., Jesuino, R.S., Kyaw, C.M., Leitao, L., Martins, C.R., Moraes, L.M., Neves, E.O., Nicola, A.M., Alves, E.S., Parente, J.A., Pereira, M., Poças-Fonseca, M.J., Resende, R., Ribeiro, B.M., Saldanha, R.R., Santos, S.C., Silva-Pereira, I., Silva, M.A., Silveira, E., Simoes, I.C., Soares, R.B, Souza, D.P., De-Souza, M.T., Andrade, E.V., Xavier, M.A., Veiga, H.P., Venancio, E.J., Carvalho, M.J., Oliveira, A.G., Inoue, M.K., Almeida, N.F., Walter, M.E., Soares, C.M., Brigido, M.M. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* 20: 263-71.

- Fernandes L., Paes H.C., Tavares A.H., Silva S.S., Dantas A., Soares C.M., Torres F.A., Felipe M.S. 2008. Transcriptional profile of *ras1* and *ras2* and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Res.* (2):300-10.
- Fernandes, L., Araujo, M.A., Amaral, A., Reis, V.C., Martins, N.Fand Felipe, M.S. 2005. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis*--inferred from comparisons with other fungi. *Genet Mol Res.* 4: 216-31.
- Fisher, M. C., Koenig, G.L., White, T.J., San-Blas, G., Negroni, R., Wanke, B., Alvarez G. and Taylor, J.W. 2001. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of Human migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(8): 4558-4562.
- Fisher, M. C., Koenig, G.L., White, T.J., Taylor.J. W. 2000. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1164-1174.
- Fisher, M. C., Koenig, G.L., White, T.J., Taylor.J. W. 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 94(1): 73-84.
- Fornari, M.C., Bava, A.J., Guerenzo, M.T., Berardi, V.E., Silaf, M.R., Negroni, R., and Diez, R.A. 2001. High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8: 1036-8.
- Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo, A. and Del Negro, G.1994. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Fraser, J.A., Stajich, J. E., Tarcha, E. J., Cole G. T., Inglis D. O., Sil, A. and Heitman J. 2007. Evolution of the mating type locus: insights gained from the dimorphic primary fungal pathogens *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, and *Coccidioides posadasii*. *Eukaryot Cell.* 6(4):622-9.
- Fukui Y., Kaziro Y., Yamamoto M. 1986. Mating pheromone-like diffusible factor released by *Schizosaccharomyces pombe*; *EMBO J* ;5(8):1991-1993
- Geiser D.M., Gueidan C., Miadlikowska J., Lutzoni F., Kauff F., Hofstetter V., Fraker E., Schoch C.L., Tibell L., Untereiner W.A., Aptroot A.2006. Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. *Mycologia.*98(6):1053-64.

- Geiser, D.M., Pitt, J.I, Taylor, J.W. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, V95 N1: 388-393.
- Glass, N.L., Grotelueschen J., Metzberg, R.L. 1990. *Neurospora crassa* A mating-type region. Proc Natl Acad Sci U S A ;87(13):4912-6.
- Goddard, M.R., Godfray, H.C., Burt, A. 2005. Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. Nature 31;434(7033):636-40.
- Goldman, G.H., Marques, E.R., Ribeiro, D.C.D., Bernardes, L.A.S., Quiapin, A.C., Vitorelli, P.M., Savoldi, M., Semighini, C.P., Oliveira, R.C., Nunes, L.R., Travassos, L.R., Puccia, R., Batista, W.L., Ferreira, L.E., Moreira, J.C., Bogossian, A.P., Tekaiia, F., Nobrega, M.P., Nobrega, F.G. and Goldman, M.H.S. 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. 2: 34–48.
- Greer, D.L., & Bolaños, B. 1977. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Sabouraudia*. 15(3):273-82.
- Grose, E. & Tamsitt, J. R. 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus Literatus*) in Colômbia. *Sabouraudia*, Oxfordshire, v.4, pags.124-125.
- Gutierrez, A. H., Ceballos, G., Ferrer, H. I., Rangel, O. 1974. Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis en ganado lechero del Valle del Aburra. *Antioquia Medica*, Medellin, Colombia, v.24, pags.339-358,
- Hahn, R. C., Macedo, A. M., Fontes, C.J.F, Batista, R.D., Santo, N.L., and Hamdan, J. S. 2003. Randomly Amplified Polymorphic DNA as a Valuable Tool for Epidemiological Studies of *Paracoccidioides brasiliensis* *J Clin Microbiol*. 41(7):2849-54.
- Hahn, R. C., Macedo, A. M., Santos, N. L., Resende, J. C. P., and Hamdan, J. S. 2002. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* atypical isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Rev. Iberoam. Micol*. 19:49–51
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98

- Harrington, T. C., and Rizzo, D. M. 1999. Defining species in the fungi. In *Structure and Dynamics of Fungal Populations* (J. J. Worrall, Ed.), pages. 43–70. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Haubold, E.M., Cooper, C.R. Jr, Wen, J.W., McGinnis, M.R., Cowan, D.F. 2000. Comparative morphology of *Lacazia loboi* (syn. *Loboa loboi*) in dolphins and humans. *Med Mycol.* Feb;38(1):9-14.
- Hawksworth, DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycol. Res.* 95:641-655.
- Hawksworth, DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105:1422-1432.
- Hedges S.B, Blair J.E, Venturi M.L., Shoe J.L. 2004. Molecular timescale of eukaryote evolution and rise a complex multicelular life. *BMC Evol Biol.* 28;4:2
- Herr R.A., Tarcha E.J., Taborda P.R., Taylor J.W., Ajello L., Mendoza L. 2001. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic *Onygenales*. *J Clin Microbiol*; 39: 309-314.
- Hillis, D. M., & J. J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetics analysis. *Syst. Biol.* 42:182–192.
- Hogan, L.H., & Klein, B.S. 1994. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect Immun.* Aug;62(8):3543–3546.
- Huson, D. H. 1998. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 14:68–73.
- Huson, D.H., Bryant,D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2):254-267, 2006.
- James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch H.T., Rauhut A., Reeb V., Arnold A.E., Amtoft A., Stajich J.E., Hosaka K., Sung G.H., Johnson D., O'rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis J.M., Slot J.C, Wang Z., Wilson A.W., Schussler A., Longcore J.E., O'donnell K., Mozley-Standridge S., Porter D., Letcher P.M., Powell M.J., Taylor J.W., White M.M., Griffith G.W, Davies D.R., Humber R.A, Morton J.B., Sugiyama J., Rossman A.Y., Rogers J.D., Pfister D.H., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker R.A., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Spotts R.A., Serdani M., Crous P.W., Hughes K.W, Matsuura K., Langer E., Langer G.,



- Untereiner W.A., Lucking R., Budel B., Geiser D.M., Aptroot A., Diederich P, Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett D.S, Lutzoni F., Mclaughlin D.J, Spatafora J.W., Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, v. 443, p. 818-822, 2006.
- Johnson, W. D. & Lang, G. M. 1977. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). *Veterinary Pathology*, Washington, v.14, p.368-371
- Kasuga T., Taylor J.W., Koenig G., McEwen J., Restrepo, A., Castañeda, E., Lacaz, C. S., Heins-Vaccari, E.M., de Freitas , Zancopé-Oliveira, R. M., Qin Z., Negroni, R., Carter, D.A., Mikami Y., Tamura, M., Taylor, M. L., Miller, G. F., Poonwan N. and Taylor, J. W. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Ecology* 12: 3383-3401.
- Kasuga T., Taylor J.W., White T. J. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 653–663.
- Kato H., Tamamoto M., Yamaguchi-Ozaki T., Kadouchi H., Iwamoto Y., Nakayashiki H., Tosa Y., Mayama S., Mori N. 2000. Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. *J Gen Plant Pathol* 66:30–47.
- Kellogg C. A., & Griffin D.W.,. 2006. Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends. Ecol. Evol.* 21(11):638-44
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:454–458.
- Kirk, PM, Cannon, PF, David, JC, Stalpers, JA. 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Koufopanou, V., Burt, A., and Taylor, J. W. 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5478–5482.
- Kwon-Chung K.J., Edman J.C., Wickes B.L.1 .1992. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* Feb;60(2):602-5.
- Kwon-Chung, K. J., & Bennett, J. E. 1992. *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.

- Loytynoja, A., & M.C. Milinkovitch. 2001. Molecular phylogenetic analyses of the mitochondrial ADP-ATP camers: The Plantae/Fungi/Metazoa/trichotomy revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10202-10207.
- Maresca B., & Kobayashi G.S. 2000. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces*. *Contrib Microbiol. Basel, Karger*, vol. 5, pags 201-216
- Matute, D.R., McEwen, J.G., Montes, B.A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J.T., Restrepo, A., Morais, F., Nino-Vega, G., Taylor, J.W. 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 65-73.
- Matute, D.R., Sepulveda, V.E., Quesada, L.M., Goldman, G.H., Taylor, J.W., Restrepo, A., McEwen, J.G.. 2006(b). Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 44(6):2153-7.
- Mayr, E. 1940. Speciation phenomena in birds. *Am. Naturalist* 74: 249–278. Brasier, C. M. 1987. The dynamics of fungal speciation. In *Evolutionary Biology of the Fungi* (A. D. M. Rayner, C. M. Brasier, and D. Moore, Eds.), pags. 231–260. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- McEwen J.G., Bedoya V., Patiño M.M., Salazar M.E., Restrepo A. 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* ;25(3):165-75
- Molinari-Madlum, E.E., Felipe, M.S., Soares, C.M. 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol.* 37(4):269-76.
- Montoya, A.E., Alvarez, A.L., Moreno, M.N., Restrepo, A., McEwen, J.G. 1999. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 37: 219-22.
- Montoya, A.E., Moreno, M.N., Restrepo, A., McEwen, J.G. 1997. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 21(2):223-7.
- Morais, F. V., Barros, T. F., Fukada, M. K. Cisalpino, P. S. and Puccia, R.. 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 38:3960–3966.

- Moscardi-Bacchi, M., Brummer, E. and Stevens, D.A. 1994. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol.* 40: 159-64.
- Nascimento, T., Martinez, R., Lopes, A. R., Bernardes, L. A. D., Barco, C. P., Goldman, M. H. S., Taylor, J. W., McEwen, J. G., Nobrega, M. P., Nobrega, F. G. and Goldman, G. H. 2004. Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5007-5014.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Newman P.L., Owen H. 1985. Evidence of asexual recombination in *Rhynchosporium secalis*. *Plant Pathol* 34: 338-340
- Nino-Vega, G. A., A. M. Calcagno, G. San-Blas, F. San-Blas, G. W. Gooday, and N. A. Gow. 2000. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 38:437–441.
- Nino-Vega, G. A., E. T. Buurman, G. W. Gooday, G. San-Blas, and N. A. Gow. 1998. Molecular cloning and sequencing of a chitin synthase gene (CHS2) of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 14:181–187.
- Nylander, J. A. A. 2002. MrModeltest. Department of Systematic Biology, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Okamoto H.T.S., Soares C.M.A. e Pereira, M. 2006. 1,3- $\beta$ -glucan synthase gene in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Genet. Mol. Res.* 5 (2): 407-418
- Ono, M.A., Bracarense, A.P., Morais, H.S., Trapp, S.M., Belitardo, D.R., Camargo, Z.P. 2001. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol.* 39(3):277-82.
- Pan, S., & Cole, G.T. 1992. Electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 40: 4872–4880.
- Paoletti M, Rydholm C, Schwier EU, Anderson MJ, Szakacs G, Lutzoni F, Debeaupuis JP, Latgé JP, Denning DW, Dyer PS. . 2005 .Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol.* 12;15(13):1242-8.
- Perkins, D. D., & Turner, B. C. 1988. *Neurospora* from natural populations: Toward the population biology of a haploid eukaryote. *Exp. Mycol.* 12: 91–131.
- Pöggeler, S. 2002. Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen

- Pontecorvo G., Roper J.A., Forbes E. 1953. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *J Gen Microbiol* 8: 198-210
- Pringle, A., D.M. Baker, J.L. Platt, J.P. Wares, J.P. Latge and J.W. Taylor. 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59(9): 1886-1899.
- Puccia, R., Schenkman, S., Gorin, P.A., Travassos, L.R. 1986. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.*;53(1):199-206.
- Raju, N.B. 1992. Genetic control of sexual cycle in *Neurospora*. *Mycol. Res.* 96:241-262
- Rannala, B., & Z. Yang. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 43:304–311.
- Restrepo A. 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* ;23(5):323-34.
- Restrepo S., Tobon A., Trujillo J., Restrepo A. 1992. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *J. Med. Vet. Mycol.*;30(3):173-84.
- Restrepo, A., Salazar, M.E., Cano, L.E., Stover, E.P., Feldman, D. and Stevens, D.A. (1984) Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to Paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 46: 346-53.
- Reynolds, D. R. 1993. The fungal holomorph: An overview. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (D. R. Reynolds and J. W. Taylor, Eds.), pp. 15–25. CAB International, Wallingford, UK.
- Richini-Pereira, V.B., Bosco, S.D., Griese, J., Theodoro, R.C., Macoris, S.A., Da Silva, R.J., Barrozo, L., Tavares, P.M., Zancopé-Oliveira, R.M., Bagagli, E. 2007. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol.*18:1-6
- Rippon J.W. 1988. Histoplasmosis (*Histoplasmosis capsulati*).In: Rippon JW (ed) *Medical Mycology*, 3<sup>rd</sup> edition, WB Saunders Company, Philadelphia, p. 381-423,
- Romani, L. 1997. The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol.* 9: 484-90.

- Romani, L., Bistoni F., e Puccetti P. 2003. Adaptation of *Candida albicans* to de host enviroment: the rola of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr. Opin Microbiol* 6(4):338-343
- Ronquist, F., & J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.
- Rozas, J., J. C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496–2497.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rumbley, C.A. & Phillips, S.M. 1999. The *schistosome* granuloma: an immunoregulatory organelle. *Microbes Infect.* 1: 499-504.
- Salazar, M.E., Restrepo, A. and Stevens, D.A. 1988. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.* 56: 711-3.
- San-Blas, G. and Niño-Vega, G. 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar, R. L., Calderone, R. A. (eds). *Fungal Pathogenesis: principles and clinical applications*. New York: Marcel Dekker, : 205-226.
- Sano, A., Tanaka, R., Yokoyama, K., Franco, M., Bagagli, E., Montenegro, M.R., Mikami, Y., Miyaji, M., Nishimura, K. 1999. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Mycopathologia*.143(3):165-9.
- Silva, S.S., Tavares, A.H., Passos-Silva, D.G., Fachin, A.L., Teixeira, S.M., Soares, C.M., Carvalho, M.J., Bocca, A.L., Silva-Pereira, I., Passos, G.A., Felipe, M.S. 2007. Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Microbes Infect* (Epub ahead of print)
- Smith, S.E., & D. J. Read. 1997. *Micorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego

- Soares C.M., Madlun, E.E., da Silva S.P., Pereira, M., Felipe, M.S. 1995. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 33(2): 505-7
- Spatafora, J.W., Johnson, D., Sung, G.-H., Hosaka, K., O'Rourke, B., Serdani, M., Spotts, R., Lutzoni, F., Hofstetter, V., Fraker, E., Gueidan, C., Miadlikowska, J., Reeb, V., Lumbsch, T., Lücking, R., Schmitt, I., Aptroot, A., Roux, C., Miller, A., Geiser, D., Hafellner, J., Hestmark, G., Arnold, A.E., Büdel, B., Rauhut, A., Hewitt, D., Untereiner, W., Cole, M.S., Scheidegger, C., Schultz, M., Sipman., H. and Schoch, C. 2006. A five-gene phylogenetic analysis of the Pezizomycotina. *Mycologia* 98: 1020-1030.
- Stambuk, B.U., Puccia, R., de Almeida, M.L., Travassos, L.R., Schenkman, S. 1988. Secretion of the 43 kDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.*;26(6):367-73
- Steenkamp, E. T., Wingfield B. D., Desjardins, A. E., Marasas, W. F. O., Wingfield, M. J. 2002 Cryptic Speciation in *Fusarium subglutinans*. *Mycologia*, Vol. 94, No. 6 pags. 1032-1043
- Sugiyama M. Ohara A., Mikawa T. 1999. Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) sequences. *Mycoscience* 40:251–258.
- Sugiyama, J. 1987. Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications. Elsevier, Amsterdam.
- Suh, S.O., C. Marshall, J.V. McHugh e M. Blackwell. 2003. Wood investigation by passalid beetles in the presence of Xylose-fermenting gut yeasts. *Mol. Ecol.*, 12:3137-3145.
- Szathmáry, E. & Maynard Smith, J. 1995. The major evolutionary transitions. *Nature* 374, 227-232.
- Taborda, C.P., Camargo, Z.P. 1993. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. *J Med Vet Mycol.*;31(2):155-60.
- Tavares, A.H., Silva, S.S., Bernardes, V.V., Maranhão, A.Q., Kyaw, C.M., Pocas-Fonseca, M. and Silva-Pereira I. 2005. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res.* 4: 372-89

- Tavares, A.H., Silva, S.S., Dantas, A., Campos, E.G., Andrade, R.V., Maranhão, A.Q., Brigido, M.M., Passos-Silva, D.G., Fachin, A.L., Teixeira, S.M., Passos, G.A., Soares, C.M., Bocca, A.L., Carvalho M.J., Silva-Pereira, I. and Felipe, M.S. 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect.* 9: 583-90.
- Taylor, J.W. 1995. Molecular phylogenetic classification of fungi. *Arch. Med. Research* 26:307-314.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Gêiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 31:21–32.
- Taylor, J.W., Turner, E., Pringle, A., Dettman, J., Johannesson, H. 2007. Fungal species: thoughts on their recognition, maintenance and selection. Pp. 313-339, In 'Fungi in the Environment'. (British Mycological Society Symposia No. 25) eds. G.M. Gadd, S.C. Watkinson and P.S. Dyer. Cambridge: Cambridge University Press.
- Teixeira, M.M., De Carvalho, M. J. A., Dantas, A. S., Felipe, M. S. S. 2005. The *hsp 70* gene presents sequence differences among isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. Vol 47.
- Terçarioli, G.R., Bagagli, E., Reis, G.M., Theodoro, R.C., Bosco, Sde. M., Macoris, S.A., Richini-Pereira, V.B 2007. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol.* 2007 22;7:92.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Ac. Res.* 22, 4673-4680.
- Torres-Guerrero H. 1999. Ploidy study in *Sporothrix schenckii*. *Fungal Genet Biol.* 27(1):49-54.
- Turner, B. C., Perkins, D. D., and Fairfield, A. 2001. *Neurospora* from Natural Populations: A Global Study. *Fungal Genet Biol.* 32(2):67-92.
- Untereiner, W.A., J.A. Scott, F.A. Naveau, L. Sigler, J. Bachewich and A. Angus. 2004. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia* 96: 812-821.

- Vilgalys, R., and Sun, B. L. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4599–4603.
- Wang, D. Y. C, S.Kumar & S.B. Hedges. 1999. Divergence time estimate for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc, R Soc. Lond. B* 266:163-171.
- Wessels, J.G.H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu Rev. Phytopathol.* 32:413-437
- Wiley, E. O. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool.* 27: 17–26.
- Wilkinson L.E. & Pringle J.R..1974. Transient G1 arrest of *S. cerevisiae* cells of mating type alpha by a factor produced by cells of mating type a. *Exp Cell Res* 89(1):175-87
- Wolfe KH & Shields DC. 1997.Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature.* 12;387(6634):708-13
- Wong, S., Butler, G., Wolfe, K.H. 2002.Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiascomycete yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9;99(14):9272-7.
- Wu, C. G. & J . W. Kimbrough. 1992. Ultrastructural studies of ascosporeogenesis in *Ascobolus immerses*. *Mycologia* 84:459-466
- Zeigler R.S., Scott R.P., Leung H., Bordeos A.A., Kumar J. and Nelson R.J. 1997. Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. *Phytopathol* 87: 284-294
- Zervakis G. I., Moncalvo J.M., Vilgalys R. 2004. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology.* ;150:715-26.



**Anexo 1 – Pontos polimórficos identificados em cada locus representantes do conjunto 1 de dados.  $\alpha$ -tubulina exon 2-3**

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Pb01	GAGAACACTG	CCTATATAAC	TTATGTCCTT	CTGCAGAACTT	CCAATTACAC	CGGCAAATTT	GATCGCCAAT	GATACGTG	TGTTTTTTTT	TAAATGTTT	
3171	T										
6810	T										G
7455	T										
84	T										
717	T										
351	T										
Raj2	T										
218	T										
206	T										
694	T										
397	T										
61	T										
57	T										
769	T										
133	T	T	T	T				C	A	G	
189	T										
A3	T	T	T	T				C	A	G	
P2	T	T	T	T				C	A	G	
P1	T	T	T	T				C	A	G	
A8	T	T	T	T				C	A	G	
A7	T	T	T	T				C	A	G	
A6	T	T	T	T				C	A	G	
A5	T	T	T	T				C	A	G	
A4	T	T	T	T				C	A	G	
A2	T	T	T	T				C	A	G	
A1	T	T	T	T				C	A	G	
PE1	T	T	T	T				C	A	G	
U1	T	T	T	T				C	A	G	
V6	T	T	T	T				C	A	G	
V5	T	T	T	T				C	A	G	
V4	T	T	T	T				C	A	G	
V3	T	T	T	T				C	A	G	
V2	T	T	T	T				C	A	G	
V1	T	T	T	T				C	A	G	
C21	T	T	T	T				C	A	G	
C20	T	T	T	T				C	A	G	
C19	T	T	T	T				C	A	G	
C18	T	T	T	T				C	A	G	
C17	T	T	T	T				C	A	G	
C16	T	T	T	T				C	A	G	
c15	T	T	T	T				C	A	G	
C14	T	T	T	T				C	A	G	
C13	T	T	T	T				C	A	G	
c12	T	T	T	T				C	A	G	
C11	T	T	T	T				C	A	G	
C10	T	T	T	T				C	A	G	
C9	T	T	T	T				C	A	G	
C8	T	T	T	T				C	A	G	
C7	T	T	T	T				C	A	G	
C6	T	T	T	T				C	A	G	
C5	T	T	T	T				C	A	G	
C4	T	T	T	T				C	A	G	
C3	T	T	T	T				C	A	G	
C2	T	T	T	T				C	A	G	
C1	T	T	T	T				C	A	G	
B26	T	T	T	T				C	A	G	
B25	T	T	T	T				C	A	G	
B24	T	T	T	T				C	A	G	
B23	T	T	T	T				C	A	G	
B22	T	T	T	T				C	A	G	
B21	T	T	T	T				C	A	G	
B20	T	T	T	T				C	A	G	
B19	T	T	T	T				C	A	G	
B18	T	T	T	T				C	A	G	
B17	T	T	T	T				C	A	G	
B16	T	T	T	T				C	A	G	
B15	T	T	T	T				C	A	G	
B14	T	T	T	T				C	A	G	
B13	T	T	T	T				C	A	G	
B12	T	T	T	T				C	A	G	
B11	T	T	T	T				C	A	G	
B10	T	T	T	T				C	A	G	
B9	T	T	T	T				C	A	G	
B8	T	T	T	T				C	A	G	
B7	T	T	T	T				C	A	G	
B6	T	T	T	T				C	A	G	
B5	T	T	T	T				C	A	G	
B4	T	T	T	T				C	A	G	
B3	T	T	T	T				C	A	G	
B2	T	T	T	T				C	A	G	
B1	T	T	T	T				C	A	G	

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Pb01	ACAGTTGTATTGCCTGGAACATGGTATTCAGGTATGTCCTGATATTGAGTCAAGTCCTCTGTTTACTTTCCTTTGCAGCTTTGTTTGTTCATGCCA									
3171	.....									
6810	.....									
7455	.....									
84	.....									
717	.....									
351	.....									
Raj2	.....									
218	.....									A.
206	.....									
694	.....									
397	.....									
61	.....									
57	.....				G					
769	.....									
133	.....						G	G	T	
189	.....									
A3	G						A	G		
P2	G						A	G		
P1	G						A	G		
A8	G						A	G		
A7	G						A	G		
A6	G						A	G		
A5	G						A	G		
A4	G						A	G		
A2	G						A	G		
A1	G						A	G		
PE1	G						A	G		
U1	G						A	G		
V6	G						A	G		T
V5	G						A	G		T
V4	G						A	G		T
V3	G						A	G		T
V2	G						G	G	T	
V1	G						A	G		T
C21	G			G		G	A	G		
C20	G			G		G	A	G		
C19	G			G		G	A	G		
C18	G			G		G	A	G		
C17	G			G		G	A	G		
C16	G			G		G	A	G		
c15	G			G		G	A	G		
C14	G			G		G	A	G		
C13	G			G		G	A	G		
c12	G			G		G	A	G		
C11	G			G		G	A	G		
C10	G			G		G	A	G		
C9	G			G		G	A	G		
C8	G			G		G	A	G		
C7	G			G		G	A	G		
C6	G			G		G	A	G		
C5	G			G		G	A	G		
C4	G			G		G	A	G		
C3	G			G		G	A	G		
C2	G			G		G	A	G		
C1	G			G		G	A	G		
B26	.....						G	G	T	
B25	G						A	G		
B24	G						A	G		
B23	.....						G	G	T	
B22	G						A	G		
B21	G						A	G		
B20	G						A	G		
B19	G						A	G		
B18	G						A	G		
B17	G						A	G		
B16	G						A	G		
B15	.....						G	G	T	
B14	G						A	G		
B13	.....						G	G	T	
B12	G						A	G		
B11	G						A	G		
B10	G						A	G		
B9	G						A	G		
B8	G						A	G		
B7	.....						G	G	T	
B6	G						A	G		
B5	G						A	G		
B4	G						A	G		
B3	G						A	G		
B2	G						A	G		
B1	G						A	G		

	210	220	230	240
Pb01	CTG	TCTACG	TACCTGGG	ATATAAGGTTAATACGACTTAAATCT
3171	.....	.....	.....	.....
6810	.....	.....	.....	.....
7455	.....	.....	.....	.....
84	.....	.....	.....	.....
717	.....	.....	.....	.....
351	.....	.....	.....	.....
Raj2	.....	.....	.....	.....
218	.....	.....	.....	.....
206	.....	.....	.....	.....
694	.....	.....	.....	.....
397	.....	.....	.....	.....
61	.....	.....	.....	.....
57	.....	.....	.....	.....
769	.....	.....	.....	.....
133	.....	TC	A	.....
189	.....	TC	A	.....
A3	.....	TC	A	A
P2	.....	TC	A	.....
P1	.....	TC	A	.....
A8	.....	TC	A	A
A7	.....	TC	A	A
A6	.....	TC	A	.....
A5	.....	TC	A	A
A4	.....	TC	A	A
A2	.....	TC	A	A
A1	.....	TC	A	.....
PE1	.....	TC	A	.....
U1	.....	TC	A	A
V6	.....	TC	A	.....
V5	.....	TC	A	.....
V4	.....	TC	A	.....
V3	.....	TC	A	.....
V2	.....	TC	A	.....
V1	.....	TC	A	.....
C21	.....	TC	A	.....
C20	.....	TC	A	.....
C19	.....	TC	A	.....
C18	.....	TC	A	.....
C17	.....	TC	A	.....
C16	.....	TC	A	.....
c15	.....	TC	A	.....
C14	.....	TC	A	.....
C13	.....	TC	A	.....
c12	.....	TC	A	.....
C11	.....	TC	A	.....
C10	.....	TC	A	.....
C9	.....	TC	A	.....
C8	.....	TC	A	.....
C7	.....	TC	A	.....
C6	.....	TC	A	.....
C5	.....	TC	A	.....
C4	.....	TC	A	.....
C3	.....	TC	A	.....
C2	.....	TC	A	.....
C1	.....	TC	A	.....
B26	.....	TC	A	.....
B25	.....	TC	A	A
B24	.....	TC	A	A
B23	.....	TC	A	.....
B22	.....	TC	A	.....
B21	.....	TC	A	.....
B20	.....	TC	A	.....
B19	.....	TC	A	C
B18	.....	TC	A	A
B17	.....	TC	A	.....
B16	.....	TC	A	.....
B15	.....	TC	A	.....
B14	.....	TC	A	.....
B13	.....	TC	A	.....
B12	.....	TC	A	.....
B11	.....	TC	A	A
B10	.....	TC	A	.....
B9	.....	TC	A	.....
B8	.....	TC	A	.....
B7	.....	TC	A	.....
B6	.....	TC	A	.....
B5	.....	TC	A	.....
B4	.....	TC	A	.....
B3	.....	TC	A	.....
B2	.....	TC	A	.....
B1	.....	TC	A	.....

## ARF-Fator de ribosilação

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Pb01	GCCTCGATGCTGCGGAAAGACCAATCCTGTACAAGCTGAAACTTGGCGAAATCGTCACAACAATCCCTACCATCGGTGAGTTCGATCCTATCTCGTA									
6810										
Raj_2										
717										
3171				A	G			G		
7455										
133										
84										
189										
61										
206										
694										
397										
57										
351										
769								A		
218										
B26				T						C..G
A3				T						C..G
P2				T						C..G
P1				T						C..G
A8				T						C..G
A7				T						C..G
A6				T						C..G
A5				T						C..G
A4				T						C..G
A2				T						C..G
A1				T						C..G
PE1				T						C..G
U1				T						C..G
V6				T						C..G
V5				T						C..G
V4				T						C..G
C20				T						C..G
V3				T						C..G
V2				T						C..G
V1				T						C..G
C21				T						C..G
C19				T						C..G
C18				T						C..G
C17				T						C..G
C16				T						C..G
C15				T						C..G
C14				T						C..G
C13				T						C..G
C12				T						C..G
C11				T						C..G
C10				T						C..G
C9				T						C..G
C8				T						C..G
C7				T						C..G
C6				T						C..G
C5				T						C..G
C4				T						C..G
C3				T						C..G
C2				T						C..G
C1				T						C..G
B25				T						C..G
B24				T						C..G
B23				T						C..G
B22				T						C..G
B21				T						C..G
B20				T						C..G
B19				T						C..G
B18				T						C..G
B17				T						C..G
B16				T						C..G
B15				T						C..G
B14				T						C..G
B13				T						C..G
B12				T						C..G
B11				T						C..G
B10				T						C..G
B9				T						C..G
B8				T						C..G
B7				T						C..G
B6				T						C..G
B5				T						C..G
B4				T						C..G
B3				T						C..G
B2				T						C..G
B1				T						C..G



	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Pb01	TCCAGTTTTT	GTTTTGTTAATATT	CGAATCTTACCCCAT	GCAGGATTTAACGTC	GAGACTGTCGAATA	TAAAAACATCCAATT	TACCGTGTGGGAC	GTGG		
6810										
Raj_2										
717										
3171										
7455										
133										
84										
189										
61										
206										
694										
397										
57										
351										
769										
218										
B26										
A3										
P2										
P1										
A8										
A7										
A6										
A5										
A4										
A2										
A1										
PE1										
U1										
V6										
V5										
V4										
C20										
V3										
V2										
V1										
C21										
C19										
C18										
C17										
C16										
C15										
C14										
C13										
C12										
C11										
C10										
C9										
C8										
C7										
C6										
C5										
C4										
C3										
C2										
C1										
B25										
B24										
B23										
B22										
B21										
B20										
B19										
B18										
B17										
B16										
B15										
B14										
B13										
B12										
B11										
B10										
B9										
B8										
B7										
B6										
B5										
B4										
B3										
B2										
B1										

	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Pb01	GTGGACAGGACAAGATCAGACCCCTGTGGAGGCAC	TACTTCCAAAA	TACCCAAGGTATC	ATTTTCGTGGTTGACAGCAACGATCGTGACCGTGTCG					
6810	.....								
Raj_2	.....								
717	.....								
3171	.....								
7455	.....								
133	.....								
84	.....								
189	.....								
61	.....								
206	.....								
694	.....								
397	.....								
57	.....								
351	.....								
769	.....								
218	.....								
B26	.....								
A3	.....								
P2	.....								
P1	.....								
A8	.....								
A7	.....								
A6	.....								
A5	.....								
A4	.....								
A2	.....								
A1	.....								
PE1	.....								
U1	.....								
V6	.....								
V5	.....								
V4	.....								
C20	.....								
V3	.....								
V2	.....								
V1	.....								
C21	.....								
C19	.....								
C18	.....								
C17	.....								
C16	.....								
C15	.....								
C14	.....								
C13	.....								
C12	.....								
C11	.....								
C10	.....								
C9	.....								
C8	.....								
C7	.....								
C6	.....								
C5	.....								
C4	.....								
C3	.....								
C2	.....								
C1	.....								
B25	.....								
B24	.....								
B23	.....								
B22	.....								
B21	.....								
B20	.....								
B19	.....								
B18	.....								
B17	.....								
B16	.....								
B15	.....								
B14	.....								
B13	.....								
B12	.....								
B11	.....								
B10	.....								
B9	.....								
B8	.....								
B7	.....								
B6	.....								
B5	.....								
B4	.....								
B3	.....								
B2	.....								
B1	.....								

# CHS E1

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Pb01	ACAGGACTCTGGGATGATTCCCTGACCCACTGCGACTTGCTTCACCCAAAACCC	TGGCCCATATGTTACCCAAACTCCCAAATAC	TCTCTCTAAGTCAATT							
133	C	C	C	C	C	A			C	
3171										
6810										
7455										
84										T
769										
717										T
Raj2										T
189										T
61										T
206										T
694										T
397										T
57										T
218										T
351										T
A8	C	C	C	C	C	A			C	
A3	C	C	C	C	C	A			C	
A7	C	C	C	C	C	A			C	
A5	C	C	C	C	C	A			C	
A4	C	C	C	C	C	A			C	
A1	C	C	C	C	C	A			C	
A2	C	C	C	C	C	A			C	
PE1	C	C	C	C	C	A			C	
V6	C	C	C	C	C	A			C	
V5	C	C	C	C	C	A			C	
V4	C	C	C	C	C	A			C	
C20	C	C	C	C	C	A			C	
V3	C	C	C	C	C	A			C	
V1	C	C	C	C	C	A			C	
C21	C	C	C	C	C	A			C	
C19	C	C	C	C	C	A			C	
C18	C	C	C	C	C	A			C	
C17	C	C	C	C	C	A			C	
C16	C	C	C	C	C	A			C	
C15	C	C	C	C	C	A			C	
C14	C	C	C	C	C	A			C	
C13	C	C	C	C	C	A			C	
C12	C	C	C	C	C	A			C	
C11	C	C	C	C	C	A			C	
C10	C	C	C	C	C	A			C	
C9	C	C	C	C	C	A			C	
C8	C	C	C	C	C	A			C	
C7	C	C	C	C	C	A			C	
C6	C	C	C	C	C	A			C	
C5	C	C	C	C	C	A			C	
C4	C	C	C	C	C	A			C	
C3	C	C	C	C	C	A			C	
C2	C	C	C	C	C	A			C	
C1	C	C	C	C	C	A			C	
B24	C	C	C	C	C	A			C	
B20	C	C	C	C	C	A			C	
B18	C	C	C	C	C	A			C	
B14	C	C	C	C	C	A			C	
B10	C	C	C	C	C	A			C	
B9	C	C	C	C	C	A			C	
B8	C	C	C	C	C	A			C	
B6	C	C	C	C	C	A			C	
B5	C	C	C	C	C	A			C	
B4	C	C	C	C	C	A			C	
B3	C	C	C	C	C	A			C	
B2	C	C	C	C	C	A			C	
B1	C	C	C	C	C	A			C	
B26	C	C	C	C	C	A			C	
V2	C	C	C	C	C	A			C	
B15	C	C	C	C	C	A			C	
B13	C	C	C	C	C	A			C	
P1	C	C	C	C	C	A			C	
A6	C	C	C	C	C	A			C	
U1	C	C	C	C	C	A			C	
B25	C	C	C	C	C	A			C	
B22	C	C	C	C	C	A			C	
B21	C	C	C	C	C	A			C	
B19	C	C	C	C	C	A			C	
B17	C	C	C	C	C	A			C	
B12	C	C	C	C	C	A			C	
B11	C	C	C	C	C	A			C	
B16	C	C	C	C	C	A			C	
B7	C	C	C	C	C	A			C	
B23	C	C	C	C	C	A			C	
P2	C	C	C	C	C	A			C	



	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Pb01	ACACTATCATGTTTAGATAAACATATAATGGCCCAAGAACTTCTAATATGGATCAATCCAAATCGGATAATGTTACTGACAATAAGCCTAATAGAAGCC									
133								G		
3171										
6810										
7455		T								
84								G		
769								G		
717								G		
Raj2								G		
189								G		
61								G		
206								G		
694								G		
397								G		
57								G		
218								G		
351								G		
A8								G		
A3								G		
A7								G		
A5								G		
A4								G		
A1								G		
A2								G		
PE1								G		
V6								G		
V5								G		
V4								G		
C20								G		
V3								G		
V1								G		
C21								G		
C19								G		
C18								G		
C17								G		
C16								G		
C15								G		
C14								G		
C13								G		
C12								G		
C11								G		
C10								G		
C9								G		
C8								G		
C7								G		
C6								G		
C5								G		
C4								G		
C3								G		
C2								G		
C1								G		
B24								G		
B20								G		
B18								G		
B14								G		
B10								G		
B9								G		
B8								G		
B6								G		
B5								G		
B4								G		
B3								G		
B2								G		
B1								G		
B26								G		
V2								G		
B15								G		
B13								G		
P1								G		
A6								G		
U1						C		G		
B25						C		G		
B22								G		T
B21								G		T
B19								G		T
B17								G		T
B12								G		T
B11						C		G		T
B16								G		T
B7								G		
B23								G		
P2								G		



	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Pb01	TGGGCAGTCACCAAAACATAACCCCATCAAACCTCACCTTGACACTCTACACCTTCCCACTCGATCGGTGTCGCCAACCCGGCCTTGGACCCCTCGCGG									
133			T	A		G		A		
3171										
6810										
7455										
84										
769										
717										
Raj2										
189										
61										
206										
694										
397										
57										
218										
351										
A8			T	A		G		A		
A3			T	A		G		A		
A7			T	A		G		A		
A5			T	A		G		A		
A4			T	A		G		A		
A1			T	A		G		A		
A2			T	A		G		A		
PE1			T	A		G		A		
V6			T	A		G		A		
V5			T	A		G		A		
V4			T	A		G		A		
C20			T	A		G		A		
V3			T	A		G		A		
V1			T	A		G		A		
C21			T	A		G		A		
C19			T	A		G		A		
C18			T	A		G		A		
C17			T	A		G		A		
C16			T	A		G		A		
C15			T	A		G		A		
C14			T	A		G		A		
C13			T	A		G		A		
C12			T	A		G		A		
C11			T	A		G		A		
C10			T	A		G		A		
C9			T	A		G		A		
C8			T	A		G		A		
C7			T	A		G		A		
C6			T	A		G		A		
C5			T	A		G		A		
C4			T	A		G		A		
C3			T	A		G		A		
C2			T	A		G		A		
C1			T	A		G		A		
B24			T	A		G		A		
B20			T	A		G		A		
B18			T	A		G		A		
B14			T	A		G		A		
B10			T	A		G		A		
B9			T	A		G		A		
B8			T	A		G		A		
B6			T	A		G		A		
B5			T	A		G		A		
B4			T	A		G		A		
B3			T	A		G		A		
B2			T	A		G		A		
B1			T	A		G		A		
B26			T	A		G		A		
V2			T	A		G		A		
B15			T	A		G		A		
B13			T	A		G		A		
P1			T	A		G		A		
A6			T	A		G		A		
U1			T	A		G		A		
B25			T	A		G		A		
B22			T	A		G		A		
B21			T	A		G		A		
B19			T	A		G		A		
B17			T	A		G		A		
B12			T	A		G		A		
B11			T	A		G		A		
B16			T	A		G		A		
B7			T	A		G		A		
B23			T	A		G		A		
P2			T	A		G		A		

	410	420	430	
	..... ..... ..... ..... ..... .....			
Pb01	GGTTCGGAA	TGGTCACGCC	CACATGCC	CCCTTCGTATC
133	.....	.....	.....	.....
3171	.....	.....	.....	.....
6810	.....	.....	.....	.....
7455	.....	.....	.....	.....
84	.....	.....	.....	.....
769	.....	.....	.....	.....
717	.....	.....	.....	.....
Raj2	.....	.....	.....	.....
189	.....	.....	.....	.....
61	.....	.....	.....	.....
206	.....	.....	.....	.....
694	.....	.....	.....	.....
397	.....	.....	.....	.....
57	.....	.....	.....	.....
218	.....	.....	.....	.....
351	.....	.....	.....	.....
A8	.....	.....	.....	.....
A3	.....	.....	.....	.....
A7	.....	.....	.....	.....
A5	.....	.....	.....	.....
A4	.....	.....	.....	.....
A1	.....	.....	.....	.....
A2	.....	.....	.....	.....
PE1	.....	.....	.....	.....
V6	.....	.....	.....	.....
V5	.....	.....	.....	.....
V4	.....	.....	.....	.....
C20	.....	.....	.....	.....
V3	.....	.....	.....	.....
V1	.....	.....	.....	.....
C21	.....	.....	.....	.....
C19	.....	.....	.....	.....
C18	.....	.....	.....	.....
C17	.....	.....	.....	.....
C16	.....	.....	.....	.....
C15	.....	.....	.....	.....
C14	.....	.....	.....	.....
C13	.....	.....	.....	.....
C12	.....	.....	.....	.....
C11	.....	.....	.....	.....
C10	.....	.....	.....	.....
C9	.....	.....	.....	.....
C8	.....	.....	.....	.....
C7	.....	.....	.....	.....
C6	.....	.....	.....	.....
C5	.....	.....	.....	.....
C4	.....	.....	.....	.....
C3	.....	.....	.....	.....
C2	.....	.....	.....	.....
C1	.....	.....	.....	.....
B24	.....	.....	.....	.....
B20	.....	.....	.....	.....
B18	.....	.....	.....	.....
B14	.....	.....	.....	.....
B10	.....	.....	.....	.....
B9	.....	.....	.....	.....
B8	.....	.....	.....	.....
B6	.....	.....	.....	.....
B5	.....	.....	.....	.....
B4	.....	.....	.....	.....
B3	.....	.....	.....	.....
B2	.....	.....	.....	.....
B1	.....	.....	.....	.....
B26	.....	.....	.....	.....
V2	.....	.....	.....	.....
B15	.....	.....	.....	.....
B13	.....	.....	.....	.....
P1	.....	.....	.....	.....
A6	.....	.....	.....	.....
U1	.....	.....	.....	.....
B25	.....	.....	.....	.....
B22	.....	.....	.....	.....
B21	.....	.....	.....	.....
B19	.....	.....	.....	.....
B17	.....	.....	.....	.....
B12	.....	.....	.....	.....
B11	.....	.....	.....	.....
B16	.....	.....	.....	.....
B7	.....	.....	.....	.....
B23	.....	.....	.....	.....
P2	.....	.....	.....	.....

# CHS E2-4

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
01	AGGAAGATTCTCCATCGAGTTCTGTATCAATTTCTCCTTGGCTTTTACGTTCTTTCTTTGGTGAGTAGCTAACACCTCCAGCAAAATACTT									
7455	.....									
3171	.....									
6810	.....									
717	.....									
769	.....C.....C									
218	.....									
351	.....									
84	.....									
Raj2	.....									
133	.....C.....A.....C									
189	.....									
694	.....									
57	.....									
61	.....									
397	.....									
206	.....									
B16	.....C.....A.....C									
A3	.....C.....A.....C									
P2	.....C.....A.....C									
P1	.....C.....A.....C									
A8	.....C.....A.....C									
A7	.....C.....A.....C									
A6	.....C.....A.....C									
A5	.....C.....A.....C									
A4	.....C.....A.....C									
A2	.....C.....A.....C									
A1	.....C.....A.....C									
PE1	.....C.....A.....C									
U1	.....C.....A.....C									
V6	.....C.....A.....C									
V5	.....C.....A.....C									
C20	.....C.....A.....C									
V4	.....C.....A.....C									
V3	.....C.....A.....C									
V1	.....C.....A.....C									
C21	.....C.....A.....C									
C19	.....C.....A.....C									
C18	.....C.....A.....C									
C17	.....C.....A.....C									
C16	.....C.....A.....C									
C15	.....C.....A.....C									
C14	.....C.....A.....C									
C13	.....C.....A.....C									
C12	.....C.....A.....C									
C11	.....C.....A.....C									
C10	.....C.....A.....C									
C9	.....C.....A.....C									
C8	.....C.....A.....C									
C7	.....C.....A.....C									
C6	.....C.....A.....C									
C5	.....C.....A.....C									
C4	.....C.....A.....C									
C3	.....C.....A.....C									
C2	.....C.....A.....C									
C1	.....C.....A.....C									
B25	.....C.....A.....C									
B24	.....C.....A.....C									
B22	.....C.....A.....C									
B21	.....C.....A.....C									
B20	.....C.....A.....C									
B19	.....C.....A.....C									
B18	.....C.....A.....C									
B17	.....C.....A.....C									
B14	.....C.....A.....C									
B12	.....C.....A.....C									
B11	.....C.....A.....C									
B10	.....C.....A.....C									
B9	.....C.....A.....C									
B8	.....C.....A.....C									
B6	.....C.....A.....C									
B5	.....C.....A.....C									
B4	.....C.....A.....C									
B3	.....C.....A.....C									
B2	.....C.....A.....C									
B1	.....C.....A.....C									
B15	.....C.....A.....C									
B26	.....C.....A.....C									
V2	.....C.....A.....C									
B13	.....C.....A.....C									
B23	.....C.....A.....C									
B7	.....C.....A.....C									

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
01	CAAGATCCTAGCGTTGATATTTTCAGTAAATTAAACAATAATTCCTCTCATCTAGGCCGAATTCCTATCTTACTTTTATTTCATGCTGGTGCCCTGTCAG									
7455										
3171										
6810										
717							T			
769	C		G					C		
218										
351										
84										
Raj2										
133	C		G		G			C		
189										
694										
57										
61										
397										
206										
B16	C		G		G			C		
A3	C		G		G			C		
P2	C		G		G			C		
P1	C		G		G			C		
A8	C		G		G			C		
A7	C		G		G			C		
A6	C		G		G			C		
A5	C		G		G			C		
A4	C		G		G			C		
A2	C		G		G			C		
A1	C		G		G			C		
PE1	C		G		G			C		
U1	C		G		G			C		
V6	C		G		G			C		
V5	C		G		G			C		
C20	C	T			G			C		
V4	C		G		G			C		
V3	C		G		G			C		
V1	C		G		G			C		
C21	C	T			G			C		
C19	C	T			G			C		
C18	C	T			G			C		
C17	C	T			G			C		
C16	C	T			G			C		
C15	C	T			G			C		
C14	C	T			G			C		
C13	C	T			G			C		
C12	C	T			G			C		
C11	C	T			G			C		
C10	C	T			G			C		
C9	C	T			G			C		
C8	C	T			G			C		
C7	C	T			G			C		
C6	C	T			G			C		
C5	C	T			G			C		
C4	C	T			G			C		
C3	C	T			G			C		
C2	C	T			G			C		
C1	C	T			G			C		
B25	C		G		G			C		
B24	C		G		G			C		
B22	C		G		G			C		
B21	C		G		G			C		
B20	C		G		G			C		
B19	C		G		G			C		
B18	C		G		G			C		
B17	C		G		G			C		
B14	C		G		G			C		
B12	C		G		G			C		
B11	C		G		G			C		
B10	C		G		G			C		
B9	C		G		G			C		
B8	C		G	N	G			C		
B6	C		G		G			C		
B5	C		G		G			C		
B4	C		G		G			C		
B3	C		G		G			C		
B2	C		G		G			C		
B1	C		G		G			C		
B15	C		G		G			C		
B26	C		G		G			C		
V2	C		G		G			C		
B13	C		G		G			C		
B23	C		G		G			C		
B7	C		G		G			C		

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
01	ACCCCACGGTGGACCCCTTTGGACATAAATATTGGAAAATACATATTCACAATACTAAGATATACCTGTGTGCTTCTCATTGCCCTTCAATTCGTCCTTGTC									
7455										
3171										
6810										
717										
769				T	G			C	A	
218										
351										
84										
Raj2										
133				T	G			C	T	A
189										
694										
57										
61										
397										
206										
B16		T		T	G			C	T	A
A3		T		T	G			C	T	A
P2				T	G			C	T	A
P1				T	G			C	T	A
A8		T		T	G			C	T	A
A7		T		T	G			C	T	A
A6				T	G			C	T	A
A5		T		T	G			C	T	A
A4				T	G			C	T	A
A2		T		T	G			C	T	A
A1				T	G			C	T	A
PE1				T	G			C	T	A
U1				T	G			C	T	A
V6				T	G			C	T	A
V5				T	G			C	T	A
C20				T	G			C	T	A
V4				T	G			C	T	A
V3				T	G			C	T	A
V1				T	G			C	T	A
C21				T	G			C	T	A
C19				T	G			C	T	A
C18				T	G			C	T	A
C17				T	G			C	T	A
C16				T	G			C	T	A
C15				T	G			C	T	A
C14				T	G			C	T	A
C13				T	G			C	T	A
C12				T	G			C	T	A
C11				T	G			C	T	A
C10				T	G			C	T	A
C9				T	G			C	T	A
C8				T	G			C	T	A
C7				T	G			C	T	A
C6				T	G			C	T	A
C5				T	G			C	T	A
C4				T	G			C	T	A
C3				T	G			C	T	A
C2				T	G			C	T	A
C1				T	G			C	T	A
B25				T	G			C	T	A
B24		T		T	G			C	T	A
B22		T		T	G			C	T	A
B21				T	G			C	T	A
B20		T		T	G			C	T	A
B19		T		T	G			C	T	A
B18				T	G			C	T	A
B17		T		T	G			C	T	A
B14		T		T	G			C	T	A
B12		T		T	G			C	T	A
B11				T	G			C	T	A
B10		T		T	G			C	T	A
B9				T	G			C	T	A
B8		T		T	G		C	T	A	
B6		T		T	G			C	T	A
B5		T		T	G			C	T	A
B4		T		T	G			C	T	A
B3		T		T	G			C	T	A
B2		T		T	G			C	T	A
B1		T		T	G			C	T	A
B15				T	G			C	T	A
B26				T	G			C	T	A
V2				T	G			C	T	A
B13				T	G			C	T	A
B23				T	G			C	T	A
B7		T		T	G		C	T	A	

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
01	AATGGGAAATCGTCCCCAGGGGTATGTAATCTAGATCCTTTCAAACCCTTTACCACCACTCCTGTTGACTAACACTTCACT-CTAGTGCCAAAAAATG									
7455										
3171										
6810										
717										
769						A.A.A.T	G	T	A.T	T
218										
351										
84										
Raj2										
133		T		C	G			C	A	T
189										
694										
57										
61										
397										
206										
B16		T		C	G			C	A	T
A3		T		C	G			C	A	T
P2		T		C	G	G		C	A	T
P1		T		C	G	G		C	A	T
A8		T		C	G			C	A	T
A7		T		C	G			C	A	T
A6		T		C	G	G		C	A	T
A5		T		C	G			C	A	T
A4		T		C	G			C	A	T
A2		T		C	G			C	A	T
A1		T		C	G	G		C	A	T
PE1		T		C	G	G		C	A	T
U1		T		C	G			C	A	T
V6		T		C	G			C	A	T
V5		T		C	G			C	A	T
C20		T		C	G			C	A	T
V4		T		C	G			C	A	T
V3		T		C	G			C	A	T
V1		T		C	G			C	A	T
C21		T		C	G			C	A	T
C19		T		C	G			C	A	T
C18		T		C	G			C	A	T
C17		T		C	G			C	A	T
C16		T		C	G			C	A	T
C15		T		C	G			C	A	T
C14		T		C	G			C	A	T
C13		T		C	G			C	A	T
C12		T		C	G			C	A	T
C11		T		C	G			C	A	T
C10		T		C	G			C	A	T
C9		T		C	G			C	A	T
C8		T		C	G			C	A	T
C7		T		C	G			C	A	T
C6		T		C	G			C	A	T
C5		T		C	G			C	A	T
C4		T		C	G			C	A	T
C3		T		C	G			C	A	T
C2		T		C	G			C	A	T
C1		T		C	G			C	A	T
B25		T		C	G			C	A	T
B24		T		C	G			C	A	T
B22		T		C	G			C	A	T
B21		T		C	G	G		C	A	T
B20		T		C	G			C	A	T
B19		T		C	G			C	A	T
B18		T		C	G			C	A	T
B17		T		C	G			C	A	T
B14		T		C	G			C	A	T
B12		T		C	G			C	A	T
B11		T		C	G			C	A	T
B10		T		C	G			C	A	T
B9		T		C	G			C	A	T
B8		T		C	G			C	A	T
B6		T		C	G			C	A	T T G
B5		T		C	G			C	A	T T G
B4		T		C	G			C	A	T T G
B3		T		C	G			C	A	T
B2		T		C	G			C	A	T
B1		T		C	G			C	A	T
B15		T		C	G			C	A	T
B26		T		C	G			C	A	T
V2		T		C	G			C	A	T
B13		T		C	G			C	A	T
B23		T		C	G			C	A	T
B7		T		C	G			C	A	T T G





```

01      ....|...
      TTAAGAT
7455   .....
3171   .....
6810   .....
717    .....
769    .....
218    .....
351    .....
84     .....
Raj2   .....
133    .....
189    .....
694    .....
57     .....
61     .....
397    .....
206    .....
B16    .....
A3     .....
P2     .....
P1     .....
A8     .....
A7     .....
A6     .....
A5     .....
A4     .....
A2     .....
A1     .....
PE1    .....
U1     .....
V6     .....
V5     .....
C20    .....
V4     .....
V3     .....
V1     .....
C21    .....
C19    .....
C18    .....
C17    .....
C16    .....
C15    .....
C14    .....
C13    .....
C12    .....
C11    .....
C10    .....
C9     .....
C8     .....
C7     .....
C6     .....
C5     .....
C4     .....
C3     .....
C2     .....
C1     .....
B25    .....
B24    .....
B22    .....
B21    .....
B20    .....
B19    .....
B18    .....
B17    .....
B14    .....
B12    .....
B11    .....
B10    .....
B9     .....
B8     .....
B6     .....
B5     .....
B4     .....
B3     .....
B2     .....
B1     .....
B15    .....
B26    .....
V2     .....
B13    .....
B23    .....
B7     .....

```





	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
01	CCAAATATATGCGAAC	TCGTTGCATAACAAT	CTGTCATTGGGGG	TGCAAGATATATCGGC	ACTGGACGTGGGTTT	GTACTGCTCGTATTC	CAATTGGT			
7455		T			G					
3171		T			G					
6810		T			G					
717		T			G					
769		T			G					
84		T			G					
133		T			G					
Raj2		T			G					
397		T			G					
189		T			G					
206		T			G					
61		T			G					
694		T			G					
57		T			G					
218		T			G					
351		T			G					
P2										
P1										
A8										
A7										
A6										
A5										
A4										
A2										
A1										
PE1										
U1										
V6		T								
V5		T								
V4		T								
C20										
V3		T								
V1		T								
C21										
C19										
C18										
C17										
C16										
C15										
C14										
C13										
C12										
C11										
C10										
C9										
C8										
C7										
C6										
C5										
C4										
C3										
C2										
C1										
B25										
B24										
B22										
B21										
B20										
B19										
B18		C								
B17										
B16										
B14										
B12										
B11										
B10										
B9										
B8										
B6										
B5										
B4										
B3										
B2										
B1										
V2										
B23										
B26										
B15										
B13										
B7										
A3										

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
01	GTTCTTTACTCCCGCTTCGCTGGTCCATCGATTTACTTTGGTTCCTCCGATTGCTGATGATGCTGCTCTTCGGAACTCTAACTGCTGGACTGGATGGTTGC									
7455	.....C.....T.....C.....									
3171	.....C.....T.....C.....									
6810	.....C.....T.....C.....									
717	.....C.....T.....C.....									
769	.....C.....T.....C.....									
84	.....C.....T.....C.....									
133	.....C.....T.....C.....									
Raj2	.....C.....T.....C.....									
397	.....C.....T.....C.....									
189	.....C.....T.....C.....									
206	.....C.....T.....C.....									
61	.....C.....T.....C.....									
694	.....C.....T.....C.....									
57	.....C.....T.....C.....									
218	.....C.....T.....C.....									
351	.....C.....T.....C.....									
P2	.....									
P1	.....									
A8	.....									
A7	.....									
A6	.....									
A5	.....									
A4	.....									
A2	.....									
A1	.....									
PE1	.....									
U1	.....									
V6	.....									
V5	.....									
V4	.....									
C20	.....									
V3	.....									
V1	.....									
C21	.....									
C19	.....									
C18	.....									
C17	.....									
C16	.....T.....									
C15	.....T.....									
C14	.....									
C13	.....									
C12	.....									
C11	.....									
C10	.....									
C9	.....									
C8	.....									
C7	.....									
C6	.....									
C5	.....T.....									
C4	.....									
C3	.....									
C2	.....									
C1	.....									
B25	.....									
B24	.....									
B22	.....									
B21	.....									
B20	.....									
B19	.....									
B18	.....									
B17	.....									
B16	.....									
B14	.....									
B12	.....									
B11	.....									
B10	.....									
B9	.....									
B8	.....									
B6	.....									
B5	.....									
B4	.....									
B3	.....									
B2	.....									
B1	.....									
V2	.....									
B23	.....									
B26	.....									
B15	.....									
B13	.....									
B7	.....									
A3	.....									

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
01	TTTACTTCTGGGCTTCTCTGCTTCTGCTTTTGCATCTCGCCATTCTTGTTC AACCCATCAGTTTGCCTGGAAATGATTTCTTCATCGACTACCGCGACTA									
7455	.....C.....G.....									
3171	.....C.....G.....									
6810	.....C.....G.....									
717	.....C.....G.....									
769	.....C.....G.....									
84	.....C.....G.....									
133	.....C.....G.....									
Raj2	.....C.....G.....									
397	.....C.....G.....									
189	.....C.....G.....									
206	.....C.....G.....									
61	.....C.....G.....									
694	.....C.....G.....									
57	.....C.....G.....									
218	.....C.....G.....									
351	.....C.....G.....									
P2	.....									
P1	.....									
A8	.....									
A7	.....									
A6	.....									
A5	.....									
A4	.....									
A2	.....									
A1	.....A.....									
PE1	.....									
U1	.....									
V6	.....									
V5	.....									
V4	.....									
C20	.....									
V3	.....									
V1	.....									
C21	.....									
C19	.....									
C18	.....									
C17	.....									
C16	.....									
C15	.....									
C14	.....									
C13	.....									
C12	.....									
C11	.....									
C10	.....									
C9	.....									
C8	.....									
C7	.....									
C6	.....									
C5	.....									
C4	.....									
C3	.....									
C2	.....									
C1	.....									
B25	.....									
B24	.....									
B22	.....									
B21	.....									
B20	.....									
B19	.....									
B18	.....									
B17	.....									
B16	.....									
B14	.....									
B12	.....									
B11	.....									
B10	.....									
B9	.....									
B8	.....									
B6	.....									
B5	.....									
B4	.....									
B3	.....									
B2	.....									
B1	.....									
V2	.....									
B23	.....									
B26	.....									
B15	.....									
B13	.....									
B7	.....									
A3	.....									

	510	520	530	540	550	560
01	CCTCCGCTGGCTTTCTCGGGGCAACTCCCGATCCCACGCGTCTTCCTGGATTGCC	TTTGGGACT				
7455	.....					
3171	.....					
6810	.....					
717	.....					
769	.....					
84	.....					
133	.....					
Raj2	.....					
397	.....					
189	.....					
206	.....					
61	.....					
694	.....					
57	.....					
218	.....					
351	.....					
P2	.....					
P1	.....					
A8	.....					
A7	.....					
A6	.....					
A5	.....					
A4	.....					
A2	.....					
A1	.....					
PE1	.....					
U1	.....					
V6	.....					
V5	.....					
V4	.....					
C20	.....					
V3	.....					
V1	.....					
C21	.....					
C19	.....					
C18	.....					
C17	.....					
C16	.....					
C15	.....					
C14	.....					
C13	.....					
C12	.....					
C11	.....					
C10	.....					
C9	.....					
C8	.....					
C7	.....					
C6	.....					
C5	.....					
C4	.....					
C3	.....					
C2	.....					
C1	.....					
B25	.....					
B24	.....					
B22	.....					
B21	.....					
B20	.....					
B19	.....					
B18	.....					
B17	.....					
B16	.....					
B14	.....					
B12	.....					
B11	.....					
B10	.....					
B9	.....					
B8	.....					
B6	.....					
B5	.....					
B4	.....					
B3	.....					
B2	.....					
B1	.....					
V2	.....					
B23	.....					
B26	.....					
B15	.....					
B13	.....					
B7	.....					
A3	.....					



# FKS-E3

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
01	CTCAGCCCGGTCGAGAGTTTCTGTGCAAGATTACGGAATTGGGCATGTTTCTGCGGATTCATTTGGGACATGTGCTTTGTTTTTCATGTTGCCGCC										
7455	C										
3171	C										
6810	C										
133	C										
84	C										
769	C										
717	C										
Raj2	C										
189	C										
61	C										
206	C										
694	C										
397	C										
57	C										
351	C										
218	C										
A3											
P1											
A8											
A7											
A6											
A5											
A4											
A2	A										
A1											
PE1											
U1											
V6											
V5	A										
V4											
C20											
V3											
V2	A										
V1											
C21											
C19											
C18											
C17											
C16											
C15											
C14											
C13											
C12											
C11											
C10											
C9											
C8											
C7											
C6											
C5											
C4											
C3											
C2											
C1											
B26	A										
B25											
B24											
B23											
B22											
B21											
B20											
B19											
B18	A										
B17											
B16											
B15	A										
B14											
B13	A										
B12											
B11											
B10											
B9											
B8											
B7	A										
B6											
B5											
B4											
B3											
B2											
B1											
P2											

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
01	GCTCTGTATCCCGTATGTTGGATAAGGGACATTCCGTTATGCTGTTTTGGTTGAGGCC	TAGGATGTTCTCCTCCCACTCCCC	TCTTCTTCTCCCGCTTG							
7455							C		T	G
3171							C		T	G
6810							C		T	G
133							C		T	G
84							C		T	G
769							C		T	G
717							C		T	G
Raj2							C		T	G
189							C		T	G
61							C		T	G
206							C		T	G
694							C		T	G
397							C		T	G
57							C		T	G
351							C		T	G
218							C		T	G
A3									T	
P1										
A8									T	
A7									T	
A6										
A5									T	
A4									T	
A2		A							T	
A1										
PE1									T	
U1									T	
V6										
V5		A							T	
V4										
C20										
V3										
V2		A							T	
V1										
C21										
C19										
C18										
C17										
C16										
C15										
C14										
C13										
C12										
C11										
C10										
C9										
C8										
C7										
C6										
C5										
C4										
C3										
C2										
C1										
B26		A							T	
B25									T	
B24									T	
B23									T	
B22									T	
B21										
B20									T	
B19									T	
B18									T	
B17									T	
B16									T	
B15		A						G	T	
B14									T	
B13		A						G	T	
B12									T	
B11									T	
B10									T	
B9									T	
B8									T	
B7		A							T	
B6									T	
B5									T	
B4									T	
B3									T	
B2									T	
B1									T	
P2										

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
01	GAACCAAA	CCTTTAACTG	ATCATA	TTAAACAAC	AACAGCCG	TCAAATCCG	CCCACCAAT	CTACTCCAT	GAAACAAT	CCAAAT	TGAGGAAGAGAGAGTCA
7455	G	.A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3171	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
6810	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
133	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
84	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
769	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
717	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
Raj2	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
189	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
61	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
206	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
694	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
397	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
57	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
351	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
218	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
A3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
P1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PE1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
U1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
V1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
P2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.



	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
01	CCCGATGAACTGCTCCAGCCCAC	TGGATTGAATAATAATGATACTACTTCTGAGTTGACGGGGTTGGCATTACGGGGTGTCCACTGATGCAACGGAAGACC									
7455					TT		A	G	T	G	
3171					TT		A	G	T	G	
6810					TT		A	G	T	G	
133					TT		A	G	T	G	
84					TT		A	G	T	G	
769					TT		A	G	T	G	
717					TT		A	G	T	G	
Raj2					TT		A	G	T	G	
189					TT		A	G	T	G	
61					TT		A	G	T	G	
206					TT		A	G	T	G	
694					TT		A	G	T	G	
397					TT		A	G	T	G	
57					TT		A	G	T	G	
351					TT		A	G	T	G	
218					TT		A	G	T	G	
A3											
P1											
A8											
A7											
A6											
A5											
A4											
A2											
A1											
PE1											
U1											
V6											
V5											
V4											
C20											
V3											
V2											
V1											
C21											
C19											
C18											
C17											
C16											
C15											
C14											
C13											
C12											
C11											
C10											
C9											
C8											
C7											
C6											
C5											
C4											
C3											
C2											
C1											
B26											
B25											
B24											
B23											
B22											
B21											
B20											
B19											
B18								T			
B17											
B16											
B15											
B14											
B13											
B12											
B11											
B10											
B9											
B8											
B7											
B6											
B5											
B4											
B3											
B2											
B1											
P2											

	510	520	530
01	GGTAA	TCCGAGG	TGTGAGGTTGTTTAC
7455	.G.A.	.G.A.	.G.A.
3171	.G.A.	.G.A.	.G.A.
6810	.G.A.	.G.A.	.G.A.
133	.G.A.	.G.A.	.G.A.
84	.G.A.	.G.A.	.G.A.
769	.G.A.	.G.A.	.G.A.
717	.G.A.	.G.A.	.G.A.
Raj2	.G.A.	.G.A.	.G.A.
189	.G.A.	.G.A.	.G.A.
61	.G.A.	.G.A.	.G.A.
206	.G.A.	.G.A.	.G.A.
694	.G.A.	.G.A.	.G.A.
397	.G.A.	.G.A.	.G.A.
57	.G.A.	.G.A.	.G.A.
351	.G.A.	.G.A.	.G.A.
218	.G.A.	.G.A.	.G.A.
A3	.	.	.
P1	.	.	.
A8	.	.	.
A7	.	.	.
A6	.	.	.
A5	.	.	.
A4	.	.	.
A2	.	.C.	.
A1	.	.A.	.
PE1	.	.	.
U1	.	.	.
V6	.	.	.
V5	.	.C.	.
V4	.	.	.
C20	.	.	.
V3	.	.	.
V2	.	.C.	.
V1	.	.	.
C21	.	.	.
C19	.	.	.
C18	.	.	.
C17	.	.	.
C16	.	.	.
C15	.	.	.
C14	.	.	.
C13	.	.	.
C12	.	.	.
C11	.	.	.
C10	.	.	.
C9	.	.	.
C8	.	.	.
C7	.	.	.
C6	.	.	.
C5	.	.	.
C4	.	.	.
C3	.	.	.
C2	.	.	.
C1	.	.	.
B26	.	.C.	.
B25	.	.	.
B24	.	.	.
B23	.	.	.
B22	.	.	.
B21	.	.	.
B20	.	.	.
B19	.	.	.
B18	.	.	.
B17	.	.	.
B16	.	.	.
B15	.	.	.
B14	.	.	.
B13	.	.	.
B12	.	.	.
B11	.	.	.
B10	.	.	.
B9	.	.	.
B8	.	.	.
B7	.	.C.	.
B6	.	.	.
B5	.	.	.
B4	.	.	.
B3	.	.	.
B2	.	.	.
B1	.	.	.
P2	.	.	.



	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200				
01	TTTTCC	TATTT	GCGGATTTT	GGCCTTTT	CGAGGCT	GC	TTTTGGCT	GAGAGCT	TATCACCC	CGGACCCCA	TCTTAGAGCT	CAC	TGGGCCACT	CCATGTT
7455														
6810														
3171														
Raj2														
397														
189														
218														
61														
717														
84														
351														
694														
57														
206														
769														
133	A	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
P2	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
P1	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
A8	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
A7	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
A3	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
A6	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
A5	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
A4	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
A2	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
A1	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
PE1	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
U1	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
V6	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
V5	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
V4	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C20	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
V3	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
V2	A	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
V1	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C21	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C19	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C18	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C17	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C16	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C15	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C14	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C13	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C12	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C11	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C10	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C9	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C8	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C7	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C6	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C5	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C4	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C3	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C2	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
C1	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B26	A	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B25	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B24	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B23	A	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B22	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B21	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B20	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B19	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B18	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B17	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B16	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B15	A	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B14	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B13	A	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B12	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B11	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B10	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B9	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B8	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B7	A	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B6	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B5	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B4	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B3	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B2	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T
B1	C	T	T	T	T	A	T	A	T	T	T	A	A	T



	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
01	TCCATTGTTGCAGGATGTATCAACAATTATGGACCTGCACAGATGGATCTACGGTGAATAAATATCTACTGTCCTCCCTATTTCCCTCCTCCTTGTTT									
7455										
6810										
3171										
Raj2										
397										
189										
218										
61										
717										
84										
351										
694										
57										
206										
769										
133		AT			G	T	T			C
P2		T	C		G	T	T			C
P1		T	C		G	T	T			C
A8		T	C		G	T	T			T
A7		T	C		G	T	T			T
A3		T	C		G	T	T			C
A6		T	C		G	T	T			C
A5		T	C		G	T	T			T
A4		T	C		G	T	T			T
A2		T	C		G	T	T			T
A1		T	C		G	T	T			C
PE1		T	C		G	T	T			C
U1		T	C		G	T	T			T
V6		T	C		G	T	T			C
V5		T	C		G	T	T			T
V4		T	C		G	T	T			C
C20		T	C		G	T	T			C
V3		T	C		G	T	T			C
V2		AT			G	T	T			C
V1		T	C		G	T	T			C
C21		T	C		G	T	T			C
C19		T	C		G	T	T			C
C18		T	C		G	T	T			C
C17		T	C		G	T	T			C
C16		T	C		G	T	T			C
C15		T	C		G	T	T			C
C14		T	C		G	T	T			C
C13		T	C		G	T	T			C
C12		T	C		G	T	T			C
C11		T	C		G	T	T			C
C10		T	C		G	T	T			C
C9		T	C		G	T	T			C
C8		T	C		G	T	T			C
C7		T	C		G	T	T			C
C6		T	C		G	T	T			C
C5		T	C		G	T	T			C
C4		T	C		G	T	T			C
C3		T	C		G	T	T			C
C2		T	C		G	T	T			C
C1		T	C	C	G	T	T			C
B26		AT			G	T	T			C
B25		T	C		G	T	T			C
B24		T	C		G	T	T			C
B23		AT			G	T	T			C
B22		T	C		G	T	T			T
B21		T	C		G	T	T			C
B20		T	C		G	T	T			T
B19		T	C		G	T	T			T
B18		T	C		G	T	T			C
B17		T	C		G	T	T			T
B16		T	C		G	T	T			T
B15		AT			G	T	T			C
B14		T	C		G	T	T			T
B13		AT			G	T	T			C
B12		T	C		G	T	T			T
B11		T	C		G	T	T			T
B10		T	C		G	T	T			T
B9		T	C		G	T	T			T
B8		T	C		G	T	T			T
B7		AT			G	T	T			C
B6		T	C		G	T	T			T
B5		T	C		G	T	T			T
B4		T	C		G	T	T			T
B3		T	C		G	T	T			T
B2		T	C		G	T	T			T
B1		T	C		G	T	T			T

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
01	TTACGGATTTTCAAGGTTTTGGTGGT			CATAGGCGTCATGAATCTTAGCTCTC	CAACCTGGCTCTTGCCAGCTGTGTTCTCGCATGGGTTTC					
7455										
6810										
3171										
Raj2										G
397										G
189										G
218										G
61										G
717										G
84										G
351										G
694										G
57										G
206										G
769										
133	A	C		A	T	T				A
P2	A	C		A	T	T				A
P1	A	C		A	T	T				A
A8	A	C		A	T	T				A
A7	A	C		A	T	T				A
A3	A	C		A	T	T				A
A6	A	C		A	T	T				A
A5	A	C		A	T	T				A
A4	A	C		A	T	T				A
A2	A	C		A	T	T				A
A1	A	C	TTGGTGGT	A	T	T				A
PE1	A	C		A	T	T				A
U1	A	C		A	T	T				A
V6	A	C		A	T	T	T			A
V5	A	C		A	T	T				A
V4	A	C		A	T	T	T			A
C20	A	C		A	T	T	T			A
V3	A	C		A	T	T	T			A
V2	A	C		A	T	T				A
V1	A	C		A	T	T	T			A
C21	A	C		A	T	T	T			A
C19	A	C		A	T	T	T			A
C18	A	C		A	T	T	T			A
C17	A	C		A	T	T	T			A
C16	A	C		A	T	T	T			A
C15	A	C		A	T	T	T			A
C14	A	C		A	T	T	T			A
C13	A	C		A	T	T	T			A
C12	A	C		A	T	T	T			A
C11	A	C		A	T	T	T			A
C10	A	C		A	T	T	T			A
C9	A	C		A	T	T	T			A
C8	A	C		A	T	T	T			A
C7	A	C		A	T	T	T			A
C6	A	C		A	T	T	T			A
C5	A	C		A	T	T	T			A
C4	A	C		A	T	T	T			A
C3	A	C		A	T	T	T			A
C2	A	C		A	T	T	T			A
C1	A	C		A	T	T	T			A
B26	A	C		A	T	T				A
B25	A	C		A	T	T	T			A
B24	A	C		A	T	T				A
B23	A	C		A	T	T				A
B22	A	C		A	T	T				A
B21	A	C		A	T	T				A
B20	A	C		A	T	T				A
B19	A	C		A	T	T				A
B18	A	C		A	T	T	T			A
B17	A	C		A	T	T				A
B16	A	C		A	T	T				A
B15	A	C		A	T	T				A
B14	A	C		A	T	T				A
B13	A	C		A	T	T				A
B12	A	C		A	T	T				A
B11	A	C		A	T	T				A
B10	A	C		A	T	T				A
B9	A	C	G	A	T	T				A
B8	A	C		A	T	T				A
B7	A	C		A	T	T				A
B6	A	C		A	T	T				A
B5	A	C		A	T	T				A
B4	A	C		A	T	T				A
B3	A	C		A	T	T				A
B2	A	C		A	T	T				A
B1	A	C		A	T	T				A

	410	420	430	440	450
01	CCTGGCA	TCCGCATCATCTCACGTCACATCTCACATTGTACCTCGTCAAGCAG			
7455					
6810					
3171					
Raj2					
397					
189					
218					
61					
717					
84					
351					
694					
57					
206					
769					
133			G		
P2			G		
P1			G		
A8			G		
A7			G		
A3			G		
A6			G		
A5			G		
A4			G		
A2			G		
A1			G		
PE1			G		
U1			G		
V6			G		
V5			G		
V4			G		
C20			G		
V3			G		
V2			G		
V1			G		
C21			G		
C19			G		
C18			G		
C17			G		
C16			G		
C15			G		
C14			G		
C13			G		
C12			G		
C11			G		
C10			G		
C9			G		
C8			G		G
C7			G		
C6			G		
C5			G		
C4			G		
C3			G		
C2			G		
C1			G		
B26			G		
B25			G		
B24			G		
B23		C	G		
B22			G		
B21			G		
B20			G		
B19			G		
B18			G		
B17			G		
B16			G		
B15			G		
B14			G		
B13			G		
B12			G		
B11			G		
B10			G		
B9			G		
B8			G		
B7		C	G		
B6			G		
B5			G		
B4			G		
B3			G		
B2			G		
B1			G		

# GP43-E2

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100								
01	AGGATGGATATGCCATCGTT	CGTGGGGTAGACAGCACCGT	CGGCGTCGCAATCTCGGAT	TGGTTTCAGCCCCCGCGCT	CCCTGGAACGGGCTT	CATGGCGCC												
7455																		
3171																		
6810																		
84																		
717																		
206																		
769		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
189																		
57																		
218																		
61																		
397																		
Raj2																		
351																		
133		A		ATA		T		T		C	C	T		AT		T		TT
A3		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
P2		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
P1		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
A8		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
A7		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
A6		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
A5		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
A1		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
A4		T		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		TT
PE10		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
U1		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
A2		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
V6		CA		ATA		T	T	T		C	C	T	T	A		T		TT
V5		CA		ATA		T	T	T		C	C	T	T	A		T		TT
V4		CA		ATA		T	T	T		C	C	T	T	A		T		TT
V3		CA		ATA		T	T	T		C	C	T	T	A		T		TT
V2		A		ATA		T	T	T		C	C	T		AT		T		TT
V1		CA		ATA		T	T	T		C	C	T	T	A		T		TT
C21		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C20		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C19		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C18		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C17		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C16		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C15		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C14		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C13		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C12		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C11		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C10		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C9		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C8		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C7		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C6		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C5		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C4		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C3		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C2		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
C1		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B26		A		ATA		T	T	T		C	C	T		AT		T		TT
B25		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B24		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B23		A		ATA		T	T	T		C	C	T		AT		T		TT
B22		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B21		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B19		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B20		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B18		CA		C		ATA		T	T	T		C	C	T		A		TT
B17		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B16		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B15		A		ATA		T	T	T		C	C	T		AT		T		TT
B14		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B13		A		ATA		T	T	T		C	C	T		AT		T		TT
B12		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B11		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B10		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B9		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B8		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B7		A		ATA		T	T	T		C	C	T		AT		T		TT
B6		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B5		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B4		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B3		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B2		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT
B1		CA		ATA		T	T	T		C	C	T		A		T		TT



	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
01	TCCGTCGCTAAGGACAGACTTACGGGAGTCGATAAGCCGTTGATTGTGGGCGAGTGGAGCGGTGCCATGACTGACTGCGCCAAGTATCTAAATGGGCGTT									
7455	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
3171	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
6810	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
84	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
717	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
206	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
769	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
189	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T . . . . .	G
57	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
218	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
61	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
397	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
Raj2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
351	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G
133	.....	T . C T . . . . .	A . C T . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	T . . . . .	G
A3	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
P2	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
P1	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
A8	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
A7	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
A6	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
A5	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
A1	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
A4	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
PE10	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
U1	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
A2	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
V6	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
V5	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
V4	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
V3	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
V2	.....	T . C T . . . . .	A . C T . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
V1	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C21	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C20	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C19	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C18	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C17	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C16	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C15	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C14	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C13	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C12	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C11	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C10	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C9	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C8	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C7	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C6	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C5	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C4	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C3	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C2	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
C1	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B26	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B25	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B24	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B23	.....	T . C T . . . . .	A . C T . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B22	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B21	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B19	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B20	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B18	.....	T . C T . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B17	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B16	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B15	.....	T . C T . . . . .	A . C T . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B14	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B13	.....	T . C T . . . . .	A . C T . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B12	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B11	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B10	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B9	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B8	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	T . . . . .	G
B7	.....	T . C T . . . . .	A . C T . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B6	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B5	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B4	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B3	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B2	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G
B1	.....	T . C T G . . . . .	A . C . . . . .	.....	AAA . . . . .	.....	.....	T . . . . .	.....	G

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400					
01	GCAGGGG	TGCGCGATT	TGATAATT	CGTACCC	TAGCGG	CAAACCAT	CTGGCG	CTTGTGG	TGCGAGG	CTACGGG	CTCCTT	CCAAATT	GTC	CCGCT	CAGCA
7455	.....A.....														
3171	.....														
6810	.....A.....A.....														
84	.....														
717	.....A.....														
206	.....														
769	TA	T	GG	T						A	G				
189	.....T.....														
57	.....														
218	.....														
61	.....														
397	.....														
Raj2	.....														
351	.....														
133	TA	T	GG	T	G	T						A	G		
A3	TA	T	GG	T						A	G				
P2	TA	T	GG	T						A	G				
P1	TA	T	GG	T						A	G				
A8	TA	T	GG	T						A	G	T			
A7	TA	T	GG	T						A	G				
A6	TA	T	GG	T						A	G				
A5	TA	T	GG	T						A	G				
A1	TA	T	GG	T						A	G				
A4	TA	T	GG	T						A	G				
PE10	TA	T	GG	T						A	G				
U1	TA	T	GG	T						A	G				
A2	TA	T	GG	T						A	G				
V6	TA	T	GG	T						A	G				
V5	TA	T	GG	T						A	G				
V4	TA	T	GG	T						A	G				
V3	TA	T	GG	T						A	G				
V2	TA	T	GG	T	G	T						A	G		
V1	TA	T	GG	T						A	G				
C21	TA	T	GG	T						A	G				
C20	TA	T	GG	T						A	G				
C19	TA	T	GG	T						A	G				
C18	TA	T	GG	T						A	G				
C17	TA	T	GG	T						A	G				
C16	TA	T	GG	T						A	G				
C15	TA	T	GG	T						A	G				
C14	TA	T	GG	T						A	G				
C13	TA	T	GG	T						A	G				
C12	TA	T	GG	T						A	G				
C11	TA	T	GG	T						A	G				
C10	TA	T	GG	T						A	G				
C9	TA	T	GG	T						A	G				
C8	TA	T	GG	T						A	G				
C7	TA	T	GG	T						A	G				
C6	TA	T	GG	T						A	G				
C5	TA	T	GG	T						A	G				
C4	TA	T	GG	T						A	G				
C3	TA	T	GG	T						A	G				
C2	TA	T	GG	T						A	G				
C1	TA	T	GG	T						A	G				
B26	TA	T	GG	T						A	G				
B25	TA	T	GG	T						A	G				
B24	TA	T	GG	T						A	G				
B23	TA	T	GG	T	A	T						A	G		
B22	TA	T	GG	T						A	G				
B21	TA	T	GG	T						A	G				
B19	TA	T	GG	T						A	G	T			
B20	TA	T	GG	T						A	G	T			
B18	TA	T	GG	T						A	G				
B17	TA	T	GG	T						A	G				
B16	TA	T	GG	T						A	G				
B15	TA	T	GG	T	G	T						A	G		
B14	TA	T	GG	T						A	G	T			
B13	TA	T	GG	T	G	T						A	G		
B12	TA	T	GG	T						A	G				
B11	TA	T	GG	T						A	G				
B10	TA	T	GG	T						A	G				
B9	TA	T	GG	T						A	G				
B8	TA	T	GG	T						A	G				
B7	TA	T	GG	T	A	T						A	G		
B6	TA	T	GG	T						A	G				
B5	TA	T	GG	T						A	G	T			
B4	TA	T	GG	T						A	G	T			
B3	TA	T	GG	T						A	G	T			
B2	TA	T	GG	T						A	G	T			
B1	TA	T	GG	T						A	G	T			





## Anexo 2 Pontos polimórficos identificados em cada locus representantes do conjunto 2 de dados. 3HYD

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
Pb01	TTTGTTTATGTTATTTTGGCGGAGAGTTAATGGATGAGGAGGTGGAAGTTGTTAATTTGAGTTATTGCGGGGAGTGAGTTGAGATTGTCCAATCTGAGCTT											
6810	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
Raj2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
7455	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
717	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
218	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
189	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
206	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
694	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
397	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
57	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
351	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
61	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
3171	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
133	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
84	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
769	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
Pb18	C	A	T							A	T	
Pb73	C	A	T							A	T	
Pb135	C	AA	T							A	T	
Pb300	C	A	T							A	T	
Pb305	A	C	A	T							A	T
Pb307	C	A	T							A	T	
Pb309	C	A	T							A	T	
Pb339	C	A	T							A	T	
Pb1684	C	A	C	AT					A	A	C	
Pb14_121	C	A	T							A	T	
Beto	C	A	T							A	T	
Dasy	C	A	T							A	T	
Eslava	C	A	T							A	T	
Higuita	C	A	T							A	T	
Ibia	C	A	T							A	T	
T1F1	C	A	T							A	T	
T7F6	C	A	T							A	T	
T8B1	C	A	T							A	T	
T13LN1	C	A	T							A	T	
Bt60	C	A	T							A	T	
Pb2	C	A	T							A	T	
Pb3	C	A	T							A	T	
Pb4	C	A	T							A	T	
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200		
Pb01	GATAATCCTGATTGATGGCTAAGGCCGTTTCATTGACCTTCTTTCGATGGCCCGGAAGGAAATTTGGTGGGACTTCTCGATCCTGTTTCCCTTCTCTAGA											
6810	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
Raj2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
7455	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
717	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
218	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
189	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
206	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
694	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
397	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
57	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
351	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
61	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
3171	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
133	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
84	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
769	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
Pb18	G	A	T	A							A	
Pb73	G	A	T	A							A	
Pb135	G	A	T	A							A	
Pb300	G	A	T	A							A	
Pb305	G	A	T	A							A	
Pb307	G	A	T	A							A	
Pb309	G	A	T	A							A	
Pb339	G	A	T	A							A	
Pb1684	G	A	T	A					A		A	
Pb14_121	G	A	T	A							A	
Beto	G	A	T	A							A	
Dasy	G	A	T	A							A	
Eslava	G	A	T	A							A	
Higuita	G	A	T	A							A	
Ibia	G	A	T	A							A	
T1F1	G	A	T	A							A	
T7F6	G	A	T	A							A	
T8B1	G	A	T	A							A	
T13LN1	G	A	T	A							A	
Bt60	G	A	T	A							A	
Pb2	G	A	T	A					A		A	
Pb3	G	A	T	A							A	
Pb4	G	A	T	A							A	

	..... .....
Pb01	A TAG T G A C
6810	.....
Raj2	.....
7455	.....
717	.....
218	.....
189	.....
206	.....
694	.....
397	.....
57	.....
351	.....
61	.....
3171	.....
133	.....
84	.....
769	.....
Pb18	.....
Pb73	.....
Pb135	.....
Pb300	.....
Pb305	.....
Pb307	.....
Pb309	.....
Pb339	.....
Pb1684	.....
Pb14_121	.....
Beto	.....
Dasy	.....
Eslava	.....
Higuita	.....
Ibia	.....
T1F1	.....
T7F6	.....
T8B1	.....
T13LN1	.....
Bt60	.....
Pb2	.....
Pb3	.....
Pb4	.....

# 5HYD

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Pb01	AAAACCATCAAAATGCAGCTCTCCAACATCGTCGCCGTGTGTCGCTCTCCTCGCCACCACTGCTGTGCGCAGCCGCTCTCCTCCCCGCCACAGCGCCCAT									
7455										
3171										
6810										
717										
189										
61										
769										
206										
57										
397										
694										
351										
84										
133										
218										
Raj2										
Pb4						C			T	
Pb3						C			T	
Pb2						C			T	
PbBeto						C			T	
Bt60						C			T	
Dasy						C			T	
Eslava						C			T	
Higuita						C			T	
Ibia						C			T	
Pb135						C			T	
Pb14121						C			T	
Pb1684						C			T	
Pb18						C			T	
Pb300						C			T	
Pb305						C			T	
Pb307						C			T	
Pb309						C			T	
Pb339						C			T	
Pb73						C			T	
T13LN1						C			T	
T1F1						C			T	
T7F6						C			T	
T8B1						C			T	

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Pb01	CCCGCCAGTTGCTCCTGTCTCCAGAGCATCCAGTGCCTCCGGCAGCCCTTCTGCTGTGCTCCCGAGAGCACCTCGGCACCACTTGCACTGCCAT									
7455										
3171										
6810										
717										
189										
61										
769										
206										
57										
397										
694										
351										
84										
133										
218										
Raj2										
Pb4					T				G	
Pb3					T				G	
Pb2					T				G	
PbBeto			A		T				G	
Bt60			A		T				G	
Dasy			A		T				G	
Eslava			A		T				G	
Higuita			A		T				G	
Ibia			A		T				G	
Pb135			A		T				G	
Pb14121			A		T				G	
Pb1684			A		T				G	
Pb18			A		T				G	
Pb300			A		T				G	
Pb305			A		T				G	
Pb307			A		T				G	
Pb309			A		T				G	
Pb339			A		T				G	
Pb73			A		T				G	
T13LN1			A		T				G	
T1F1			A		T				G	
T7F6			A	A	T				G	
T8B1			A		T				G	

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Pb01	GTCCGGCAGCTCCGTCCAGTGC	CAACAGCCCTCATTGCTGCTG	CAACAACAATGGCAGCGGTG	TAAGTATTGCCAGAAACAATC	ATTCCCAACTGG					
7455	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
3171	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
6810	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
717	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
189	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
61	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
769	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
206	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
57	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
397	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
694	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
351	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
84	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
133	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
218	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Raj2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Pb3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Pb2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
PbBeto	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
Bt60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
Dasy	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Eslava	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Higuita	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Ibia	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
Pb135	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
Pb14121	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
Pb1684	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
Pb18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
Pb300	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Pb305	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Pb307	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Pb309	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Pb339	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
Pb73	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....
T13LN1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
T1F1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
T7F6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T
T8B1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	T

	310	320	330	340
Pb01	ATAGACTAGTATCTAATCAGATA	AATCTTTCCAATATATAGACT	CAA	
7455	.....	.....	.....	.....
3171	.....	.....	.....	.....
6810	.....	.....	.....	.....
717	.....	.....	.....	.....
189	.....	.....	.....	.....
61	.....	.....	.....	.....
769	.....	.....	.....	.....
206	.....	.....	.....	.....
57	.....	.....	.....	.....
397	.....	.....	.....	.....
694	.....	.....	.....	.....
351	.....	.....	.....	.....
84	.....	.....	.....	.....
133	.....	.....	.....	.....
218	.....	.....	.....	.....
Raj2	.....	.....	.....	.....
Pb4	C	C	C	C
Pb3	C	C	C	C
Pb2	C	C	C	C
PbBeto	C	C	CA	C
Bt60	C	C	CA	C
Dasy	C	C	C	C
Eslava	C	C	C	C
Higuita	C	C	C	C
Ibia	C	C	CA	A
Pb135	C	C	CA	C
Pb14121	C	C	CA	C
Pb1684	C	C	CA	C
Pb18	C	C	CA	C
Pb300	C	C	C	C
Pb305	C	C	C	C
Pb307	C	C	C	C
Pb309	C	C	C	C
Pb339	C	C	C	C
Pb73	C	C	C	C
T13LN1	C	C	CA	C
T1F1	C	C	CA	C
T7F6	C	C	CA	C
T8B1	C	C	CA	A





**KEX**

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
01	CGATGCCGGATT	CACCCCTGAG	TTTTGTTGACT	GTCTCGTTAG	ATTTTCATG	TTCATGCTTCT	TGGTTTGGGG	TGGATAGCAGG	AGTGGGGGGGC	TT
7455		T								
3171										
6810										
133										
84										
769										
717		A								
351										
Raj2										
218										
189										
61										
206										
694										
397										
57										
18		T		GT		C		C	AG	C
Pb73		T		GT		C		C	AG	C
Pb135		T		GT		C		C	AG	C
Pb300	C	T		GT		C		C	AG	C
Pb305	C	T		GT		C		C	AG	C
Pb307	C	T		GT		C		C	AG	C
Pb309	C	T		GT		C		C	AG	C
339		T		GT		C		C	AG	C
1684		T		GT		C		C	AG	C
Pb14_121		T		GT		C		C	AG	C
Beto		T		GT		C		C	AG	C
Dasy		T		GT		C		C	AG	C
Eslava		T		GT		C		C	AG	C
Higuaita		T		GT		C		C	AG	C
Ibia		T		GT		C		C	AG	C
T1F1		T		GT		C		C	AG	C
T7F6		T		GT		C		C	AG	C
T8B1		T		GT		C		C	AG	C
T13LN1		T		GT		C		C	AG	C
Bt60		T		GT		C		C	AG	C
pb2		T		G		C		C	AG	C
pb3		T		G		C		C	AG	C
pb4		T		G		C		C	AG	C

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
01	TTGTTGGCACTT	ACCAATGAACG	AGCGACATA	AAAAGTCCA	ATCAACGTAG	CCAGCGCGG	AGGTCATCCA	ATTTCCTCGT	CGTACTTAGA	TAGCTGACGGC
7455										
3171										
6810										
133										
84										
769										
717										
351										
Raj2										
218										
189										
61										
206										
694										
397										
57										
18						A		T		T
Pb73						A		T		T
Pb135						A		T		T
Pb300						A		T		T
Pb305						A		T		T
Pb307						A		T		T
Pb309						A		T		T
339						A		T		T
1684						A		T		T
Pb14_121						A		T		T
Beto						A		T		T
Dasy						A		T		T
Eslava						A		T		T
Higuaita						A		T		T
Ibia						A		T		T
T1F1						A		T		T
T7F6						A		T		T
T8B1						A		T		T
T13LN1						A		T		T
Bt60						A		T		T
pb2						A		T		T
pb3						A		T		T
pb4						A		T		T

```
.....|.....|
01      TCCAGTGGGA
7455    .....
3171    .....
6810    .....
133     .....
84      .....
769     .....
717     .....
351     .....
Raj2    .....
218     .....
189     .....
61      .....
206     .....
694     .....
397     .....
57      .....
18      .....
Pb73    .....
Pb135   .....
Pb300   .....
Pb305   .....
Pb307   .....
Pb309   .....
339     .....
1684    .....
Pb14_121 .....
Beto    .....
Dasy    .....
Eslava  .....
Higuita .....
Ibia    .....
T1F1    .....
T7F6    .....
T8B1    .....
T13LN1  .....
Bt60    .....
pb2     .....
pb3     .....
pb4     .....
```



# ITS

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
01	TGGGGGGACGGGGCCCGATCGGGTTCCCCGACCCCTCTCACCTGGCCACCCTTGTCTATCCTACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCTGCAGCGATGCTGCCGGGG									
7455										
6810										
3171										
218										
351										
769										
189										
61										
206										
694										
397										
57										
133										
717										
raj2										
84										
PbT8B1										
PbT7F6										
PbT1F1										
PbBT										
Pb309										
Pb307										
Pb305										
Pb300										
Pb1684										
Pb135										
Bt60										
Pb73										
Pb339										
Pb2										
Pb3										
Pb4										
Pb_18										
T13Ln1										
Bt										
IBIA										
HIGUITA										
ESLAVA										
DASYPUS										

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
01	GGGC TTGGCCTCCC GGGCTCGT GCCCGCCGGGGACACCG TTGAAC TCTCGG TTCGGAGCTTTGACG TCTGAGACCCATCATAATCAGTGAAAAC TTTCAA									
7455										
6810										
3171										
218										
351										
769										
189										
61										
206										
694										
397										
57										
133										
717										
raj2										
84										
PbT8B1										
PbT7F6										
PbT1F1										
PbBT										
Pb309										
Pb307										
Pb305										
Pb300										
Pb1684										
Pb135										
Bt60										
Pb73										
Pb339										
Pb2										
Pb3										
Pb4										
Pb_18										
T13Ln1										
Bt										
IBIA										
HIGUITA										
ESLAVA										
DASYPUS										

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
01	CAACGGATCTCTGGTTCCGACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCCATAAGTAAATGTAATTGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC									
7455	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
6810	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
3171	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
218	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
351	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
769	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
189	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
61	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
206	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
694	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
397	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
57	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
133	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
717	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
raj2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
84	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pbt8B1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pbt7F6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pbt1F1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PbBT	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb309	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb307	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb305	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb300	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb1684	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb135	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Bt60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb73	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb339	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pb_18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
T13Ln1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Bt	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
IBIA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HIGUITA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ESLAVA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DASYPUS	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
01	ATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCAAGCGCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGCGTCCCCCATGGACGTGC									
7455	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
6810	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
3171	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
218	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
351	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
769	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
189	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
61	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
206	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
694	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
397	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
57	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
133	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
717	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
raj2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
84	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pbt8B1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pbt7F6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pbt1F1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
PbBT	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb309	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb307	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb305	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb300	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb1684	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb135	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Bt60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb73	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb339	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Pb4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	T	G
Pb_18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
T13Ln1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
Bt	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
IBIA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
HIGUITA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
ESLAVA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G
DASYPUS	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	G

	410	420	430	440	450	460	470	480	490
01	CCGAAAAGCAGCGGGCGGCTCGCGTTC	CGGTGCCCCGAGCGTATGGGGCTTC	CGTACACCGCTCTCAGAGGCCCGGCCG	CCCCGGCCCC	ACTCATCGA				
7455	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	---
6810	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	---
3171	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	---
218	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	---
351	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
769	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
189	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
61	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	---
206	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
694	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
397	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
57	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
133	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	---
717	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
raj2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	---
84	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
PbT8B1	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
PbT7F6	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
PbT1F1	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
PbBT	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb309	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb307	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb305	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb300	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb1684	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb135	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Bt60	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb73	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb339	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb2	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb3	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb4	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Pb_18	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
T13Ln1	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
Bt	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
IBIA	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
HIGUITA	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
ESLAVA	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T
DASYPUS	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	A	T

Artigo *in press*, FGB como co-autor.

















































