

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

JULIANA MAZIERO AZANHA

**ANÁLISES FILOGENÉTICAS BASEADAS NO DNA
RIBOSSOMAL E MITOCONDRIAL DE ISOLADOS DE
*Pythium insidiosum***

BAURU
2015

JULIANA MAZIERO AZANHA

**ANÁLISES FILOGENÉTICAS BASEADAS NO DNA
RIBOSSOMAL E MITOCONDRIAL DE ISOLADOS DE
*Pythium insidiosum***

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte de requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen.

BAURU
2015

Azanha, Juliana Maziero

A991a

Análises filogenéticas baseadas no DNA ribossomal e mitocondrial de isolados de *Pythium insidiosum* / Juliana Maziero Azanha. -- 2015.

70f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Análises filogenéticas. 2. DNA mitocondrial. 3. DNA ribossomal. 4. Oomiceto. 5. *Pythium insidiosum*.
I. Rasmussen, Lucas Trevizani. II. Título.

JULIANA MAZIERO AZANHA

**ANÁLISES FILOGENÉTICAS BASEADAS NO DNA RIBOSSOMAL E
MITOCONDRIAL DE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum***

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte de requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco
Instituto de Biociências – UNESP

Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 02 de dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, por me darem amor, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador e a minha banca examinadora pela oportunidade, suporte, incentivo, confiança e correções.

A Fapesp (Fundação de Amparo a Pesquisa) pelo incentivo financeiro, como bolsas e auxílios.

Aos meus amigos de turma e do Laboratório de Micologia Médica do Depto. de Microbiologia e Imunologia, IBB/UNESP, pela amizade, companheirismo e ajuda.

RESUMO

Pythium insidiosum é o agente etiológico da pitiose, uma doença que afeta humanos e animais, principalmente em países de clima tropical e subtropical. Este patógeno não é um fungo verdadeiro, pois pertence ao Reino Stramenopila, Filo Oomycota. Estudos moleculares têm sido realizados recentemente e vêm mostrando que o DNA mitocondrial, particularmente o gene da citocromo c oxidase (Cox II) é um bom marcador para estudos filogenéticos entre as espécies do gênero, bem como para avaliar a variabilidade intraespecífica. Fez-se a análise filogenética de 20 isolados de *P. insidiosum* provenientes de casos de pitiose equina, humana e canina de diferentes municípios do estado São Paulo. A pesquisa teve como objetivo fazer análises filogenéticas baseadas na região do DNA ribossomal, como a região ITS-1-5.8S-ITS-2 e a região D1 e D2 da subunidade 28S; e do DNA mitocondrial, gene da citocromo c oxidase II (COX II). Os isolados de *Pythium insidiosum* foram cultivados em tubos contendo Ágar Sabouraud Dextrose para que seus fragmentos fossem postos em Caldo Sabouraud Dextrose, sendo posteriormente utilizados nos procedimentos de extração de DNA. Com o DNA já extraído, análises da integridade e da concentração desse material genético foram realizadas para se prosseguir com a reação em cadeia da polimerase (PCR) usando *primers* e perfis de ciclagem específicos para cada região do DNA. A observação dos *amplicons* em gel de agarose com a posterior purificação desse produto tornou-se possível realizar o sequenciamento e as análises filogenéticas. Dessa forma, com base na nas árvores filogenéticas, a região ITS apresentou baixos *bootstraps* separando os isolados americanos dos isolados da Tailândia. A região da citocromo c oxidase II permitiu melhor separação geográfica dos isolados americanos dos isolados de *P. insidiosum* da Tailândia, no entanto observou-se que um isolado ambiental da Tailândia agrupou-se na árvore filogenética desse gene. O entendimento das relações filogenéticas auxilia na compreensão da distribuição geográfica deste patógeno, mas não distingue se há genótipos de *P. insidiosum* que causam a doença em animais e humanos.

Palavras-chave: Análises filogenéticas. DNA mitocondrial. DNA ribossomal. Oomiceto. *Pythium insidiosum*.

ABSTRACT

Pythium insidiosum is the etiological agent of pythiosis, a disease that affects human and animals, mainly in countries with tropical and subtropical climates. This pathogen is not a true fungi, it belongs to Stramenopila Kingdom, Oomycota Phylum. Molecular studies have been conducted recently and shown that mitochondrial DNA, particularly cytochrome c oxidase (Cox II) is a good marker for phylogenetic analysis among species, as well as intraspecific variability analysis. It was made phylogenetic analysis among 20 isolates of *P. insidiosum*, from cases of equine, human and canine pythiosis from different counties of the state of São Paulo. The research aimed to make phylogenetic analysis based on ribosomal DNA region, as the ITS-1-5.8S-ITS-2 region and the D1 and D2 region of the 28S subunit; and mitochondrial DNA, cytochrome c oxidase gene II (COX II). Isolates of *Pythium insidiosum* were cultivated in tubes containing agar Sabouraud Dextrose and fragments were put into Sabouraud Dextrose broth, subsequently used in DNA extraction procedures. With the DNA already extracted, analysis of the integrity and concentration of this genetic material were carried out to proceed with polymerase chain reaction (PCR) using specific *primers* and cycling conditions for each region analysed. The observation of *amplicons* on agarose gel with the subsequent purification of the product has become possible to perform the sequencing and the phylogenetic analysis. Thus, based on the phylogenetic trees, the ITS region has showed low *bootstraps* separating the American isolates of isolates from Thailand. The cytochrome c oxidase II region has allowed better geographical separation of the American and Thai isolates of the *P. insidiosum*, however it was observed that one environmental Thai isolate has grouped into American isolates by phylogenetic analysis with this gene. Understanding of the phylogenetic relationships may help in the comprehension of geographical distribution, but not enabled associations between the genotypes of *P. insidiosum* from animal and human diseases.

Keywords: Mitochondrial DNA. Oomycete. Phylogenetic analyses. *Pythium insidiosum*. Ribosomal DNA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Hifas de <i>P. insidiosum</i> cultivadas em Caldo SAB.....	19
Figura 2: Quantificação em gel.....	23
Figura 3: PCR-gradiente de temperatura para os <i>primers</i> FM58 e FM66 que amplificam o gene da citocromo c oxidase II (Cox-II) de <i>Pythium insidiosum</i>	25
Figura 4: PCR-gradiente de temperatura para os <i>primers</i> NL1 e NL4 que amplificam a região variável D1-D2 do RNA ribossomal, subunidade 28S..	26
Figura 5: PCR-gradiente de temperatura para os <i>primers</i> ITS4 e ITS5 que amplificam a região ITS1, gene 5.8S, e ITS2 do DNA ribossomal..	27
Figura 6: Região ITS amplificada, com o tamanho do fragmento de aproximadamente 955pb.....	28
Figura 7: Região ITS amplificada, com o tamanho do fragmento de aproximadamente 955pb.	29
Figura 8: Região ITS amplificada, com o tamanho do fragmento de aproximadamente 955pb.	30
Figura 9: Amplificação região do COX-II dos isolados de <i>P.insidiosum</i> , observando o tamanho de aproximadamente 609pb.....	31
Figura 10: Amplificação da região D1 e D2.	32
Figura 11: Purificação dos fragmentos da região ITS dos isolados de <i>P.insidiosum</i> , observando o tamanho de aproximadamente 955pb.	33
Figura 12 Purificação dos fragmentos da região do COX-II dos isolados de <i>P.insidiosum</i> , observando o tamanho de aproximadamente 609pb.....	34
Figura 13: Purificação dos fragmentos da região D1 e D2 dos isolados de <i>P.insidiosum</i> , observando o tamanho de aproximadamente 786pb.....	35
Figura 14: Análise filogenética da região ITS.	39
Figura 15: Análise filogenética da região Cox-II	40
Figura 16:A-) Análise filogenética da região D1-D2 do DNA <i>ribossomal</i>	42
Figura16:B-) Análise filogenética da região D1-D2 do DNA ribossomal.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de DNA ($\eta\text{g}/\mu\text{L}$) e valores das razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} dos diferentes isolados de <i>Pythium insidiosum</i>	22
Tabela 2: Identidade molecular das sequências de ITS, Cox-II e D1-D2 dos isolados.	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Isolados de <i>Pythium insidiosum</i> que foram empregados nas extrações de DNA, de acordo com a espécie animal que permitiu o isolamento e sua procedência.	18
Quadro 2: Sequência dos <i>primers</i> da região ITS e da região D1e D2 do rDNA e do gene Cox II do mtDNA empregados para as análises moleculares.	27
Quadro 3: Lista de isolados de <i>Pythium insidiosum</i> empregados para as análises filogenéticas da região ITS.	44
Quadro 4: Lista de isolados de <i>Pythium insidiosum</i> empregados para as análises filogenéticas da citocromo c oxidase (CoxII).	48
Quadro 5: Lista de isolados de <i>Pythium insidiosum</i> empregados para as análises filogenéticas da região D1-D2.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Trifosfato

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

%: Porcento

ng: Nanogramas

°C: Grau Celsius

μL: Microlitros

H₂O: Água

HCl: Ácido Clorídrico

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

ml: Mililitros

NaCl: Cloreto de Sódio

nm: nanômetro

pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase

Rpm: Rotação por minuto

SAB: Sabouraud

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	17
3	PROCEDIMENTOS REALIZADOS.....	18
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS PESQUISAS E ISOLADOS AVALIADOS...18	
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA	19
3.3	QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	21
3.4	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	24
3.5	VISUALIZAÇÃO DO <i>AMPLICON</i> POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	28
3.5.1	ITS	28
3.5.2	COX-II	30
3.5.3	D1-D2	31
3.6	PREPARO DOS <i>AMPLICONS</i> PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO....	32
3.7	SEQUENCIAMENTO DOS <i>AMPLICONS</i>	35
3.8	ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	37
	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	53
	APÊNDICE A - SEQUÊNCIA PARCIAL DE OLIGONUCLEOTÍDIOS DA REGIÃO ITS-1, 5.8S E ITS-2 DO DNA RIBOSSOMAL	57
	APÊNDICE B - SEQUÊNCIA PARCIAL DE OLIGONUCLEOTÍDIOS DA CITOCROMO C OXIDASE (COX-II) DO DNA MITOCONDRIAL .	62
	APÊNDICE C - SEQUÊNCIA PARCIAL DE OLIGONUCLEOTÍDIOS DA REGIÃO D1-D2 DA SUBUNIDADE 28S DO DNA RIBOSSOMAL	66

1 INTRODUÇÃO

Pythium é um gênero complexo da classe dos Oomycetes que inclui cerca de 120 espécies descritas, estas podendo ocupar ambientes terrestres e aquáticos. (VAN der PLAATS-NITERINK et al., 1981; DICK et al., 1990).

Dentre os membros desse gênero há espécies cujos nichos ecológicos podem ser diversos, desde seres saprófitos, ou seja, que se alimentam de substratos orgânicos em decomposição; como também aqueles benéficos por serem agentes de controle biológico ou auxiliares na produção ácidos graxos insaturados utilizados como suplemento dietético para o uso humano. (GANGHI; WEETE, 1991; MARTIN; LOPER, 1999). Além disso, existem espécies que são patogênicas para as plantas, afetando o crescimento dessas, como também de animais como peixes, camarões, larvas, algas, mosquitos e até mesmo mamíferos o qual é prejudicado pela espécie *Pythium insidiosum*. (de COCK et al., 1987).

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático que pertence ao Reino Stramenopila, filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Pythiales e família Pythiaceae. Ele é o agente etiológico da pitiose, uma doença emergente e considerada fatal em alguns casos mais severos, que afeta animais, inclusive o ser humano. (GAASTRA et al., 2010). A doença ocorre predominantemente em países de clima tropical e subtropical. É caracterizada por causar lesões granulomatosas nos tecidos cutâneo e subcutâneo. Já foram reconhecidos casos dessa enfermidade em gatos, cães, ovinos, bovinos e equinos, sendo esta última a mais frequentemente acometida. (SANTURIO et al., 2006). Também foi detectado um caso de pitiose em uma ave silvestre (*Plegadis chihi*, “caraúna de cara branca”), bem como foi relatado um caso de pitiose humana por *Pythium aphanidermatum*. (PESAVENTO et al., 2008; CALVANO et al., 2011).

Não há pré-disposição por raça, idade e sexo para o desenvolvimento da enfermidade, sendo esta determinada principalmente pela permanência do animal em áreas alagadas onde o patógeno vive. (MENDOZA et al., 1993).

A infecção é adquirida em ambiente aquático com presença de vegetação, local este favorável à produção de zoósporos biflagelados, forma infectante do patógeno. (MENDOZA et al., 1993). O ciclo de vida deste patógeno envolve a colonização de material vegetal, onde se desenvolvem as hifas de *P. insidiosum*. Na extremidade dessas hifas são formados esporângios, que em seu interior contém os

zoósporos biflagelados, oriundos de reprodução assexuada. Uma vez liberados, os zoósporos nadam até se encistarem em tecido vegetal, onde emitem um tubo germinativo para recomeçar seu ciclo. Se o animal penetrar nesse ambiente, o patógeno se desenvolverá no tecido subcutâneo e dará origem à doença. (MENDOZA et al., 1993). A penetração da hifa no tecido se dá por ação de proteinases, bem como de força mecânica que essas hifas exercem. (RAVISHANKAR et al., 2001). A literatura menciona que o hospedeiro animal deve ter uma lesão prévia que sirva de porta de entrada ao zoósporo, entretanto, trabalhos demonstram que o patógeno possui tropismo por folículo piloso, não havendo a necessidade de lesão prévia. (MENDOZA et al., 1993; SANTURIO et al., 1998).

A doença em humanos possui três formas clínicas: lesões granulomatosas de tecidos cutâneos e subcutâneos; forma sistêmica, caracterizada pelo desenvolvimento de arterite crônica, oclusão arterial e gangrena; e forma ocular, que envolve desde ceratites até severas úlceras que acometem todo o globo ocular. (THIANPRASIT et al., 1996).

A pitiose é de difícil diagnóstico e tratamento, sendo necessários grandes procedimentos cirúrgicos. (TRISCOT et al., 1993). O primeiro caso da doença em humanos foi constatado na Tailândia, na década de 80, país que registra a maior casuística dessa doença em humanos. (THIANPRASIT et al., 1996). Já o primeiro caso brasileiro foi recentemente diagnosticado e aconteceu em um indivíduo do sexo masculino, que morava no interior do estado de São Paulo. Ele se queixava de úlcera cutânea na perna esquerda com evolução de três meses. A lesão iniciou-se com uma pústula, uma semana após uma pescaria em lago de águas paradas, no qual permanecera com as pernas submersas. O diagnóstico inicial foi de celulite bacteriana, sendo o paciente tratado sem melhoras. Procedeu-se à biópsia cutânea que no exame anatomopatológico mostrou micro-organismo sugestivo de hifa não septada, compatível com fungo zigomiceto. O paciente foi então tratado e não apresentou melhora. Uma grande cirurgia foi realizada e a cultura de fragmentos dessa lesão permitiu o isolamento do agente, o qual foi corretamente identificado após o sequenciamento da região ITS-5.8S do DNA ribossomal. (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006).

A identificação e classificação de *Pythium insidiosum* baseada apenas em características morfológicas não é uma tarefa fácil, pois requer micologista treinado.

Morfologicamente os oomicetos podem compartilhar muitas características em comum com os fungos verdadeiros, entretanto os oomicetos são filogeneticamente relacionados às algas. (ALEXOPOULOS et al., 1996). Dentre várias características que diferem os oomicetos dos fungos verdadeiros destacam-se: i) ausência de quitina e a presença de celulose na parede celular dos oomicetos, ii) ausência de ergosterol na membrana plasmática dos oomicetos, iii) zoósporos biflagelados (nos fungos do Filo Chytridiomycota os zoósporos são uniflagelados), iv) mitocôndrias com crista tubular (enquanto que nos fungos verdadeiros são achatadas), dentre outras características bioquímicas. (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A biologia molecular vem proporcionando grandes avanços no estudo dos fungos, de uma maneira geral e também vem auxiliando no estudo de *Pythium insidiosum*. É utilizada tanto para finalidade diagnóstica, permitindo diagnóstico precoce da doença, bem como auxilia na identificação do patógeno. (GROOTERS; GEE, 2002).

Para garantir esta aplicabilidade, as técnicas da biologia molecular (como a extração de DNA, as reações de PCR e o sequenciamento do material genético e sua análise), necessitam de um adequado processamento para proporcionar resultados satisfatórios. Dessa forma, LOHNOO et al. (2014) compararam diferentes técnicas relacionadas à extração do DNA de *P. insidiosum*, a *salt-extraction*, *rapid-extraction* e extração convencional (empregando fenol-clorofórmio), levando em consideração o tempo de duração, o preço, o descarte, a periculosidade dos reagentes utilizados e a qualidade e quantidade do DNA obtido em cada uma delas. A extração pela técnica chamada *salt-extraction* consistiu no tratamento da massa fúngica em homogeneizador de tecido empregando-se *glass-beads* e solução tampão de extração com maior concentração de NaCl. A extração pela técnica *rapid-extraction* consistiu na fervura prévia da massa fúngica por 30 minutos seguidos de agitação mecânica em vortex por 2 minutos e a empregou-se fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. A extração pela técnica chamada convencional empregou a maceração de massa fúngica em nitrogênio líquido e a seguir o pó obtido foi submetido à extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Concluíram que a *rapid-extraction*, apesar de ser um protocolo rápido, a quantidade e a qualidade do material genético extraído foi bastante limitada, sendo o protocolo que mais degradou o DNA ao final da extração. Tanto a técnica de *salt-extraction* como a chamada convencional mostraram DNA com mesma qualidade, sendo um pouco

mais degradado na primeira técnica. No entanto, apesar de degradar um pouco mais que a metodologia convencional, os autores destacam essa técnica como sendo a mais rápida e que não emprega reagentes caros e perigosos à saúde e ao meio ambiente (LOHNOO et al., 2014).

A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) vem sendo cada vez mais utilizada para identificação molecular dos fungos, sendo inclusive considerada “código de barra” (*barcoding*) dos fungos, auxiliando na identificação molecular. (IWEN et al., 2002; SCHOCH et al., 2012).

Além do uso no diagnóstico e na identificação, tais ferramentas vêm auxiliando em estudos filogenéticos os quais permitiram a verificação de *clusters* geneticamente distintos de isolados de *Pythium insidiosum* de diferentes continentes. Nesse sentido, Schurko et al. (2003) realizaram uma análise filogeográfica utilizando-se do PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*) no sequenciamento das região IGS (*Integenic Spacer*) do DNA ribossomal. Esta análise se baseou na presença de diferenças genéticas entre os isolados nativos de *P. insidiosum* entre as áreas geográficas tais como Ásia, Austrália e Américas. Os isolados avaliados foram divididos em três *clusters* distintos e apenas um isolado não foi incluído em nenhum desses grupos. Verificou-se que o *cluster* I é constituído de dezesseis isolados das Américas (Costa Rica, Brasil, Haiti e EUA); já o *cluster* II possui sete isolados da Ásia (Índia, Japão, Tailândia, Nova Guiné e Papua) e da Austrália; e o *cluster* III incluem dois isolados tailandeses e um norte americano. Este último grupo apresenta uma maior distância em relação aos *clusters* I e II os quais são mais próximos entre si, evidenciando, desta forma, uma variabilidade intraespecífica na espécie *P. insidiosum*. (SCHURCKO et al., 2003).

A região ITS, como também outros genes do DNA ribossomal são utilizados para estudos filogenéticos. Apesar de ser amplamente utilizada para identificação fúngica, essa região não permitiu a discriminação das cepas do *P. insidiosum* em grupos genéticos distintos, como observado em isolados ambientais e clínicos de *P. insidiosum* avaliados na Tailândia. (KAMMARNJESADAKUL et al., 2011).

Por isso, outra abordagem para os estudos relacionados à filogenia de *P. insidiosum* vem sendo representada pela utilização do DNA mitocondrial. (MARTIN, 2000). A mitocôndria é uma organela citoplasmática da célula eucariota que possui seu DNA próprio (mtDNA) e existem várias mitocôndrias em cada célula, sendo assim, inúmeras cópias de mtDNA são encontradas em uma única célula. O mtDNA

é distinto do DNA genômico nuclear. Em geral, o mtDNA possui tamanho e estrutura que varia entre diferentes organismos eucariotos. Por exemplo, em animais possui aproximadamente 16 Kb e codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa. Além disso, codifica RNA ribossomal (16S, 12S) e RNA transportador (22S). (VAZ JR, 2002).

Em fungos, o tamanho do mtDNA é variável em função de uma série de inserções/deleções, as quais foram identificadas como *íntrons* localizados em certos genes, particularmente os que codificam a citocromo c oxidase subunidades 1 e 2. (BIRLEY & CROFT, 1986).

O mtDNA também está envolvido nos processos de microevolução, dessa forma, auxilia no entendimento de aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos, em relação à filogenia desses. (AVISE et al., 1987).

Sobre o gênero *Pythium*, uma das características do seu genoma mitocondrial que este possui uma repetição invertida, em uma proporção grande, de aproximadamente 80% do genoma mitocondrial. Essa repetição invertida tem ocorrência em grupos intimamente relacionados com os Oomycetes indicando ancestralidade, sua modificação ou perda dentro dos Oomycetes pode ser tratada como um caráter de avaliação filogenética (MCNABB et al., 1987; MARTIN, 2000).

Em relação ao formato do mtDNA do gênero *Pythium*, a maioria das espécies foram identificados com genoma mitocondrial circular, porém existem espécies com genoma linear, como é o caso *Pythium irregulare*. Além disso, também há um número de espécies com mtDNA circular e linear, o qual este último se apresenta em menor quantidade, aparecendo em alguns isolados como de *Pythium oligandrum* e *P. irregulare*, porém esta característica evidenciada tem uma significância filogenética incerta. (MARTIN, 1995).

Entre os genes do DNA mitocondrial, a COX II (citocromo c oxidase) é a mais utilizada nos estudos de diferenciação de espécies. Este gene codifica proteínas metabólicas e são menos ambíguos do que a região ITS para as análises filogenéticas. (MARTIN, 2000). A utilização de sequências de COX II gera uma árvore filogenética com maior resolução do que de análise da região ITS. Portanto, esse gene mitocondrial pode ser considerado como um novo marcador molecular para a análise filogenética de *P. insidiosum*, como foi demonstrado por KAMMARNJESADAKUL et al. (2011), que analisaram as árvores filogenéticas do gene da COX II como também da sequência ITS dos isolados clínicos e ambientais

de *P. insidiosum* da Tailândia. Foi observado que em relação ao gene da Cox II houve agrupamento de três *clusters*, A, B e C, sendo o mesmo observado nas análises da região ITS. Entretanto, o gene Cox II permitiu melhor distinção entre os isolados dos *clusters* B e C quando comparados com a região ITS. Os autores concluem que as análises baseadas no gene da Cox II permitem melhor separação em nível intraespecífico. (KAMMARNJESADAKUL et al., 2011).

AZEVEDO et al. (2012) realizaram análises filogenéticas com isolados de *P. insidiosum* provenientes do Brasil (região centro-oeste e sul), bem como incorporaram sequências, dessas regiões gênicas, de isolados dos EUA, Costa Rica e Tailândia, obtidas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Foi observado, semelhantemente ao trabalho de KAMMARNJESADAKUL et al. (2011), que a árvore filogenética obtida pela análise do gene Cox II permitiu melhor resolução intraespecífica quando comparada à região ITS.

BRIARD et al. (1995) realizaram análises filogenéticas entre espécies do gênero *Pythium* e *Phytophthora* spp., baseadas na análise do sequenciamento de 177 pares de base da região D-2 da subunidade maior (28S) do rDNA, e observaram agrupamento das espécies do gênero *Pythium* em um mesmo clado. Em fungos verdadeiros, a região D1/D2 localiza-se na subunidade 28S do rDNA e esta região vem se mostrando eficiente também para identificação molecular e estudos filogenéticos de leveduras do gênero *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. *Rhodotorula* spp. e *Saccharomyces* spp. (BRIARD et al., 1995; ECHEVERRIGARAY et al., 2013; HAYASHI et al., 2013; SATOH, et al., 2013). Embora amplamente utilizada para identificação e análises filogenéticas em fungos, a região D1/D2 não foi devidamente explorada em *Pythium insidiosum*.

THONGSRI et al. (2013) realizaram a padronização de uma técnica para diagnóstico da pitiose denominada *single-Tube Nested PCR*, na qual consiste da utilização de dois pares de *primers*, denominados *outer primers* (CPL6/CPR8) e *inner primers* (YTL1/YTR1) e dois perfis de ciclagem, um primeiro com 30 ciclos empregando temperatura de anelamento a 68°C e a seguir um segundo ciclo empregando 57°C como temperatura de anelamento. Para a amostra testada ser considerada positiva, deve ser observado um padrão de 4 bandas nos tamanhos 512, 452, 340 e 240 pb. Os autores realizaram testes de sensibilidade e especificidade (testando DNA de diferentes fungos e bactérias, inclusive testando outras espécies de *Pythium*: *P. middletoni*, *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* e *P.*

deliense) e obtiveram as 4 bandas somente para *P. insidiosum*.(THONGSRI et al.,2013).

2 OBJETIVOS

Realizar análises filogenéticas baseadas no sequenciamento do gene Cox-II do mtDNA e da região ITS do rDNA de diferentes isolados clínicos de *Pythium insidiosum*.

3 PROCEDIMENTOS REALIZADOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS PESQUISAS E ISOLADOS AVALIADOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu.

Foram avaliados 20 isolados de *Pythium insidiosum*, um proveniente do primeiro caso da doença em humanos, dezoito de casos de pitiose equina e um vindo de um caso diagnosticado na espécie canina. Os isolados vêm sendo mantidos em tubos contendo ágar Sabouraud e subcultivados a cada 20 dias e mantidos em estufa a 27°C. Quadro 1 sumariza os dados sobre espécie animal e procedência dos isolados de *P. insidiosum* que foram avaliados.

Quadro 1: Isolados de *Pythium insidiosum* que foram empregados nas extrações de DNA, de acordo com a espécie animal que permitiu o isolamento e sua procedência.

Isolados de <i>Pythium insidiosum</i> (P.i.) e identificação laboratorial	Espécie	Procedência
<i>P.i.</i> B-01	Humana	Paraguaçu Paulista/SP
<i>P.i.</i> Eq-2	Equina	Jaú/SP
<i>P.i.</i> Eq-3	Equina	Barra Bonita/SP
<i>P.i.</i> Eq-4	Equina	Itápolis/SP
<i>P.i.</i> Eq-5	Equina	Porto Feliz/SP
<i>P.i.</i> Eq-6	Equina	Piracicaba/SP
<i>P.i.</i> Eq-7	Equina	Anhembi/SP
<i>P.i.</i> Eq-8	Equina	Paranapanema/SP
<i>P.i.</i> Eq-9	Equina	Piracicaba/SP
<i>P.i.</i> Eq-10	Equina	Paranapanema/SP
<i>P.i.</i> Eq-11	Equina	Piracicaba/SP
<i>P.i.</i> Eq-12	Equina	Bofete/SP
<i>P.i.</i> Eq-13	Equina	Piracicaba/SP
<i>P.i.</i> Eq-15	Equina	Igaraçu de Tietê/SP
<i>P.i.</i> Eq-16	Equina	Pereiras/SP
<i>P.i.</i> Eq-20	Equina	Jaú/SP
<i>P.i.</i> Eq-21	Equina	Laranjal Paulista/SP
<i>P.i.</i> Eq-22	Equina	Araçatuba/SP
<i>P.i.</i> Eq-24	Equina	São Pedro/SP
<i>P.i.</i> Cão	Canina	Boituva/SP

Fonte: Elaborado pela autora

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Na proposta inicial, o protocolo de extração seria o descrito por McCULLOUGH et al., (2000) com algumas modificações. Em função dos resultados obtidos, houve a necessidade de se testar novos protocolos.

A extração de DNA foi uma etapa do procedimento o qual ocorreu alguns empecilhos, desses a dificuldade de rompimento da parede celular do *P.insidiosum* composta por celulose, tendo a necessidade da escolha de vários outros métodos, como o uso do nitrogênio líquido, choque térmico provocado pela mudança brusca de temperatura, de 37°C para -80°C e a agitação no aparelho Precellys 24 (Bertin Technologies) que predominou na última extração realizada.

O protocolo empregado então foi o proposto por VAN BURIK (1998) o qual se realizou da seguinte maneira: os fragmentos de hifas com cinco a sete dias de crescimento em ágar Sabouraud a 37°C foram ressuspensos em caldo SAB Dextrose em agitação de 150 rpm a 37°C por 4 dias, para depois ser lavado com solução salina a 0,85%.

Quando há a retirada de fragmentos do material microbiológico, através de alças, vem aderido ao fungo, meio de cultura. Por esse motivo, ao invés, dessas hifas com ágar ser diretamente empregadas para a extração de DNA, estas foram colocadas em erlenmeyers com 60mL de Caldo SAB para serem agitadas. Obtendo-se micélios os quais foram lavados com solução salina, a fim de ser retirado o caldo SAB e assim, prosseguir a extração. Como ilustra a Figura 1.

Figura 1: Hifas de *P. insidiosum* cultivadas em Caldo SAB, em agitação por 4 dias.



Fonte: Elaborada pela autora

Após foi adicionado aproximadamente 0,1 g de hifas em 500µL de solução tampão (TrisHCl 50mM, EDTA 50mM, SDS 2% e 2-mercapetanol) e 400 µL da mistura fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (PHE:CHL:IAA) na proporção 25:24:1 já contendo as *glass beads* nos microtubos (425-600 microns, acid washed, Sigma-Aldrich), em seguida levou-se a solução à agitação em aparelho Precellys 24 (Bertin Technologies) com 3 ciclos alternados de 40 segundos de agitação e 20 segundos de descanso, logo após seguiu-se com a centrifugação. O uso de tampão de extração, constituído de 100mM Tris-HCl, 20mMEDTA, 1% SDS, 0,2% mercaptoetanol, foi utilizado com a finalidade de promover a saída do DNA da célula, o controle de pH, inibição de DNAses e desnaturação de proteínas. Além desse tampão, a adição de PHE:CHL:IAA na solução fez com que houvesse a extração de lipídios, polissacarídeos e proteínas os quais através da centrifugação foram precipitadas e o DNA dissolvido na solução orgânica, considerado sobrenadante.

O sobrenadante foi coletado para neste ser adicionado, dependendo do volume que se obteve, a quantidade similar da mistura de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Centrifugou-se novamente, para depois o sobrenadante ser coletado e assim ser posta a mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (CHL:IAA) na proporção de 24:1 em igual volume ao do obtido no sobrenadante. A mistura foi homogeneizada por inversão dos tubos e a seguir centrifugada a 14.000 rpm à 4°C por 15 minutos. Todos os procedimentos de centrifugação obedeceram a esses parâmetros. Coletou-se o sobrenadante em novo tubo e foi adicionado proporcional volume de isopropanol gelado e 10 µL de acetato de sódio para promover a precipitação de sais e do material genético. Deixou-se os tubos na geladeira *overnight* para posteriormente centrifugar e se obter o pellet, que depois foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado o qual dificulta a ressuspensão do DNA e faz dessalinização dessa molécula e a remoção dos resíduos.

Eluiu-se o DNA em 100 µL de água MilliQ autoclavada. A partir deste protocolo, acarretou-se melhores concentrações e integridade do DNA observados na quantificação e assim pode ser dada a sequencia do projeto.

Resultados semelhantes ao se empregar fenol, clorofórmio e álcool isoamílico foram obtidos por LOHNOO et al. (2014) ao testarem três protocolos de extração de DNA para *P. insidiosum*, na Tailândia, sendo que em dois destes protocolos foram empregados a mistura PHE:CHL:IAA.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Foi feita em gel de agarose a 2% empregando-se o marcador de peso molecular DNA Low Mass® (Invitrogen) para avaliação da integridade da molécula de DNA. Após a corrida eletroforética, o gel foi submetido à luz ultra-violeta e fotografado para registro da imagem. Como corante intercalante do DNA utilizou-se o SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) ao invés de brometo de etídio. Além da quantificação em gel, também se realizou a quantificação em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare) em comprimento de onda de 260 nm.

O principal motivo da necessidade de fazer várias extrações, com diferentes métodos, se deve a concentração final do DNA e sua integridade, pois se essas não estiverem em valores adequados e satisfatórios, problemas ao realizar o PCR e o sequenciamento irão se originar posteriormente.

Com o protocolo de Van Burik (1998), o resultado da quantificação foi satisfatório, tanto na análise pelo NanoVue (GE Healthcare) quanto em gel de agarose. A Tabela 1 mostra o rendimento de DNA obtido através das extrações a partir da extração com fenol, clorofórmio e álcool isoalmílico, bem como as razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} . Na Figura 2 observa-se o rendimento do material genético e sua integridade, através da visualização de bandas e a comparação com o marcador de peso molecular DNA Low Mass® (Invitrogen).

Tabela 1: Concentrações de DNA ($\eta\text{g}/\mu\text{L}$) e valores das razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} dos diferentes isolados de *Pythium insidiosum*.

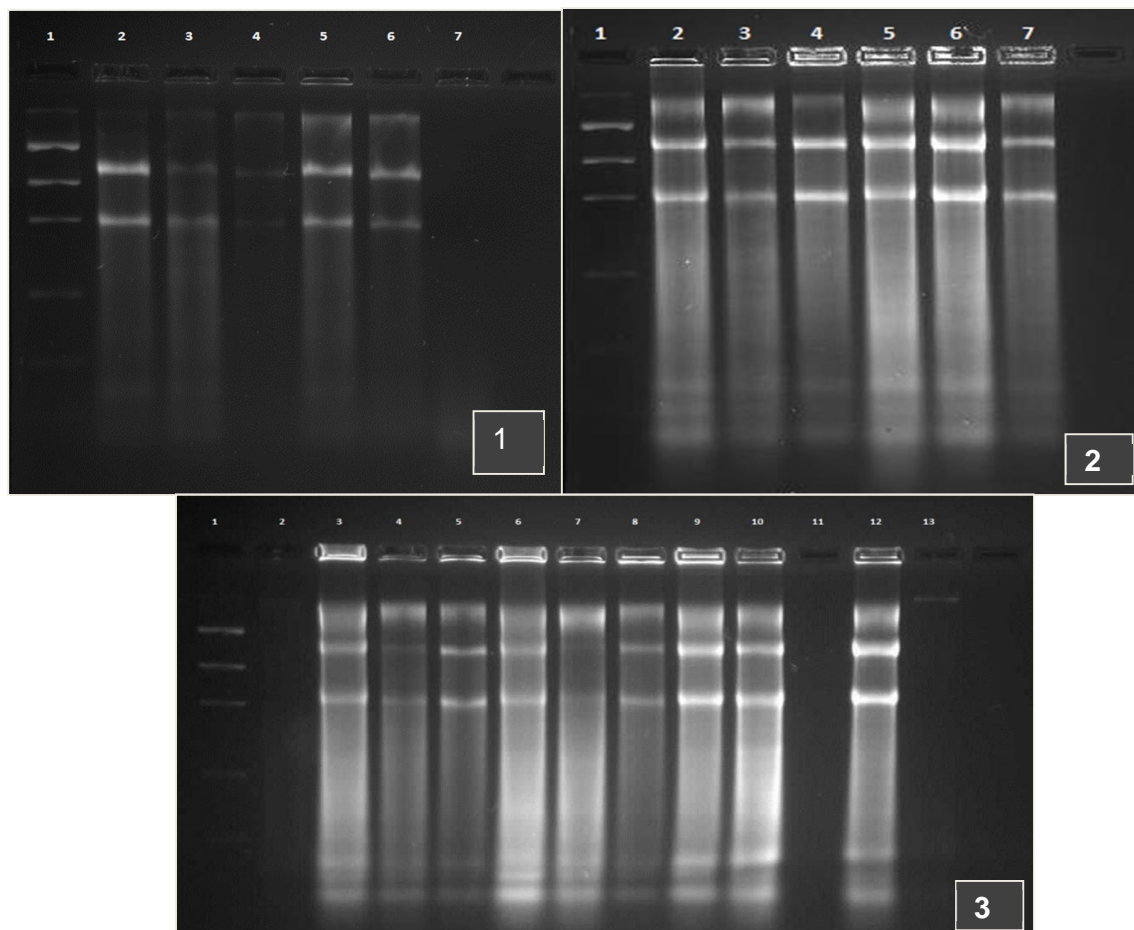
isolados de <i>Pythium insidiosum</i>	[DNA]	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
B-01	53,0	1,583	1,963
Eq-2	459,0	2,481	2,054
Eq-3	408,5	2,561	2,027
Eq-4	79,0	2,548	1,881
Eq-5	557,0	2,657	2,025
Eq-6	381,0	2,384	2,003
Eq-7	2700,0	2,574	2,096
Eq-8	1200,0	2,547	2,063
Eq-9	1472,0	2,573	2,070
Eq-10	3892,0	2,527	2,094
Eq-11	3469,0	2,573	2,075
Eq-12	1010,0	2,584	2,079
Eq-13	2873,0	2,481	2,170
Eq-15	986,0	2,526	2,191
Eq-16	485,0	2,545	2,167
Eq-20	2988,0	2,439	2,151
Eq-21	1860,0	2,514	2,188
Eq-22	999,0	2,485	2,151
Eq-24	2572,0	2,572	2,178
Cão-1	531,5	1,132	1,131

Fonte: Elaborada pela autora

As razões de A_{260}/A_{230} que mostram valores acima de 2,4 indicam que a amostras possui muito RNA. Já as razões A_{260}/A_{280} que mostram valores abaixo de 1,5 indicam que a amostras possui muita proteína.

Sendo que, o isolado Cão, por apresentar razão A_{260}/A_{280} , abaixo de 1,5 possui na sua amostra muita proteína, mas em relação razão de A_{260}/A_{230} se estabelece dentro dos valores de referência. Entretanto não se repetiu o procedimento da extração do DNA para este isolado.

Figura 2: Quantificação em gel. **1:** 1- DNA Low Mass ladder® (Invitrogen) 2=Eq-02; 3=Eq-03; 4=Eq-04; 5=Eq-05; 6- Eq-06; 7=Controle(Levedura). **2:** 1=DNA Low Mass ladder® (Invitrogen); 2=Eq-07; 3=Eq-08; 4= Eq- 09; 5= Eq-10; 6=Eq-11; 7=Eq-12. **3:** 1-DNA Low Mass ladder® (Invitrogen) 2=B-01; 3=Eq-13; 4=Eq-15; 5=Eq-16; 6- Eq-20; 7= Eq-21; 8= Eq-22; 9= Eq-24; 10= Cão; 12=Controle (Eq-11 diluído); 13= Controle (Levedura).



Fonte: Elaborada pela autora

Através da visualização dos géis, com ilustra a Figura 2 percebe-se um arraste, em todas as amostras, indicando a possível presença de DNA degradado. Entretanto, três bandas se destacam possuindo uma intensidade próxima a da primeira banda do marcador, indicando que as concentrações estão acima de $50\text{ng}/\mu\text{L}$.

É visto também, valores elevados nas concentrações para alguns isolados, com base na Tabela 1, tendo a necessidade de diluir esse material para 100ng/μL. Somente após a diluição que se pode continuar com a próxima etapa: o PCR.

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A caracterização molecular dos isolados foi realizada baseando-se na região do DNA ribossomal (rDNA), envolvendo a região codificadora 5.8S e as regiões variáveis ITS (*Internal Transcribed Spacer*) 1 e 2 e a região codificadora da citocromo c oxidase (Cox II) do mtDNA.

Foram empregadas reações de PCR com os *primers* universais para fungos ITS4/ITS5, como proposto por WHITE et al. (1990) para amplificação das regiões ITS1-5.8S e ITS2 e os *primers* FM58/FM66 para amplificação da região do mtDNA, como proposto por KAMMARNJESADAKUL et al. (2011).

A região D1 e D2 contida no gene 28S do DNA ribossomal também foi avaliada para a caracterização molecular.

A Taq DNA Polimerase da Invitrogen® foi usada nos primeiros PCRs, porém como no laboratório, onde se realizou a pesquisa, possuía a GoTaq® Green Master Mix (Promega), esta substituiu a outra Taq, pelo motivo do resultado do PCR, visto pelo gel, aparecer bandas com maior intensidade.

A mudança da Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) para a GoTaq® Green Master Mix (Promega), promoveu a necessidade de realizar gradientes para as três regiões pesquisadas (ITS, D1-D2 e COX-II). Com fins, principalmente de minimizar a possibilidade de aparecimento de bandas inespecíficas, fato ocorrido com o ITS.

Para a reação de PCR-gradiente da região do COXII, D1-D2 e ITS, as temperaturas empregadas na PCR-gradiente foram:

1 - 50,0°C	4 - 51,9°C	7 - 56,5°C	10 - 61,0°C
2 - 50,2°C	5 - 53,3°C	8 - 58,8°C	11 - 61,9°C
3 - 50,8°C	6 - 54,8°C	9 - 69,7°C	12 - 62,5°C

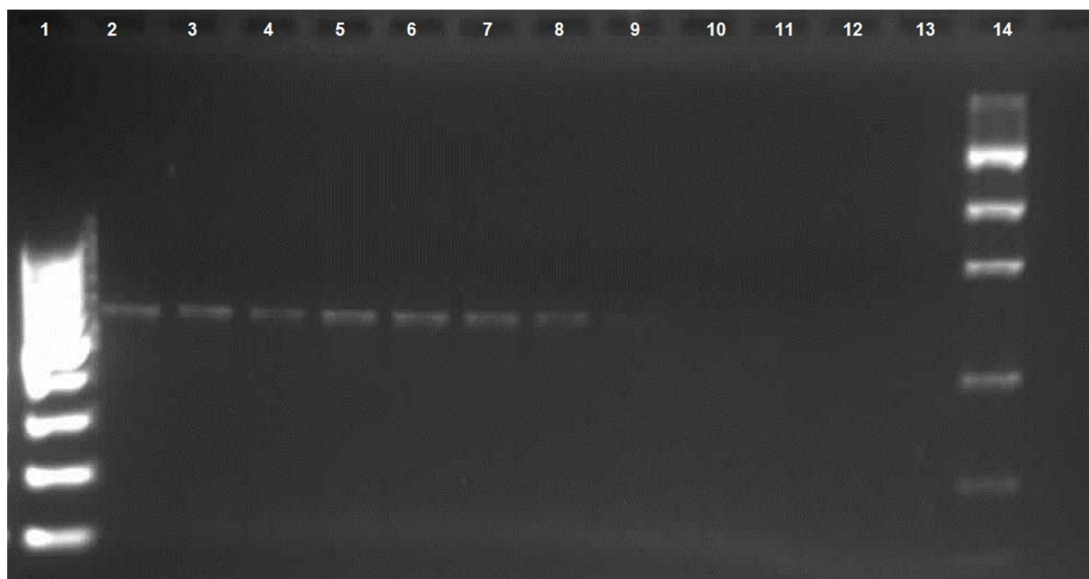
Os intervalos de 50°C a 62°C foram adotados, possuindo como base a temperatura de *melting* do *primer* expressa no site da NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e também a melhor temperatura exibida no manual da Taq polimerase.

De acordo com tamanho do fragmento da região amplificada e do *primer* é definido o tempo de *annealing* e de extensão, variando entre um minuto e meio a dois minutos.

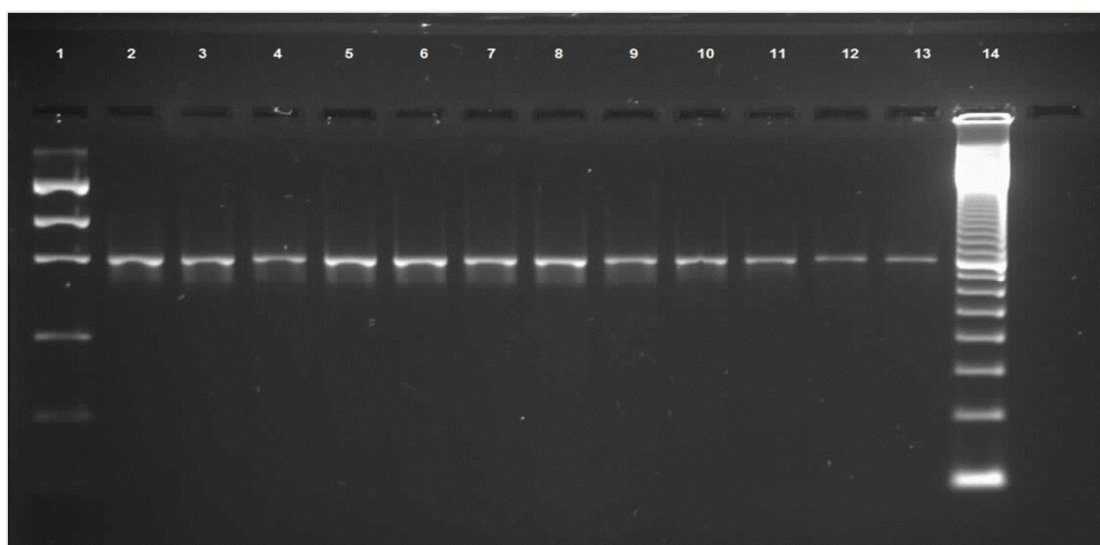
As Figuras 3, 4 e 5 exibem os gradientes das três regiões avaliadas.

Figura 3: PCR-gradiente de temperatura para os *primers* FM58 e FM66 que amplificam o gene da citocromo c oxidase II (Cox-II) de *Pythium insidiosum*. Observar a ausência de amplificação a partir do número e bandas únicas. 1 = Marcador molecular de 1kb; 2 = 50,0°C; 3 = 50,2°C; 4 = 50,8°C; 5 = 51,9°C; 6 = 53,3°C; 7 = 54,8°C; 8 = 56,5°C; 9 = 58,1°C; 10 = 59,7°C; 11 = 61,0°C; 12 = 61,9°C; 13 = 62,5°C.; 14 = DNA Low Mass ladder® (Invitrogen). É notável, que os números 7 e 8 obtiveram bandas mais reluzentes, concluindo que a temperatura de melhor *annealing* seria entre 54°C a 56°C, isto é, 55°C foi a adotada.



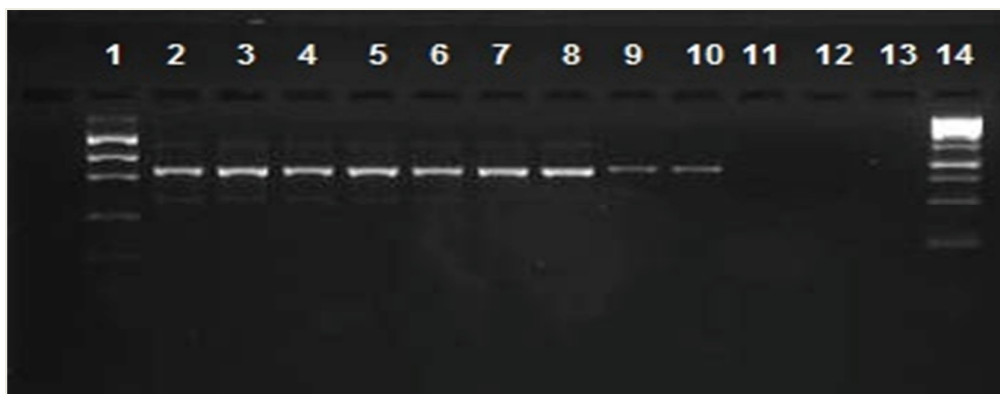
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 4: PCR-gradiente de temperatura para os *primers* NL1 e NL4 que amplificam a região variável D1-D2 do RNA ribossomal, subunidade 28S. Observar amplificação de banda única nas temperaturas correspondentes aos números 2 ao 13; 1 = DNA Low Mass ladder® (Invitrogen); 2 = 50,0°C; 3 = 50,2°C; 4 = 50,8°C; 5 = 51,9°C; 6 = 53,3°C; 7 = 54,8°C; 8 = 56,5°C; 9 = 58,1°C; 10 = 59,7°C; 11 = 61,0°C; 12 = 61,9°C; 13 = 62,5°C.; 14 = DNA 100 pb Ladder®. É notável, que os números 10 e 11 obtiveram bandas mais reluzentes e definidas, concluindo que a temperatura de melhor *anelamento* seria 60°C a qual foi a adotada.



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 5: PCR-gradiente de temperatura para os *primers* ITS4 e ITS5 que amplificam a região ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), gene 5.8S, e ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) do DNA ribossomal. Observar amplificação de 3 bandas e ausência de amplificação nas temperaturas correspondentes aos números 11, 12 e 13. 1 = DNA Low Mass ladder® (Invitrogen); 2 = 50,0°C; 3 = 50,2°C; 4 = 50,8°C; 5 = 51,9°C; 6 = 53,3°C; 7 = 54,8°C; 8 = 56,5°C; 9 = 58,1°C; 10 = 59,7°C; 11 = 61,0°C; 12 = 61,9°C; 13 = 62,5°C. É notável, que os números 7 e 8 obtiveram bandas mais reluzentes, concluindo que a temperatura de melhor *annealing* seria entre 54°C a 56°C, isto é, 55°C foi a adotada.



Fonte: Elaborada pela autora

No Quadro 2 encontram-se as sequências dos *primers* utilizados, bem como os perfis de ciclagem, já estabelecidos através do PCR-gradiente.

Quadro 2: Sequência dos *primers* da região ITS e da região D1e D2 do rDNA e do gene Cox II do mtDNA empregados para as análises moleculares.

Sequencia (5' – 3')	região	Perfil de ciclagem
ITS 4 – TCCTCCGCTTATTGATATGC ITS 5 - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS	1X 94°C/5min; 35X 94°C/1min, 55°C/2min, 72°C/2min; 1X 72°C/10 min
FM 58 - CCACAAATTTCACTACATTGA FM 66 – TAGGATTTCAAGATCCTGC	Cox II	1X 94°C/5min; 35X 94°C/1min, 55°C/1,5min, 72°C/1,5min; 1X 72°C/10 min
NL1 -GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG NL4 – GGTCCGTGTTTCAAGACGG	D1/D2	1X 94°C/5min; 35X 94°C/1min, 60°C/1,5min, 72°C/1,5min; 1X 72°C/10 min

Fonte: Elaborado pela autora

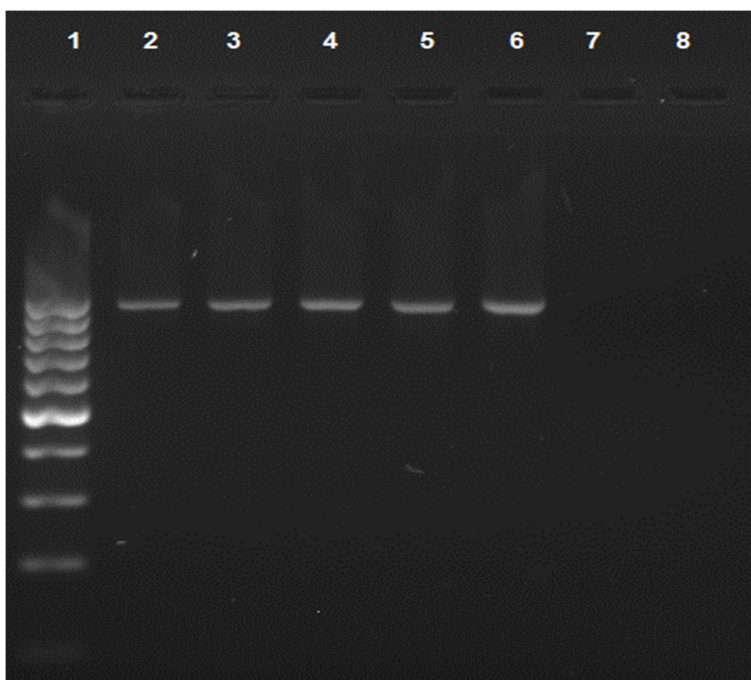
3.5 VISUALIZAÇÃO DO *AMPLICON* POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A visualização do material amplificado foi realizada a partir de eletroforese em gel de agarose 2,0% empregando-se marcador de peso molecular de 100 pares de base (Promega), bem como o agente intercalante de DNA descrito acima.

3.5.1 ITS

A Figura 6 ilustra os *amplicons* originados da PCR da região ITS, dos primeiros isolados de *P. insidiosum*.

Figura 6: Região ITS amplificada, com o tamanho do fragmento de aproximadamente 955pb. 1= DNA 100 pb Ladder® (Fermentas); 2- Eq-02; 3=Eq-03; 4= Eq- 04; 5= Eq-05; 6=Eq-06; 7= NO; 8=NO.



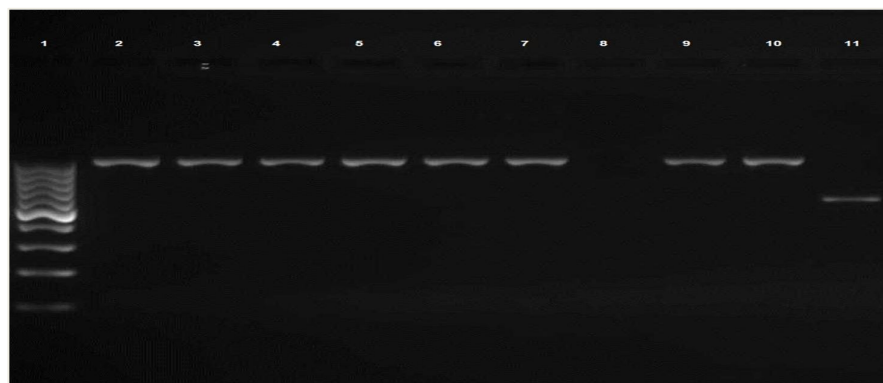
Fonte: Elaborada pela autora

A partir dessa imagem conclui-se, que o PCR realmente foi eficaz e a temperatura de *annealing* de 55°C seria a recomendada para seguir com o sequenciamento. Observa-se a presença de bandas únicas, porém com um pouco de arraste (*smears*).

Nos seguintes isolados, o protocolo de extração do material genético e o perfil de ciclagem foram os mesmos que os primeiros. Entretanto, na fotografia do gel, não surgiram bandas, e foi notado muito arraste (*smears*). Por consequente, as amostras de DNA sofreram diluições com água MiliQ autoclavada, contendo 100ng/μL como concentração final.

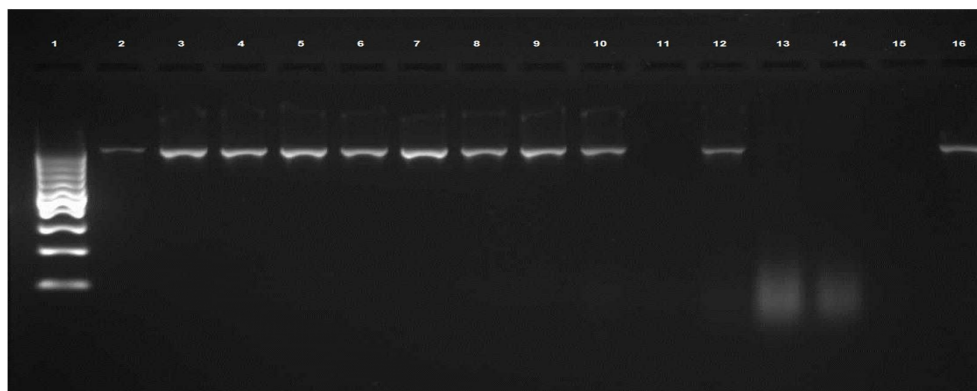
Concentrações elevadas de DNA poderiam interferir no rendimento da reação de PCR, pois após a diluição apareceram bandas como ilustram nas Figuras 7 e 8 onde mostram bandas únicas que só apareceram depois da concentração de DNA ser diluída.

Figura 7: Região ITS amplificada, com o tamanho do fragmento de aproximadamente 955pb. DNA diluído pra a concentração de 100ng/μL 1- DNA 100 pb Ladder® (Fermentas); 2- Eq-07; 3=Eq-08; 4= Eq- 09; 5= Eq-10; 6=Eq-11; 7= 12; 8=NO; 9= Controle (Eq-08); 10=Controle(Eq-05); 11= Controle (Levedura).



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 8: Região ITS amplificada, com o tamanho do fragmento de aproximadamente 955pb. DNA diluído pra a concentração de 100ng/μL 1- DNA 100 pb Ladder® (Fermentas); 2-B-01; 3=Eq-13; 4= Eq-15; 5= Eq-16; 6=Eq-20; 7= Eq-21; 8=Eq-22; 9=Eq-24; 10- Cão; 11- No; 12-Eq-15 sem estar diluído; 13=Eq-20 sem estar diluído; 14= Cão sem estar diluído;15=Controle (Levedura),16= Controle(Eq-05, diluída). Observando-se um arraste nas amostras que não foram diluídas.



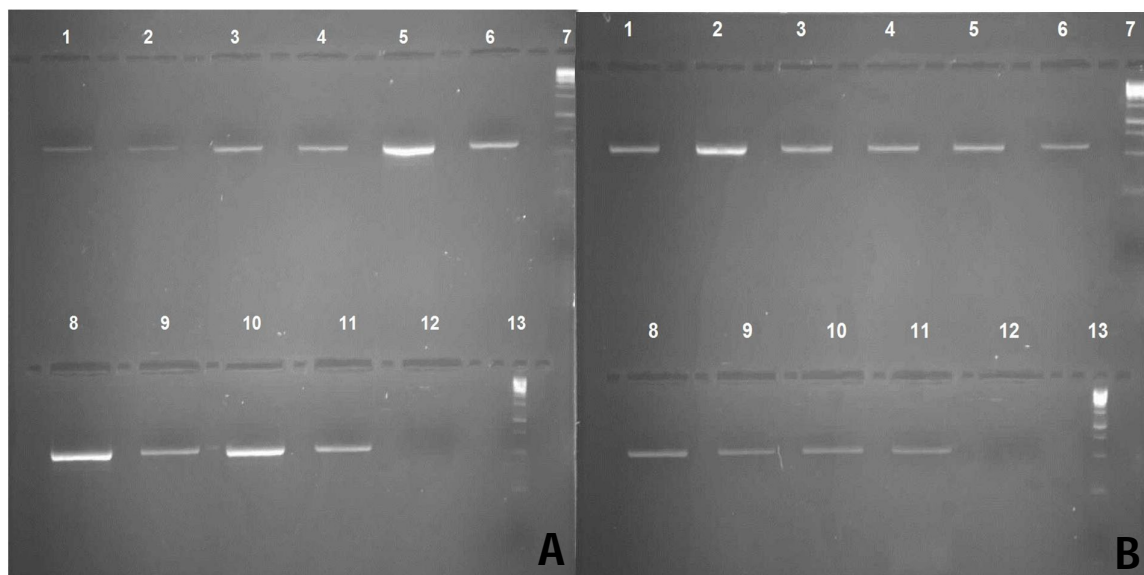
Fonte: Elaborada pela autora

3.5.2 COX-II

Essa região foi muito difícil de ser amplificada, pois como se trata de DNA mitocondrial, este está em menor concentração quando comparado ao DNA genômico (ITS e D1-D2).

Para que, a região mitocondrial fosse amplificada, a quantidade de *primers* posta no mix do PCR, teve que ser dobrada, visto que, depois desse ato, as amplificações foram sucedidas, como pode ser observado na Figura 9.

Figura 9: Amplificação região do COX-II dos isolados de *P.insidiosum*, observando o tamanho de aproximadamente 609pb. A) 1=B-01; 2:Eq-02; 3-Eq-03; 4=Eq-04, 5=Eq-05, 6= Eq-06; 7= Marcador molecular de 1kb; 8=Eq-07; 9=Eq-08; 10=Eq-09 e 11=Eq-10; 12=NO ; 6=Marcador molecular de 1kb. B) 1=Eq-11; 2:Eq-12; 3-Eq-13; 4=Eq-15, 5=Eq-16, 6=Eq-20; 7 =Marcador molecular de 1kb; 8=Eq-21; 9=Eq-22; 10=Eq-24 e 11=Cão; 12-NO; 13= Marcador molecular de 1kb.



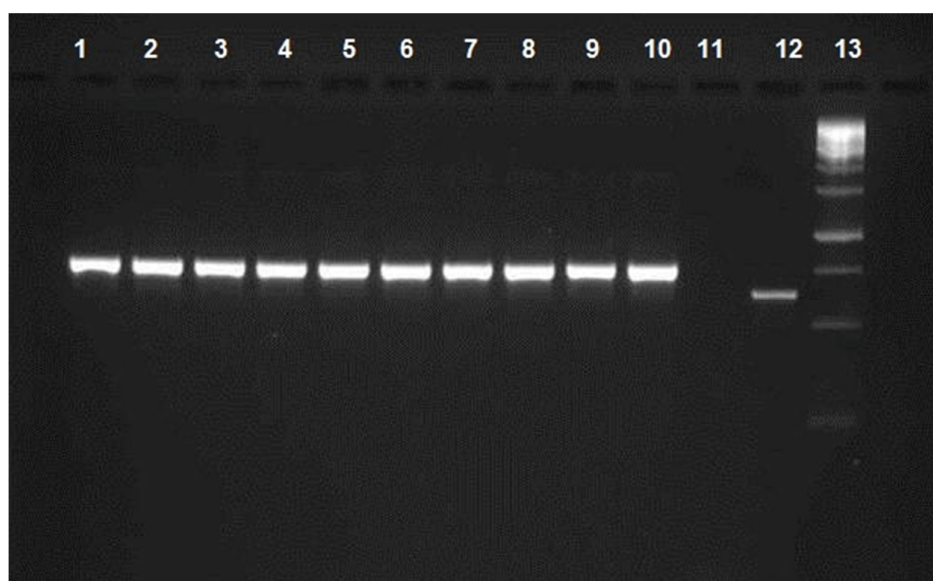
Fonte: Elaborada pela autora

3.5.3 D1-D2

A região D1 e D2 pertencem a região 28S do DNA ribossomal do *P. insidiosum* e 26S dos microrganismos pertencentes ao gênero *Candida*, foi amplificada, de acordo com os perfis de ciclagem determinado pelo gradiente; purificada e sequenciada e sendo os isolados agrupados de acordo com a árvore filogenética escolhida e adequada.

Entretanto, primeiramente necessitou fazer um PCR dessa região e a sua verificação e visualização de produto amplificado na eletroforese. A Figura 10 mostra a visualização desse fragmento amplificado, confirmando que o isolado apresenta esta região e esta pode ser amplificada e sequenciada.

Figura 10: Amplificação da região D1 e D2. O fragmento possui cerca de 786pb. 1=B01; 2- Eq-02; 3=Eq-03; 4= Eq- 04; 5= Eq-05; 6=Eq-06; 7=Eq-07; 8=Eq-08; 9=Eq-09; Eq-10; 11=NO; 12= Controle (Leveduras);13- DNA 1kb Ladder®.



Fonte: Elaborada pela autora

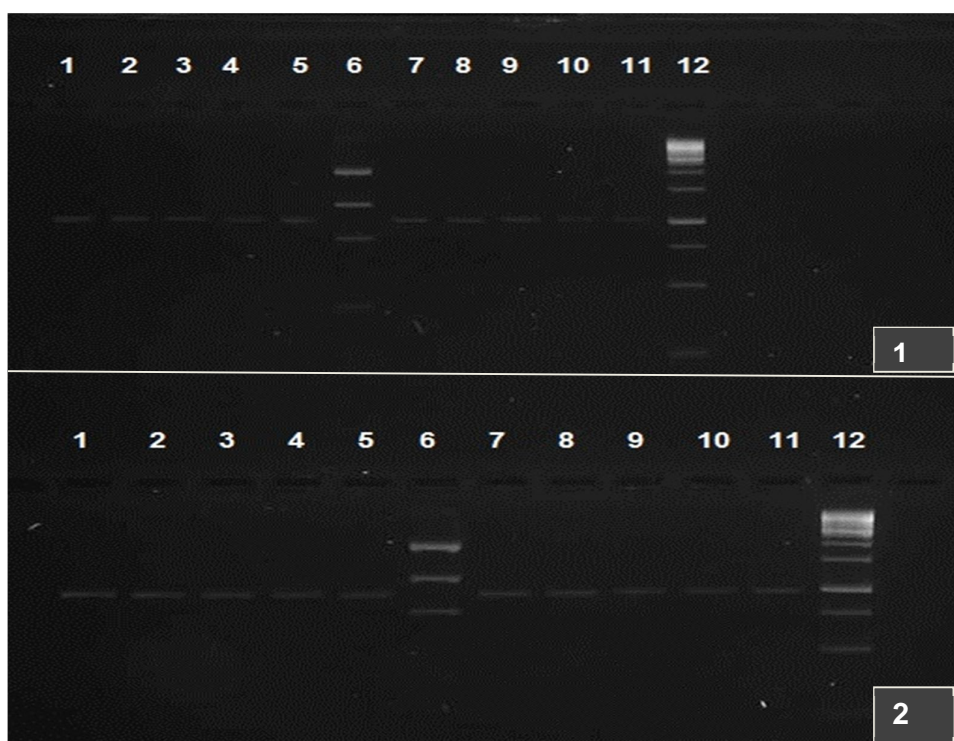
3.6 PREPARO DOS AMPLICONS PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE) foi utilizado a fim de purificar apenas uma banda resultante do PCR, sendo esta, cortada e retirada do gel para seguir com a etapa de purificação.

A Figura 11 mostra o resultado da purificação dos *amplicons* da região ITS, já a Figura 12 da COX e Figura 13 da D1-D2.

Figura 11: Purificação dos fragmentos da região ITS dos isolados de *P.insidiosum*, observando o tamanho de aproximadamente 955pb.

- 1)** 1=B-01; 2=Eq-02; 3=Eq-03; 4=Eq-04, 5=Eq-05, 6= DNA Low Mass ladder® (4µL; Invitrogen); 7=Eq-06; 8=Eq-07; 9=Eq-08; 10=Eq-09 e 11=Eq-10; 12= DNA 1kb Ladder.
- 2)** 1=Eq-11; 2=Eq-12; 3=Eq-13; 4=Eq-15, 5=Eq-16, 6= DNA Low Mass ladder® (4µL; Invitrogen); 7=Eq-20; 8=Eq-21; 9=Eq-22; 10=Eq-24 e 11=Cão.; 12= DNA 1kb Ladder.



Fonte: Elaborada pela autora

As concentrações dessas amostras permaneceram próximas de 20ng/µL, podendo posteriormente ser sequenciadas.

Figura 12 Purificação dos fragmentos da região do COX-II dos isolados de *P.insidiosum*, observando o tamanho de aproximadamente 609pb. Bandas com pouca intensidade.

- 1) 1=B-01; 2=Eq-02; 3=Eq-03; 4=Eq-04, 5=Eq-05, 6= DNA Low Mass ladder® (4µL; Invitrogen); 7=Eq-06; 8=Eq-07; 9=Eq-08; 10=Eq-09 e 11=Eq-10.
- 2) 1=Eq-11; 2=Eq-12; 3=Eq-13; 4=Eq-15, 5=Eq-16, 6= DNA Low Mass ladder® (4µL; Invitrogen); 7=Eq-20; 8=Eq-21; 9=Eq-22; 10=Eq-24 e 11=Cão.



Fonte: Elaborada pela autora

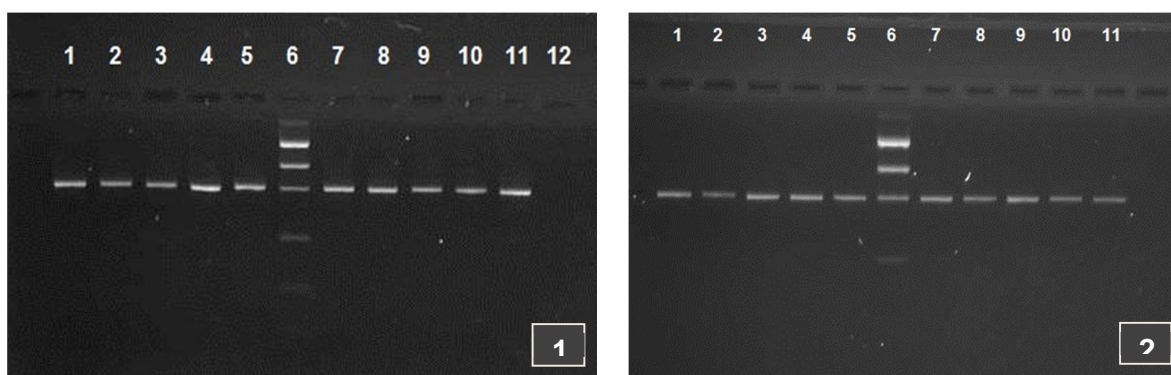
Observa-se, através do marcador de peso molecular que as concentrações encontram-se na faixa de 10ng/µL ou menor, que em teoria não estaria adequada para o sequenciamento. Ao enviar-se essas amostras para o sequenciamento, a técnica responsável, no momento de processar essas amostras do Cox-II, aumentou

o tempo de injeção das amostras no aparelho, o que ajudou bastante no resultado do sequenciamento.

Figura 13: Purificação dos fragmentos da região D1 e D2 dos isolados de *P.insidiosum*, observando o tamanho de aproximadamente 786pb.

1) 1=B-01; 2=Eq-02; 3=Eq-03; 4=Eq-04, 5=Eq-05, 6= DNA Low Mass ladder® (4µL; Invitrogen); 7=Eq-06; 8=Eq-07; 9=Eq-08; 10=Eq-09 e 11=Eq-10.

2) 1=Eq-11; 2=Eq-12; 3=Eq-13; 4=Eq-15, 5=Eq-16, 6= DNA Low Mass ladder® (4µL; Invitrogen); 7=Eq-20; 8=Eq-21; 9=Eq-22; 10=Eq-24 e 11=Cão.



Fonte: Elaborada pela autora

Já as concentrações dessas amostras permaneceram próximas de 30ng/µL, podendo posteriormente ser sequenciadas.

3.7 SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS

O sequenciamento dos *amplicons* foi terceirizado junto ao Laboratório de Diagnóstico Molecular do Depto. de Microbiologia e Imunologia-IBB/UNESP, segundo a plataforma do sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems). As sequências *sense* e *antisense* obtidas foram visualizadas pelo programa Chromas 2.3, alinhadas pelo programa Mega 6.0 e então submetidas ao Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para confirmar a identidade molecular dos *amplicons* de *P. insidiosum* obtidos.

Nos Apêndices A, B e C podem ser observadas todas as sequencias de nucleotídeos obtidas no sequenciamento da região ITS, Cox-II e D1-D2, dos 20 isolados de *Pythium insidiosum*.

Ao se analisarem essas sequencias no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) obteve-se altas porcentagens de identidade com isolados de *P. insidiosum*, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Identidade molecular das sequências de ITS, Cox-II e D1-D2 dos isolados.

Isolados	isolado de maior identidade molecular e número de acesso no GenBank					
	ITS		Cox-II		D1-D2	
	% identidade e	n° acesso	% identidade	n° acesso	% identidade	n° acesso
B01	99%	JQ305801.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-2	99%	AY151168.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-3	99%	JN126298.1	99%	AF196597.1	99%	JQ305800.1
Eq-4	97%	JN126290.1	99%	AF196597.1	99%	JQ305800.1
Eq-5	79%	GQ2601231	99%	AF196597.1	99%	JQ305800.1
Eq-6	92%	AY151165.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-7	99%	AY151166.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-8	99%	JN126307.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-9	99%	JQ305801.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-10	99%	AY151168.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-11	89%	AY151158.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-12	93%	AY151157.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-13	99%	AY151166.1	99%	AF196597.1	99%	JQ305800.1
Eq-15	99%	AY151157.1	99%	AF196597.1	99%	JQ305800.1
Eq-16	99%	AY151157.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-20	99%	AY598637.1	99%	AF196597.1	99%	JQ305800.1
Eq-21	99%	AY598637.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Eq-22	95%	HQ6435701	99%	AF196597.1	99%	JQ305800.1
Eq-24	97%	JN126307.1	99%	AF196597.1	100%	JQ305800.1
Cão	97%	HQ6435701	99%	AF196597.1	99%	JQ305800.1

Elaborada pela autora

3.8 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As análises filogenéticas foram realizadas no programa Mega 6.0, após o alinhamento das sequencias pelo Clustal W.

Sequências de DNA do gene da região codificadora da citocromo oxidase II e ITS de outras espécies de fungos foram obtidas a partir da base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e foram usadas como grupo externo (*outgroup*) para análises filogenéticas por Neighbor Joining.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Na análise filogenética da região ITS observa-se baixos *bootstraps* separando os nossos isolados dos isolados do Tailândia, corroborando com AZEVEDO et al. (2012). A região ITS não representa ser um bom marcador, pois não houve a separação com consistência dos *bootstraps*. Houve apenas um forte bootstrap separando os isolados de *P. insidiosum* do grupo externo (*outgroup*). A Figura 14 ilustra a árvore filogenética dos nossos isolados em comparação aos isolados Tailandeses. (KAMMARNJESADAKUL et al., 2011) e também dos isolados de *P. insidiosum* da região Sul e Centro-Oeste do Brasil. (AZEVEDO et al., 2012). Nessa análise foram também incluídos os isolados trabalhados por AZEVEDO et al. (2012).

SCHURCKO et al. (2003) realizaram análises filogenéticas de isolados de *P. insidiosum*, baseadas na região intergênica IGS do DNA ribossomal, provenientes de várias regiões geográficas e observaram a separação em clados distintos de isolados provenientes do Continente Americano e isolados provenientes da Tailândia, embora deste último foi empregado um baixo número de isolados. BOSCO et al. (2008) ao realizarem a comparação de sequências da região ITS de dois isolados de *P. insidiosum* do Estado de São Paulo (um deles aqui novamente avaliado, o isolado B-01) observaram que esses isolados se agruparam em um mesmo clado que os isolados previamente avaliados por SCHURCKO et al. (2003), corroborando dessa forma para esses achados que os isolados do Continente Americano diferem dos Tailandeses.

A análise filogenética do CoxII permitiu a clara separação dos nossos isolados em comparação aos isolados de *P. insidiosum* da Tailândia. Os isolados da América do Sul de diferentes hospedeiros, como equinos, cão e humano, não são geneticamente distintos, ou seja, não tem associação com hospedeiro específico. As fontes ambientais são comuns para diferentes os hospedeiros. Os genótipos de *P. insidiosum* provenientes do Brasil, aqui representados pelas regiões sudeste, sul e centro-oeste, e ainda os isolados da América Central (Costa Rica) e América do Norte (Texas, USA) são relativamente homogêneos, ou seja, agrupam-se em um *cluster* próprio nitidamente separado dos isolados tailandeses, que por sua vez, aparentam ter uma maior diversidade genética.

Os genótipos americanos podem ter sido originados da região da Ásia, provavelmente Tailândia, uma vez que observou-se dois genótipos de *P. insidiosum* da Tailândia agrupados no *cluster* dos isolados americanos, sugerindo um provável efeito fundador.

Para confirmar nossas hipóteses ainda são necessários mais estudos, como a realização de análise de rede de haplótipos, *molecular clock*, além de testes de biogeografia.

Figura 14: Análise filogenética da região ITS realizada pelo método de Neighbor-Joining com *bootstrap* de 1000 replicações (Saitou & Nei, 1987). A distância evolucionária foi computada pelo método Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980) a partir do alinhamento de 79 seqüências de nucleotídeos. As análises foram realizadas no MEGA6 (Tamura et al., 2013).

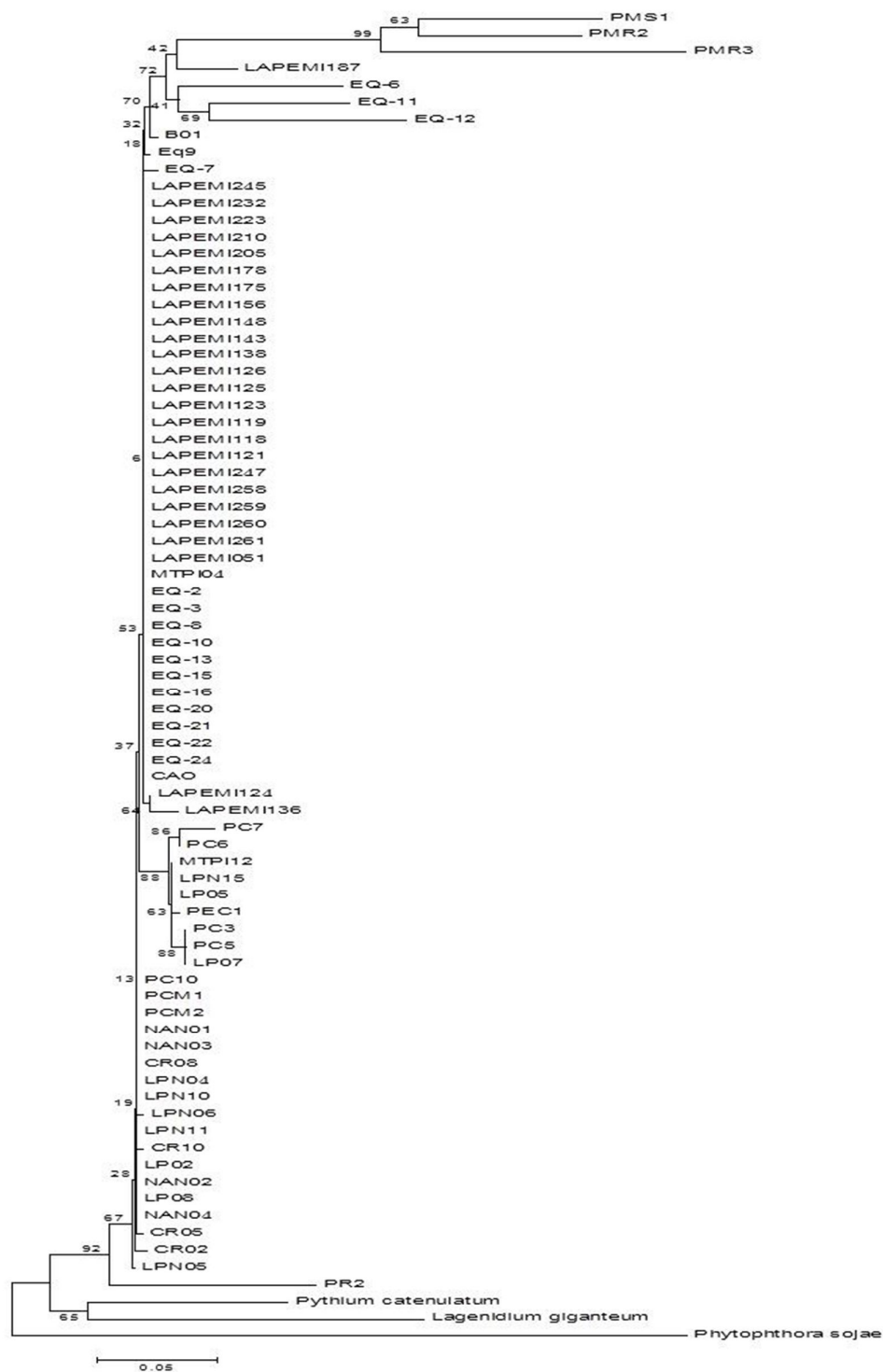
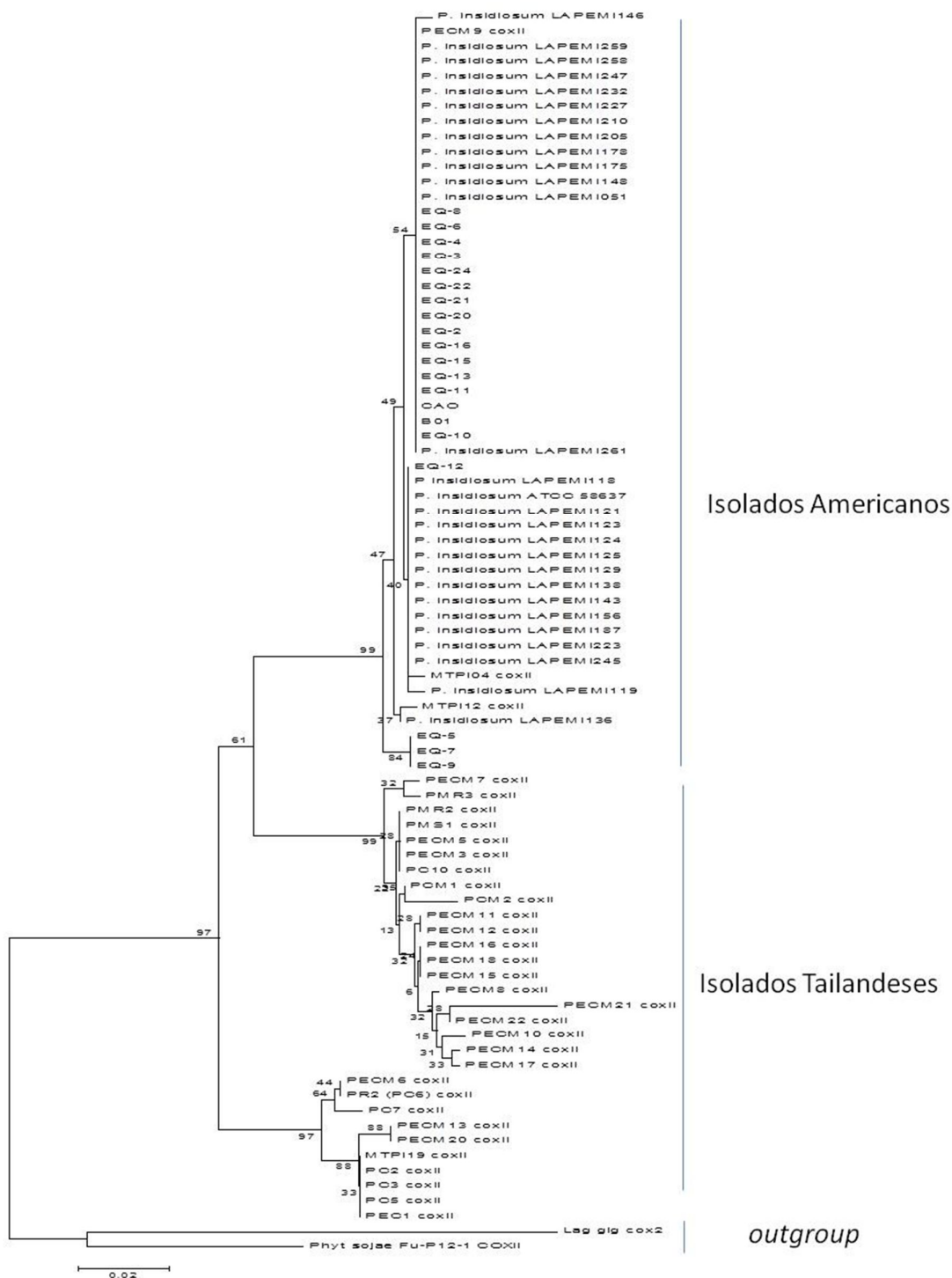
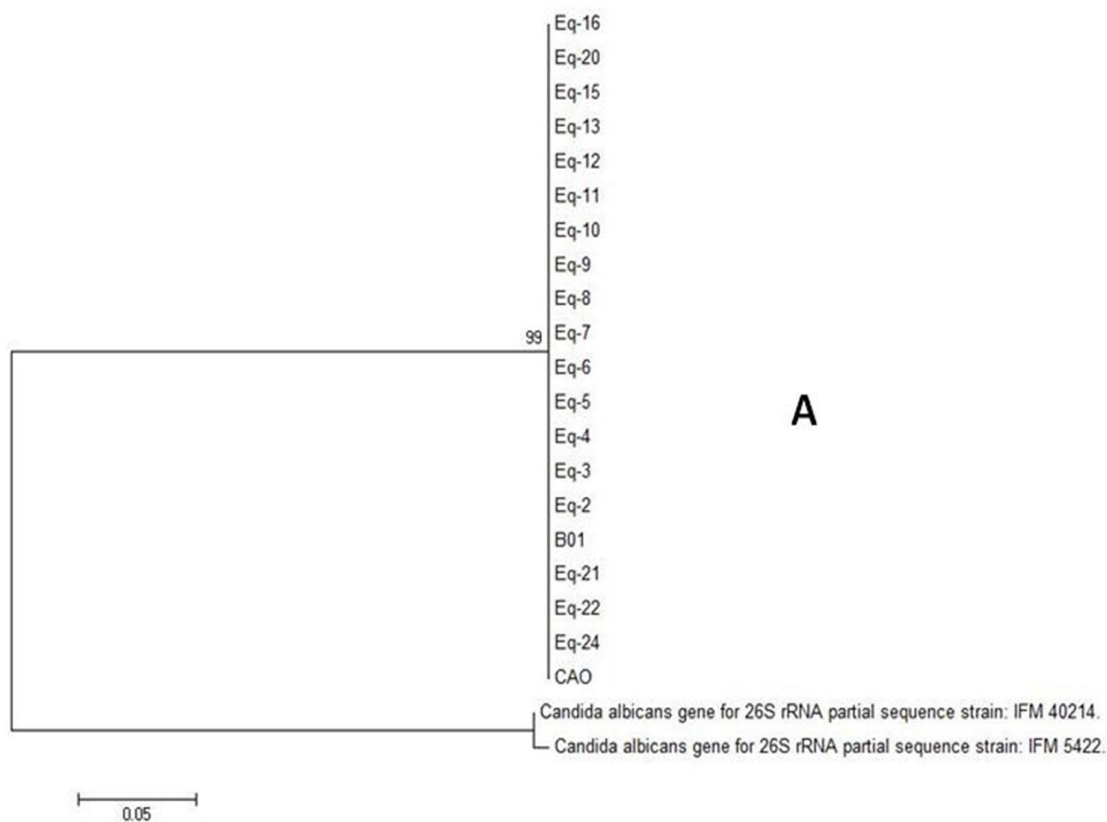


Figura 15: Análise filogenética da região Cox-II realizada pelo método de Neighbor-Joining com *bootstrap* de 1000 replicações (Saitou & Nei, 1987). A distância evolucionária foi computada pelo método Tamura 3-parâmetros (Tamura, 1992) a partir do alinhamento de 83 sequências de nucleotídeos. As análises foram realizadas no MEGA6 (Tamura et al., 2013).



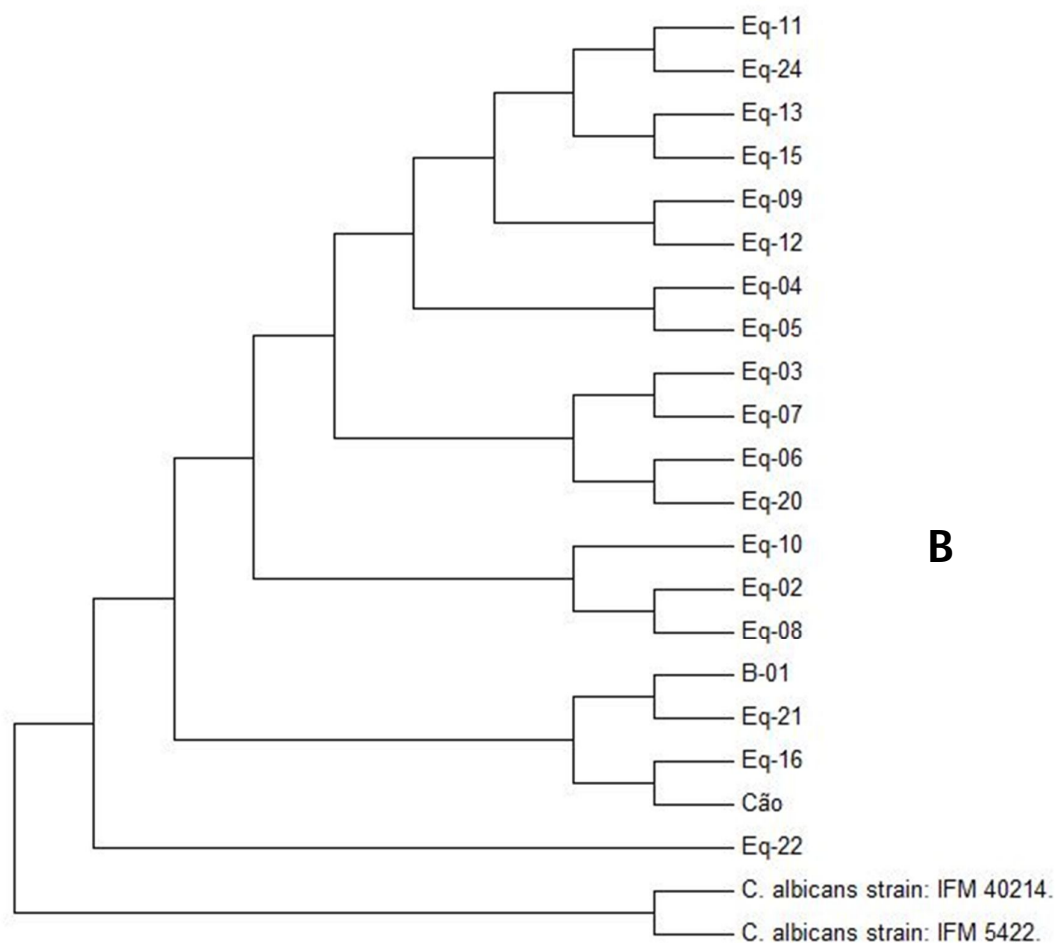
Em relação à análise filogenética da região D1-D2, não existe depósito dessa região em particular nas bases de dados do GenBank. Como observado na Tabela 3, a região D1-D2 foi a que mostrou a maior porcentagem de identidade, chegando a 100% em 12 isolados e 99% em 8 isolados. Como é observado para as leveduras do gênero *Candida*, essa região muitas vezes é a de escolha para a identificação molecular. (BRIARD et al., 1995; ECHEVERRIGARAY et al., 2013; HAYASHI et al., 2013; SATOH, et al., 2013). A análise de um maior número de isolados, incluindo isolados provenientes da Tailândia, é necessária para se inferir se a região D1-D2 é a melhor para a identificação molecular de *P. insidiosum*. As Figura 16 A e B ilustram as árvores filogenéticas baseadas na região D1-D2 da subunidade 28S do DNA ribossomal, sendo a Figura 16 A árvore original e a Figura 16 B a árvore de acordo com o agrupamento entre os nossos isolados. Para essas análises foram empregados como grupo externo (*outgroup*) cepas de *Candida albicans* depositadas no GenBank.

Figura 16:A-) Análise filogenética da região D1-D2 do DNA *ribossomal* realizada pelo método de Neighbor-Joining com *bootstrap* de 1000 replicações (Saitou & Nei, 1987). A distância evolucionária foi computada pelo método Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969) a partir do alinhamento de 22 sequências de nucleotídeos. As análises foram realizadas no MEGA6 (Tamura et al., 2013).



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 16:B-) Análise filogenética da região D1-D2 do DNA ribossomal realizada pelo método de Neighbor-Joining com *bootstrap* de 1000 replicações (Saitou & Nei, 1987). A distância evolucionária foi computada pelo método Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969) a partir do alinhamento de 22 sequências de nucleotídeos. As análises foram realizadas no MEGA6 (Tamura et al., 2013).



Fonte: Elaborada pela autora

Quadro 3: Lista de isolados de *Pythium insidiosum* empregados para as análises filogenéticas da região ITS.

Espécie	Isolado	Fonte	Origem	referência	n° acesso Genbank
<i>P. insidiosum</i>	B-01	Humano	Paraguaçu Paulista/SP – Brasil	presente trabalho	KP842832
<i>P. insidiosum</i>	Eq-2	Equino	Jaú/SP – Brasil	presente trabalho	KP842833
<i>P. insidiosum</i>	Eq-3	Equino	Barra Bonita/SP – Brasil	presente trabalho	KP842834
<i>P. insidiosum</i>	Eq-4	Equino	Itápolis/SP-Brasil	presente trabalho	KP842835
<i>P. insidiosum</i>	Eq-5	Equino	Porto Feliz/SP – Brasil	presente trabalho	KP842836
<i>P. insidiosum</i>	Eq-6	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842837
<i>P. insidiosum</i>	Eq-7	Equino	Anhembi/SP - Brasil	presente trabalho	KP842838
<i>P. insidiosum</i>	Eq-8	Equino	Paranapanema/SP – Brasil	presente trabalho	KP842839
<i>P. insidiosum</i>	Eq-9	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842840
<i>P. insidiosum</i>	Eq-10	Equino	Paranapanema/SP – Brasil	presente trabalho	KP842841
<i>P. insidiosum</i>	Eq-11	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842842
<i>P. insidiosum</i>	Eq-12	Equino	Bofete/SP – Brasil	presente trabalho	KP842843
<i>P. insidiosum</i>	Eq-13	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842844
<i>P. insidiosum</i>	Eq-15	Equino	Igaraçu do Tietê/SP – Brasil	presente trabalho	KP842845
<i>P. insidiosum</i>	Eq-16	Equino	Pereiras/SP – Brasil	presente trabalho	KP842846
<i>P. insidiosum</i>	Eq-20	Equino	Jaú/SP – Brasil	presente trabalho	KP842847
<i>P. insidiosum</i>	Eq-21	Equino	Laranjal Paulista/SP – Brasil	presente trabalho	KP842848
<i>P. insidiosum</i>	Eq-22	Equino	Araçatuba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842849
<i>P. insidiosum</i>	Eq-24	Equino	São Pedro/SP – Brasil	presente trabalho	KP842850
<i>P. insidiosum</i>	Cão	Canino	Boituva/SP – Brasil	presente trabalho	KP842851
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 051	Ambiente	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126309
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 118	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126280

<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 119	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126281
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 121	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126282
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 123	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126283
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 124	Equino	Região Centro-oeste - Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126284
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 125	Equino	Região Centro-oeste - Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126285
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 126	Equino	Região Centro-oeste - Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126286
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 136	Equino	Região Centro-oeste - Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126288
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 138	Equino	Região Centro-oeste - Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126289
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 143	Equino	Região Centro-oeste - Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126290
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 148	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126292
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 156	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126293
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 175	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126294
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 178	Equino	Região Centro-oeste - Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126295
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 187	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126296
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 205	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126297
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 210	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126298
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 223	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126300
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 232	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126302
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 245	Equino	Região Sudeste – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126303
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 247	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126304
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 258	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126305

<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 259	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126306
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 260	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126307
<i>P. insidiosum</i>	Lapemi 261	Equino	Região Sul – Brasil	Azevedo et al., 2012	JN126308
<i>P. insidiosum</i>	MTP104	Equino	Texas - EUA	Schurcko et al., 2003	GQ475490
<i>P. insidiosum</i>	CR02	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016903
<i>P. insidiosum</i>	CR05	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016906
<i>P. insidiosum</i>	CR08	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016909
<i>P. insidiosum</i>	CR10	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016911
<i>P. insidiosum</i>	PC3	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	GQ260122
<i>P. insidiosum</i>	PC5	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	GQ260120
<i>P. insidiosum</i>	PC6	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	FJ917389
<i>P. insidiosum</i>	PC7	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	GQ260124
<i>P. insidiosum</i>	PC10	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	FJ917395
<i>P. insidiosum</i>	PCM1	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	FJ917393
<i>P. insidiosum</i>	PCM2	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	GQ260121
<i>P. insidiosum</i>	PEC1	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	FJ917392
<i>P. insidiosum</i>	PMR2	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	GQ260118
<i>P. insidiosum</i>	PMR3	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	GQ260119
<i>P. insidiosum</i>	PMS1	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul et al., 2011	GQ260123
<i>P. insidiosum</i>	LP02	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016885
<i>P. insidiosum</i>	LP05	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016888
<i>P. insidiosum</i>	LP07	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016890
<i>P. insidiosum</i>	LP08	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016891
<i>P. insidiosum</i>	LPN04	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016867
<i>P. insidiosum</i>	LPN05	ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016868
<i>P. insidiosum</i>	LPN06	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al.,	EF016869

				2008	
<i>P. insidiosum</i>	LPN10	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016873
<i>P. insidiosum</i>	LPN11	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016874
<i>P. insidiosum</i>	LPN15	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016878
<i>P. insidiosum</i>	NAN01	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016896
<i>P. insidiosum</i>	NAN02	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016897
<i>P. insidiosum</i>	NAN03	Ambiente	Tailândia	Supabandhu et al., 2008	EF016898
<i>P. catenulatum</i>	ECU1	Ambiente	Tailândia		FJ917394
<i>Ph. sojae</i>	Fu-P12-1	Soja	Japão	Villa et al., 2006	AB217683
<i>L. giganteum</i>		Mosquito	Carolina do Norte - EUA	Schurcko et al., 2003	AY151183

P. catenulatum = *Pythium catenulatum* *Ph. sojae* = *Phytophthora sojae* *L. giganteum* = *Lagenideum giganteum*

Fonte: Elaborado pela autora

Quadro 4: Lista de isolados de *Pythium insidiosum* empregados para as análises filogenéticas da citocromo c oxidase (CoxII).

Espécie	isolado	Fonte	origem	referência	n°acesso Genbank
<i>P. insidiosum</i>	B-01	Humano	Paraguaçu Paulista/SP -Brasil	presente trabalho	KP842872
<i>P. insidiosum</i>	Eq-2	Equino	Jaú/SP - Brasil	presente trabalho	KP842873
<i>P. insidiosum</i>	Eq-3	Equino	Barra Bonita/SP - Brasil	presente trabalho	KP842874
<i>P. insidiosum</i>	Eq-4	Equino	Itápolis/SP - Brasil	presente trabalho	KP842875
<i>P. insidiosum</i>	Eq-5	Equino	Porto Feliz/SP - Brasil	presente trabalho	KP842876
<i>P. insidiosum</i>	Eq-6	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842877
<i>P. insidiosum</i>	Eq-7	Equino	Anhemi/SP - Brasil	presente trabalho	KP842878
<i>P. insidiosum</i>	Eq-8	Equino	Paranapanema/SP - Brasil	presente trabalho	KP842879
<i>P. insidiosum</i>	Eq-9	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842880
<i>P. insidiosum</i>	Eq-10	Equino	Paranapanema/SP - Brasil	presente trabalho	KP842881
<i>P. insidiosum</i>	Eq-11	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842882
<i>P. insidiosum</i>	Eq-12	Equino	Bofete/SP - Brasil	presente trabalho	KP842883
<i>P. insidiosum</i>	Eq-13	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842884
<i>P. insidiosum</i>	Eq-15	Equino	Igaraçu do Tietê/SP - Brasil	presente trabalho	KP842885
<i>P. insidiosum</i>	Eq-16	Equino	Pereiras/SP - Brasil	presente trabalho	KP842886
<i>P. insidiosum</i>	Eq-20	Equino	Jaú/SP - Brasil	presente trabalho	KP842887
<i>P. insidiosum</i>	Eq-21	Equino	Laranjal Paulista/SP - Brasil	presente trabalho	KP842888
<i>P. insidiosum</i>	Eq-22	Equino	Araçatuba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842889
<i>P. insidiosum</i>	Eq-24	Equino	São Pedro/SP - Brasil	presente trabalho	KP842890
<i>P. insidiosum</i>	Cão	Canino	Boituva/SP - Brasil	presente trabalho	KP842891
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI18	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159478
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI18	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159479
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI21	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159477
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI23	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159480
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI24	Equino	Região Centro-Oeste-Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159481
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI25	Equino	Região Centro-Oeste-Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159482
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI29	Equino	Região Centro-Oeste-Brasil	Azevedo, et al., 2012	N159484
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI36	Equino	Região Centro-Oeste-Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159485
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI38	Equino	Região Centro-Oeste-Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159486
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI43	Equino	Região Centro-Oeste-Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159487
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI146	Canino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159488

<i>P. insidiosum</i>	LAPMI1 48	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159489
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI1 56	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159490
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI1 75	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159491
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI1 78	Equino	Região Centro-Oeste- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159492
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI1 87	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159493
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 05	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159494
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 10	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159495
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 23	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	N159497
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 27	Equino	Região Centro-Oeste- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159498
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 32	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159499
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 45	Equino	Região Sudeste- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159500
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 47	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159501
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 58	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159502
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 59	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159503
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI2 61	Equino	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159505
<i>P. insidiosum</i>	LAPMI0 51	Água	Região Sul- Brasil	Azevedo, et al., 2012	JN159507
<i>P. insidiosum</i>	ATCC58 637	Equino	Costa Rica	Azevedo, et al., 2012	JN159506
<i>P. insidiosum</i>	MTPI04	Equino	Texas-USA	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45157 1
<i>P. insidiosum</i>	MTPI12	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45157 0
<i>P. insidiosum</i>	MTPI19	Equino	Costa Rica	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45156 9
<i>P. insidiosum</i>	PC2	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45156 9
<i>P. insidiosum</i>	PC3	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45157 3
<i>P. insidiosum</i>	PC5	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45159 0
<i>P. insidiosum</i>	PC6	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45157 4
<i>P. insidiosum</i>	PC7	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45158 8
<i>P. insidiosum</i>	PC10	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45157 5
<i>P. insidiosum</i>	PCM1	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ45158 7

<i>P. insidiosum</i>	PCM2	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451591
<i>P. insidiosum</i>	PEC1	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451576
<i>P. insidiosum</i>	PECM3	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451577
<i>P. insidiosum</i>	PECM5	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451578
<i>P. insidiosum</i>	PECM6	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451579
<i>P. insidiosum</i>	PECM7	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451580
<i>P. insidiosum</i>	PECM8	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451581
<i>P. insidiosum</i>	PECM9	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451602
<i>P. insidiosum</i>	PECM10	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451603
<i>P. insidiosum</i>	PECM11	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451582
<i>P. insidiosum</i>	PECM12	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451596
<i>P. insidiosum</i>	PECM13	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451594
<i>P. insidiosum</i>	PECM14	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451597
<i>P. insidiosum</i>	PECM15	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451598
<i>P. insidiosum</i>	PECM16	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451599
<i>P. insidiosum</i>	PECM17	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451600
<i>P. insidiosum</i>	PECM18	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451601
<i>P. insidiosum</i>	PECM20	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451595
<i>P. insidiosum</i>	PECM22	Ambiente	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451592
<i>P. insidiosum</i>	PMR2	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451583
<i>P. insidiosum</i>	PMR3	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451584
<i>P. insidiosum</i>	PMS1	Humano	Tailândia	Kammarnjesadakul, et al., 2011	GQ451586
<i>Ph. sojae</i>	Fu-P12-1	Soja	Japão		DQ071416
<i>L. giganteum</i>		Mosquito	Carolina do Norte - EUA	Schurcko, et al., 2013	AF086697

P. catenulatum = *Pythium catenulatum* *Ph. sojae* = *Phytophthora sojae* *L. giganteum* = *Lagenideum giganteum*

Fonte: Elaborada pela autora

Quadro 5: Lista de isolados de *Pythium insidiosum* empregados para as análises filogenéticas da região D1-D2.

Espécie	Isolado	Fonte	Origem	referência	n° acesso Genbank
<i>P. insidiosum</i>	B-01	Humano	Paraguaçu Paulista/SP – Brasil	presente trabalho	KP842852
<i>P. insidiosum</i>	Eq-2	Equino	Jaú/SP – Brasil	presente trabalho	KP842853
<i>P. insidiosum</i>	Eq-3	Equino	Barra Bonita/SP – Brasil	presente trabalho	KP842854
<i>P. insidiosum</i>	Eq-4	Equino	Itápolis/SP - Brasil	presente trabalho	KP842855
<i>P. insidiosum</i>	Eq-5	Equino	Porto Feliz/SP – Brasil	presente trabalho	KP842856
<i>P. insidiosum</i>	Eq-6	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842857
<i>P. insidiosum</i>	Eq-7	Equino	Anhembi/SP - Brasil	presente trabalho	KP842858
<i>P. insidiosum</i>	Eq-8	Equino	Paranapanema/S P – Brasil	presente trabalho	KP842859
<i>P. insidiosum</i>	Eq-9	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842860
<i>P. insidiosum</i>	Eq-10	Equino	Paranapanema/S P – Brasil	presente trabalho	KP842861
<i>P. insidiosum</i>	Eq-11	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842862
<i>P. insidiosum</i>	Eq-12	Equino	Bofete/SP – Brasil	presente trabalho	KP842863
<i>P. insidiosum</i>	Eq-13	Equino	Piracicaba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842864
<i>P. insidiosum</i>	Eq-15	Equino	Igaraçu do Tietê/SP – Brasil	presente trabalho	KP842865
<i>P. insidiosum</i>	Eq-16	Equino	Pereiras/SP – Brasil	presente trabalho	KP842866
<i>P. insidiosum</i>	Eq-20	Equino	Jaú/SP – Brasil	presente trabalho	KP842867
<i>P. insidiosum</i>	Eq-21	Equino	Laranjal Paulista/SP – Brasil	presente trabalho	KP842868
<i>P. insidiosum</i>	Eq-22	Equino	Araçatuba/SP - Brasil	presente trabalho	KP842869
<i>P. insidiosum</i>	Eq-24	Equino	São Pedro/SP – Brasil	presente trabalho	KP842870
<i>P. insidiosum</i>	Cão	Canino	Boituva/SP – Brasil	presente trabalho	KP842871

C. albicans = *Candida albicans*

Elabora pela autora

5 CONCLUSÃO

De acordo com a análise das árvores filogenéticas, pode-se concluir que a região ITS, não é a mais adequada para avaliar uma variabilidade intraespecífica. A região do citocromo c oxidadase II (COX-II), indica ser um melhor marcador molecular, para separar os isolados de acordo com a origem geográfica, além de permitir melhor avaliação intraespecífica. A análise da região D1-D2 mostrou alta percentagem de homologia com os dados do GenBank, evidenciando ser uma boa região para auxiliar na identificação molecular de *P. insidiosum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**.4. Ed. New York: John Wiley & sons, Inc., 1996.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.E.; BIRMINGHAM, LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.S.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v.18, p. 489-522, 1987.

AZEVEDO, M.I.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B.; ROBE, L.J.; JESUS, F.P.K.; MAHL, C.D.; COSTA, M.M.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. **Vet. Microbiol.**, v. 159, p. 141- 148, 2012.

BIRLEY, A.J.; CROFT, J.H. **Mitochondrial DNAs and Phylogenetic Relationships**: Evolution. In: DUTTA, S.K.; PH, D. **DNA Systematics**: Boca Raton, Florida: Crc, Press, 1988, p.107-139.

BOSCO, S.M.G.; BAGAGLI, E.; ARAÚJO Jr.; J.P.; et al. Human pythiosis Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, p. 715-717, 2005.

BRIARD, M.; DUTERTRE, M.; ROUXEL, F.; BRYGOO, Y. Ribosomal RNA sequence divergence within the Pythiaceae. **Mycol. Res.**, v. 99, p. 1119-27, 1995.

CALVANO, T.P.; BLATZ, P.J.; VENTO, T.J.; WICKES, B.L.; SUTTON, D.A.; THOMPSON, E.H.; WHITE, C.E.; RENZ, E.M; HOSPENTHAL, D.R. *Pythium aphanidermatum* Infection following Combat Trauma. **J. Clin. Microbiol.**, v.49, p. 3710–3713, 2011.

De COCK, A. W. A. M.; MENDOZA, L.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L.; KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. nov.; the etiologic agent of pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p.344-9, 1987.

DICK M.W. *Keys to Pythium*. Reading, UK: **University of Reading, School of Plant Science, Department of Botany**, p.64, 1990.

ECHEVERRIGARAY, S.; RANDON, M.; da SILVA, K.;ZACARIA, J.; DELAMARE, A.P. Identification and characterization of non-saccharomyces spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 29 , p. 1019-27, 2013.

GAASTRA, W.; LIPMAN, L.J.A.; De COCK, A.W.A.M.; EXEL, E.T.; PEGGE, R.B.G.; SCHEURWATER, R.V.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: an over-view. **Vet. Microbiol.**, v.146, p. 1–16, 2010.

GANDHI, S.R.; Weete, J.D. Production of polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*. **J. Gen. Microbiol.**, v.137, p.1825-1830, 1991.

GARZON, C.D.; YANEZ, J.M.; MOORMAN, G.W. *Pythium cryptoirregulare*, a new species within the *P. irregulare* complex. **Mycologia**, v.99, p.291–301, 2007.

GROOTERS, A.M.; GEE, M.K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 16, p. 147-152, 2002.

HAYASHI, T.; SUGITA, T.; HATA, E.; KATSUDA, K.; ZHANG, E.; KIKU, Y.; SUGAWARA, K.; OZAWA, T.; MATSUBARA, T.; ANDO, T.; OBAYASHI, T.; ITO, T.; YABUSAKI, T.; KUDO, K.; YAMAMOTO, H.; KOIWA, M.; OSHIDA, T.; TAGAWA, Y.; KAWAI, K. Molecular-based identification of yeasts isolated from bovine clinical mastitis in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 75, p. 387-390, 2013.

IWEN, P.C.; HINRICHS, S.H.; RUPP, M.E. Utilization of the Internal Transcribed Spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Med. Mycol.**, v.40, p.87-109, 2002.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. **Evolution of protein molecules**. In: MUNRO, H.N, **Mammalian Protein Metabolism**, New York: Academic Press, 1969, p. 21-132.

KAMMARNJESADAKUL, P.; PALAGA, T.; SRITUNYALUCKSANA, K.; MENDOZA, L.; KRAJAEJUN, T.; VANITTANAKOM, N.; TONGCHUSAK, S.; DENDUANGBORIPANT, J.; CHINDAMPORN, A. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and Internal Transcribed Spacer Regions (ITS). **Med. Mycol.**, v. 49(3), p. 289-95, 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111-120, 1980.

LOHNOO, T.; JONGRUJA, N.; RUJIRAWAT, T.; YINGYON, W.; LERKSUTHIRAT, T.; NAMPOON, U.; KUMSANG, Y.; ONPAEW, P.; CHONGTRAKOOL, P.; KEERATIJARUT, A.; BRANDHORST, T.T.; KRAJAEJUN, T. Efficiency Comparison of Three Methods for Extracting Genomic DNA of the Pathogenic Oomycete *Pythium insidiosum*. **J. Med. Assoc. Thai**. V.97. p. 342-348, 2014.

MARQUES, S.A.; BAGAGLI, E.; BOSCO, S.M.G.; CAMARGO, R.M.P.; MARQUES, M.E. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81(5), p. 483-5, 2006.

MARTIN, F. Phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. **Mycologia**, v. 92, p. 711–727, 2000.

MARTIN, F.N. Linear mitochondrial genome organization in vivo in the genus *Pythium*. **Curr. Genet.**, v.28, p.225-234, 1995.

MARTIN, F.N.; LOPER, J.E. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. **Crit. Rev. P1 Sci.**, v. 18, p.111-181, 1999.

MCNABB, S.A.; BOYD, D.A.; BELKHIRI, A.; DICK, M.W.; KLASSEN, G.R. An inverted repeat composes more than three-quarters of the mitochondrial genome in two species of *Pythium*. **Curr. Genet.**, v. 12, p.205-208, 1987.

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Clin. Microb.**, v.31, p. 2967-2973, 1993.
PESAVENTO, P.A.; BARR, B.; RIGGS, S.M.; et al. Cutaneous Pythiosis in a Nestling White-faced Ibis. **Vet. Pathol.**, v. 45, p. 538–541, 2008.

PIRES, L.; BOSCO, S.M.G.; BAPTISTA, M.S.; KURACHI, C. Photodynamic Therapy in *Pythium insidiosum* – **An In Vitro Study of the Correlation of Sensitizer Localization and Cell Death. PloS One**, v. 9, 2014.

PIRES, L., BOSCO, S.M.G., SILVA, N.F. JR, KURACHI, C. Photodynamic therapy for pythiosis. **Vet Dermatol.**, v. 24, p. 130-136, 2013.

RAVISHANKAR, J.P.; DAVIS, C.M.; DAVIS, D.J.; Macdonald, E.; MAKSELAN, S.D.; MILLWARD, L.; MONEY, N.P. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fung. Genet. Biol.**, v. 34, p.167–175, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p. 406-425, 1987.

SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; PEREIRA, D.B.; ARGENTA, J. S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 1-14, 2006.

SANTURIO, J.M.; MONTEIRO, A.B.; LEAL, A.T.; KOMMERS, G.D.; DE SOUSA, R.N.; CATTO, J.B. Cutaneous Pythiosis insidiososi in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia.**, v. 141, p. 123-25, 1998.

SATOH, K.; MAEDA, M.; UMEDA, Y.; SUGAMATA, M.; MAKIMURA, K. *Cryptococcus lacticolor* sp. nov. and *Rhodotorula oligophaga* sp. nov., novel yeasts isolated from the nasal smear microbiota of Queensland koalas kept in Japanese zoological parks. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.104, p. 83-93, 2013.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDOERFC, S.; ROBERTD, V.; SPOUGEA, J.L.; LEVESQUEB, C.A.; CHENB, W., and Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **PNAS**, v.109. n. 16 p. 6241–6246, 2012.

SCHURCKO, A.; MENDOZA, L.; DeCOCK, A.W.A.M.; Klassen, G.R. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and Americas are explored. **Mycol.**, v. 95, p. 200-208, 2003.

SUPABANDHU J, FISHER MC, MENDOZA L, VANITTANAKOM N. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Med Mycol.**, v. 46, p. 41-52, 2008.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p.678-687, 1992.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI A.; KUMAR S. MEGA6: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution**, v.30, p. 2725-2729, 2013.

THIANPRASIT, M.; CHAIPRASERT, A.; IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis. **Curr. Topics. Med. Mycol.**, v. 7, p. 43-54, 1996.

THONGSRI, Y.; WONGLAKORN, L.; CHAIPRASERT; A.; SVOBODOVA, L.; HAMAL, P.; PAKARASANG, M.; PRARIYACHATIGUL, C. Evaluation for the clinical diagnosis of *Pythium insidiosum* using a single-tube nested PCR. **Mycopathologia**, v.176, p.369-376, 2013.

TRISCOTT, M.A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **J. Cutaneous Pathol.**, v. 20, p. 267-71, 1993.

VAN BURIK, J.A.; SCHRECKHISE R.W.; WHITE, T.C.; BOWDEN,R.A.; MYERSON,D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. **Med. Mycol.**, v.3, p. 299–303, 1998.

VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology**, no. 21, p. 200-239, 1981.

VAZ Jr; ITABAJARA Da Silva. **Bioenergética e Metabolismo: Mitocôndrias, Cloroplastos e Peroxissomos**. In: COOPER, G.M. **A Célula: Uma Abordagem Molecular**. 2.ed. São Paulo: Artmed, 2002, p. 411-444.

VILLA, N.O.; KAGEYAMA, K.; ASANO, T.; SUGA, H. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and beta-tubulin gene sequences. **Mycol.**, v.98, p.410–422, 2006.

**APÊNDICE A - SEQUÊNCIA PARCIAL DE OLIGONUCLEOTÍDIOS DA REGIÃO ITS-1, 5.8S E ITS-2 DO DNA
RIBOSSOMAL DE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum*.**

isolados	sequência de oligonucleotídeos
B01	GTTCTAAATATGTTCTGTTGCTTCGTCGAAGCGGACTGATCTCTCCCGGAGAATGGTCTTGCGACGGCTTGAGGCTGAACGAAAGGCTTGCTCAGTAACTCGTATGACTCTCGGGTTGTACGGCGGAACTGCTGGCCGATGTCTTTTTCAAACCCATTTTTACTAAACACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAAAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCCGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCGTACATCAAACCTGCCTTTCTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAAAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCCCTCTTTTGGGAGATAGCACGATCCCCTTAAATGTACGTTGATCCTCTTAAATGTACGTTGATCTCTTTGAGGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTGTTCCGTTCTTTCCCTTGAGGTGTACCTGTCTGTGTGAGGTGCGAACTGGACGCTGGTTATTGTGTAGTAGATTGCTGCGCTTTGACGCTTCGGGTAAGAAGGACGACACTAATTTGGGAACGGAA
Eq-2	CATTACCACCACCTAAAACTTTCCACGTGAACCGGTTCTAAAAATATGTTTCTTGCTTCGTCGAAGCGGACTTGCATTCTCTCCGGAGAGAATTGGTCTTGGCCGACGGCTTGGAGGCCGAACCGAAAGGCCCTTGCCTCCAGTTGACTTCGTTATGGACTCTTTCGGGTTGTTACCGGTCCGAAACTTGCTTGCCGGAATGTTCCTTTTCAAACCCCATTTTACTAAACACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCCGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGCCGTACATCAAACCTGCCTTTCTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCCCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTAAATGTACGTTGATCCTCTTTGAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTTTCCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTTGAGGTGTA
Eq-3	AATATGTTCTGTGCTTCGTCGAAGCGGACTGCTCTCTCCCGGAGAATGGTCTTGCGACGGCTTGAGGCTGAACGAAGGCTTGCTCAGTAACTCGTATGACTCTCGGGTTGTACGGCGGAACTGCTAGCCGATGTCTTTTTCAAACCCATTTTACTAAACACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCCGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGCCGTACATCAAACCTTTCCTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCCCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTAAATGTACGTTGATCTCTTTGTGTCTTAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTTTCCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTCTGAGGTGTACCTGTCTGTGTGAGGTGCGAACTGGACGCTGGGTAATTGTGTAGTAGATTGCTGCGCTTTGACGCTTTCCGGGTAAAGAGGACGACACTAATTTGGGGAACGGAGAACTGCGGCTTCT
Eq-4	CCAAATTAGTGTGCTCCTCTTTACCCGAAGCGGTCCAAAGCGGCAGCAATACTTACTACACCAATAACCAGCGTTCCAGTTCGACCTCACACCACGACAGGTACACCCTCAAGGAAAGAACGGAAACAACACCCCGTCAAGCTGCAACGTCGGGCCGAAGCCTAACATACCGCCAATAGAGGGTCACTCCTTAATGTCTTTCCGAAGTCGCCACCCAGCGCAAAGCAATCTGAACAGATCACTGCGTTCGAGCATTACACTTCACTAAGACACAAGAGAGATCAACGTACATTTAAAGGGACTCGTGCTATCTCCCAAAAAGAGGGGACGGCTCGAGACACCTCACATTCTGCCATCTCGATTCTGACTACACAGAAAAAGAAAGGCAAGTTTGATGTACGGACACTGATACAGGCATACTTCCAGGCATAACCCGAAAGTGAATATGCGTTCAAAATTTGATGACTCACTGAATCCTGCAATTCGCATTACGTATCGCAGTTCGCAGCGTTTTTCATCGATGTGCGAGCCTAGACATCCACTG

	CTGAAAGTTGTTAATGGATTA AAAACCAAAGACTTTCGTCTCGGAGTATAGATCAGTGTGTTAGTAAAAATGGGGTTTGAAAAAACATCGGCTCAGCAGTTCGGCCGTACAACCCGAGGAGTCATACGAGTACTGAGCAGGCTTTCGTTTCAGCCTTCAAGCCGTGCGAAGACCATTCTCGGGAGAGAGCAGTTCGGCTTCGACGAAGCACAGAACA
Eq-5	GCCGCAGTTCTCCGTTCCCAAATTAGTGTCCTCTTTACCCGAGGGCGTCAAAGCGCAACAACACTCTACTACACAATAACCAGCGTCCTTCTCCCCCTCACACACCAGGGGCACCCCTCGGGGTAGAAAGGAGACACAACACCCCTCCTGTGCCGCGTGGGGCAAACCCTCATATAGCCCCTATAGAGGTCTCTCTTTGTGTTTTTCAAACCTCCCCCCCCGCGCAAAAATCTCTGAACATATCTGTGTGCTAGAGTTTTACACTTCTCAAACACACAAGAGAGATCCGCGCATTTTTAGGGGACTCGCGCTCTCTCCAAAAAGAGGGGAGGGCGCGAGACACCTCACACTCTGCTCTCTCTATTTGTGACTACACAAAAAAAAGAGGCGTGTGTTATGTGGACACACTGATACGCGTATATCCCGGCGCATCCCCGAGAGTGCAATATGTGGCTCAAAATTTATAAGACACTCTGTCTCGCGCATTCACAATATATATCGCATCGCGCAGCGCTTTTTATCTGTGTGCGCGTCTACACATCTGTGGTGAGAGGTGTATGGGTAAAAAAAACAACACTCTCCCCTCTCAGAATATATATCAGTGTATAAAAAAGTGGGGTGTAAAAAACATATCGCTAGCGCATTTTCCCCGCAACACCCCGAGAGTTATAAGAGTACTGTGAGAGCGTTTTTTTCATACCTCTCAAACGTCTCACGAGAAATTTTTCCGAGAGAGAGAACCCCTTTTTCCAAAAACAAAAAATTTTTAAAGGGT
Eq-6	CCACGTGAACCCGTTCTAAATATGTTCTGTGCTTCGTGAAAGCGGACTGCTCTCCGGAGAATGGTTCCTTGCACCCGGCTTGGAAGGCTGAACGAAGGGCCTTGCTCAGTGAACTCGTAATGACCTCCTCGGGTTGTTACGGTGGAAGTGTGGCCGATGTCTTTTTCAAACCCATTTTCTAAACACTGGTCTATACTCCAGGAACAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAAACAATTCAGCAGTGGATGGCTAGGCTCCACATCCATGA AAAACGCTGCCAACTGGCATACTAATGGGAATTGGAGACTCCGTGAGTCATCCAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCCGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGGATCAATGGCCGTACCTCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGGGGAATCCGGAATCCAAATGGCAAATGGGAGGTGGCTCCAGCCCTCCCCTCCTTTTTGGGAGATAACACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTCTTTGTGTCTTAATGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTTCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAAGGCTTCCGGGCCCGACGTTGCAGCTGAACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTTGAGGTGTACCTGTCGTGTGTGAGGTGCAACTGGACGCTGGTTATTGTGT
Eq-7	CATTACCACACCTAAAACTTTCCACGTGAACCGTTCTAAATATGTTCTGTGCTTCGTGAAAGCGGACTGCTCTCCGGAGAATGGTCTTGCGACGGCTTGAGGCTGAACGAAGGCTTGCTCAGTAACTCGTATGACTCTCGGGTTGTACGGCGGAAGTGTGGCCGAATGTCTTTTTCAAACCCATTTTACTAAACACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAAACAATTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCCAAGTGCATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAATCAGTGCATCCAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCCGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCCCTCTTTTTGGGAGATAGCAGGACTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTTTCTTTGTGTCTTAGTGAAGTGTAAATGCTCGAACGAGTACGAGTGTTCAGATTGCTTTTGCCTTTTGGCGCTGGTGGGCGACTTCGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTGGCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTTGAGGTGTACCTGTCGTGTGTGAAGGTGCAACTGGACGCTGGTTATTGTGTAGTAAAGTATTGCTGCGCTTTGACGCCTTCCGGTAAAGAGGACGACT
Eq-8	GCGGACTGCTCTCTCCGGgAGAATGGTCTTGCGACGGCTTGAGGCTGAACGAAGGCTTGCTCAGTAACTCGTATGACTCTCGGGgTTGTACGGCGAAGTGTGGCCGATGTCTTTTTCAAACCCATTTTACTAAACACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAA CAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCCAAGTGCATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAAGTCA TCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCCGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTG TAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCCCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATC TCTCTTGTGTCTTAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGTCTGTTTCAAGTTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGAAAGGACATTAAGG AGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTTGAGGTGTACCTGT CGTGTGAGGTGCAACTGGACGCTGGTTATTGGTGTAGTAGAGTATTGGCTGCGCTTTGACGCCTTCCGGTAAAGAGGGACGACTAAT TTGGG

Eq-9	GAAGCTGCCTCTTCTCCCGGGAGAAATGGTCTTGCACGGCTTGAGGCTGAACGAAGACTTGCTCAGTAACTCGTATGACTCTCGGGTTGT ACGGTGGAACTGCTAGCCGATGTCTTTTTCAAACCCATTTTACTAAACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTA ACAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCCAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTC ATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTATGCCTGGAAGTATGCCCGTATCAGTGCCGTACATCAAACCTGCCCTTTCTTTTTCTGT GTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGAT CTCTCTTGTGCTTAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTTTCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGGAAAGGACATTAAG GAGATGACCTCTATTGGGCGGTAATGTTAGGCTTTCCGGCCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTT
Eq-10	AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTCTAAATATGGTTCTGTGCTTCGTGCAAGCGGACTGCATCTCTCCGGAGAATGGTCTTGCACGGCTTG AGGCTGAACGAAGGCCTTGCTCAGTAACTCGTATAGACTCTCTGGGTTGTACGGGGGAACTGCTGGCCCGATGTCTTTTTCAAACCCATTT TTACTAAACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGAT GAAGAACGCTGCCAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTATGC CTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTC GAGCCGTCCCCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTTGTGTCTTAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAG TGATCTGTTTCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCC GACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTGAGGTGTACCTGTCGTGTGAGGTGCAACTGGACGCTGGTTATTGTGTAGT AGATATTGCTGCGCTTTGACGCCTTCGGGTAAAGAGGACGACACTAATTTGGGAACGAAAACCTGCGGCTTCTTGTCTGCGGCTT
Eq-11	CATTACCACCACTAAAAAACTTTTTGCACGTGAACCGTTCTAAATATTGTTCTGTTGGCTTCGTGCAAGCGGACTGCTCTCTCTCCCGGAGAAT GGGTTCTTGCCAACCGGCTTGAAGGCTGAAACGAAGGGCCTTGCTCTAAAGTAACTCGGATATGACTCTTCCGGGTTGTTACGGGCCGGAA CTGCCTTGCCGATTGTCTTTTTCAAACCCATTTTACTAAACACGGATCTATACTCCAAGGACAAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACA ACTTTACCAGGGGATGTCTAGGCTCGCACATCAATAAAAAACCCTGCAAACTGCAATACTTAAGGCGATTGGCAGGATCCATGGAGTCATC AAAATTTTACCAGCATATGGCACTTTCGGGTAATGCCTGGAATTATGCTGGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCCGGGA AGTCAGGAATCGAGATGGCAAAGTGTGAGGTGTCTCAACCCGTTCCCTCTTTTTGGGAAAAAGCACGAGTCCCTTTAATTGTACGTTGATCT CTCTTGTGCTTAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTTTCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGGAAAGGACATTAAGGA GATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGA
Eq-12	GTGGAAGTGCGAAGATCATACACACACCTAAAAACCTTTCCACCGGTGAACCGGTTCTTAAATATTGTTCTGTTGCTTCGTGCAAGGCGGAC TGCTTCTCTCCCGAAGATTGGTCTGAGACGGCTTGAGGCTGAACGAAGGCTTGCTCAGTAACTCGTATGACTCTCGGGTTGTACGGCGG AACTGCTAGCCGATGTCTTTTTCAAACCCATTTTACTAAACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACCTT TCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCCAATGAAGAACGCTGCCAACTGCGATACGAAATGCAATTTGCAGAATCCGGGGATCCACGGA ATTTTTGACCGCATATTGGCCCTTTCCGGTTATGGCCGGGAGGTTGGCCTGTTTCGGGGCCCGTACATTAACCTTGGCTTTCTTTTTCCGGGG AGTCAAGAAATCCAAATGGGCAAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCCCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCT CTCTTGTGCTTAGTGAAGTGAATGGCTCGAACGCAGTGATCTGTTTCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGGACTTCGGAAAGGACATTA GGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTTTGAGGTGTACCT GTCGTGTGTGGAAGTGCAACTGGACGCTGGTTATTGTGTAGTAGATTGCTGCGCTTTGACGCCTTCGGGTAAAGAGGACGACACCTA ATTTGGGAACGGAAGAACTGCGGCTTCTTGTGCGGCTTTCTGAACTTTCAAATTGG
Eq-13	AAAACTTTCCACGTGAACCGTTCTAAATATGTCTGTGGCTTCGTGCAAGCGGACTGCTCTCCTCGAGGAAATGGTCTTGCACGGCCTTGA GGCTGAACGAAGGCTTGCTCAGTAACTCGTATGACTCTCGGGTTGTACGGCGGAACTGCTAGCCGAATGTCTTTTTCAAACCCATTTTACTA AACACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACCTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGA ACGCTGCCAACTGCGATACGTAATGCGAATTGGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTATGCCTGG AAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGC

	CGTCCCCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTCTTTGTGCTTAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTTTCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCCCTTG
Eq-15	TATGTTCTGTGCTTCGTGCGAAGCGGACTGCTCTCTCCCGGAGAATGGTCTTGCACGGCTTGAGGCTGAACGAAGGCTTGCTTCAGTGAACTCGTATGACTCTCGGGTTGTACGGCGGAAGTCTGGCCGATGCTTTTTCAAACCCATTTTTACTAAACACTGATCTATACTCCGAGGACGA AAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGC GAATTGCAGGATTGAGTGAGTCATCGAAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGCCGTACAT CAAACTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCTCTTTTTGGGAGATAGCACG AGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTTTGTGCTTAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTTTCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGG CCGACTTCGGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGT TCTTTCTTTGAGGTGTACCTGTCTGTGTGAGGTGCGAAGTGGACGCTGTTATTGTGTAGTAGAGTATTGCTGCGCTTTGACGCCTTCGGGT AAAGAGGACGACACTAATTTGGGAACGGAGAAGTTCGGGCTTCTTGCTGCGGCTTTCTGA
Eq-16	CATTACCACACCTAAAACTTTCCACGTGAACCGTTCTAAATATGTTCTGTGCTTCGTGCGAAGCGGACTGCTCTCTCCGGAGAATGGTCTTGC GACGGCTTGAGGCTGAACGAAGGCTTGCTCAGTGACTCGTATGACTCTCGGGTTGTACGGCGGAAGTCTGGCCGATGCTTTTTTCAAAC CCATTTTTACTAAACACTGATCTATACTCCGAGGACAAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC ATCGATGAAGAACGCTGCGAAGTGCATACGTAATGCGAATTGCGAATTGCGAGTTCAGTGCATCGAAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCCGGG TTATGCCGGAAGTATGCCTGTATCAGTGCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGG TGTCTCGAGCCGTCCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTCTTTGTGCTTAGTGAAGTGAATGCTCGA ACGCAGTGATCTGTTTCAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTC GGCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTTTGAGGTGTACCTGTCTGTGTGAGGTGCGAAGTGGACGCTGGTTATTG TGTAGTAGAGTATTGCTGCGCTTTGACGCCTTCGGGTAAAGAGGACGACACTAATTTGGGAACGGAGAAGTGC
Eq-20	CTTTCCACGTGAACCGTTCTAAATATGTTCTGTGCTTCGTGCGAAGCGGACTGCTCTCTCCGGAGAATGGTCTTGCACGGCTTGAGGCTGAA CGAAGGCTTGCTCAGTGACTCGTATGACTCTCGGGTTGTACGGTGGAAGTCTGGCCGATGCTTTTTCAAACCCATTTTTACTAAACACTGA TCTATACTCCGAGGACGAAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCG AACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCCGGGTTATGCCTGGAAGTATGCCT GTATCAGTGTCGGTACATCAAACCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCTCTCT TTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTCTTTGTGCTTAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTTTCAGAT TGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCCGACGTTTGCAGCTG ACGGGGTTGTTGTTTCCGTTCTTTCTTTGAGGTGTACCTGTCTGTGTGAGGTGCGAAGTGGACGCTGGTTATTGTGTAGTAGAGTATTGCT GCGCTTTGACGCC
Eq-21	CTTTCCACCGTGAACCGTTCTAAATATGTTCTGTGCTTCGTGCGAAGCGGACTGCTCTCTCCGGAGAATGGTCTTGCACGGCTTGAGGCTG AACGAAGGCTTGCTCAGTGACTCGTATGACTCTCGGGTTGTACGGCGGAAGTCTGGCCGATGCTTTTTCAAACCCATTTTTACTAAACA CTGATCTATACTCCGAGGACGAAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGC TGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTATGCCTGGAAGTAT GCCTGTATCAGTGTCGGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTC CTTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTTTGTGCTTAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTT CAGATCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCCGACGTTGCA GCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTTTGAGGTGTACCTGTCTGTGTGAGGTGCGAAGTGGACGCTGGTTATTGTGTAGTAGAGTAT TGCTTGCCTTTGACGCCTTCGGGTAAAGAGGACGACACTAATTTGGGAACGGA

Eq-22	<p>ACCACACCTAAAAACTTTCCACCGTGAACCGGTCTAAATATGTTCTGTGGCTTCGTTCCGAAAGCGGGACTGCTCTCTCCGGAGGATGGT CCTTGCAGGACGGGCTTGGAGGCCTGAACGAAAGGCTTTGCTCCAGTTACCTCCGTAATGACTCTCTCGGGGTTGTTACGGTGGGAACTGCT TGCCGGAAGTTTTTTTTCAAACCCAAATTTACTAAACACTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACCTTTAG CAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTT TGAACGCCATATTGCACTTTTCGGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTCTGTGTAGTCAG GAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCCCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTCTTG TGCTTATAGTGAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTTGAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGAAAGGACATTAAGGAGATGAC CTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCGACGTTGCAGCTGACGGGGTGTGTTCCGTTCTTTCTTGGAGGTGTACCTGTCGTGTGTGA GGTCAACTGGACGCTGGTT</p>
Eq-24	<p>AGGGTTGGTCAGTAACTCCTATGACTCTCGGGTTGGACGGGGGAACTGCTGGCCGATGTCTTTTTCAAACCCATTTTTACTAAACCACTGAT CTATACTCCAGAGGACAAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACCTTTACCAGGGGATGTCTAGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAG AACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTTTCGGGTTATGCCTGG AAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGC CGTCCCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTCTTTGTGTCTTATGTAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGAT CTGTTGAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCGACG TTGCAGCTGACGG</p>
Cão	<p>CTTTCCACGTGAACCGTTCTAAATATGTTCTGTGCTTCGTCGAAGCGGACTGCTCTCTCCGGAGAATGGGCTTGGCACCGGCTTGGGGGTG AACCAAAGGTTGGTCCATAACTCCGAATGAATCTCGGGGTGGACGGGGGAACTGGTGGGCCAAGGCTTTTTCCAACCCCTTTTTACTAAACA CTGATCTATACTCCGAGGACGAAAGTCTTTGGTTTTAATCCATTAACAACCTTTAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGC TGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTTTCGGGTTATGCCTGGAAGTAT GCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGAATCGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGAGCCGTCC CCTCTTTTTGGGAGATAGCACGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATCTCTCTTTGTGTCTTATGTAAGTGAATGCTCGAACGCAGTGATCTGTT CAGATTGCTTTGCGCTGGTGGGCGACTTCGAAAGGACATTAAGGAGATGACCTCTATTGGCGGTATGTTAGGCTTCGGCCCGACGTTGCA GCTGACGGGGTGTGTTTCCGTTCTTTCTTGAGGTGTACCTGTCTGTGTGTGAGGTGCGAACTGGACGCTGGTTATTGTGTAGTAGAGTATTG CTGCGCTTTGACGCCTTCGGGTAAAGAGGACGACACTAATTTGGGAACGGAAGAACTGCGGCTTCTTGCTGCGGCTTTTCTGAACTTTTTCAA ATTGGACCTGATATCAG</p>

**APÊNDICE B - SEQUÊNCIA PARCIAL DE OLIGONUCLEOTÍDIOS DA CITOCROMO C OXIDASE (COX-II) DO DNA
MITOCONDRIAL DE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum*.**

isolados	sequência de oligonucleotídeos
B01	TTTTATTACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTGTAATTTAAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTTCTTGAACCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTACGCAAATTCAAAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAAATTTATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATTGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACAAAACAGTTACAATAATTAATAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-2	ATATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTGTAATTTAAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTTCTTGAACCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTACGCAAATTCAAAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAAATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATTGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAAACAAAACAGTTACAATAATTAATAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-3	CTTTAATATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTGTAATTTAAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTTCTTGAACCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTACGCAAATTCAAAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAAATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATTGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAAACAAAACAGTTACAATAATTAATAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGTTAATAAT
Eq-4	TATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTGTAATTTAAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTTCTTGAACCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTACGCAAATTCAAAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAAATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATTGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAAACAAAACAGTTACAATAATTAATAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-5	TATACATAGAAGTTTGAATTTAAACGACCAGGACAAGCGTCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCTGATGCTGTAAATTTAAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTTCTTGAACCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTACGCAAATTCAAAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAAATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATTGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAAACAAAACAGTTACAATAA
Eq-6	TTTAATATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTGTAATTTAAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTTCTT

	GAACCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAAATTTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATTGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACAAAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-7	TATACATAGAAGTTTGATTTAAACGACCAGGACAAGCGTCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCTGATGCTGT AATTA AAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTCCTTGAACC ATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTA ATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAA TTTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATGGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACA AAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGTAAATAAT
Eq-8	TATACATAGAAGTTTGTTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTG TAATTA AAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTCCTTGAAC CATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGT AATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAA ATTATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATGGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACA AAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-9	TATACATAGAAGTTTGATTTAAACGACCAGGACAAGCGTCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCTGATGCTGT AATTA AAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTCCTTGAACC ATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTA ATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAA TTTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATGGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACA AAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-10	TATACATAGAAGTTTGATTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTGT AATTA AAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTCCTTGAACC ATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTA ATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAA TTTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATGGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACA AAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGTAAATAAT
Eq-11	TATACATAGAAGTTTGTTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTG TAATTA AAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTCCTTGAAC CATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGT AATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAA ATTATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATGGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACA AAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-12	TATACATAGAAGTTTGATTTAAACGGCCAGGACAAGCGTCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTG TAATTA AAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTCCTTGAAC CATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGT AATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATAATAAAGCAAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAA

	ATTATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAAATGGATTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACA AAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-13	CTTTTTATATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAG ATGCTGTAATTAACCTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTC TTGAACCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTT TAAAGTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATATAATAAAGCAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTA GTCCAAATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATGGATTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAA CAAACAAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-15	TATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTG TAATTAACCTCTAATAATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTCCTGAAC CATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGT AATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATATAATAAAGCAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAA ATTATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAAATGGATTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAAC AAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-16	TTCTTTAATATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATC AGATGCTGTAATTAACCTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATT TTCTTGAACCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTA CTTTTAAAGTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATATAATAAAGCAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATA GTAGTCCAAATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATGGATTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATC CAACAAACAAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-20	TATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTG TAATTAACCTCTAATAATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTCCTGAAC CATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGT AATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATATAATAAAGCAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAA ATTATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAAATGGATTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACA AAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-21	CTCTTTAATATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATC AGATGCTGTAATTAACCTCTAATATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATT TTCTTGAACCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTA CTTTTAAAGTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATATAATAAAGCAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATA GTAGTCCAAATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATGGATTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATC CAACAAACAAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT
Eq-22	TATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTG TAATTAACCTCTAATAATGACTATTTGTTGGTACAACACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTTCCTGAAC CATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCATAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGT AATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATATAATAAAGCAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAA ATTATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAAATGGATTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACA AAAACAGTTACAATAATTAAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT

Eq-24	<p>ATATACATAGAAGTTTGGTTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCT GTAATTA AAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACA ACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTCTTTGAA CCATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCTAAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAA GTAATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATATAATAAAGCAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCC AAATTATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATTGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAA CAAAAACAGTTACAATAATTA AAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGTTAATAAT</p>
Cão	<p>TATACATAGAAGTTT GATTTAAACGGCCAGGACAAGCATCTAATTTAATACCTAAAGAAGGAATAGCCCATGAATGTAAAACATCAGATGCTGT AATTA AAACTCTAATATGACTATTTGTTGGTACA ACTACTCTATTATCTACTTCTAATAATCTAAATTGACCTATTTCTAAATCATTCTTTGAACC ATATAACTATCAAAAATTAAGGTTTCGTCAGCAAATTCTAAATTATCAGAATATTCATAACTCCAATACCATTGACTACCAATTACTTTTAAAGTA ATAATAGGATCAATGATTTTCATCCATAGAATATAATAAAGCAAAAGATGGAACAGCTACTGTTAATAAAAATTAATGCTGGAATAGTAGTCCAAA TTATTTCTATAGTAGCACCATGAACAAATGTTGCTGGAATTGGATTTTTTTTTTTCATCAAATAATGTTACTACTCTAAATAACATCCAACAAACAA AAACAGTTACAATAATTA AAAAAAACATTAGATCATGGTGAAAGT</p>

**APÊNDICE C - SEQUÊNCIA PARCIAL DE OLIGONUCLEOTÍDIOS DA REGIÃO D1-D2 DA SUBUNIDADE 28S DO DNA
RIBOSSOMAL DE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum*.**

isolados	sequência de oligonucleotídeos
B01	GCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGTTGTGCGGGATA AGTTCCCTTGGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT TGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATATTTCA TTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGTTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTTGCTTGCTGGTGCCCTGTGTTGTGGTGG GACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGT GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCAC ATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACCTGTTGCCGT
Eq-2	GCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGTTGTGCGGGATA AGTTCCCTTGGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT TGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATATTTCA TTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGTTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTTGCTTGCTGGTGCCCTGTGTTGTGGTGG GACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGT GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCAC ATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACCTGTTGCCGT
Eq-3	GCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGTTGTGCGGGATA AGTTCCCTTGGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT TGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATATTTCA TTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGTTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTTGCTTGCTGGTGCCCTGTGTTGTGGTGG GACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGT GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGGCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCAC ATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACCTGTTGCCGT
Eq-4	CGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGT TGTGCGGGATAAGTTCCCTTGGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTG AGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGT GAGGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCAT GACATATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTTGCTTGCTGGTGCCCTGT GTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGT TAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGC TAGTGGTCACATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACCTGTTGCCGT

Eq-5	<p>GCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGTTGTGCGGGATA AGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT TGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATATTTCA TTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGGCTGGTGCCTGTGTTGTGGTGG GACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTCGCTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGT GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCAC ATCGGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGT</p>
Eq-6	<p>CCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGT CAGTGCGGTTGTGCGGGATAAGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACAC GTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAA CAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGT CTATAATCCATGACATATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGTGCT GGTGCCTGTGTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTCGCTTCGGTGATTGTTATA CCCTGGCAGTTAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAG CTTGCTGTGCTAGTGGTCACATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGT</p>
Eq-7	<p>CGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGT TGTGCGGGATAAGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTG AGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGT GAGGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCAT GACATATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGTGCTGGTGCCTGT GTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTCGCTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGT TAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGC TAGTGGTCACATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGT</p>
Eq-8	<p>CGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGT TGTGCGGGATAAGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTG AGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGT GAGGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCAT GACATATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGTGCTGGTGCCTGT GTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTCGCTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGT TAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGC TAGTGGTCACATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACT</p>
Eq-9	<p>GCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGTTGTGCGGGATA AGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT TGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATATTTCA TTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGGCTGGTGCCTGTGTTGTGGTGG GACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTCGCTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGT GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCAC</p>

	ATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGTGGCCGTTCCG
Eq-10	GCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGTTGTGCGGGATA AGTTCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT TGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATATTTCA TTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCTTGTGGTGCCTGTGTTGTGGTGG GACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGT GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCAC ATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGT
Eq-11	GCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGTTGTGCGGGATA AGTTCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT TGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATATTTCA TTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCTTGTGGTGCCTGTGTTGTGGTGG GACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGT GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCAC ATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGTGGCCGTT
Eq-12	CGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGT TGTGCGGGATAAGTTCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTG AGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGT GAGGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCAT GACATATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCTTGTGGTGCCTGT GTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGT TAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGC TAGTGGTCACATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGT
Eq-13	GCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGTTGTGCGGGATA AGTTCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT TGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATATTTCA TTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCTTGTGGTGCCTGTGTTGTGGTGG GACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGT GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGGCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCAC ATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGTGGCCGTT
Eq-15	CGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGCGATGTCAGTGCGGT TGTGCGGGATAAGTTCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTG AGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGT GAGGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCAT GACATATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCTTGTGGTGCCTGT GTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGT

	TAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTTCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGC TAGTGGTCACATCGGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGT
Eq-16	CCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAACTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGGCGATGT CAGTGCGGTTGTGCGGGATAAGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACAC GTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCAGACCGATAGCGAA CAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGT CTATAATCCATGACATAATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGCGGTTGTTGTGCGTTTGCCTTGT GGTGCCTGTGTTGTTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGTA
Eq-20	CGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAACTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGGCGATGTCAGTGCAGG TGTGCGGGATAAGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTG AGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCAGACCGATAGCGAACAAGTACCGT GAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCAT GACATAATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCCTTGTGGTGCCTGT GTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGT TAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTTCGAGTCTGCGGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTG CTAGTGGTCACATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGT
Eq-21	TAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAACTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGGCGATGTCAG TGCGGTTGTGCGGGATAAGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTT TCTTTGAGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCAGACCGATAGCGAACAAG TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTAT AATCCATGACATAATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCCTTGTGGT GCCCTGTGTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCCGGTGATTGTTATAGCC TGGCAGTTAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTTCGAGTCTGCGGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTT GCTGTGCTAGTGGTCACATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGTGGCCGT
Eq-22	GCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAACTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGGCGATGTCAGTGCAGGTTGTGCGGGATA AGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTT TGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATAATTTCA TTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCCTTGTGGTGCCTGTGTTGTGGTGG GACGTCAGAGTCAGTTCGATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGT GGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTTCGAGTCTGCGGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCAC ATCGGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGTGGCCGT
Eq-24	CGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAACTCTGTGCAGGTTCTGCATGGCGAATTGTAGTCTATGGAGGGCGATGTCAGTGCAGG TGTGCGGGATAAGTTCCCTTGAAGAGGACAGCATCGAGGGTGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTG AGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATAATTGGTGCAGACCGATAGCGAACAAGTACCGT GAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTCCAGTGTCTATAATCCAT GACATAATTTCAATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGAAGTGGGTTTCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCCTTGTGGTGCCTGT GTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGATGCCGCGGGAAATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGT TAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTTTTCGAGTCTGCGGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGC

	TAGTGGTCACATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGTTGCCGT
Cão	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAAATCTCTGTG CAGGTTCTGCATGCGTCGAATTGTAGTCTATGGAGGGCGATGTCAGTGC GGTTGTGCGGGATAAGTTCCTTGGAAGAGGACAGCATCGAGGG TGATACTCCCGTATGTGCCTGTACAGCTGCGCGTACGACACGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTTTGGGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAA TTCCATCTAAAGCTAAATATTGGTGCAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAG TACCTGAAACTGCTGAAAGGGAATCGAATCGTTTTCCAGTGTCTATAATCCATGACATATTTTCATTGGCGCGTGAATGCGTGCAGCGTTTTGGA AGTGGGTTTCCTCTCCTGGCGTTGTTGTGCGTTTGCTTGCTGGTGCCCTGTGTTGTGGTGGGACGTCAGAGTCAGTTCGTATGCCGCGGGA AATGGCTGTCAGGGAGGTAGGTGCGTTCCGGTGATTGTTATAGCCTGGCAGTTAGTAGTCGTGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGCGCTT TCGAGTCTGCGGGACTCTCGTCTGGTTGCCTGCTTGGACAGCTTGCTGTGCTAGTGGTCACATCGGGCGATTGAGATCTGTAGTAACTTGTT GCCGTTCCGACTGACGAATTGTTGGCGG