

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POLIMORFISMOS NO nrDNA EM UMA PLANTA DE
GENOMA REDUZIDO *Utricularia gibba* L.
(LENTIBULARIACEAE): EVOLUÇÃO EM CONCERTO
INCOMPLETA E SUA IMPLICAÇÃO NA INFERÊNCIA
FILOGENÉTICA**

Néstor Darío Franco Marulanda
Engenheiro de produção biotecnológica

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POLIMORFISMOS NO nrDNA EM UMA PLANTA DE
GENOMA REDUZIDO *Utricularia gibba* L.
(LENTIBULARIACEAE): EVOLUÇÃO EM CONCERTO
INCOMPLETA E SUA IMPLICAÇÃO NA INFERÊNCIA
FILOGENÉTICA**

Néstor Darío Franco Marulanda

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

Coorientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP para obtenção do Título de Mestre em Agronomia – (Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas).

2016

Franco Marulanda, Néstor Darío

F825 Polimorfismos no nrDNA em uma planta de genoma reduzido
p *Utricularia gibba* L. (LENTIBULARIACEAE) : evolução em concerto
incompleta e sua implicação na inferência filogenética / Néstor
Darío Franco Marulanda. – – Jaboticabal, 2016

iv, 78 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

Coorientadora: Janete Aparecida Desidério

Banca examinadora: Marcos Túlio de Oliveira, Maurício Bacci
Junior

Bibliografia

1. Evolução em concerto. 2 ITS. 3. Polimorfismos. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:581.137.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POLIMORFISMOS NO nrDNA EM UMA PLANTA DE GENOMA REDUZIDO *Utricularia gibba* L. (LENTIBULARIACEAE): EVOLUÇÃO EM CONCERTO INCOMPLETA E SUA IMPLICAÇÃO NA INFERÊNCIA FILOGENÉTICA

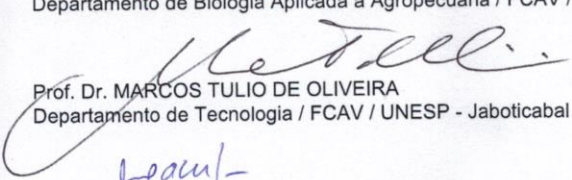
AUTOR: NESTOR DARIO FRANCO MARULANDA

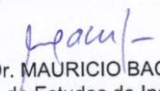
ORIENTADOR: VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

CO-ORIENTADORA: JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR
Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Jaboticabal, 29 de julho de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Néstor Darío Franco Marulanda, nascido em 19 de novembro de 1982, natural de Pereira. Graduado no ano 2007 em Engenharia de Produção Biotecnológica da Universidade Francisco de Paula Santander, UFPS, Colômbia. Realizou estágio e projeto de Trabalho de conclusão de curso no laboratório de micro propagação de plantas do Programa de gestão e inovação tecnológica da Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – COORPOICA (2005-2007) e Chefe do laboratório de micro propagação de plantas de GREENLEAF Colômbia (2007-2013).

AGRADECIMENTOS

Agradeço os meus orientadores Dr. Vitor F.O. de Miranda e Dra. Janete Aparecida Desidério pela ajuda e orientação no trabalho e pela confiança.

Agradeço também o Dr. Manoel Victor Franco Lemos pela disponibilização do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada e o pessoal desse laboratório que com sua ajuda e dicas facilitou o desenvolvimento do projeto, em especial a Eliane C.C Alves e Maria Laura Augusto Viola.

Meus agradecimentos para Dasmiliá Cruz e Bruno García pelo material vegetal cedido gentilmente e que enriqueceu de maneira significativa os resultados do projeto. Também os amigos e colegas do Laboratório de Sistemática Vegetal, pela ajuda nas coletas, discussões e sugestões feitas no decorrer desses dois anos.

Igualmente agradeço a FAPESP, CAPES e CNPq, pelo financiamento do trabalho em questão.

SUMARIO

	Página
RESUMO	3
ABSTRACT.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABELAS.....	6
1.INTRODUÇÃO.....	8
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 Família Lentibulariaceae Rich.....	10
2.2 <i>Utricularia gibba</i> L.....	10
2.3 DNA Ribossomal.....	12
2.4 Evolução em concerto e Pseudogenes no nrDNA.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Material vegetal, extração de DNA e amplificação da região ITS.....	14
3.2 Clonagem, amplificação dos insertos, purificação e sequenciamento.....	15
3.3 Análises dos dados.....	15
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Comprimento e conteúdo GC da região ITS do nrDNA.....	18
4.2 Análises filogenéticas	23
4.3 Diversidade das sequências e testes de neutralidade	27
4.3.1 Diversidade intragenômica	27
4.3.2 Diversidade Intra e interpopulacional.....	32
4.3.3 Diversidade interespecífica.....	35
4.4 Conservação de motifs nas regiões ITS1 e 5,8S.....	36

	Página
4.5 Comparação da estrutura secundária da região ITS2.....	38
4.6 Frequências e redes dos haplótipos.....	43
5. DISCUSSÃO.....	52
5.1 Amplificação da região ITS1+5,8S+ITS2 em <i>Utricularia gibba</i>	52
5.2 Motifs conservados, polimorfismos e funcionalidade das cópias	53
5.3 Inferências filogenética e filogeográficas.....	54
5.4 Genoma reduzido e origem dos polimorfismos em <i>Utricularia gibba</i> L.....	56
6. CONCLUSÕES.....	58
7.REFERÊNCIAS.....	59
8. APÊNDICES.....	68

Polimorfismos no rDNA em uma planta de genoma reduzido *Utricularia gibba* L. (Lentibulariaceae): Evolução em concerto incompleta e sua implicação na inferência filogenética

RESUMO

A planta carnívora *Utricularia gibba* (Lentibulariaceae) apresenta um genoma reduzido de aproximadamente 82 Mpb e foi empregada no presente estudo para se investigar a diversidade de cópias da região ITS (nrDNA). Uma das características do nrDNA é que suas cópias em tandem apresentam alto grau de similaridade pela ação homogeneizadora da evolução em concerto. Porém, neste estudo foram encontradas variações intragenômicas, intra e interpopulacionais nas regiões ITS em *U. gibba*. Com o objetivo de elucidar o impacto dos polimorfismos nos espaçadores ITS1, ITS2 e no gene 5,8S nas análises filogenéticas e filogeográficas, foi clonada a região ITS completa de 25 indivíduos de 5 populações, assim obtidos 292 cópias as quais foram analisadas isoladamente cada região (ITS1, 5,8S e ITS2) e em conjunto. Desta forma foram avaliados o comprimento e o conteúdo das regiões, as variações nucleotídicas e haplotípicas e realizadas análises filogenéticas e filogeográficas. Para determinar a funcionalidade das sequências obtidas foram identificados motifs conservados das regiões ITS1 e 5,8S e para os haplótipos da região ITS2 foi confirmada a sua estrutura secundária por transferibilidade das hélices em estruturas secundárias conhecidas de espécies filogeneticamente relacionadas. Assim, as três regiões apresentaram polimorfismos representados em haplótipos para cada sequência. Os resultados sugerem que todos os diferentes haplótipos presentes em *U. gibba* são cópias funcionais que podem ser usadas como marcadores filogenéticos para o nível de espécie, seja de forma isolada ou a região completa (ITS1+5,8S+ITS2). Entretanto, em análises filogenéticas e filogeográficas podem ser gerados artefatos e histórias evolutivas errôneas quando comparadas populações dentro de uma mesma espécie, dada à presença de haplótipos compartilhados por indivíduos de diferentes populações.

Palavras chave: Evolução em concerto, ITS motifs, polimorfismos, nrDNA, *Utricularia gibba*.

nrDNA polymorphisms in a plant with minimal *Utricularia gibba* L. (Lentibulariaceae): incomplete concerted evolution and its implication in phylogenetic inference

ABSTRACT –

The aquatic carnivorous plant, *Utricularia gibba* (Lentibulariaceae) has a small genome of with approximately 82 Mpb and was used in this work for the variance analysis of the copies diversity of the ribosomal DNA ITS region (nrDNA). One of the nrDNA features is that its its copies in tandem ys have present a high degree of similarity in intra individual and interspecies genomes due the homogenizing action of concerted evolution. However, in this study intragenomic, intra, and inter-populational variations were found in ITS1 + 5.8S + ITS2 ITS regions in individuals and populations evaluated. *U. gibba*. With the main objectiveaim of to elucidate the impact of polymorphisms of their the intergenic spacers ITS1, ITS2, and gene 5.8S and ITS2 regions in phylogenetic and phylogeographic analyzes, we was cloned the complete ITS region of 25 individuals from 5 populations, thereby obtained 292 clones copies and internal spacers ITS1 and ITS2 and the 5.8S gene were identified, which were analyzed individually (ITS1, 5.8S, and ITS2) and togetherconcatenated. Thus we evaluate the length and GC concentration of the regions, the nucleotide and haplotype variations and achieved phylogenetic and phylogeographic analyzes were madedinferences. To determine test the functionality of the sequences obtained we were searched and compared conserved motifs in spacer ITS1 and 5.8S gene and the haplotypes of spacer ITS2 was evaluated the ITS2 its secondary structure by transferability of helices in known secondary structures known of closely phylogenetically related species. Thus, the three regions showed polymorphisms represented by generating haplotypes for each region. These results suggest that the all different haplotypes present in *U. gibba* are functional copies that can should be used as phylogenetic markers for species studies, either alone each isolated or the complete ITS region (ITS1 + 5.8S + ITS2). But in phylogenetic and phylogeographical analyzes artifacts and erroneous evolutionary histories can be generated when populations from the same species were compared, in population studies due the presence of haplotypes shared by individuals from different populations. Hence, the present results show the need to analyze the variability of the ITS region before its use as a molecular marker.

Keywords: Concerted evolution, ITS motifs, polymorphisms, nrDNA, *Utricularia gibba*.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Utricularia gibba</i>	11
Figura 2. Conteúdo GC das três regiões (ITS1, ITS2 e 5,8S) de <i>Utricularia gibba</i>	21
Figura 3. Cladograma de análise bayesiana para o espaçador ITS1 das populações de <i>Utricularia gibba</i> . As probabilidades posteriores (PP) de cada clado são indicadas junto aos nós.....	24
Figura 4. Cladograma de análise bayesiana para o gene 5,8S das populações de <i>Utricularia gibba</i> . As probabilidades posteriores (PP) de cada clado são indicadas junto aos nós.....	25
Figura 5. Cladograma de análise bayesiana para o espaçador ITS2 das populações de <i>Utricularia gibba</i> . As probabilidades posteriores de cada clado são indicadas junto aos nós.....	26
Figura 6. Cladograma de análise bayesiana para a região ITS1+5,8S+ITS2 das populações de <i>Utricularia gibba</i> . As probabilidades posteriores (PP) de cada clado são indicadas junto aos nós.....	28
Figura 7. Estrutura secundária do espaçador ITS2 usando como modelo espécies distintas da seção <i>Utricularia</i>	40
Figura 8. Rede de haplótipos para o espaçador ITS1 das populações de <i>Utricularia gibba</i>	44
Figura 9. Rede haplótipos para o gene 5,8S das populações de <i>Utricularia gibba</i>	45
Figura 10. Rede haplótipos para o espaçador ITS2 das populações de <i>Utricularia gibba</i>	47
Figura 11. Rede de haplótipos da região ITS1+5,8S+ITS2 das populações de <i>Utricularia gibba</i>	50

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Populações amostradas e localização dos locais de amostragem.....	14
Tabela 2. Identificação dos clones selecionados para cada indivíduo.....	19
Tabela 3. Comprimentos e conteúdo de GC das regiões por população.....	22
Tabela 4. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS1 para os indivíduos	29
Tabela 5. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do gene 5,8S para os indivíduos	30
Tabela 6. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS2 para os indivíduos	31
Tabela 7. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade da região ITS1+5,8S+ITS2 para os indivíduos	32
Tabela 8. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS1 para as populações.....	33
Tabela 9. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do gene 5,8S para as populações.....	34
Tabela 10. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS2 para as populações.....	34
Tabela 11. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade da região ITS1+5,8S+ITS2 para as populações.....	35
Tabela 12. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade de todos os clones para cada região.....	36
Tabela 13. Haplótipos identificados nos clones para o espaçador ITS1 de <i>Utricularia gibba</i>	37
Tabela 14. Haplótipos identificados nos clones para o gene 5,8S de <i>Utricularia gibba</i>	38
Tabela 15. Haplótipos identificados nos clones para o espaçador ITS2 de <i>Utricularia gibba</i>	41
Tabela 16. Porcentagens de transferibilidade das hélices na configuração da estrutura secundária do espaçador ITS2 de <i>Utricularia gibba</i>	42

Tabela 17. Haplótipos identificados nos clones para a região ITS1+5,8S+ITS2 de <i>Utricularia gibba</i>	48
---	----

1. INTRODUÇÃO

A família de plantas carnívoras Lentibulariaceae agrupa cerca de 350 espécies arrançadas em três gêneros: *Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia*. Nesta família encontram-se os menores genomas de plantas conhecidos, particularmente as espécies dos gêneros *Genlisea* e *Utricularia*, tendo espécies que podem apresentar genomas de 60 Mpb (ALBERT et al., 2010). A sua vez *Utricularia gibba* L., de hábito aquático, possui um genoma relativamente pequeno de 82 Mpb (IBARRA-LACLETTE et al., 2013), mesmo assim este acomoda um número típico de genes de uma planta. Os genes que codificam rRNAs estão presentes em conjunto e em grande número de cópias no genoma dos organismos eucariotos (HOFMAN et al., 1979; BROSIUS et al., 1981). Tais cópias são bastante similares entre si e estão arrançadas em tandem, constituindo o chamado DNA ribossomal nuclear (nrDNA). Uma das propriedades notáveis de nrDNA (incluindo ITS) é que seus genes parálogos nos indivíduos são bastante homogêneos, resultante da evolução concertada (ARNHEIM et al., 1980). Entretanto, há registro de casos em que o rDNA não evolui em concerto, não ocorrendo a homogenização entre as cópias. De acordo com Carreto-Paulet et al. (2015), o genoma de *U. gibba* evolui baixo uma forte pressão de seleção, levando à perda de genes ao longo do tempo. Assim duplicações gênicas completas (*Whole Genome duplications*) poderiam originar cópias adicionais dos genes, por meio da aquisição e expansão das famílias genicas, que podem servir como amortecedor contra o colapso e a extensão de linhagens (IBARRA-LACLETTE et al., 2011a, b; CARRETO-PAULET et al., 2015).

Considerando a funcionalidade das regiões cistrônicas, motifs conservados no ITS1 foram descritos por Liu e Schardl (1994) e também para o gene 5,8S de acordo com Harpke e Peterson (2008). Acredita-se que a configuração do espaçador ITS2 apresenta uma estrutura secundária muito conservada nas plantas com flores e compartilhada com algas verdes. (MAI & COLEMAN, 1997). Com o objetivo de se prever as estruturas secundárias das moléculas, a região ITS2 dos haplótipos pode ser comparada e modelada com estruturas da região de espécies conhecidas (WOLF et al., 2005). Assim no presente estudo foram obtidos 292 clones da região ITS (ITS1,

5,8S e ITS2) de diferentes indivíduos de diferentes populações de *Utricularia gibba* L. Nesse contexto, os principais objetivos foram: (i) testar se há variações intragenômicas (nos mesmos indivíduos), intrapopulacionais (em diferentes indivíduos das mesmas populações) e intraespecíficas (com a comparação de diferentes populações) na região ITS de *U. gibba*, assumindo como premissa a existência da evolução em concerto; (ii) inferir a funcionalidade das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 e (iii) discutir sobre as implicações do emprego da região ITS nas análises filogenéticas e filogeográficas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Família Lentibulariaceae Rich.

As espécies da família Lentibulariaceae apresentam características relacionadas à síndrome da carnivoría, como tricomas glandulares que segregam enzimas digestivas e mucilagem. Além disso, podem ser verificadas diversas especializações morfológicas nas folhas para cada um dos três gêneros (*Pinguicula*, *Genlisea* e *Utricularia*), mas sempre em função da captura e digestão de insetos e outros pequenos organismos (METCALFE & CHALK, 1972; KRÓL et al., 2012).

Estudos filogenéticos suportam que *Utricularia* é grupo irmão de *Genlisea* juntamente com *Pinguicula*, constituindo um grupo monofilético (JOBSON & ALBERT, 2002; MÜLLER et al., 2000, 2005, 2006). De acordo com Guisande *et al.*, (2007), o gênero *Utricularia* agrupa cerca de 35% das espécies dentre todas as demais famílias de plantas carnívoras e a maioria das espécies é encontrada em regiões tropicais e subtropicais da Venezuela, Guianas e no Brasil (TAYLOR, 1989), sendo que neste último foram catalogadas 69 espécies das quais 20 consideradas endêmicas (MIRANDA et al., 2014).

2.2 *Utricularia gibba* L.

Utricularia gibba L., apresenta tamanho pequeno a mediano sendo anual ou perene, afixada ou aquática suspendida, com rizoides curtos e os estolões filiformes e glabros, geralmente numerosos e muito ramificados, às vezes um ramo de cada dicotomia é substituído por uma armadilha ovoide de 1-2,5 mm de comprimento. A inflorescência é ereta, emergente, ou às vezes submersa, de 1-20 cm de comprimento, solitária ou com duas ou mais flores em sucessão (Figura 1). *U. gibba* apresenta distribuição pantropical e tem sido introduzida em alguns países europeus como erva daninha (TAYLOR, 1989).

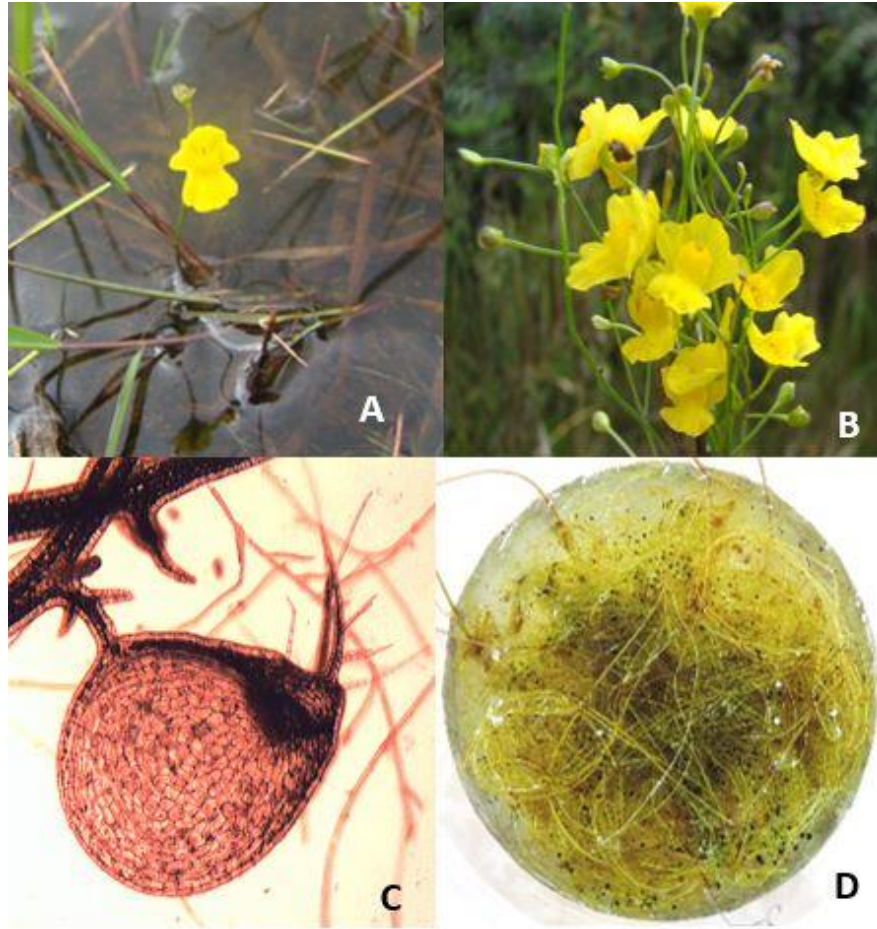


Figura 1. *Utricularia gibba*. A) hábito, B) Inflorescências, C) Utrículo, D) Aspecto vegetativo.

Em 2013 foi relatado o genoma de 82 Mpb para *Utricularia gibba* (IBARRA-LACLETTE et al., 2013) e apesar do seu tamanho pequeno, o genoma rico em G-C da espécie acomoda um número típico de genes de uma planta, cerca de 28.500 genes (MICHAEL & JACKSON, 2013). Mesmo os representantes de Lentibulariaceae, principalmente de *Utricularia* e *Genlisea* apresentam altas taxas de substituição nucleotídica nos genomas mitocondrial, plastidial e nuclear (JOBSON & ALBERT, 2002; MULLER et al., 2004; MULLER & BOSRCH, 2005; MULLER et al., 2006).

2.3 DNA Ribossomal

Os genes que codificam rRNAs, exceto os que codificam o gene 5S RNA, estão presentes em conjunto e em grande número de cópias no genoma dos organismos eucariotos e tais cópias são bastante similares entre si e estão arranjadas em tandem, constituindo o chamado DNA ribossomal nuclear (nrDNA) (ROGERS & BENDICH, 1987, HILLIS & DIXON, 1991).

As unidades de repetição, em todas as plantas terrestres, exceto briófitas, são compostas pelos genes que codificam os rRNAs de 18S, 5,8S e 26S, pelos espaçadores internos transcritos (ITS), pelos espaçadores externos transcritos (ETS) e espaçadores intergênicos, que separam os genes. As repetições em tandem estão localizadas em um ou mais *loci* de um ou vários cromossomos não-homólogos em um genoma (SONE et al., 1999). Uma das propriedades notáveis de nrDNA (incluindo ITS) é que seus genes parálogos são bastante homogêneos, resultante da evolução em concerto (ARNHEIM et al., 1980; XIAO et al., 2010).

2.4 Evolução em concerto e pseudogenes no nrDNA

A evolução em concerto é um processo biológico abrangente e a maioria das famílias gênicas repetitivas examinadas até o momento sofre sua ação, que se especula se dá por meio de recombinações de DNA, reparo e mecanismos de replicação, como cruzamento desigual entre unidades de repetição (SMITH, 1976) e conversão gênica (ZIMMER et al., 1980; NAGYLAKI, 1984; LIAO, 1999; ALVAREZ & WENDEL 2003).

Já foi demonstrado que deleções em certas regiões de ITS1 inibem a maturação da subunidade menor dos rRNAs (MUSTER et al., 1990; VAN NUES et al., 1994) e deleções ou mutações pontuais no ITS2 interferem na produção da subunidade maior (VAN DER SANDE et al., 1992). Assim, há uma forte pressão de seleção agindo para que estas regiões se mantenham relativamente conservadas,

quando comparadas a espaçadores intergênicos e aos espaçadores externos não-transcritos (GOEL et al., 2002).

Entretanto as regiões ITS1 e ITS2 divergem mais que as subunidades do nrDNA (26S, 18S e 5,8S) e são variáveis o suficiente para permitir a reconstrução filogenética em níveis taxonômicos abaixo de família (BALDWIN, 1995). O DNA ribossomal (rDNA) é utilizado em estudos filogenéticos de muitos organismos (HILLS & DIXON, 1991). É por isso que a região ITS do DNA nuclear tem sido uma das sequências mais amplamente usadas a níveis taxonômicos inferiores na filogenia de plantas e estudos evolutivos (ALVAREZ & WENDEL, 2003; BAILEY et al., 2003; MIRANDA et al., 2010)

Em plantas, parálogos divergentes de nrDNA foram encontrados em estudos dos ITS e nos espaçadores intergênicos (IGS) (SUH et al., 1993; DUBCOVSKY & DVORÁK, 1995; BUCKLER & HOLTSFORD, 1996 a; HARPKE & PETERSON, 2006; ZHENG et al., 2008; XIAO et al., 2010; HŘIBOVÁ et al., 2011; HODAC et al., 2014; XU et al., 2015). Os parálogos com polimorfismo podem surgir pela hibridação de espécies (MUIR et al., 2001), ou quando os parálogos estão dispersos em cromossomos não-homólogos no genoma (WEI & WANG , 2004).

Algumas das cópias podem divergir, podendo se tornar pseudogenes (CHILDS et al., 1981). A não-homogenização das cópias pode ser detectada através do alto conteúdo de A-T nas sequências, taxas de substituição altas e grande número de inserções e deleções de sequências estruturais conservadas, assim como a estrutura de RNA apresenta menor estabilidade termodinâmica (BUCKLER & HOLTSFORD, 1996a, b; BUCKLER et al, 1997; MAYOL & ROSSELLÓ, 2001; BAILEY et al., 2003; ALVAREZ & WENDEL, 2003; RAZAFIMANDIMBISON et al., 2004; HARPKE & PETERSON 2006,).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal, extração de DNA e amplificação da região ITS

Foram coletados e preservados em sílica gel 5 indivíduos de 5 populações de *Utricularia gibba* L., sendo uma população de Cuba e quatro do Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Populações amostradas de *Utricularia gibba*.

População	País	Estado/Província	Localidade	Coordenadas	Altitude a.s.l. (m)	Voucher
POP B	Cuba	Isla de la Juventud	Isla de la Juventud	21,881151, -82,799761	9	HAC43076 ¹
POP C	Brasil	São Paulo	Sertãozinho	-21,140230, -48,023949	579	JABU2223 ²
POP D	Brasil	Bahia	Ibicoara	-12,462804, -41,418060	1027	JABU2234 ²
POP E	Brasil	São Paulo	Mogi das Cruzes – Ponto 38	-23,525360, -46,150588	742	JABU2245 ²
POP X	Brasil	São Paulo	Mogi das Cruzes – Ponto 42	-23,533038, -46,159728	742	NFM00001 ²

¹Intituto de Ecología y Sistemática HAC (La Habana, Cuba).

²Materiais-testemunho depositados no Herbário JABU (Unesp/FCAV).

A extração do DNA genômico dos 25 indivíduos foi feita segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1987) modificado por Lodhi et al. (1994). A amplificação da região ITS1+5,8S+ITS2 foi realizada com o emprego de termociclador PTC-100 (MJ Research), com os *primers* ITS 5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White et al., 1990) e o 28cc (5'- ACT CGC CGT TAC TAG GGG AA-3') (HILLIS & DIXON., 1991).

Foram realizadas reações de PCR de 25 µL, 2mM de MgSO₄, 0,2 nM de dNTPs, 0,1 mM de cada *primer*, 2U Taq DNA Platinum® polimerase (Thermo Fisher Scientific Inc), 1 X High Fidelity PCR Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc) e 3% do adjuvante dimetilssulfóxido (DMSO), e em média 50ng de gDNA. A amplificação foi feita pelo

programa: 3 min a 95 °C, 35 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 54 °C, 60s a 72 °C e extensão final de 10 min a 72 °C.

3.2 Clonagem, amplificação dos insertos, purificação e sequenciamento

Os *amplicons* do rDNA foram clonados com o Kit pGEM®-T easy (Promega, Madison, USA) e 15 clones foram aleatoriamente amostrados para cada indivíduo e, após crescimento das colônias, foi feita purificação do DNA plasmidial por lise alcalina (BIRNBOIM & DOLY, 1979).

Os insertos no DNA plasmidial foram amplificados usando os *primers* específicos do plasmídeo SP6 (5´-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3´) e T7 (5´- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3´) (Promega, Madison, USA) e verificados os tamanhos dos fragmentos em eletroforese com gel de agarose. Os produtos de PCR foram purificados seguindo o protocolo de Sambrook e Russell (2001) e ambas as fitas, senso e antissenso, foram sequenciadas pelo método de Sanger, em um sequenciador automático modelo 3730xl ABI (Applied Biosystems).

3.3 Análises dos dados

A verificação dos eletroferogramas, as sequências consenso e os conteúdos de GC foram determinados pelo aplicativo BioEdit versão 7.5.0.2 (HALL, 1999). Para verificar as sequências de contaminantes, a identidade das sequências foi verificada pela ferramenta BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990) disponível no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Foram analisadas as três regiões de forma isolada (ITS1, ITS2 e 5,8S) e a região completa (ITS1+5,8S+ITS2). Para tanto, os limites do ITS1, 5,8S e ITS2 foram identificados com a ferramenta de exploração de sequências da base de dados Rfam

versão 12.1 (NAWROCKI et al., 2014) e foram construídas matrizes para cada região pelo aplicativo BioEdit versão 7.5.0.2 (HALL, 1999) e alinhadas pelo aplicativo MAFFT versão 7 (KATO & STANDLEY, 2013) com a estratégia de alinhamento Q-INS-I que considera a estrutura secundária do RNA.

Para as análises filogenéticas, foram usadas como grupo externo sequências de *Utricularia aurea*, *U. foliosa*, *U. inflexa* e *U. minor* produzidas no Laboratório de Sistemática Vegetal e também de *U. geminiscapa* (EF526399.1) e *U. vulgaris* (EF526385.1), disponíveis no NCBI. O modelo de substituição de bases mais adequado (*best-of-fit*) para a matriz de cada região foi obtido *a priori* pelo jModelTest versão 2.1.1 (DARRIBA et al., 2012), seguindo o critério de informação de Akaike corrigido, ou AICc (AKAIKE, 1973; SUGIURA, 1978), sendo para o espaçador ITS1 o modelo TrN+G, para a região 5,8S o K80, para o espaçador ITS2 o TPM1uf+G e para a região ITS1+5,8S+ITS2 o modelo TrN+G. A inferência bayesiana (IB) foi realizada pelo MrBayes versão 3.2.2 (HUELSENBECK et al., 2001) conduzida com 3×10^9 gerações, com as probabilidades posteriores estimadas por meio do algoritmo MCMCMC, utilizando-se quatro cadeias quentes. Foram amostradas árvores a cada 100 gerações (1 árvore/100 gerações), com descarte de 25% das amostras iniciais (*burn-in*). As árvores obtidas foram editadas por meio do programa TreeGraph versão 2 (STÖVER, 2010).

Na determinação dos haplótipos e suas frequências, na diversidade das sequências e nos testes de neutralidade de cada matriz foi usado o aplicativo DnaSP versão 5.10 (LIBRADO & ROZAS, 2009). Na identificação da funcionalidade dos parálogos das regiões ITS1 e 5.8S dos haplótipos foram procurados motifs conservados. Sendo para o espaçador ITS1 o motif 5'-GGRY- (4 a 7 n) - GYGYCAAGGAA-3' descrito por Liu e Schardl (1994) e para o gene 5,8S o motif 1 (5'-CGATGAAGAACGTAGC-3') o motif 2 (5'-GAATTGCAGAATCC-3) e o motif 3 (5'-TTTGAACGCA-3) usados por Harpke e Peterson (2008). A região ITS2 dos haplótipos foi comparada e modelada com estruturas obtidas com o aplicativo ITS2 data-base de Wolf et al. (2005) com base na rede global (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>).

A construção das redes de haplótipos por meio de análises filogenéticas intraespecíficas baseadas nos haplótipos das regiões identificadas em cada clone foram realizadas utilizando o aplicativo Network versão 4.6.1.1 mediante o método *median-joining* (BANDELT *et al.*, 1999).

4. RESULTADOS

Para obter as sequências consenso foram sequenciadas, alinhadas e comparadas as fitas senso e antissenso de cada clone. Dessa forma foram obtidas no total 375 sequências completas da região ITS, as quais tiveram suas identidades verificadas pelo BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990) e como resultado foram excluídas 83 sequências (22,13% do total) das quais 77 identificadas como nrDNA de algas, fungos e insetos (Apêndice A e B) e 6 descartadas por excesso de ruído, indicando diversos picos na mesma base nos eletroferogramas. Dessa maneira foram consideradas 292 sequências de clones (Tabela 2), das quais foram identificados e isolados os espaçadores ITS1 e ITS2, o gene 5,8S, e a região ITS completa (ITS1+5,8s+ITS2) para seu uso em as análises posteriores.

4.1 Comprimento e conteúdo GC da região ITS do nrDNA

O comprimento da região ITS1+5,8S+ITS2 nos 292 clones oscilou de 572 a 660 pb (Tabela.3). A hierarquia na variação do comprimento foi ITS1 > ITS2 > 5,8S. O espaçador ITS1 apresentou um comprimento de 176 a 260 pb, variando em 84 pb, o espaçador ITS2 oscilando entre 238 até 254 pb, com uma variação 16 pb. Por sua vez o gene 5,8S é muito conservado em comprimento, apresentando exatamente 156 pb em os 292 clones.

A população E teve a maior variação no comprimento do espaçador ITS1 e para região ITS completa variando em 80 e 86 pb respectivamente. Para o ITS2, a população X apresentou o maior valor com 15 pb. As menores variações em comprimento foram observadas tanto para o espaçador ITS1 quanto para a região ITS1+5,8S+ITS2 na população C, com 23 pb e 28 pb, respectivamente. Para o espaçador ITS2 a menor variação, 2 pb, foi observada na população B (Tabela 3.).

Tabela 2. Identificação dos clones selecionados para cada indivíduo de *Utricularia gibba*

POPULAÇÃO	TOTAL CLONES	INDIVÍDUO	NÚMERO DE CLONES	IDENTIFICAÇÃO CLONES
B	44	1	15	B1-1, B1-2, B1-3, B1-4, B1-5, B1-6, B1-7, B1-8, B1-9, B1-10, B1-11, B1-12, B1-13, B1-14, B1-15
		2	15	B2-1, B2-2, B2-3, B2-4, B2-5, B2-6, B2-7, B2-8, B2-9, B2-10, B2-11, B2-12, B2-13, B2-14, B2-15
		4	1	B4-4
		6	13	B6-1, B6-2, B6-4, B6-6, B6-7, B6-8, B6-9, B6-10, B6-11, B6-12, B6-13, B6-14, B6-15
C	59	1	14	C1-1, C1-2, C1-4, C1-5, C1-7, C1-8, C1-9, C1-10, C1-12, C1-13, C1-14, C1-15, C1-16, C1-17
		2	6	C2-1, C2-8, C2-11, C2-14, C2-15, C2-17
		3	15	C3-1, C3-4, C3-5, C3-6, C3-7, C3-8, C3-9, C3-10, C3-11, C3-12, C3-13, C3-14, C3-15, C3-16, C3-17
		4	14	C4-1, C4-2, C4-3, C4-4, C4-5, C4-6, C4-7, C4-9, C4-10, C4-11, C4-12, C4-14, C4-15, C4-16
D	52	5	10	C5-1, C5-4, C5-6, C5-7, C5-8, C5-9, C5-10, C5-11, C5-13, C5-14
		2	1	D2-8
		3	11	D3-1, D3-3, D3-5, D3-6, D3-8, D3-9, D3-10, D3-11, D3-13, D3-14, D3-16
		4	15	D4-1, D4-2, D4-3, D4-4, D4-5, D4-6, D4-7, D4-8, D4-9, D4-10, D4-11, D4-12, D4-13, D4-14, D4-16
E	68	6	15	D6-1, D6-2, D6-3, D6-4, D6-5, D6-7, D6-8, D6-9, D6-10, D6-11, D6-12, D6-13, D6-14, D6-16, D6-17
		7	10	D7-2, D7-3, D7-4, D7-5, D7-6, D7-8, D7-10, D7-14, D7-15, D7-16
		1	11	E1-2, E1-3, E1-5, E1-6, E1-7, E1-10, E1-11, E1-12, E1-14, E1-16, E1-17
		3	12	E3-1, E3-2, E3-3, E3-4, E3-7, E3-8, E3-9, E3-10, E3-13, E3-14, E3-15, E3-16
X	69	4	15	E4-1, E4-2, E4-3, E4-4, E4-5, E4-6, E4-7, E4-8, E4-9, E4-10, E4-12, E4-13, E4-15, E4-16, E4-17
		5	16	E5-1, E5-2, E5-3, E5-4, E5-5, E5-6, E5-7, E5-8, E5-9, E5-10, E5-11, E5-12, E5-13, E5-14, E5-16, E5-17
		8	14	E8-2, E8-3, E8-4, E8-5, E8-7, E8-8, E8-9, E8-11, E8-12, E8-13, E8-14, E8-15, E8-16, E8-17
		11	13	X11-4, X11-5, X11-6, X11-7, X11-9, X11-10, X11-11, X11-12, X11-13, X11-14, X11-15, X11-16, X11-17
		12	15	X12-1, X12-2, X12-3, X12-4, X12-5, X12-6, X12-7, X12-8, X12-9, X12-10, X12-11, X12-13, X12-15, X12-16, X12-17
		13	15	X13-1, X13-3, X13-4, X13-5, X13-6, X13-7, X13-8, X13-9, X13-10, X13-11, X13-12, X13-13, X13-14, X13-16, X13-17
		15	11	X15-1, X15-2, X15-5, X15-6, X15-7, X15-8, X15-11, X15-12, X15-15, X15-16, X15-17
		19	15	X19-1, X19-2, X19-5, X19-6, X19-7, X19-8, X19-9, X19-10, X19-11, X19-12, X19-13, X19-14, X19-15, X19-16, X19-17

O conteúdo de GC variou entre 60,81 e 68,21% com um valor médio de 61,85% para a região ITS completa (Figura 2). A região com menor conteúdo foi o gene 5,8S, seguido do espaçador ITS1 e o espaçador ITS2 com os maiores conteúdos de GC. (Tabela. 3).

Com 59,29% a população C apresentou o menor valor para o conteúdo de GC para o espaçador ITS1 e valor máximo de 60,95% da população B. A média do total das populações foi de 60,03%. As sequências clonadas do gene 5,8S variou pouco nas populações na concentração de GC assim o valor médio mínimo encontrado foi de 56,99% da população X e o máximo de 57,04% da população C. O espaçador ITS2 oscilou entre 65,85% e 67,64% das populações C e B respectivamente, com uma média total de 66,31%

Para a região ITS1+5,8S+ITS2, os valores médios do comprimento das populações 575,34 pb da população B máximo 605 pb da população X e total de 599,55 pb e o conteúdo de GC com pouca variação, de 61,42% da população C a 62,66% da população B. O valor médio para o conjunto de populações foi de 61,86%.

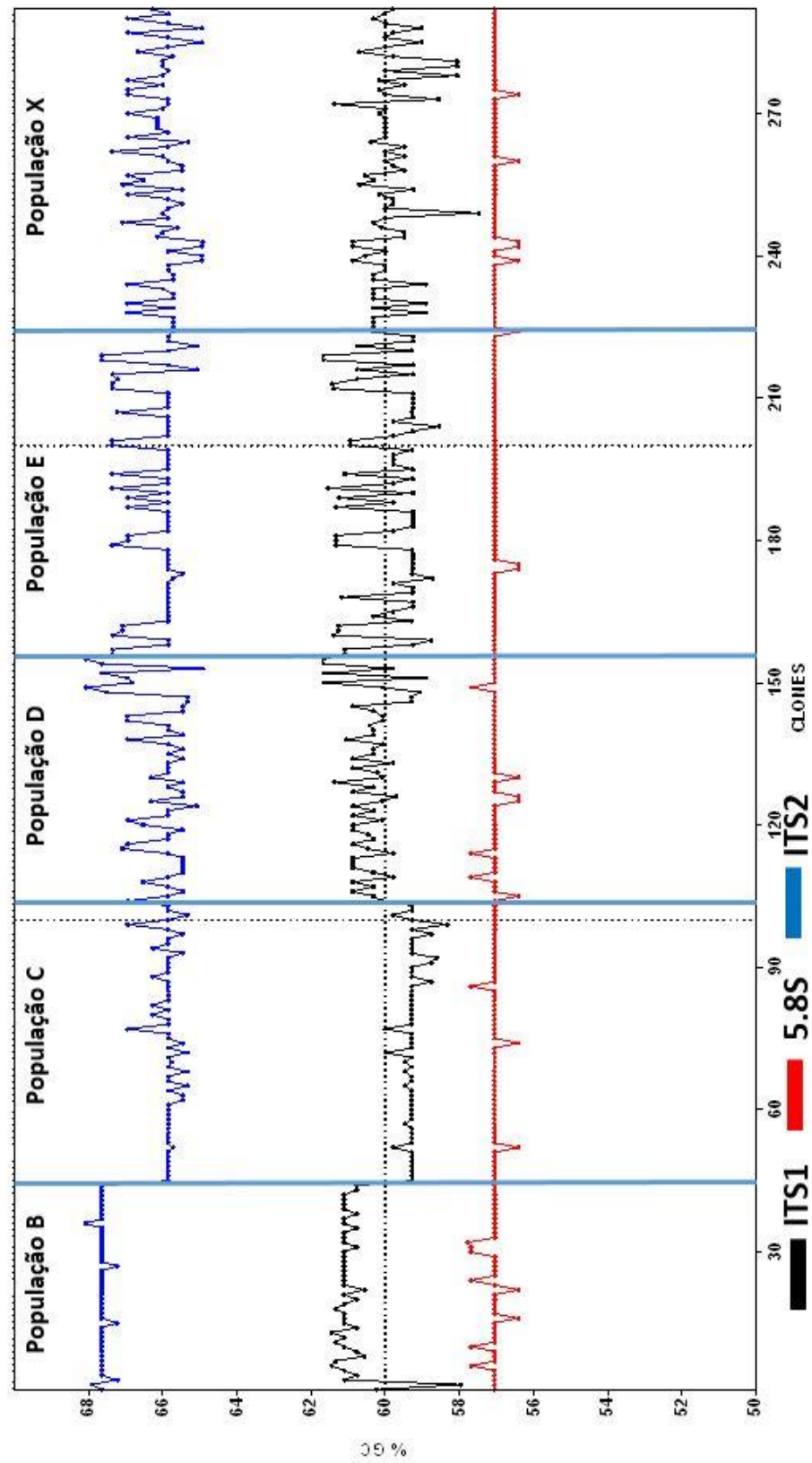


Figura 2. Conteúdo GC das três regiões (ITS1, ITS2 e 5,8S) de *Utricularia gibba*.

Tabela 3. Comprimentos e conteúdo de GC das regiões do nrDNA por população de *U. gibba*.

ITS1								
	N		Min	Max	Max- Min	Desvio padrão	Média± Erro padrão	Mediana
POP B	44	pb	179	226	47	6,92	181,2955±1,0427	180
		% GC	57,96	61,45	3,49	0,52	60,95409±0,07852655	61,11
POP C	59	pb	180	203	23	2,56	193,3898±0,3332508	194
		% GC	58,33	60	1,67	0,26	59,28085±0,03354497	59,28
POP D	52	pb	176	253	77	27,47	200,9808±3,808826	189
		% GC	58,92	61,67	2,75	0,63	60,43212±0,08717596	60,32
POP E	68	pb	180	260	80	29,39	205,1471±3,563562	189
		% GC	58,55	61,67	3,12	0,92	59,9625±0,1120827	59,28
POP X	69	pb	183	257	74	25,76	201,4348±3,100991	190
		% GC	57,48	61,38	3,9	0,71	59,88145±0,08505684	60
TOTAL	292	pb	176	260	84	23,60	197,5582±1,381233	189
		% GC	57,48	61,67	4,19	0,84	60,03866±0,04944695	60
5.8S								
	N		Min	Max	Max- Min	Desvio padrão	Média± Erro padrão	Mediana
POP B	44	pb	156	156	0	0	156	156
		% GC	56,41	57,77	1,36	0,27	57,11±0,04130022	57,05
POP C	59	pb	156	156	0	0	156	156
		% GC	56,41	57,69	1,28	0,15	57,03915±0,01889602	57,05
POP D	52	pb	156	156	0	0	156	156
		% GC	56,41	57,69	1,28	0,24	57,03769±0,03283559	57,05
POP E	68	pb	156	156	0	0	156	156
		% GC	56,41	57,05	0,64	0,11	57,03118±0,01321054	57,05
POP X	69	pb	156	156	0	0	156	156
		% GC	56,41	57,05	0,64	0,18	56,99435±0,02186867	57,05
TOTAL	292	pb	156	156	0	0	156	156
		% GC	56,41	57,77	1,36	0,19	57,03712±0,01122681	57,05
ITS2								
	N		Min	Max	Max- Min	Desvio padrão	Média± Erro padrão	Mediana
POP B	44	pb	238	240	2	0,30	238,0455±0,04545455	238
		% GC	67,23	68,07	0,84	0,13	67,63705±0,02018828	67,65
POP C	59	pb	239	251	12	1,71	248,8644±0,2221746	249
		% GC	65,34	66,95	1,61	0,29	65,85119±0,03797634	65,86
POP D	52	pb	238	252	14	4,01	246,4038±0,5562341	249
		% GC	64,92	68,07	3,15	0,79	66,11385±0,1093496	65,86
POP E	68	pb	238	249	11	3,58	246,75±0,434657	249
		% GC	65,06	67,65	2,59	0,70	66,26338±0,08497524	65,86
POP X	69	pb	239	254	15	3,85	247,5942±0,4631883	249
		% GC	64,92	67,36	2,44	0,61	66,03435±0,0732277	65,86
TOTAL	292	pb	238	254	16	4,67	246,0034±0,2733902	249
		% GC	64,92	68,07	3,15	0,81	66,30634±0,04762998	65,86
ITS1+5.8S+ITS2								
	N		Min	Max	Max- Min	Desvio padrão	Média± Erro padrão	Mediana
POP B	44	pb	573	622	49	7,22	575,3409±1,088059	574
		% GC	61,58	63	1,42	0,21	62,665±0,03171374	62,72
POP C	59	pb	580	608	28	3,24	598,2881±0,4222417	599
		% GC	61,1	62,07	0,97	0,13	61,42644±0,01724571	61,44
POP D	52	pb	572	657	85	26,74	603,3077±3,708713	594
		% GC	61,2	68,21	7,01	0,96	62,00462±0,1324603	61,8
POP E	68	pb	574	660	86	27,56	607,8971±3,342016	594
		% GC	61,02	62,89	1,87	0,48	61,78397±0,05855786	61,6
POP X	69	pb	580	659	79	24,25	605,029±2,919784	595
		% GC	60,81	62,26	1,45	0,31	61,66377±0,03686922	61,68
TOTAL	292	pb	572	660	88	23,71	599,5548±1,387728	594
		% GC	60,81	68,21	7,4	0,63	61,85538±0,03681838	61,68

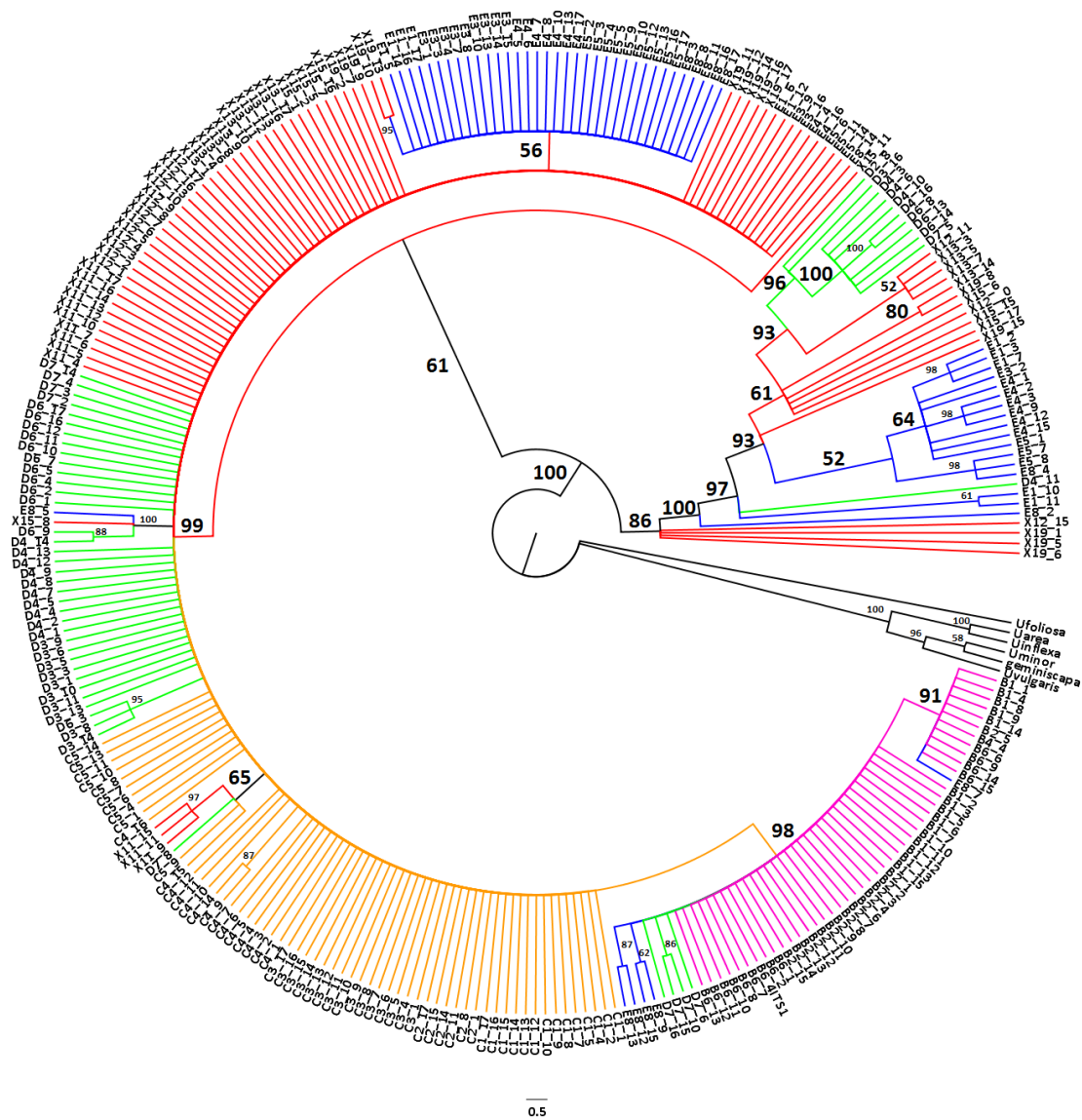
4.2 Análises filogenéticas

Nas árvores filogenéticas resultantes de inferências bayesianas, para os espaçadores e o gene 5.8S e para a região ITS1+5.8S+ITS2, de todos os clones das 5 populações de *Utricularia gibba* foram agrupados em um único clado monofilético com valores altos de probabilidade posterior, sendo de 100 para análise do espaçador ITS1 (Figura 3), 97 para a região 5,8S (Figura 4), 96 para o espaçador ITS2 (Figura 5) e de 100 para a região ITS1+5,8S+ITS2 (Figura 6).

Para o espaçador ITS1 o alinhamento com o grupo externo foi de 537 pb. De acordo como a topologia filogenética o clado formado por todos os clones de *U. gibba* encontra-se dividido em dois sub-clados um formado por clones das populações D, E e X do Brasil e o outro com os clones das demais populações (Figura 6), por sua vez com sub-clados agrupando clones das diferentes populações. Um dos sub-clados agrupa todos os clones da população B de Cuba com clones das populações E (Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil) e D (Ibicoara, Bahia, Brasil).

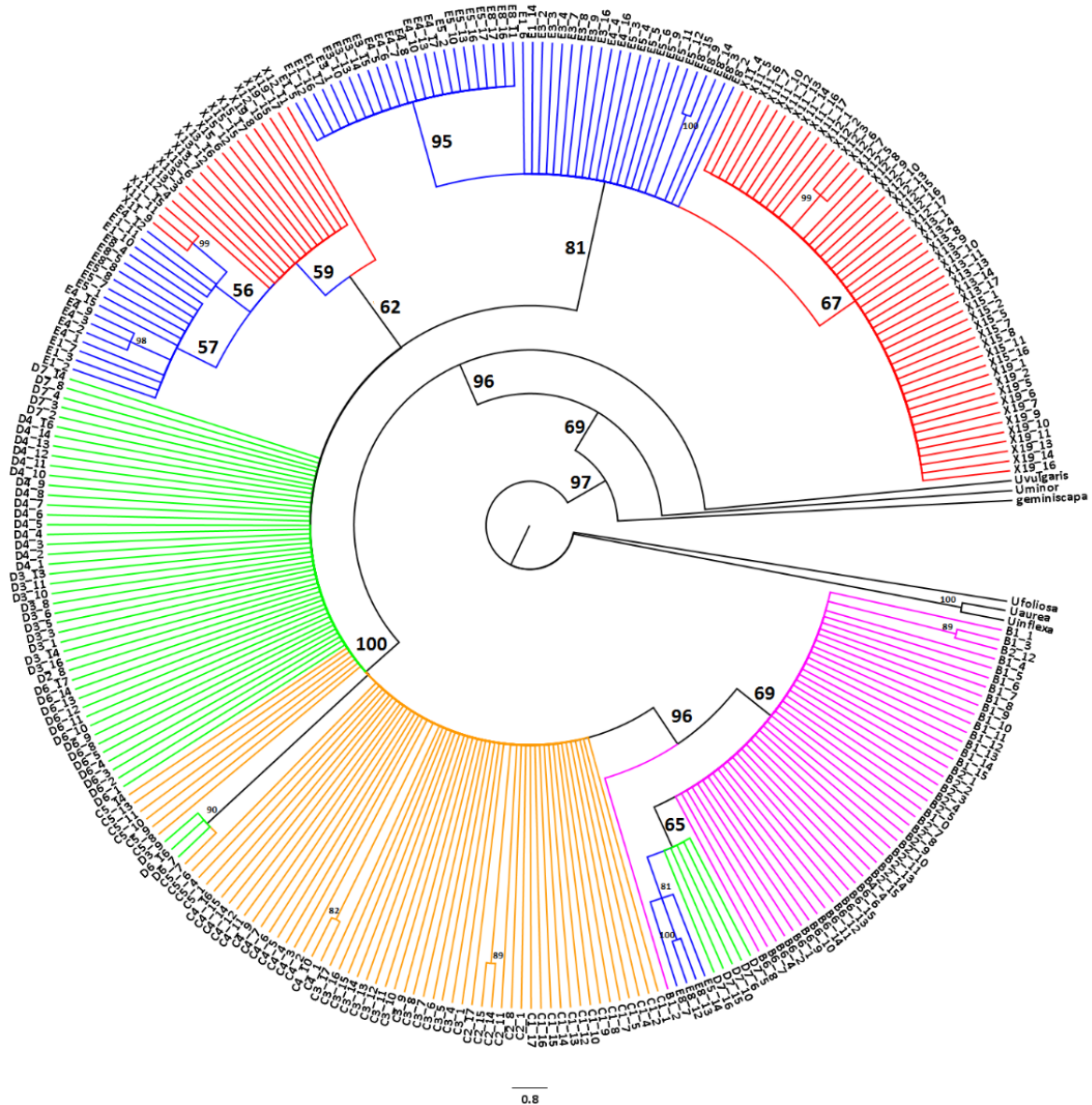
Na árvore da região 5,8S (Figura 4) o clado que agrupa todos os clones de *U. gibba* em uma grande politomia, apenas subdividida em três sub clados, um formado por três clones do indivíduo X12 (população de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil), outro com dois clones do indivíduo E3 (de outra população de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil) e um clado com dois clones de populações diferentes (uma de Cuba e outra da Bahia, Brasil, B e D, respectivamente).

O alinhamento para o espaçador ITS2 com o grupo externo foi 356 pb e resultou em uma topologia de maneira geral muito congruente com a do ITS1 (Figura 5), agrupando os clones em uma grande politomia com sub-clados constituídos por clones das populações E e X (ambas de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil) com, outros com clones das populações C e D (Sertãozinho e Bahia, Brasil) e um sub-clado agrupando todos os clones da população cubana (B) com alguns clones, separados ainda em um sub-clado das populações D e E (da Bahia e São Paulo, respectivamente).



	POPULAÇÃO	LOCALIDADE
	POP B	Isla de la Juventud, Cuba.
	POP C	Sertãozinho, SP. Brasil
	POP D	Ibicoara, BA. Brasil
	POP E	Mogi das Cruzes, pto 42, SP. Brasil
	POP X	Mogi das Cruzes, pto 38, SP. Brasil

Figura 3. Cladograma de análise bayesiana para o espaçador ITS1 das populações de *Utricularia gibba*. As probabilidades posteriores (PP) de cada clado são indicadas junto aos nós



	POPULAÇÃO	LOCALIDADE
	POP B	Isla de la Juventud, Cuba.
	POP C	Sertãozinho, SP. Brasil
	POP D	Ibicoara, BA. Brasil
	POP E	Mogi das Cruzes, pto 42, SP. Brasil
	POP X	Mogi das Cruzes, pto 38, SP. Brasil

Figura 5. Cladograma de análise bayesiana para o espaçador ITS2 das populações de *Utricularia gibba*. As probabilidades posteriores de cada clado são indicadas junto aos nós.

Com um alinhamento de 879 pb a região ITS1+5,8S+ITS2 apresentou maior divisão e estruturação dos clados internos (Figura 6), todos agrupando clones de diferentes populações, ficando evidente que nenhuma das cinco populações foi segregada como grupo monofilético. Da mesma forma como apresentado pelas histórias filogenéticas dos espaçadores ITS1 e ITS2, alguns clones da população cubana (B) estão agrupados com clones das populações brasileiras D e E em um clado.

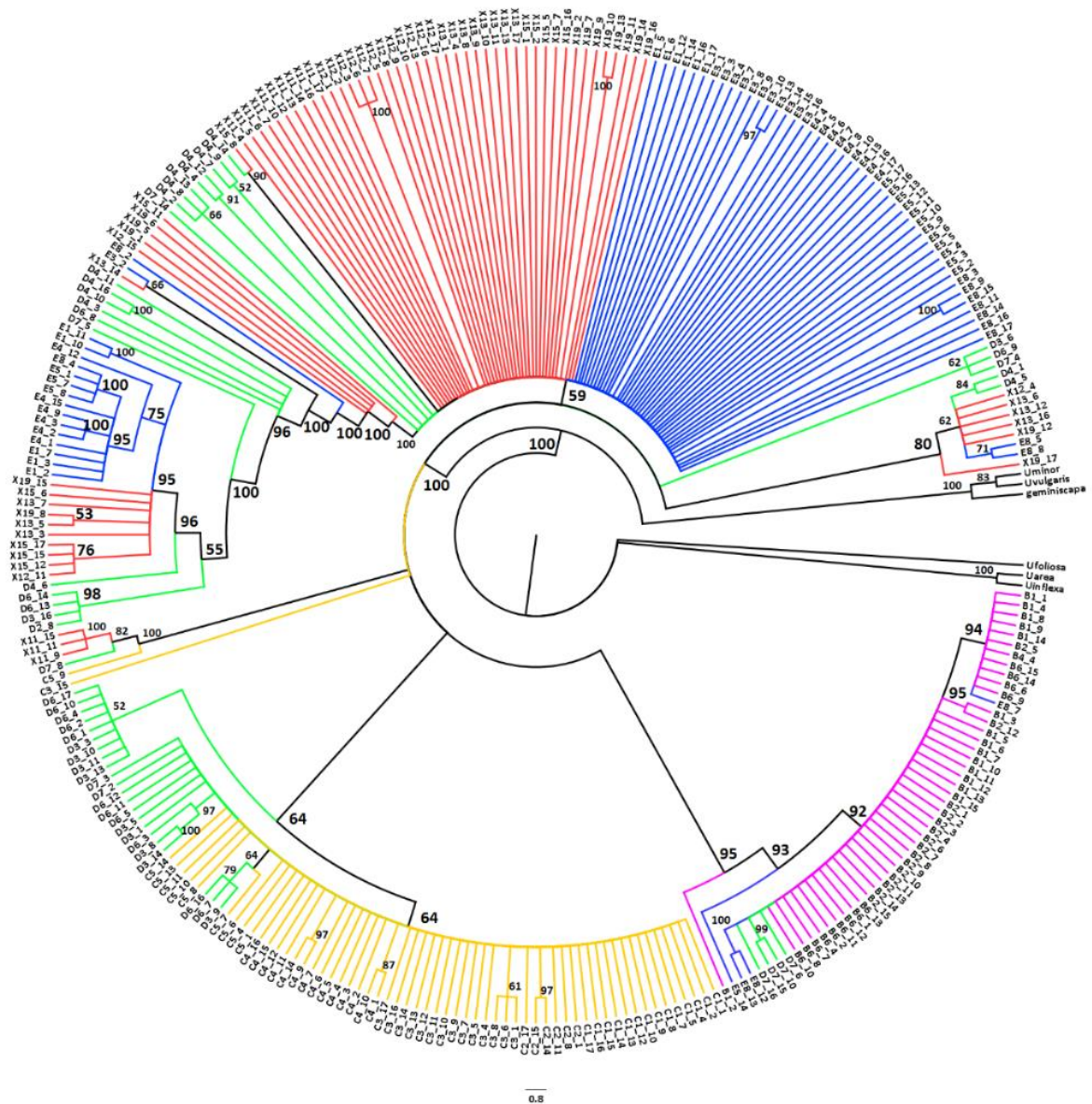
4.3 Diversidade das sequências e testes de neutralidade

4.3.1 Diversidade intragenômica

Para os indivíduos B4 e D2 não foram calculados os valores de diversidade e testes de neutralidade por ter apenas um clone amostrado por indivíduo.

Para o espaçador ITS1 o valor máximo de haplótipos foi de 8 (Tabela 4), encontrando-se no indivíduo E8 da população E, com 14 clones os quais apresentaram 19 sítios polimórficos e 20 mutações totais. Seguido pelos indivíduos D6, D7 e E1 com 7 haplótipos. Desses o indivíduo D6 teve iguais valores de sítios polimórficos e mutações totais do que o E8. O indivíduo E1 com 19 sítios polimórficos e 19 mutações totais e o D7 apresentaram os valores máximos achados para esses critérios. E para a diversidade haplotípica e nucleotídica o valor máximo foi encontrado no indivíduo E4 com 15 clones. O indivíduo C2 com 6 clones amostrados teve um haplótipo, assim o indivíduo C1 com 2 haplótipos apresentou os menores valores calculados para todos os critérios avaliados.

Também para o espaçador ITS1 os testes de neutralidade (Tabela 4) D de Tajima e D^* e F^* de Fu e Li, os indivíduos B1, C5 e E3 tiveram valores negativos e significativos, e o D3 negativos para os três testes, mas foram significativos os testes D^* e F^* de Fu e Li. A sua vez os indivíduos E4 e X15 apresentaram valores significativos para os três testes, mas com valores positivos.



	POPULAÇÃO	LOCALIDADE
	POP B	Isla de la Juventud, Cuba.
	POP C	Sertãozinho, SP. Brasil
	POP D	Ibicoara, BA. Brasil
	POP E	Mogi das Cruzes, pto 42, SP. Brasil
	POP X	Mogi das Cruzes, pto 38, SP. Brasil

Figura. 6. Cladograma de análise bayesiana para a região ITS1+5,8S+ITS2 das populações de *Utricularia gibba*. As probabilidades posteriores (PP) de cada clado são indicadas junto aos nós.

Tabela 4. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS1 para os indivíduos

INDIVÍDUO	N	S	ETA	HAP	Hd	π	K	TESTES DE NEUTRALIDADE		
								D*	F*	D
B1	15	13	14	3	0,562±0,01	0,0129±0,00007	2,162	-3,0077**	-3,0768**	-1,8059*
B2	15	2	2	3	0,26±0,02	0,0015±0,0000007	0,267	-1,8728	-2,0195	-1,4905
B4	1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
B6	13	1	1	2	0,46± 0,01	0,0026± 0,0000004	0,4615	0,7324	0,8887	0,9505
C1	14	1	1	2	0,14±0,01	0,0008± 0,0000004	0,1429	-1,3975	-1,5139	-1,1552
C2	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0
C3	15	2	2	3	0,45±0,02	0,0025±0,0000007	0,4762	-0,4762	-0,577	-0,5942
C4	14	3	3	3	0,39±0,02	0,0029±0,000002	0,5495	-1,0369	-1,2509	-1,2783
C5	10	13	13	3	0,38±0,03	0,0147±0,0001	2,600	-2,3182**	-2,5144**	-1,9758**
D2	1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
D3	11	17	18	3	0,64± 0,01	0,0216± 0,0002	3,9091	-2,3055**	-2,3681*	-1,4622
D4	15	21	21	6	0,80± 0,01	0,0456± 0,00005	8,24762	0,4345	0,7233	1,1390
D6	15	19	20	7	0,84± 0,004	0,0335±0,00008	5,9905	0,0645	0,0863	0,1027
D7	10	32	32	7	0,91±0,01	0,051±0,0004	8,5778	-1,5833	-1,6687	-1,1636
E1	11	19	19	7	0,91± 0,004	0,0512±0,00004	8,9091	0,8958	1,2433	1,6858
E3	12	18	18	3	0,44±0,02	0,0178±0,0002	3,2424	-2,4804**	-2,6764**	-1,9877*
E4	15	19	19	4	0,73±0,01	0,0526± 0,00005	9,6191	1,5501**	2,1259**	2,6358**
E5	16	18	18	3	0,56±0,01	0,0337±0,0001	6,0250	1,5442	1,4249	0,4413
E8	14	19	20	8	0,87±0,005	0,0352±0,00007	6,0110	1,066	0,8989	0,0254
X11	13	3	3	2	0,39± 0,02	0,0066± 0,000005	1,1539	1,0863	1,0945	0,6119
X12	15	21	21	4	0,54±0,02	0,0228±0,0002	4,0381	-0,9236	-1,258	-1,5409
X13	15	20	20	5	0,71± 0,01	0,0410±0,0001	7,4667	1,0855	1,1819	0,8762
X15	11	16	16	4	0,71± 0,01	0,0448±0,00004	8,4727	1,5222**	1,9932**	2,4560**
X19	15	22	22	6	0,76±0,01	0,0391±0,00008	7,1619	0,9223	0,8447	0,2414

Número de sítios polimórficos (S), número total de mutações (ETA), número de haplótipos (HAP), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), Diferença entre pares de nucleotídeos (K). Testes de neutralidade: D de Tajima, D* e F* de Fu & Li, Fs de Fu. # valores não calculados por N inferior ao necessário. N.A não aplicável. Significância: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Para o gene 5,8S os indivíduos C2, C5, D6, E1, E4, E5, E8, X13, X19 apresentaram um único haplótipo e não foram calculados os valores de diversidade nem os testes de neutralidade (Tabela 5).

O indivíduo com o número maior de haplótipos foi o B2, com 15 clones amostrados, apresentando também os valores máximos encontrados para todos os critérios avaliados e ademais teve valores negativos e significativos para os três testes de neutralidade.

Tabela 5. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do gene 5,8S para os indivíduos

INDIVÍDUO	N	S	ETA	HAP	Hd	π	K	TESTES DE NEUTRALIDADE		
								D*	F*	D
B1	15	2	2	3	0,257±0,02	0,00171±0,000001	0,267	-1,8728	-2,0195	-1,49051
B2	15	5	5	6	0,571±0,02	0,00427±0,000002	0,667	-2,4896*	-2,6708*	-1,9108*
B4	1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
B6	13	2	2	2	0,154±0,02	0,00197±0,000003	0,308	-1,7764	-1,9228	-1,468
C1	14	1	1	2	0,143±0,01	0,00092±0,0000006	0,143	-1,3975	-1,5139	-1,1552
C2	6	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
C3	15	1	1	2	0,133±0,013	0,00085±0,0000005	0,133	-1,4264	-1,5427	-1,1595
C4	14	1	1	2	0,143±0,014	0,00092±0,0000006	0,143	-1,39745	-1,5139	-1,1552
C5	10	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
D2	1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
D3	11	2	2	3	0,473±0,026	0,00326±0,0000016	0,509	-0,3303	-0,4943	-0,7782
D4	15	2	2	3	0,362±0,021	0,00244±0,0000011	0,381	-0,4762	-0,6972	-1,0016
D6	15	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
D7	10	4	4	4	0,533±0,032	0,00513±0,0000048	0,800	-1,9158	-2,07655	-1,66706
E1	11	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
E3	12	1	1	2	0,303±0,022	0,00194±0,0000009	0,303	0,75202	0,58317	-0,19492
E4	15	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
E5	16	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
E8	14	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
X11	13	1	1	2	0,154±0,0159	0,00099±0,0000007	0,154	-1,36547	-1,48111	-1,14915
X12	15	1	1	2	0,343±0,0164	0,0022±0,0000007	0,343	0,70104	0,66114	0,23502
X13	15	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
X15	11	1	1	2	0,182±0,021	0,00117±0,0000008	0,182	-1,28946	-1,39919	-1,1285
X19	15	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A

Número de sítios polimórficos (S), número total de mutações (ETA), número de haplótipos (HAP), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), Diferença entre pares de nucleotídeos (K). Testes de neutralidade: D de Tajima, D* e F* de Fu & Li, Fs de Fu. # valores não calculados por N inferior ao necessário. N.A não aplicável. Significância: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Nas análises para espaçador ITS2 o indivíduo C1, com 14 clones, apresentou um haplótipo (Tabela 6), sendo o menor valor e não foram calculados os outros critérios pela falta de variabilidade. Do indivíduo D7 foram amostrados 10 clones e há presença de 8 haplótipos, os quais apresentaram os valores máximos de variabilidade haplotípica e nucleotídica além das diferenças entre pares de nucleotídeos.

Os valores mínimos calculados foram encontrados no indivíduo B2 que com 15 clones teve 2 haplótipos e os menores valores de todos os critérios avaliados. Os indivíduos B6 e C2 também com 2 haplótipos.

Para os testes de neutralidade do espaçador ITS2 os indivíduos C3, C5 e E1 tiveram valores significativos sendo negativos para C3 e C5 e positivos para o indivíduo E1. O indivíduo B1 teve valores negativos e significativos para os testes D

de Tajima e F^* de Fu e Li e o indivíduo E4 valor positivo significativo para o teste D de Tajima. Os outros indivíduos tiveram valores não significativos positivos e negativos nos indivíduos da mesma população.

Tabela 6. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS2 para os indivíduos

INDIVÍDUO	N	S	ETA	HAP	Hd	π	K	TESTES DE NEUTRALIDADE		
								D*	F*	D
B1	15	8	8	5	0,476±0,02387	0,00496±0,0000057	1,181	-2,25309	-2,47762*	-1,91494*
B2	15	1	1	2	0,133±0,01261	0,00056±0,0000002	0,133	-1,42646	-1,54266	-1,15945
B4	1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
B6	13	1	1	2	0,462±0,0120	0,00256±0,0000004	0,462	0,73235	0,88867	0,95051
C1	14	0	0	1	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
C2	6	1	1	2	0,533±0,02963	0,00214±0,0000005	0,533	1,05247	1,02905	0,85057
C3	15	5	5	4	0,371±0,02346	0,0028±0,0000022	0,667	-2,48964*	-2,67082*	-1,91084*
C4	14	3	3	4	0,495±0,02267	0,00221±0,0000006	0,549	-1,03687	-1,25085	-1,27826
C5	10	8	8	4	0,533±0,03243	0,00672±0,0000148	1,6	-2,18183*	-2,36585*	-1,87333*
D2	1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
D3	11	11	11	5	0,782±0,00857	0,00993±0,0000131	2,364	-2,07471	-2,20921	-1,59482
D4	15	13	13	5	0,81±0,00347	0,01968±0,0000245	4,762	1,13305	1,18134	0,75122
D6	15	15	15	6	0,848±0,00287	0,0222±0,0000256	5,371	1,2023	1,20939	0,6562
D7	10	22	26	8	0,956±0,00353	0,0381±0,0000213	9,067	-0,42786	-0,14222	0,78422
E1	11	13	13	3	0,655±0,01243	0,02716±0,0000144	6,545	1,48988**	1,85521**	2,07781*
E3	12	2	2	3	0,621±0,00751	0,00281±0,0000003	0,697	-0,37372	-0,27309	0,15307
E4	15	13	13	4	0,619±0,01431	0,02534±0,0000134	6,057	1,13305	1,58099	2,02508*
E5	16	19	20	3	0,425±0,01759	0,02006±0,0000461	4,775	-0,99026	-1,03685	-0,6652
E8	14	21	21	5	0,78±0,00716	0,0325±0,0000338	7,67	0,90314	0,96549	0,6778
X11	13	9	9	3	0,5±0,01859	0,01357±0,0000193	3,231	0,95617	0,938	0,44899
X12	15	9	9	4	0,619±0,01431	0,00928±0,0000141	2,21	0,92259	0,53668	-0,75644
X13	15	14	14	5	0,79±0,00353	0,02065±0,0000142	4,914	1,16976	1,15208	0,56036
X15	11	10	10	4	0,673±0,01518	0,01818±0,0000134	4,364	0,67416	0,90811	1,18381
X19	15	14	14	5	0,562±0,02055	0,01465±0,0000212	3,486	-0,77273	-0,88197	-0,75485

Número de sítios polimórficos (S), número total de mutações (ETA), número de haplótipos (HAP), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), Diferença entre pares de nucleotídeos (K). Testes de neutralidade: D de Tajima, D^* e F^* de Fu & Li, F^* de Fu. # valores não calculados por N inferior ao necessário. N.A não aplicável. Significância: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Para a região ITS1+5,8S+ITS2 o indivíduo que apresentou o maior número de haplótipos, 10 em total com 15 clones amostrados, foi o indivíduo D4 (Tabela 7), seguido pelos indivíduos E8, X13 e X19 com 9 haplótipos cada, no entanto o indivíduo D7 apresentou os valores mais altos para os critérios de variabilidade. Para os três testes de neutralidade os indivíduos B1, B2 e C5 apresentaram valores significativos negativos e o indivíduo E4 valores positivos significativos.

Tabela 7. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade da região ITS1+5,8S+ITS2 para os indivíduos

INDIVÍDUO	N	S	ETA	HAP	Hd	π	K	TESTES DE NEUTRALIDADE		
								D*	F*	D
B1	15	23	23	7	0,657±0,01916	0,00566±0,0000123	3,181	-3,00654**	-3,22705**	-2,2777**
B2	15	8	8	8	0,733±0,01548	0,00186±0,0000002	1,067	-2,7694**	-2,96256**	-2,086**
B4	1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
B6	13	4	4	4	0,654±0,01124	0,00161±0,0000002	0,923	-1,35316	-1,42302	-0,96419
C1	14	2	2	3	0,275±0,02202	0,00048±0,0000001	0,286	-1,82689	-1,97405	-1,48074
C2	6	1	1	2	0,533±0,02963	0,00089±0,0000001	0,533	1,05247	1,02905	0,85057
C3	15	8	8	6	0,648±0,01790	0,00219±0,0000005	1,276	-2,25309	-2,43353	-1,7724
C4	14	7	7	7	0,813±0,00890	0,00208±0,0000002	1,242	-1,47691	-1,72677	-1,60832
C5	10	11	11	4	0,533±0,03243	0,00387±0,0000047	2,20	-2,27595**	-2,4683**	-1,94429*
D2	1	#	#	#	#	#	#	#	#	#
D3	11	32	33	7	0,873±0,00794	0,01498±0,0000340	8,673	-1,06284	-1,17524	-0,95829
D4	15	36	36	10	0,943±0,00162	0,02313±0,0000087	13,390	0,67049	0,84228	0,88974
D6	15	31	33	8	0,895±0,00276	0,01866±0,0000174	10,676	0,66813	0,71709	0,50516
D7	10	50	52	8	0,956±0,00353	0,02908±0,0000201	16,311	-0,94246	-0,90477	-0,37695
E1	11	32	32	7	0,909±0,00431	0,02707±0,0000116	15,455	1,20075	1,57298	1,92676
E3	12	21	21	6	0,848±0,00554	0,00724±0,0000157	4,242	-2,13779	-2,309	-1,71848
E4	15	32	32	5	0,752±0,00843	0,02712±0,0000134	15,676	1,469*	2,02195**	2,50386**
E5	16	37	38	4	0,592±0,01480	0,01888±0,0000356	10,80	0,26238	0,17445	-0,13148
E8	14	42	43	9	0,912±0,00351	0,0267±0,0000163	15,088	1,2951	1,27525	0,62065
X11	13	13	13	4	0,603±0,01707	0,00798±0,0000063	4,538	0,82811	0,79876	0,34334
X12	15	28	28	6	0,705±0,01298	0,01006±0,0000179	5,733	-0,65722	-0,99361	-1,40094
X13	15	32	32	9	0,924±0,00193	0,0225±0,0000135	13,048	1,00726	1,27743	1,3758
X15	11	27	27	7	0,873±0,00794	0,02225±0,0000124	13,018	1,11597	1,49308	1,90057
X19	15	32	33	9	0,876±0,00486	0,01635±0,0000147	9,419	0,08379	0,01176	-0,18125

Número de sítios polimórficos (S), número total de mutações (ETA), número de haplótipos (HAP), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), Diferença entre pares de nucleotídeos (K). Testes de neutralidade: D de Tajima, D* e F* de Fu & Li, Fs de Fu. # valores não calculados por N inferior ao necessário. Significância: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

4.3.2 Diversidade intra e interpopulacional

Para o espaçador ITS1 as populações D, E e X apresentaram o maior número de haplótipos (Tabela 8). Assim como para o número total de mutações (ETA) e de sítios polimórficos (S) e diferença entre pares de nucleotídeos (K). Os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica dessas três populações estão próximos e a sua vez as populações B e C apresentaram os menores valores para o número de haplótipos, de sítios polimórficos, mutações, nucleotídica e diferença de nucleotídeos.

A população C apresentou os menores valores de diversidade haplotípica, nucleotídica e diferenças entre pares de nucleotídeos, porem com um número maior de haplótipos do que a população B.

No teste *D* de Tajima todas as populações obtiveram valores negativos, a exceção de população X, o que denota a presença de polimorfismos de baixa frequência, porém esses valores foram significativos apenas para as populações B e C.

Tabela 8. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS1 para as populações

POPULAÇÃO	N	S	ETA	HAP	Hd	π	K	TESTES DE NEUTRALIDADE		
								D*	F*	D
POP B	44	14	15	4	0,45±0,00487	0,006±0,0000105	1,008	-5,00149**	-4,78027**	-2,13006**
POP C	59	16	16	7	0,224±0,00525	0,00362±0,0000050	0,641	-4,3551**	-4,3829**	-2,45472**
POP D	52	30	33	17	0,838±0,00114	0,03479± 0,0000197	5,775	-2,23531	-1,89302	-0,43039
POP E	68	23	24	12	0,711± 0,00217	0,03997± 0,0000197	6,475	-0,0459	0,43384	1,07988
POP X	69	24	24	12	0,617±0,00431	0,03137±0,0000214	5,113	0,02453	0,05049	0,0732

Número de sítios polimórficos (S), número de mutações (ETA), número de haplótipos (HAP), diversidade haplotípica (*Hd*), diversidade nucleotídica (π), Diferença entre pares de nucleotídeos (K). Testes de neutralidade: *D* de Tajima, *D** e *F** de Fu & Li, *Fs* de Fu. # valores não calculados por *N* inferior ao necessário. Significância: * *P* < 0,05, ** *P* < 0,01, *** *P* < 0,001

Nas análises de diversidade para o gene 5,8S a população B (Tabela 9) que tem o menor número de clones, apresentou o maior número de haplótipos, de sítios polimórficos, número de mutações, diversidade haplotípica e nucleotídica e de diferença entre pares de nucleotídeos e valor negativo e o único significativo para o teste *D* de Tajima pela presença de excesso de polimorfismo de baixa frequência.

A população E, com dois haplótipos, foi a do menor valor, da mesma forma para os valores de sítios polimórficos, diversidade haplotípica e nucleotídica e de diferença de pares de bases e com valores negativos para o teste *D* de Tajima, porém não significativo. E foi a única população com valores positivos para os testes *D** e *F** de Fu e Li.

A população D com 7 haplótipos obteve o segundo maior número de haplótipos, diversidade haplotípica nucleotídica e de diferença de nucleotídeos e valores negativos para os testes *D* de Tajima, *D** e *F** de Fu e Li.

As populações C e X evidenciaram valores negativos para os testes *D** e *F** de Fu e Li contração das populações

Tabela 9. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do gene 5,8S para as populações

POPULAÇÃO	N	S	ETA	HAP	Hd	π	K	TESTES DE NEUTRALIDADE		
								D*	F*	D
POP B	44	10	10	10	0,371±0,00887	0,00887± 0,0000008	0,455	-4,55439**	-4,51939**	-2,34905**
POP C	59	3	3	4	0,1±0,00285	0,00065±0,0000001	0,102	-3,1215*	-3,12735*	-1,6778
POP D	52	7	7	7	0,317±0,00698	0,00244±0,0000005	0,380	-1,89908	-2,26197	-1,98136
POP E	68	1	1	2	0,058±0,00149	0,00037±0,0000001	0,058	0,51855	0,1179	-0,90021
POP X	69	4	4	5	0,166±0,00360	0,0011±0,0000002	0,171	-2,48398*	-2,61597*	-1,68597

Número de sítios polimórficos (S), número de mutações (ETA), número de haplótipos (HAP), diversidade haplotípica (*Hd*), diversidade nucleotídica (π), Diferença entre pares de nucleotídeos (K). Testes de neutralidade: *D* de Tajima, *D** e *F** de Fu & Li, *F_s* de Fu. # valores não calculados por *N* inferior ao necessário. Significância: * *P* < 0,05, ** *P* < 0,01, *** *P* < 0,001

Nas análises populacionais do espaçador ITS2 a população com mais haplótipos foi a D apresentado também os máximos valores para todos os critérios avaliados (Tabela 10).

As populações B e E com menor número de haplótipos dentre todas as populações, 6 e 9 respectivamente, mas a população E apresentou valores maiores na variabilidade haplotípica e nucleotídica, diferenças entre pares de nucleotídeos e os números de sítios polimórficos e de mutações do que a população C, que junto com a população registram os menores valores para tais critérios. Para essas duas populações os valores dos testes de neutralidade foram negativos e significativos. Para o resto das populações esses valores foram negativos, mas não significativos

Tabela 10. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade do espaçador ITS2 para as populações

POPULAÇÃO	N	S	ETA	HAP	Hd	π	K	TESTES DE NEUTRALIDADE		
								D*	F*	D
POP B	44	9	9	6	0,256±0,00746	0,00208±0,0000010	0,496	-3,12876*	-3,31989**	-2,18061**
POP C	59	14	14	11	0,367±0,00660	0,00268± 0,0000009	0,638	-2,99554*	-3,27724**	-2,32782**
POP D	52	30	34	17	0,866± 0,00079	0,02698±0,0000094	6,420	-1,69216	-1,3409	-0,10906
POP E	68	23	24	9	0,557±0,00427	0,0179±0,0000070	4,172	-0,0459	-0,21148	-0,40717
POP X	69	16	16	13	0,768±0,00211	0,01146±0,0000018	2,660	-0,29608	-0,47672	-0,59313

Número de sítios polimórficos (S), número de mutações (ETA), número de haplótipos (HAP), diversidade haplotípica (*Hd*), diversidade nucleotídica (π), Diferença entre pares de nucleotídeos (K). Testes de neutralidade: *D* de Tajima, *D** e *F** de Fu & Li, *F_s* de Fu. # valores não calculados por *N* inferior ao necessário. Significância: * *P* < 0,05, ** *P* < 0,01, *** *P* < 0,001

Para a região ITS1+5,8S+ITS2 o número de haplótipos varia de 15, da população B, até 29 da população X, de Mogi (Tabela.11). Porém a população D com 27 haplótipos teve os maiores valores para os critérios de número de sítios polimórficos, número total de mutações, diversidade haplotípica e nucleotídica e diferença entre pares de nucleotídeos.

As populações D, E e X tiveram os maiores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica e diferença entre pares de nucleotídeos. A sua vez as populações B e C apresentaram os menores valores para todos os caracteres e para os três testes de neutralidade as duas populações tiveram valores negativos e significativos

Tabela 11. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade da região ITS1+5,8S+ITS2 para as populações

POPULAÇÃO	N	S	ETA	HAP	Hd	π	K	TESTES DE NEUTRALIDADE		
								D*	F*	D
POP B	44	33	33	15	0,57±0,00827	0,00282±0,0000019	1,58668	-5,49039**	-5,36554**	-2,70298***
POP C	59	24	24	18	0,587±0,00603	0,00201±0,0000003	1,13968	-3,2949*	-3,57239**	-2,47672**
POP D	52	63	68	27	0,941±0,00035	0,02047±0,0000045	11,42232	-1,9825	-1,76842	-0,62802
POP E	68	46	48	19	0,781±0,00218	0,01867±0,0000042	10,32397	-0,05279	0,07401	0,24724
POP X	69	40	40	29	0,928±0,00036	0,01374±0,0000025	7,57118	-0,83969	-0,75711	-0,2959

Número de sítios polimórficos (S), número de mutações (ETA), número de haplótipos (HAP), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), Diferença entre pares de nucleotídeos (K). Testes de neutralidade: D de Tajima, D* e F* de Fu & Li, Fs de Fu. # valores não calculados por N inferior ao necessário. Significância: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

4.3.3 Diversidade interespecífica

Para o total dos indivíduos amostrados os valores da diferença entre pares de nucleotídeos (K), o número de haplótipos e diversidade haplotípica (Hd) para as regiões apresentaram a seguinte hierarquia ITS2 > ITS1 > 5,8S (Tabela. 12).

Tabela 12. Diversidade nucleotídica e testes de neutralidade de todos os clones para cada região

REGIÃO	S	ETA	HAP	Hd	π	K	TESTES DE NEUTRALIDADE		
							D*	F*	D
ITS1	50	58	37	0,745-0,00063	0,02653-0,0000045	3,79431	-7,69911**	-5,90506**	-1,51427
5.8S	24	24	23	0,189-0,00098	0,00136-0,0000001	0,21195	-6,83848**	-6,10039**	-2,50656***
ITS2	45	49	46	0,893-0,00008	0,02124-0,0000007	4,69317	-5,99295**	-4,53205**	-0,99342
ITS Completa	111	120	94	0,899-0,00019	0,01505-0,0000006	7,79843	-8,61542**	-6,25677**	-1,69469

Número de sítios polimórficos (S), Número de mutações (ETA), Número de haplótipos (HAP), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), número médio de diferenças (k). Testes de neutralidade: D de Tajima, D* e F* de Fu & Li, Fs de Fu. Significância: * $P < 0,05$, ** $P < 0,02$, *** $P < 0,001$

De acordo com os números de sítios polimórficos (S) e total de mutações (ETA) o gradiente foi ITS1 > ITS2 > 5,8S. Fica claro que mesmo que o espaçador ITS1 tenha um número superior de mutações, o espaçador ITS2 ainda assim apresenta um número superior de haplótipos. Para a diversidade nucleotídica as regiões ITS1 e ITS2 obtiveram valores próximos, 0,02653 e 0,02124 respectivamente, sendo o valor da região ITS2 15,62 vezes maior do que o valor da região 5.8S (Tabela. 12) .

A neutralidade da evolução foi testada usando o número total de sítios segregantes e, para os testes D* e F* de Fu e Li (FU & LI, 1993) tanto a região completa quanto as três regiões isoladas apresentaram diferenças significativas. Para o teste D de Tajima (TAJIMA, 1989) a região 5,8S teve desvio significativo das expectativas do modelo de neutralidade padrão.

4.4 Conservação de motivos nas regiões ITS1 e 5,8S

Para o espaçador ITS1 o motif 5'-GGRY- (4 a 7 n) -GYGYCAAGGAA-3', descrito por Liu e Schardl (1994), está presente em 290 clones, 99,32%, como 5'-GGCGC- (7n) -GCGCCAAGGAA-3'. A exceção do clone X13-4, identificado como o Haplótipo 27 (Tabela 13), que mostra uma transição de G para A na oitava base da segunda parte do motif e no clone C1-16, Haplótipo 5, com uma T na segunda posição da segunda parte do motif.

Tabela 13. Haplótipos identificados nos clones para o espaçador ITS1 de *Utricularia gibba*.

HAPLÓTIPO	FREQUÊNCIA	%	CLONES
HAP 1	12	4,11	B1-1 B1-4 B1-8 B1-9 B1-14 B2-5 B4-4 B6-6 B6-9 B6-14 B6-15 E8-7
HAP 2	1	0,34	B1-2
HAP 3	34	11,64	B1-3 B1-5 B1-6 B1-7 B1-10 B1-11 B1-12 B1-13 B1-15 B2-1 B2-2 B2-3 B2-4 B2-6 B2-7 B2-8 B2-9 B2-10 B2-11 B2-12 B2-13 B2-14 B2-15 B6-1 B6-2 B6-4 ITS1 B6-7 B6-8 B6-10 B6-11 B6-12 B6-13 E8-9 E8-15
HAP 4	140	47,95	C1-1 C1-2 C1-4 C1-5 C1-7 C1-8 C1-9 C1-10 C1-12 C1-13 C1-14 C1-15 C1-17 C2-1 C2-8 C2-11 C2-14 C2-15 C2-17 C3-1 C3-4 C3-5 C3-6 C3-7 C3-8 C3-10 C3-11 C3-12 C3-13 C3-14 C3-15 C3-16 C3-17 C4-1 C4-2 C4-3 C4-4 C4-5 C4-6 C4-7 C4-10 C4-11 C4-12 C4-15 C4-16 C5-1 C5-4 C5-6 C5-8 C5-10 C5-11 C5-13 C5-14 D7-2 D7-3 D7-4 X11-4 X11-5 X11-6 X11-7 X11-10 X11-12 X11-13 X11-14 X11-16 X11-17 X12-1 X12-2 X12-4 X12-5 X12-8 X12-9 X12-10 X12-13 X12-16 X12-17 X13-1 X13-6 X13-8 X13-9 X13-10 X13-11 X13-12 X13-13 X13-16 X13-17 X15-1 X15-2 X15-5 X15-7 X15-16 X19-2 X19-7 X19-9 X19-11 X19-14 X19-16 X19-17 E1-5 E1-12 E1-17 E3-1 E3-3 E3-4 E3-7 E3-8 E3-9 E3-10 E3-13 E3-14 E3-15 E3-16 E4-4 E4-5 E4-6 E4-7 E4-8 E4-10 E4-13 E4-16 E4-17 E5-2 E5-3 E5-4 E5-5 E5-6 E5-9 E5-10 E5-11 E5-12 E5-13 E5-14 E5-16 E5-17 E8-3 E8-8 E8-11 E8-14 E8-16 E8-17
HAP 5	1	0,34	C1-16
HAP 6	1	0,34	C3-9
HAP 7	2	0,68	C4-9 C4-14
HAP 8	1	0,34	C5-7
HAP 9	1	0,34	C5-9
HAP 10	13	4,45	D2-8 D4-10 D6-13 D6-14 D7-5 X12-11 X13-3 X13-7 X15-6 X12-15 X15-15 X15-17 X19-15
HAP 11	1	0,34	D3-16
HAP 12	15	5,14	D3-14 D3-8 D3-1 D3-5 D3-9 D4-2 D4-8 D4-13 D6-3 D6-5 D6-7 D6-11 D6-12 D6-16 D7-8 D3-13 D3-11 D3-10 D3-3 D3-6 D4-1 D4-4 D4-5 D4-7 D4-9 D4-12 D6-2 D6-4 D6-10 D6-17
HAP 13	18	6,16	X12-3 X12-6 X12-7
HAP 14	1	0,34	D4-3
HAP 15	2	0,68	D4-6 D4-16
HAP 16	1	0,34	D4-11
HAP 17	1	0,34	D4-14
HAP 18	1	0,34	D6-1
HAP 19	1	0,34	D6-8
HAP 20	2	0,68	D6-9 X15-8
HAP 21	1	0,34	D7-6
HAP 22	2	0,68	D7-10 D7-15
HAP 23	1	0,34	D7-14
HAP 24	1	0,34	D7-16
HAP 25	3	1,03	X11-9 X11-11 X11-15
HAP 26	4	1,37	X12-15 X19-1 X19-5 X19-6
HAP 27	1	0,34	X13-4
HAP 28	17	5,82	X13-5 X13-14 X19-8 E1-2 E1-3 E1-7 E3-2 E4-1 E4-2 E4-3 E4-9 E4-12 E4-15 E5-1 E5-7 E5-8
HAP 29	1	0,34	X15-11
HAP 30	3	1,03	X19-10 X19-13 E1-6
HAP 31	1	0,34	X19-12
HAP 32	2	0,68	E1-10 E1-11
HAP 33	1	0,34	E1-14
HAP 34	1	0,34	E1-16
HAP 35	1	0,34	E8-2
HAP 36	1	0,34	E8-5
HAP 37	2	0,68	E8-12 E8-13

Os três motifs conservados em magnoliofitas (angiospermas) no gene 5,8S, usados por Harpke e Peterson (2008) na identificação de parálogos de ITS funcionais foram detectados em 287 sequências dos clones, representando 98% do total. As exceções foram para o motif 1, 5'-CGATGAAGAACGTAGC-3', que teve uma transição no clone X11-4, haplótipo 13 (Tabela 14), de G para A na posição 12 e o clone B4-4, uma transversão de A para C na posição 6. Para o motif 2, 5'-GAATTGCAGAATCC-3, o clone C1-10, teve uma transição de G para A na posição 8

e para o motif 3, 5'-TTTGAACGCA-3', os clones D3-14 e D3-8, que conformam o Haplótipo 11, apresentaram uma transição de A para G na base 5 do motif.

Tabela 14. Haplótipos identificados nos clones para a região 5,8S de *Utricularia gibba*.

HAPLÓTIPO	FREQUÊNCIA	%	CLONES
HAP 1	263	90,07	B1-1 B1-2 B1-3 B1-4 B1-5 B1-7 B1-8 B1-9 B1-11 B1-12 B1-13 B1-14 B1-15 B2-2 B2-3 B2-4 B2-5 B1-6 B2-10 B2-11 B2-12 B2-13 B2-14 B6-15 B6-14 B6-13 B6-12 B6-11 B6-10 B6-9 B6-8 B6-2 B6-4 B6-6 B6-7 C1-1 C1-2 C1-4 C1-5 C1-7 C1-8 C1-9 C1-12 C1-13 C1-14 C1-15 C1-16 C1-17 C2-1 C2-8 C2-11 C2-14 C2-15 C2-17 C3-1 C3-4 C3-5 C3-6 C3-7 C3-8 C3-9 C3-10 C3-11 C3-13 C3-14 C3-15 C3-16 C3-17 C4-1 C4-2 C4-3 C4-4 C4-5 C4-6 C4-9 C4-10 C4-11 C4-12 C4-14 C4-15 C4-16 C5-1 C5-4 C5-6 C5-7 C5-8 C5-9 C5-10 C5-11 C5-13 C5-14 D2-8 D3-3 D3-5 D3-6 D3-9 D3-10 D3-11 D3-13 D3-16 D4-1 D4-2 D4-3 D4-4 D4-5 D4-6 D4-7 D4-8 D4-9 D4-12 D4-13 D4-14 D6-1 D6-2 D6-3 D6-4 D6-5 D6-7 D6-8 D6-9 D6-10 D6-11 D6-12 D6-13 D6-14 D6-16 D6-17 D7-2 D7-3 D7-6 D7-8 D7-10 D7-14 D7-15 X11-5 X11-6 X11-7 X11-9 X11-10 X11-11 X11-12 X11-13 X11-14 X11-15 X11-16 X11-17 X12-1 X12-2 X12-4 X12-5 X12-8 X12-9 X12-10 X12-11 X12-13 X12-15 X12-16 X12-17 X13-1 X13-3 X13-4 X13-5 X13-6 X13-7 X13-8 X13-9 X13-11 X13-12 X13-13 X13-14 X13-16 X13-17 X15-1 X15-2 X15-5 X15-6 X15-7 X15-8 X15-11 X15-15 X15-16 X15-17 X19-1 X19-2 X19-5 X19-6 X19-7 X19-8 X19-9 X19-10 X19-11 X19-12 X19-13 X19-14 X19-15 X19-16 X19-17 E1-2 E1-3 E1-5 E1-6 E1-7 E1-10 E1-11 E1-12 E1-14 E1-16 E1-17 E3-1 E3-2 E3-3 E3-4 E3-7 E3-8 E3-9 E3-14 E3-15 E3-16 E4-1 E4-2 E4-3 E4-4 E4-5 E4-6 E4-7 E4-8 E4-9 E4-10 E4-12 E4-13 E4-15 E4-16 E4-17 E5-1 E5-2 E5-3 E5-4 E5-5 E5-6 E5-7 E5-8 E5-9 E5-10 E5-11 E5-12 E5-13 E5-14 E5-16 E5-17 E8-2 E8-3 E4-8 E8-5 E8-7 E8-8 E8-9 E8-11 E8-12 E8-13 E8-14 E8-15 E8-16 E8-17
HAP 2	1	0,34	B1-6
HAP 3	2	0,68	B1-10 D7-5
HAP 4	1	0,34	B2-7
HAP 5	1	0,34	B2-9
HAP 6	1	0,34	B2-15
HAP 7	1	0,34	C1-10
HAP 8	1	0,34	C3-12
HAP 9	1	0,34	C4-7
HAP 10	2	0,68	D3-1 D4-11
HAP 11	2	0,68	D3-8 D3-14
HAP 12	2	0,68	D4-10 D4-16
HAP 13	1	0,34	X11-4
HAP 14	1	0,34	X13-10
HAP 15	1	0,34	X15-12
HAP 16	2	0,68	E3-10 E3-13
HAP 17	1	0,34	B2-1
HAP 18	1	0,34	B2-8
HAP 19	1	0,34	B4-4
HAP 20	1	0,34	B6-1
HAP 21	1	0,34	D7-4
HAP 22	1	0,34	D7-16
HAP 23	3	1,03	X12-3 X12-6 X12-7

4.5 Comparação da estrutura secundária do espaçador ITS2

Na comparação dos haplótipos do espaçador ITS2 foram identificados na ITS2 *data base* (WOLF et al.,2005) como melhores modelos por identidade as espécies *Utricularia geminiscapa* Benj., *U. intermedia* Hayne, e *U. minor* L., todas da mesma

seção *Utricularia*, da qual também faz parte *U. gibba* (Figura 7). Os valores máximos de transferibilidade foram encontrados nos haplótipos 18, 19 e 20 (Tabela 15) com 75,39% e o mínimo no haplótipo 32 com 61,61% com um valor médio de similaridade das quatro hélices de 68,99% (Tabela.16).

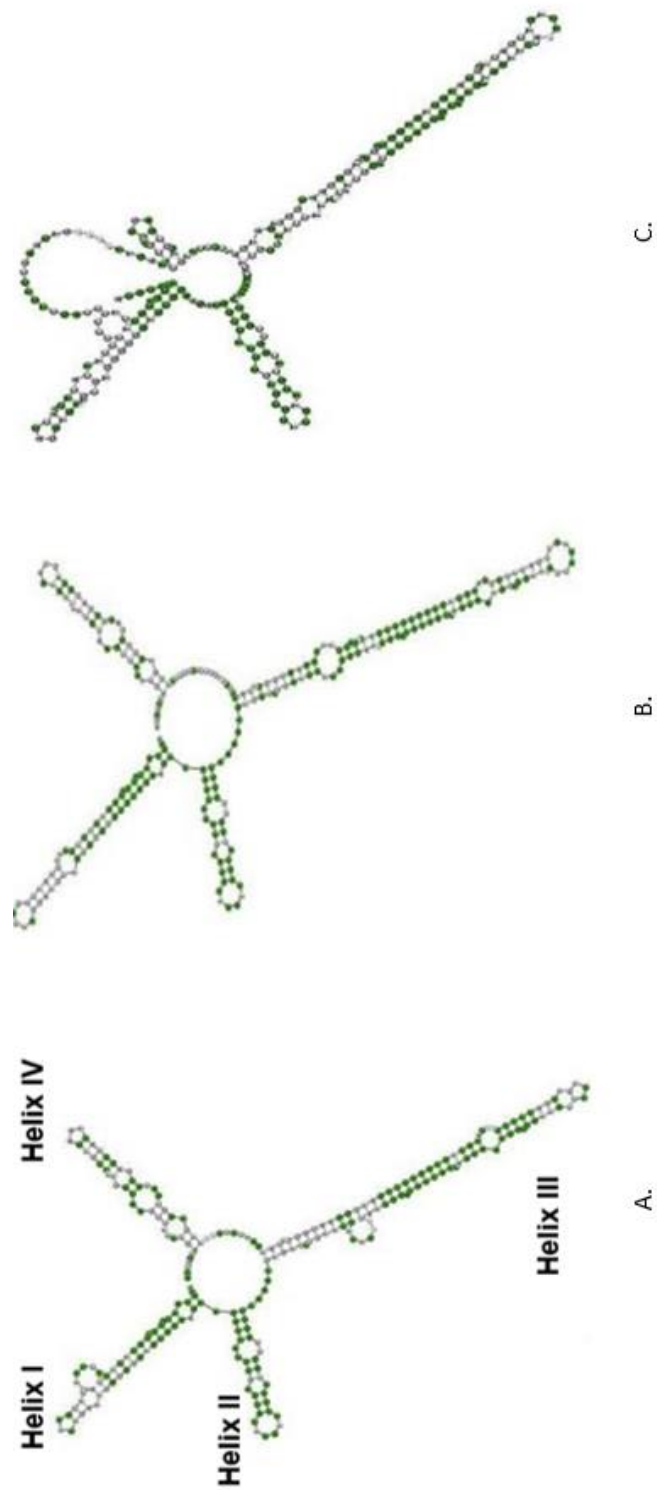


Figura. 7. Estrutura secundária do espaçador ITS2 usando como modelo espécies distintas da seção *Utricularia*. A.) *Utricularia intermedia* Hayne. com Hap 29 (71.92%) .B) *Utricularia geminiscapa* Benj. com Hap 18,19 e 20 (75.39%) . C) *Utricularia minor* L. com Hap 17 e 40 (64.37%) (As bases em verde indicam homologia nas sequências e na estrutura)

Tabela 15. Haplótipos identificados nos clones para o espaçador ITS2 de *Utricularia gibba*.

HAPLÓTIPO	FREQUÊNCIA	%	CLONES
HAP 1	40	13,70	B1-1 B1-4 B1-5 B1-6 B1-7 B1-9 B1-10 B1-11 B1-12 B1-13 B1-14 B2-1 B2-2 B2-3 B2-4 B2-5 B1-6 B2-7 B2-8 B2-9 B2-10 B2-11 B2-13 B2-14 B2-15 B4-4 B6-6 B6-15 B6-13 B6-12 B6-11 B6-14 B6-10 B6-9 B6-1 B6-2 B6-4 B6-8 D7-10 D7-15
HAP 2	1	0,34	B1-2
HAP 3	2	0,68	B1-3 B2-12
HAP 4	1	0,34	B1-8
HAP 5	1	0,34	B1-15
HAP 6	1	0,34	B6-7
HAP 7	59	20,21	C1-1 C1-2 C1-4 C1-5 C1-7 C1-8 C1-9 C1-10 C1-12 C1-13 C1-14 C1-15 C1-16 C1-17 C2-1 C2-8 C2-11 C2-17 C3-1 C3-4 C3-5 C3-6 C3-7 C3-9 C3-10 C3-11 C3-13 C3-14 C3-16 C3-17 C4-2 C4-4 C4-5 C4-6 C4-7 C4-9 C4-11 C4-12 C4-14 C4-15 C5-4 C5-6 C5-8 C5-10 C5-11 C5-13 C5-14 D6-3 D6-5 D6-11 D6-12 D3-14 D3-1 D3-5 D3-8 D4-2 D4-7 D4-8 D4-13
HAP 8	2	0,68	C2-14 C2-15
HAP 9	1	0,34	C3-8
HAP 10	1	0,34	C3-12
HAP 11	1	0,34	C3-15
HAP 12	2	0,68	C4-1 C4-10
HAP 13	1	0,34	C4-3
HAP 14	1	0,34	C4-16
HAP 15	1	0,34	C5-1
HAP 16	4	1,37	C5-7 D6-7 D6-16 D3-9
HAP 17	2	0,68	C5-9 D7-8
HAP 18	1	0,34	D6-1
HAP 19	1	0,34	D6-2
HAP 20	15	5,14	D6-4 D6-8 D6-10 D6-17 D3-3 D3-10 D3-11 D3-13 D4-3 D4-4 D4-11 D4-12 D4-14 D7-2 D7-3
HAP 21	8	2,74	D6-9 D6-13 D6-14 D2-8 D3-16 D4-1 D4-5 D4-6
HAP 22	1	0,34	D3-6
HAP 23	1	0,34	D4-9
HAP 24	2	0,68	D4-10 D4-16
HAP 25	1	0,34	D7-4
HAP 26	1	0,34	D7-5
HAP 27	1	0,34	D7-6
HAP 28	1	0,34	D7-14
HAP 29	1	0,34	D7-16
HAP 30	11	3,77	E1-2 E1-3 E1-7 E4-1 E4-15 E5-1 E5-7 E5-8 E8-8 E8-5 E8-4
HAP 31	50	17,12	E1-5 E1-6 E1-12 E1-14 E1-16 E1-17 E3-1 E3-2 E3-3 E3-4 E3-7 E3-8 E3-10 E3-13 E3-14 E3-15 E3-16 E4-4 E4-5 E4-6 E4-7 E4-8 E4-10 E4-13 E4-16 E4-17 E5-2 E5-3 E5-4 E5-5 E5-6 E5-9 E5-10 E5-11 E5-12 E5-13 E5-16 E5-17 E8-17 E8-16 E8-14 E8-11 E8-3 E8-2 X12-17 X13-1 X13-4 X13-8 X13-9 X19-7
HAP 32	16	5,48	E1-10 E1-11 E4-12 X12-4 X12-11 X13-3 X13-5 X13-6 X13-7 X13-16 X15-6 X15-12 X15-15 X15-17 X12-19 X19-15
HAP 33	1	0,34	E3-9
HAP 34	3	1,03	E4-2 E4-3 E4-9
HAP 35	1	0,34	E5-14
HAP 36	2	0,68	E8-15 E8-9
HAP 37	2	0,68	E8-13 E8-12
HAP 38	1	0,34	E8-7
HAP 39	9	3,08	X11-4 X11-5 X11-6 X11-7 X11-10 X11-12 X11-13 X11-16 X11-17
HAP 40	3	1,03	X11-9 X11-11 X11-15
HAP 41	1	0,34	X11-14
HAP 42	31	10,62	X12-1 X12-2 X12-5 X12-8 X12-9 X12-10 X12-13 X12-15 X12-16 X13-10 X13-11 X13-13 X13-14 X13-17 X15-1 X15-2 X15-5 X15-7 X15-8 X15-11 X15-16 X19-1 X19-2 X19-5 X19-6 X19-9 X19-10 X19-11 X19-13 X19-14 X19-16
HAP 43	3	1,03	X12-3 X12-6 X12-7
HAP 44	1	0,34	X13-12
HAP 45	1	0,34	X19-8
HAP 46	1	0,34	X19-17

Tabela 16. Porcentagens de transferibilidade das hélices na configuração da estrutura secundária do espaçador ITS2 de *Utricularia gibba*.

HAPLÓTIPO	% FREQUÊNCIA	CLONE	HELIX 1	HELIX 2	HELIX 3	HELIX 4	MEDIA	ESPECIE MODELO
HAP 1	13,70	B1-1	66,67	100	58,33	57,14	70,55	<i>U. intermedia</i>
HAP 2	0,34	B1-2	66,67	100	58,33	57,14	70,55	<i>U. intermedia</i>
HAP 3	0,68	B1-3	66,67	100	58,33	57,14	70,55	<i>U. intermedia</i>
HAP 4	0,34	B1-8	66,67	100	58,33	57,14	70,55	<i>U. intermedia</i>
HAP 5	0,34	B1-15	66,67	100	58,33	57,14	70,55	<i>U. intermedia</i>
HAP 6	0,34	B6-7	66,67	100	58,33	57,14	70,55	<i>U. intermedia</i>
HAP 7	20,21	C1-1	61,91	100	72,97	40	68,72	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 8	0,68	C2-14	61,91	90	72,97	40	66,22	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 9	0,34	C3-8	66,67	100	58,33	50	68,75	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 10	0,34	C3-12	61,91	90	72,97	40	66,22	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 11	0,34	C3-15	61,91	100	72,97	20	63,72	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 12	0,68	C4-1	61,91	100	75,68	40	69,4	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 13	0,34	C4-3	61,91	100	72,97	40	68,72	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 14	0,34	C4-16	61,91	100	72,97	40	68,72	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 15	0,34	C5-1	61,91	100	72,97	40	68,72	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 16	1,37	C5-7	61,91	100	72,97	40	68,72	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 17	0,68	C5-9	54,94	90	54,55	60	64,37	<i>U. minor</i>
HAP 18	0,34	D6-1	61,91	100	72,97	66,67	75,39	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 19	0,34	D6-2	61,91	100	72,97	66,67	75,39	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 20	5,14	D6-4	61,91	100	72,97	66,67	75,39	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 21	2,74	D6-9	61,11	100	55,56	50	66,67	<i>U. intermedia</i>
HAP 22	0,34	D3-6	66,67	100	58,33	50	68,75	<i>U. intermedia</i>
HAP 23	0,34	D4-9	61,91	90	72,97	53,33	69,55	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 24	0,68	D4-10	61,11	100	55,56	50	66,67	<i>U. intermedia</i>
HAP 25	0,34	D7-4	61,91	100	67,57	40	67,37	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 26	0,34	D7-5	66,67	100	58,33	57,14	70,54	<i>U. intermedia</i>
HAP 27	0,34	D7-6	66,67	100	58,33	57,14	70,54	<i>U. intermedia</i>
HAP 28	0,34	D7-14	61,91	100	72,97	33,33	67,05	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 29	0,34	D7-16	66,67	100	63,89	57,14	71,92	<i>U. intermedia</i>
HAP 30	3,77	E1-2	61,11	100	55,56	50	66,67	<i>U. intermedia</i>
HAP 31	17,12	E1-5	61,91	100	72,97	53,33	72,05	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 32	5,48	E1-10	61,11	100	63,89	21,43	61,61	<i>U. intermedia</i>
HAP 33	0,34	E3-9	61,91	100	72,97	53,33	72,05	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 34	1,03	E4-2	61,11	100	52,78	50	65,67	<i>U. intermedia</i>
HAP 35	0,34	E5-14	66,67	90	58,33	57,14	68,04	<i>U. intermedia</i>
HAP 36	0,68	E8-15	66,67	100	72,97	53,33	73,24	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 37	0,68	E8-13	66,67	100	55,56	57,14	69,84	<i>U. intermedia</i>

HAPLÓTIPO	% FREQUÊNCIA	CLONE	HELIX 1	HELIX 2	HELIX 3	HELIX 4	MEDIA	ESPECIE MODELO
HAP 38	0,34	E8-7	66,67	100	58,33	57,14	70,54	<i>U. intermedia</i>
HAP 39	3,08	X11-4	61,11	100	55,56	50	66,67	<i>U. intermedia</i>
HAP 40	1,03	X11-9	54,94	90	54,55	60	64,37	<i>U. minor</i>
HAP 41	0,34	X11-14	61,11	100	63,89	50	68,75	<i>U. intermedia</i>
HAP 42	10,62	X12-1	61,91	100	72,97	60	73,72	<i>U. geminiscapa</i>
HAP 43	1,03	X12-3	66,67	100	58,33	50	68,75	<i>U. intermedia</i>
HAP 44	0,34	X13-12	61,11	100	55,56	50	66,67	<i>U. intermedia</i>
HAP 45	0,34	X19-8	61,11	100	52,78	50	65,67	<i>U. intermedia</i>
HAP 46	0,34	X19-17	66,67	100	58,33	50	68,75	<i>U. intermedia</i>

A hélice que apresenta a maior transferibilidade média é a hélice II com 98,70%, seguidas das Hélices III e I com 63,91% e 63,21% respectivamente. A menor foi a hélice IV com 50,30% (Tabela 16).

Para os haplótipos do espaçador ITS2 mais frequentes nos clones analisados (Tabela 15) as porcentagens de transferibilidade foram para o Haplótipo 7 de 68,72%, para o Haplótipo 31 de 72,05%, para o Haplótipo 1 de 70,55%, para o Haplótipo 42 de 73,72% e o Haplótipo 20 com 75,39% sendo este último o máximo valor encontrado.

4.6 Frequências e redes dos haplótipos

Para o espaçador ITS1 foram identificados 37 haplótipos (Tabela 13), o haplótipo com a maior representação foi o Haplótipo 4 com 140 clones (47,95% do total), constituído por clones das quatro populações brasileiras C, D, E e X, mostrando-se como o possível haplótipo ancestral (Figura 8). Separado desse por dois passos mutacionais se encontra o segundo haplótipo mais frequente, o haplótipo 3, representado por 34 indivíduos (11,64%), constituído principalmente por clones da população cubana (B) e poucos da Mogi das Cruzes, SP, Brasil (E). Os demais clones da população cubana apresentaram também o haplótipo 1, presente em clones da população E separado do haplótipo 3, no mínimo por 11 passo mutacionais, na rede

de haplótipos (Figura 8). Todos os haplótipos da população C estão concentrados no haplótipo ancestral ou separados deste por um passo mutacional.

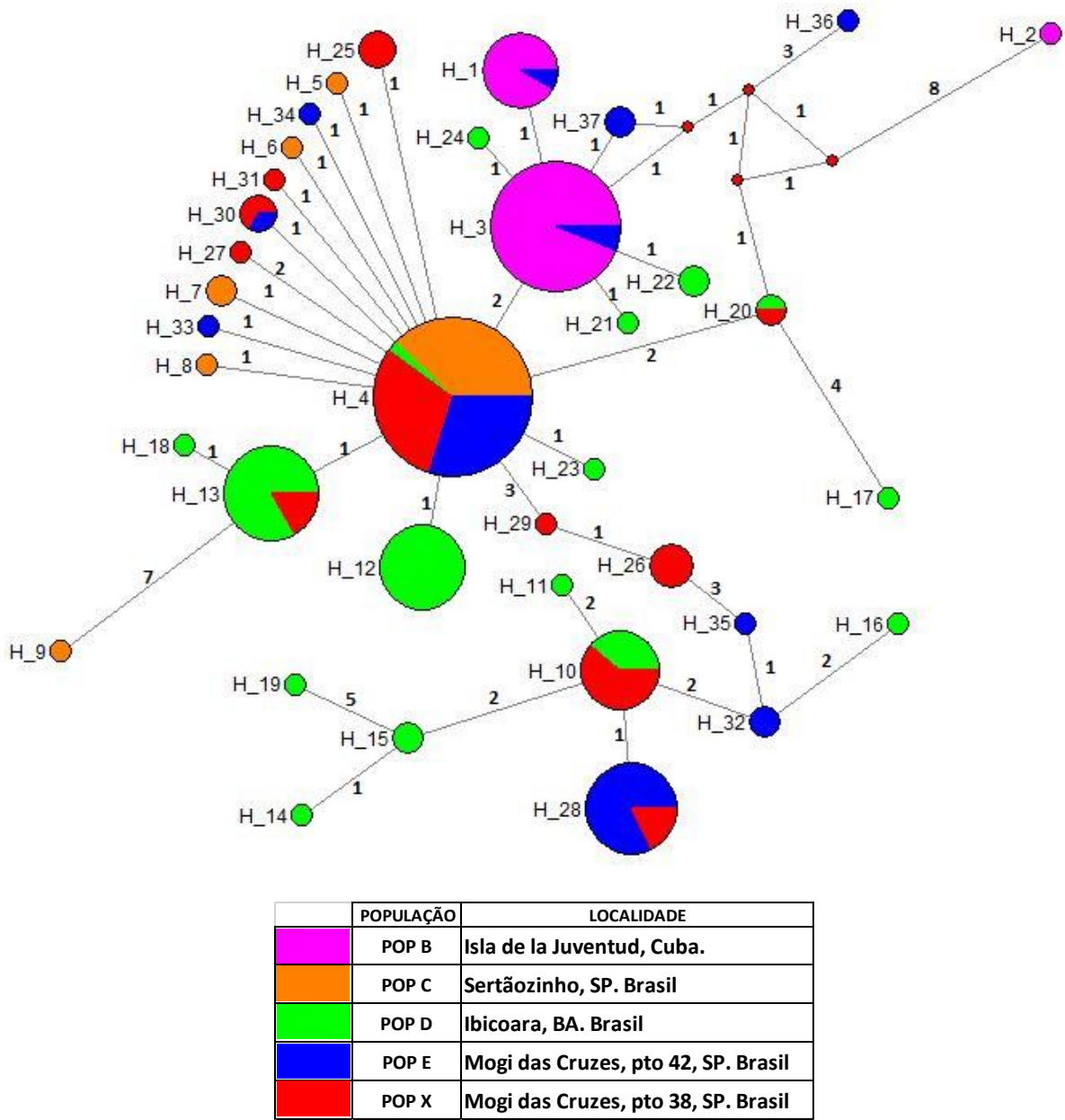
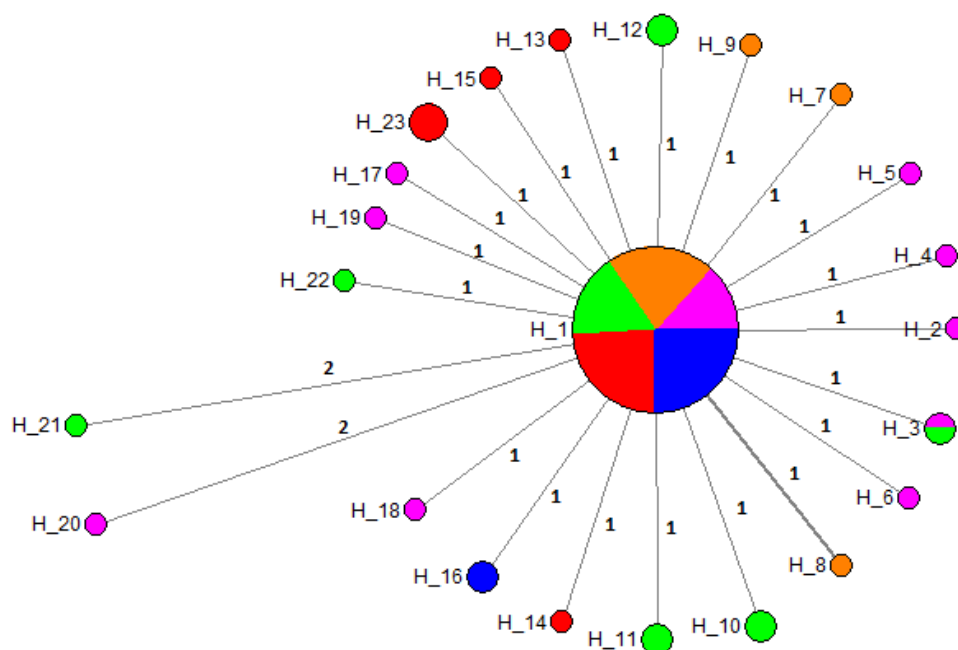


Figura 8. Rede de haplótipos para o espaçador ITS1 das populações de *Utricularia gibba*

Há haplótipos compartilhados por duas populações, como o Haplótipo 28 e o Haplótipo 30, presentes nas populações X e E. Os haplótipos 13, 10 e 20, por sua vez,

são compartilhados nas populações D e X. Na rede são observados poucos haplótipos intermediários não amostrados.

A rede de haplótipos da região 5,8S (Figura 9) apresenta uma estrutura em forma de estrela tendo como centro ou haplótipo primário, o haplótipo 1, agrupando 263 das 292 sequências, 90,07% do total (Tabela. 14), presente em todos os indivíduos avaliados e também no genoma de *Utricularia gibba* (id25895) (IBARRA-LACLETTE et al., 2013) de material coletado em Michoacán, México, comparado com a ferramenta CoGeBlast da base de dados CoGe (LYONS & FREELING, 2008). Do haplótipo ancestral se derivam por um ou dois passos mutacionais os haplótipos secundários, pouco frequentes e exclusivos para cada população, com a exceção do Haplótipo 3 presente nas populações B e D.



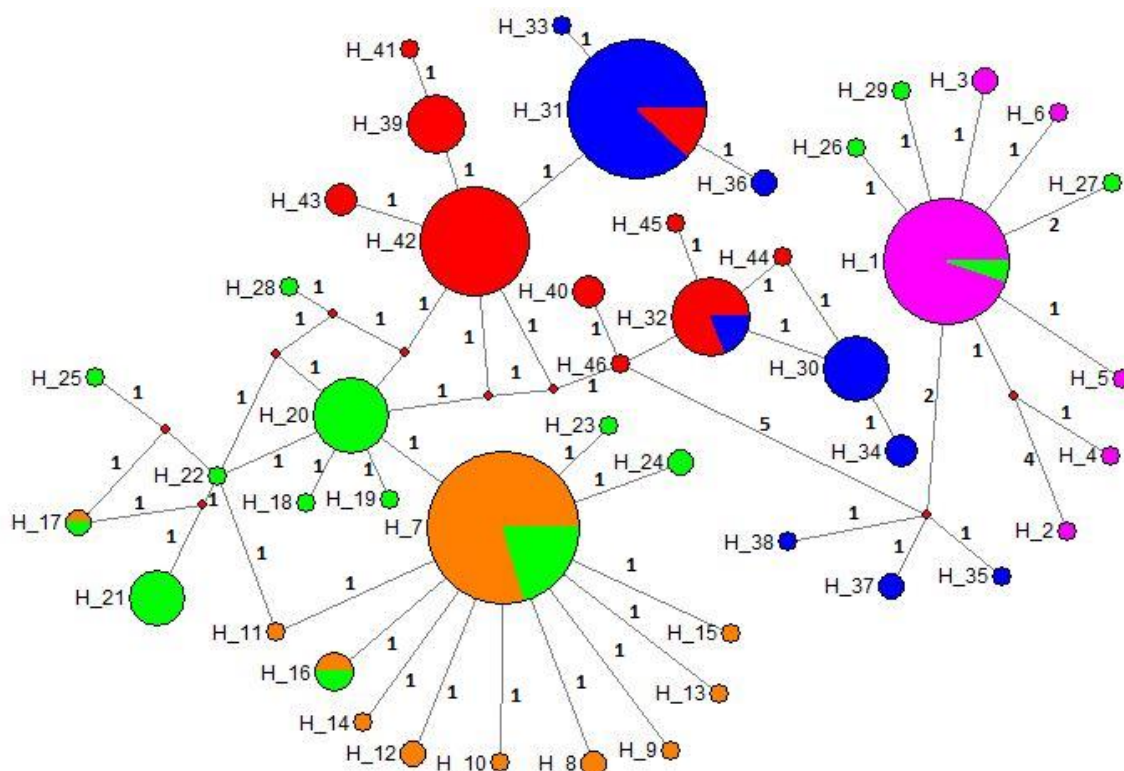
	POPULAÇÃO	LOCALIDADE
	POP B	Isla de la Juventud, Cuba.
	POP C	Sertãozinho, SP. Brasil
	POP D	Ibicoara, BA. Brasil
	POP E	Mogi das Cruzes, pto 42, SP. Brasil
	POP X	Mogi das Cruzes, pto 38, SP. Brasil

Figura 9. Rede haplótipos para o gene 5,8S das populações de *Utricularia gibba*.

Com um total de 46 haplótipos do espaçador ITS2 apresenta o maior número dentre as três regiões (Tabela. 15). A rede de haplótipos não apresenta um haplótipo

ancestral comum claro para as populações ou sua maioria (Figura 10), mas sim haplótipos mais frequentes compartilhados por duas populações. Destes haplótipos, as populações C e D compartilham o haplótipo 17, o Haplótipo 16 e o haplótipo mais frequente, o Haplótipo 7, que reúne 59 clones (20,21% do total), do qual descendem possíveis haplótipos secundários menores por um passo mutacional, exclusivos para cada uma dessas populações. A população D (Bahia, Brasil) também compartilha com a população B (Cuba) o Hap-1 representado por 40 clones, do qual por um passo mutacional são gerados os demais haplótipos da população cubana e outros presentes na população brasileira D. Dois haplótipos são compartilhados pelas populações E e X o mais frequente é o haplótipo 31 (50 clones) e o haplótipo 32 (16 clones).

Dentre os haplótipos com altas frequências (Figura 10), mas formados por clones de uma única população, estão o Haplótipo 42 com 31 clones e o Haplótipo 39, ambos da população X (Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil), os Hap-20 e Hap-21 da população D (Ibicoara, Bahia, Brasil) e para a população E o Hap-30 (segunda população de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil).



	POPULAÇÃO	LOCALIDADE
	POP B	Isla de la Juventud, Cuba.
	POP C	Sertãozinho, SP. Brasil
	POP D	Ibicoara, BA. Brasil
	POP E	Mogi das Cruzes, pto 42, SP. Brasil
	POP X	Mogi das Cruzes, pto 38, SP. Brasil

Figura 10. Rede haplótipos para o espaçador ITS2 das populações de *Utricularia gibba*.

Com 94 haplótipos a rede para a região ITS1+5,8S+ITS2 completa (ITS1+5,8S+ITS2; Figura 11) tem como possível haplótipo ancestral o Haplótipo 16, com 83 clones e representando 28,42% do total (Tabela. 17), das populações C, E e X, todas representadas por populações do Estado de São Paulo (Brasil). O Haplótipo 16 se encontra rodeado de haplótipos secundários, de baixa frequência, a um passo mutacional das populações C (Sertãozinho, São Paulo, Brasil) e da população E (Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil). Deriva-se desse haplótipo também o Haplótipo 37 da pop D (da população D, de Ibicoara, Bahia, Brasil) com 8 clones do qual são originados outros haplótipos da população D (Figura11). Todos os haplótipos secundários da

população C estão separados do haplótipo ancestral por um ou dois passos mutacionais, à exceção do Haplótipo 31, com 4 passos no mínimo de distância.

Tabela 17. Haplótipos identificados nos clones para a região ITS1+5,8S+ITS2 de *Utricularia gibba*.

HAPLÓTIPO	FREQUÊNCIA	%	CLONES
HAP 1	29	9,93	B1-1 B1-4 B1-5 B1-7 B1-9 B1-11 B1-12 B1-13 B1-14 B2-2 B2-3 B2-4 B2-5 B2-6 B2-10 B2-11 B2-13 B2-14 B6-15 B6-14 B6-13 B6-12 B6-11 B6-2 B6-4 B6-6 B6-8 B6-9 B6-10
HAP 2	1	0,34	B1-2
HAP 3	2	0,68	B1-3 B2-12
HAP 4	1	0,34	B1-6
HAP 5	1	0,34	B1-8
HAP 6	1	0,34	B1-10
HAP 7	1	0,34	B1-15
HAP 8	1	0,34	B2-1
HAP 9	1	0,34	B2-7
HAP 10	1	0,34	B2-8
HAP 11	1	0,34	B2-9
HAP 12	1	0,34	B2-15
HAP 13	1	0,34	B4-4
HAP 14	1	0,34	B6-1
HAP 15	1	0,34	B6-7
HAP 16	83	28,42	C1-1 C1-2 C1-4 C1-5 C1-7 C1-8 C1-9 C1-12 C1-13 C1-14 C1-15 C1-17 C2-1 C2-8 C2-11 C2-17 C3-1 C3-4 C3-5 C3-6 C3-7 C3-10 C3-11 C3-13 C3-14 C3-16 C3-17 C4-2 C4-4 C4-5 C4-6 C4-11 C4-12 C4-15 C5-4 C5-6 C5-8 C5-10 C5-11 C5-13 C5-14 X12-17 X13-1 X13-8 X13-9 X19-7 E1-5 E1-12 E1-17 E3-1 E3-3 E3-4 E3-7 E3-8 E3-14 E3-15 E3-16 E4-4 E4-5 E4-6 E4-7 E4-8 E4-10 E4-13 E4-16 E4-17 E5-17 E5-16 E5-13 E5-12 E5-11 E5-10 E5-9 E5-6 E5-5 E5-4 E5-3 E5-2 E8-3 E8-11 E8-14 E8-16 E8-17
HAP 17	1	0,34	C1-10
HAP 18	1	0,34	C1-16
HAP 19	2	0,68	C2-14 C2-15
HAP 20	1	0,34	C3-8
HAP 21	1	0,34	C3-9
HAP 22	1	0,34	C3-12
HAP 23	1	0,34	C3-15
HAP 24	2	0,68	C4-1 C4-10
HAP 25	1	0,34	C4-3
HAP 26	1	0,34	C4-7
HAP 27	2	0,68	C4-9 C4-14
HAP 28	1	0,34	C4-16
HAP 29	1	0,34	C5-1
HAP 30	1	0,34	C5-7
HAP 31	1	0,34	C5-9
HAP 32	11	3,77	D2-8 D6-13 D6-14 D4-6 X12-11 X13-3 X13-7 X15-6 X15-15 X15-17 X19-15
HAP 33	1	0,34	D3-16
HAP 34	2	0,68	D3-14 D3-8
HAP 35	9	3,08	D3-13 D3-11 D3-10 D3-3 D6-4 D6-10 D6-17 D4-4 D4-12
HAP 36	1	0,34	D3-1
HAP 37	8	2,74	D3-5 D6-3 D6-5 D6-11 D6-12 D4-2 D4-8 D4-13
HAP 38	1	0,34	D3-6
HAP 39	3	1,03	D3-9 D6-7 D6-16

HAPLÓTIPO	FREQUÊNCIA	%	CLONES
HAP 40	1	0,34	D6-1
HAP 41	1	0,34	D6-2
HAP 42	1	0,34	D6-8
HAP 43	1	0,34	D6-9
HAP 44	23	7,88	D7-2 D7-3 X12-1 X12-2 X12-5 X12-8 X12-9 X12-10 X12-13 X12-16 X13-11 X13-13 X13-17 X15-1 X15-2 X15-5 X15-7 X15-16 X19-2 X19-9 X19-11 X19-14 X19-16
HAP 45	1	0,34	D7-4
HAP 46	1	0,34	D7-5
HAP 47	1	0,34	D7-6
HAP 48	1	0,34	D7-8
HAP 49	2	0,68	D7-10 D7-15
HAP 50	1	0,34	D7-14
HAP 51	1	0,34	D7-16
HAP 52	2	0,68	D4-1 D4-5
HAP 53	1	0,34	D4-3
HAP 54	1	0,34	D4-7
HAP 55	1	0,34	D4-9
HAP 56	1	0,34	D4-10
HAP 57	1	0,34	D4-11
HAP 58	1	0,34	D4-14
HAP 59	1	0,34	D4-16
HAP 60	1	0,34	X11-4
HAP 61	8	2,74	X11-5 X11-6 X11-7 X11-10 X11-12 X11-13 X11-16 X11-17
HAP 62	3	1,03	X11-9 X11-11 X11-15
HAP 63	1	0,34	X11-14
HAP 64	3	1,03	X12-3 X12-6 X12-7
HAP 65	3	1,03	X12-4 X13-6 X13-16
HAP 66	4	1,37	X12-15 X19-1 X19-5 X19-6
HAP 67	1	0,34	X13-4
HAP 68	2	0,68	X13-5 E4-12
HAP 69	1	0,34	X13-10
HAP 70	1	0,34	X13-12
HAP 71	1	0,34	X13-14
HAP 72	1	0,34	X15-8
HAP 73	1	0,34	X15-11
HAP 74	1	0,34	X15-12
HAP 75	1	0,34	X19-8
HAP 76	2	0,68	X19-10 X19-13
HAP 77	1	0,34	X19-12
HAP 78	1	0,34	X19-17
HAP 79	9	3,08	E1-2 E1-3 E1-7 E4-1 E4-15 E5-8 E5-7 E5-1 E8-4
HAP 80	1	0,34	E1-6
HAP 81	2	0,68	E1-10 E1-11
HAP 82	1	0,34	E1-14
HAP 83	1	0,34	E1-16
HAP 84	1	0,34	E3-2
HAP 85	1	0,34	E3-9
HAP 86	2	0,68	E3-10 E3-13
HAP 87	3	1,03	E4-2 E4-3 E4-9
HAP 88	1	0,34	E5-14
HAP 89	1	0,34	E8-2
HAP 90	1	0,34	E8-5
HAP 91	1	0,34	E8-7
HAP 92	1	0,34	E8-8
HAP 93	2	0,68	E8-9 E8-15
HAP 94	2	0,68	E8-12 E8-13

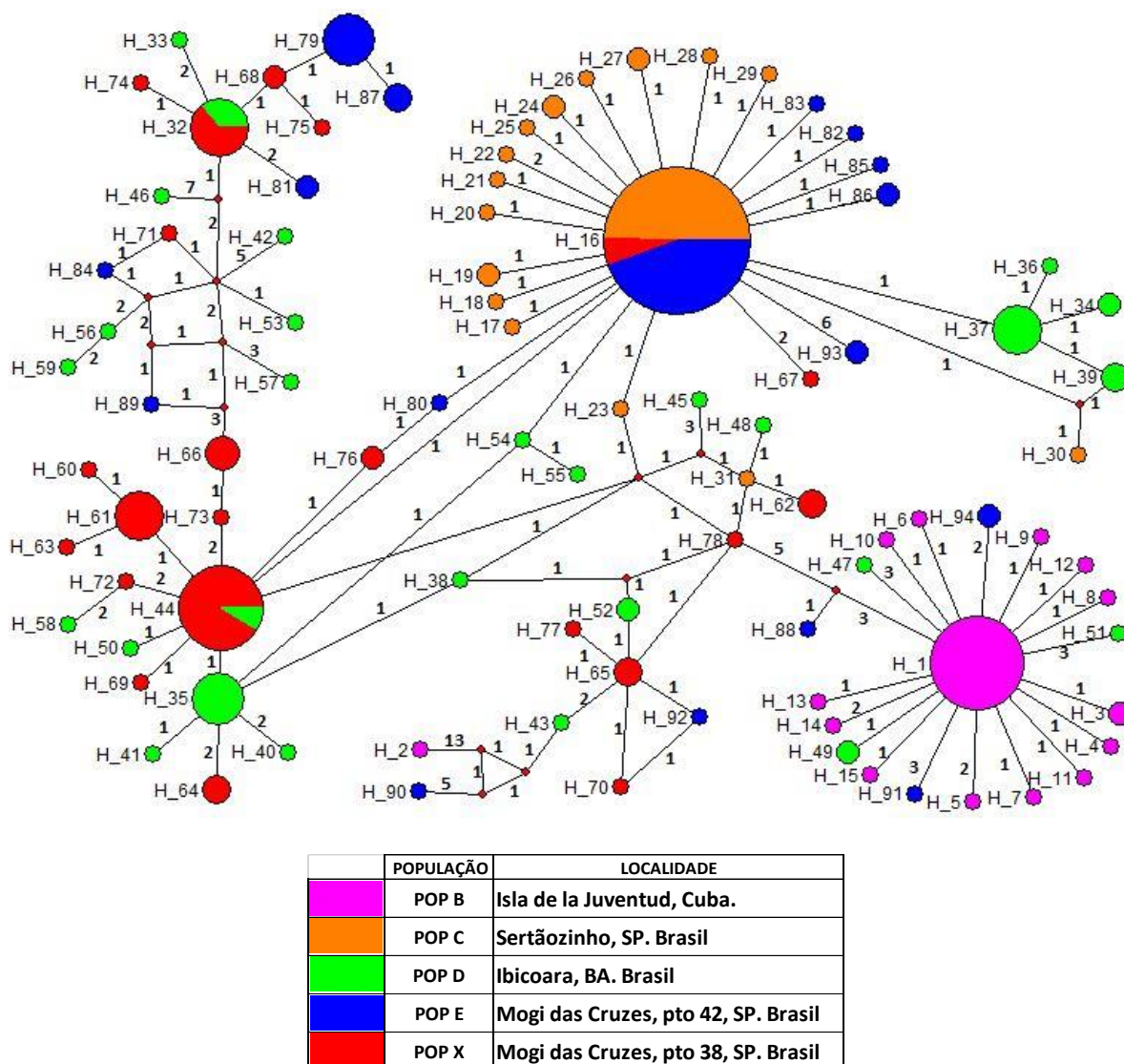


Figura. 11 Rede de haplótipos da região ITS1+5,8S+ITS2 das populações de *Utricularia gibba*.

Dois haplótipos são compartilhados por duas populações, os haplótipos 44 e 32 presentes nas populações D e X. Entretanto, os demais haplótipos são exclusivos de uma única população, dentre eles o maior, representado por 29 clones, é o Haplótipo 1 com clones da população cubana (B) da qual são derivados haplótipos menos frequentes com no geral apenas uma mutação, a exceção do Haplótipo 2 distante no mínimo em 25 passos mutacionais. Conectados ao Haplótipo 1 aparecem também haplótipos da população D (Ibicoara, Bahia, Brasil) e da população E (Mogi

das Cruzes, São Paulo, Brasil), resultado congruente com a topologia obtida pela inferência bayesiana (Figura 11).

Outros grupos de haplótipos são originados por poucos passos mutacionais do haplótipo principal, o Haplótipo 16, e criam uma rede menor de haplótipos que estão presentes nas populações D, E e X.

5. DISCUSSÃO

5.1 Amplificação da região ITS1+5,8S+ITS2 em *Utricularia gibba*

Neste trabalho foram utilizados na reação de amplificação da região ITS1+5,8S+ITS2 3% de DMSO (dimetilssulfóxido) (Miranda et al., 2010). Esse protocolo se mostrou suficiente para conseguir amplificar uma ampla amostragem de diferentes cópias (ortólogas e parálogas) de ITS da planta alvo, *Utricularia gibba*. Apesar do emprego desse adjuvante para as amplificações, esse procedimento não restringiu em excesso a diversidade de cópias da região da ITS, o que poderia ser um viés para o presente estudo que se propôs a avaliar a diversidade de cístrons ITS. Pelo contrário, a amplitude de amostragem foi tão elevada, pela pouca estringência do processo de amplificação, devido as baixas temperaturas de anelamento e o uso de iniciadores universais, que inclusive foram obtidas cópias exógenas de ITS resultantes de contaminantes como fungos, bactérias, algas e insetos (Apêndice Tabela S2). Segundo Alvarez e Wendel (2003) o uso de DMSO pode relaxar a estrutura secundária na amplificação, processo que poderia aumentar a diversidade de *amplicons* e esses poderiam assim ser obtidos e sequenciados.

A clonagem permitiu separar cópias presentes na amplificação da região ITS próprias da planta e dos nrDNA exógenos. Desse jeito, foram encontrados indivíduos até com 10 haplótipos diferentes da região ITS da planta alvo, como o indivíduo D4, do qual foram analisados 15 clones (Tabela 7) e indivíduos como o B4 com 14 de 15 clones com nrDNA exógeno (Apêndice B). A presença de múltiplas cópias de nrDNA nas amplificações não seria evidenciada usando sequenciamento direto.

A região ITS1+5,8S+ITS2 amplificada para *Utricularia gibba* teve valores de comprimento entre 572 a 660 pb (Tabela 4), os quais estão entre os valores típicos presentes nos genomas de angiospermas nas quais a região ITS varia em comprimento de 500 a 700 pb (BALDWIN et al., 1995).

5.2 Motifs conservados, polimorfismos e funcionalidade das cópias

Utricularia gibba apresenta um dos menores genomas conhecidos para angiospermas, com aproximadamente 82Mpb (IBARRA-LACLETTE, 2013, GREILHUBER et al., 2006). O gênero *Utricularia* apresenta uma alta amplitude de tamanhos de genomas nucleares, com variações interespecíficas que vai de 79 Mpb até os 561 Mpb (VELEBA et al., 2014). Entretanto, a maior parte das variações interespecíficas está relacionada à proporção de DNA repetitivo e elementos transponíveis, sendo a quantidade de genes mais ou menos conservadas (IBARRA-LACLETTE et al., 2013). Entretanto, ao contrário das expectativas uma vez que *U.gibba* apresenta um dos menores genomas conhecidos para o gênero e também para as angiospermas (GREILHUBER et al., 2006), foi encontrada alta proporção de cópias de diversidade haplotípica de cístrons ITS no genoma da espécie.

O alto grau de variação foi principalmente encontrado no comprimento e no conteúdo de GC nos espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) e na região completa dos clones dos indivíduos (Tabela 4). Para os dois espaçadores tanto o comprimento quanto o conteúdo de GC estão dentro dos valores para plantas com flores de acordo com Baldwin et al. (1995), porém o comprimento médio da região ITS2, que é 246 pb (Apêndice A), encontra-se dentre os maiores valores encontrados e a máxima de 254 pb (Tabela 3), é a maior até então reportada para as angiospermas.

Diferentes evidências apontam para que todos os haplótipos encontrados neste trabalho sejam cópias funcionais. Em nenhum dos 292 clones analisados foram encontradas deleções ou inserções na região 5,8S que são tipicamente encontrados nos pseudogenes (ALVAREZ & WENDEL, 2003), assim como a presença dos motifs conservados do gene 5,8S (HARPKE & PETERSON, 2008) e para o espaçador ITS1 (LI & SCHARLD, 1994). O gene 5,8S é a região mais conservada nas cópias dentre as regiões avaliadas, demonstrado pelas diferenças nos valores da variação haplotípica, a diversidade nucleotídica, a diferença entre pares de nucleotídeos, e a variação do comprimento e conteúdo de GC dos espaçadores ITS1 e ITS2 (Tabelas 3-4). Porém foram obtidos valores negativos no teste *D* de Tajima para a região ITS completa e para as regiões analisadas isoladamente (ITS1, ITS2 e 5,8S), o que indica

excesso de polimorfismos de baixa frequência; porém, esses valores foram significativos apenas para a região 5,8S (Tabela 4).

Altas taxas de polimorfismo intra-individuais têm sido descritas em diferentes táxons de angiospermas (MAYOL & ROSSELLO, 2001, RAZAFIMANDIMBISON et al., 2014, HARPKE & PETERSON, 2006) e em estudo com espécies do gênero *Pyrus*, Zheng et al. (2008) encontraram pseudogenes, cópias ancestrais recombinantes e diversas cópias funcionais no mesmo indivíduo. De forma semelhante, nesse estudo foram encontradas múltiplas cópias, porém todas funcionais, em todos os 25 indivíduos estudados, provenientes de 5 populações distintas distribuídas nos neotrópicos de *U. gibba*.

As estruturas secundárias do espaçador ITS2 dos diferentes haplótipos encontrados (Figura 6) foram modeladas por transferibilidade de estrutura com espécies relacionadas taxonomicamente baseadas no fato de a estrutura secundária da região ITS2 ser nas sequências funcionais geralmente muito conservada, como reportado para outros táxons (HERSHKOVITZ & ZIMMER, 1996; BALDWIM et al., 1995; MAI & COLEMAN, 1997). A conservação intraespecífica, intrapopulacional ou mesmo intra-individual (no mesmo genoma) desses motifs confere estabilidade à estrutura secundária do rRNA, sendo sua manutenção fundamental para o processo de ribogênese (CÔTÉ et al. 2002).

5.3 Inferências filogenéticas e filogeográficas

Nas hipóteses filogenéticas por inferência bayesianas para as regiões isoladas (espaçadores ITS1, ITS2 e gene 5,8S; Figura 2-4) e a região completa (ITS1+5,8S+ITS2; Figura 5) todos os clones de *Utricularia gibba* foram agrupados em um clado monofilético. O gene 5,8S, por ser muito conservado, apresenta uma politomia na qual são reagrupados poucos haplótipos em sub-clados. Os espaçadores ITS1 e o ITS2 e a região ITS1+5,8S+ITS2 apresentam topologias congruentes quando

comparados os três cladogramas (Figura 2,4-5). Nestas hipóteses nas quais todos os clones da população cubana (B) encontram-se formando um clado monofilético com presença de clones dos indivíduos das populações brasileiras (D e E). As relações filogenéticas dentro dos clados não foram bem resolvidas e clones do mesmo indivíduo não foram agrupadas nos mesmos clados, mas sim dispersos em diferentes sub-clados. Segundo Alvarez e Wendel (2003) a homoplasia não afetaria a acurácia das análises filogenéticas se os caracteres homoplásticos não fossem informativos. E os resultados apresentados pelo presente estudo mostram, pela estruturação tanto dos cladogramas quanto das redes filogenéticas, e sua congruência geral, que a homoplasia é suplantada pelo sinal filogenético. Buckler et al. (1997) advertem sobre os riscos potenciais na incorporação de parálogos de ITS nos estudos evolutivos, o que poderia confundir os resultados, assim os mesmos devem ser cuidadosamente analisados. Por esse tipo de resultado Feliner e Rosselló (2007) recomendam o uso da região ITS em combinação com sequências plastídias ou mitocondriais. Álvarez e Wendel (2003), por sua vez, recomendam a necessidade de se fazer uma amostragem representativa seguida de estudos-piloto de prospecção, protocolos de laboratório e análises cuidadosas.

Os estudos filogeográficos com uso de redes de haplótipos são baseados na teoria da coalescência que indica que os haplótipos ancestrais estão localizados na parte interna da rede, ocorrendo em alta frequência e mostrando um grande número de conexões com haplótipos de baixa frequência (TEMPLETON et al., 1992). Entretanto, a rede de haplótipos para o espaçador ITS2 não apresenta um haplótipo ancestral compartilhado pela maior parte das populações, mas sim haplótipos compartilhados por duas populações e haplótipos exclusivos para cada população. Por sua vez, as redes de haplótipos para as regiões ITS1, 5,8S e a região ITS1+5,8S+ITS2 apresentaram um haplótipo ancestral. No caso do gene 5,8S, o haplótipo ancestral encontra-se em todas os indivíduos das populações estudadas e é igual ao reportado por Ibarra-laclette (2013) no genoma de *Utricularia gibba*. Para o espaçador ITS1 o ancestral comum está presente em todas as populações brasileiras e para a região ITS completa presente em três populações brasileiras (C, E e X) (Figuras 11-13) assim as redes dos haplótipos para essas regiões reflete uma história demográfica caracterizada por eventos de expansão populacional e/ou

geográfica a partir de uma população fundadora devido à topologia em formato de estrela. Demonstrando que mesmo com a presença de haplótipos compartilhados pelas diferentes populações as redes haplotípicas dos espaçadores ITS1 e ITS2 e da região ITS1+5,8S+ITS2 refletem a história evolutiva e de dispersão das populações de *U.gibba* estudadas e são informativas nos estudos populacionais.

O posicionamento dos clones da população cubana (B) nas hipóteses filogenéticas por inferência bayesiana tanto para os espaçadores ITS1 e ITS2 e a região ITS1+5,8s+ITS2, o clado, conformado por todos os clones dos indivíduos da população, se apresentou como o mais derivado e relacionado com indivíduos da população da Bahia (D) e de Mogi das Cruzes (E). Resultados similares foram obtidos nas redes haplotípicas dos espaçadores ITS1 e ITS2 e da região ITS1+5,8s+ITS2. Dessa maneira, na rede de haplótipos do espaçador ITS1 o haplótipo principal e o maior haplótipo secundário para essa população e compartilhado pela população E de Mogi das Cruzes. Para o espaçador ITS2 o haplótipo principal da população B e compartilhado com a população D da Bahia e na rede de haplótipos da região ITS1+5,8S+ITS2 a população cubana apresenta um haplótipo exclusivo agrupando a maior parte dos clones da população e está rodeado por haplótipos secundários menores da mesma população e das populações D e E. Baseados nesses resultados, e nas distancias e localização das populações e a reprodução assexuada de *U.gibba* poder-se afirmar que a população cubana é recente e derivada de populações procedentes do Brasil.

5.4 Genoma reduzido e origem dos polimorfismos em *Utricularia gibba*

Para as espécies de *Utricularia* aquáticas tem sido descrito que a sua reprodução é principalmente assexuada (KAMEYANA et al., 2005; KAMEYANA & OHARA, 2006). Da mesma forma, Taylor (1989) adverte sobre a presença de flores cleistogâmicas, comuns para diversas espécies do gênero, inclusive para a seção *Utricularia*, padrão que poderia elevar a taxa de endogamia.

As plantas carnívoras da família Lentibulariaceae dos gêneros *Utricularia* e *Genlisea* apresentam altas taxas de substituição nucleotídica nos genomas

mitocondriais, plastidiais e nucleares (JOBSON & ALBERT, 2002; MULLER et al., 2004; MULLER & BOSRCH, 2005; MULLER et al., 2006) o qual foi comprovado pela variação haplotípica do nrDNA de *Utricularia gibba* neste estudo. No caso de *Utricularia gibba*, uma espécie diploide, com $2n = 28$ (KONDO, 1972; CASPER & MANITZ, 1975), de reprodução sexuada e principalmente vegetativa (TAYLOR, 1989), as duplicações e a presença de cópias funcionais poderiam ser explicadas pelo fato de que os *loci* funcionais podem ser duplicados na ausência de poliploidia e novos *loci* poderiam ser originados a partir de *loci* pre-existentes (FELINER & ROSELLÓ, 2007). Ademais a ação mutagênica de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ALBERT et al., 2010) nas células somáticas e a propagação delas em novas plantas, por meio de reprodução clonal, como por fragmentação dos estolões, poderia conduzir substancialmente polimorfismos dentro das populações clonais independente da reprodução sexual (IBARRA-LACLETTE, 2011). Também se tem descrito que o genoma de *Utricularia gibba* evoluiu sob alta pressão seletiva, o que poderia trazer com o tempo perda de genes e que as duplicações do genoma (*Whole Genome Duplication*) poderiam prover cópias adicionais dos genes na aquisição e expansão das famílias gênicas, podendo servir como mecanismos de proteção contra colapsos ou extinção de linhagens (IBARRA-LACLETTE et al., 2013; CARRETO-PAULET et al., 2015), uma vez que sempre haverá cópias disponíveis como repositórios.

6. CONCLUSÕES

-Evidenciou-se evolução em concerto incompleta pelas variações intragenômicas, interpopulacionais e intraespecíficas no DNA ribossomal de *Utricularia gibba* com a presença de elevada proporção de cópias parálogas da região ITS.

-Inferiu-se que todas as cópias dos espaçadores ITS1 e ITS2 e do gene 5,8S encontradas nas diferentes cópias são funcionais, sejam intragenômicas, inter ou intrapopulacionais.

-Evidenciou-se que as cópias da região ITS do mesmo indivíduo são polifiléticas e há haplótipos compartilhados por indivíduos de populações diferentes.

-Os espaçadores ITS1 e ITS2, mesmo apresentando taxas mutacionais diferentes e regiões conservadas próprias, mantêm o caráter informativo nas análises de hipóteses filogenéticas e filogeográficas.

-Mostrou-se a necessidade da implementação de estratégias de prospecção, como a clonagem devido a possíveis erros na interpretação dos eletroferogramas produzido por sequenciamento direto.

7.REFERÊNCIAS

AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov, B.N. & Csaki, F. (Eds). **Second International Symposium on Information Theory**. Budapest: Akademiai Kiado. pp. 267–281, 1973.

ALBERT, V. A.; JOBSON, R. W.; MICHAEL, T. P.; TAYLOR, D. J. The carnivorous bladderwort (*Utricularia*, *Lentibulariaceae*): a system inflates. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.1, p. 5-9, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v.215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVAREZ, I.; WENDEL, J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* v.29, p. 417–434, 2003.

ARNHEIM, N.; KRYSTAL, M.; SCHMICKEL, R.; WILSON, G.; RYDER, O.; ZIMMER, E. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V.77, n.12, p. 7323-7327, 1980.

BAILEY, C. D.; CARR, T. G.; HARRIS, S. A.; HUGHES, C. E. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. **Molecular phylogenetics and evolution**, v.29, n.3, p.435-455, 2003.

BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S.; DONOGHUE, M. J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 247-277, 1995.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.

BIRNBOIM, H; DOLY, J.. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl. Acids Res.** v.7, p. 1513-1523, 1979

BROSIUS, J.; DULL,T; SLEETER, D; NOLLER, H.. Gene organization and primary structure of ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, v.148, p.107-127, 1981.

BUCKLER, E.S.; HOLTSFORD, T.P. Zea ribosomal repeat evolution and mutation patterns. **Mol. Biol. Evol.** v.13, p.623–632,1996a

BUCKLER, E.S.; HOLTSFORD, T.P. Zea systematics: ribosomal ITS evidence. **Mol. Biol. Evol.** v.13, p.612–622, 1996b.

BUCKLER, E.S.; IPPOLITO, A.; HOLTSFORD, T.P.The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. **Genetics** v.145, p.821–832, 1997.

CASPER, J.; MANITZ, H. Beiträge zur Taxonomie und Chorologie der mitteleuropäischen *Utricularia*-Arten 2. Androsporogenese, Chromosomenzahlen und Pollenmorphologie. **Feddes Repertorium**, v. 86, n. 4, p. 211-232, 1975.

CHILDS, G.; MAXSON, R.; COHN, R. H.; KEDES, L. Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eucaryotes. **Cell** v.23, n.3, p.651-663,1981.

CÔTÉ, C. A.; GREER, C. L.; PECULIS, B. A. Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast. **Rna**, v.8, n.6, p.786-797,2002.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**,v.9, n.8, p.772-772. 2012.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem Bull.** v. 19, p. 11-15, 1987.

DUBCOVSKY, J.; DVORÁK, J. Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. **Genetics**, v.140, n.4, p.1367-1377, 1995.

FU, Y.; LI, W.. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, n. 3, p. 693–709. 1993.

LYONS, E; FREELING, M. How to usefully compare homologous plant genes and chromosomes as DNA sequences. **The Plant Journal**, v.53, n.4, p. 661-673, 2008

GOEL, S.; RAINA, S; OGIHARA, Y. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the Phaseolus-Vigna Complex. **Mol. Phyl. Evol.** v.22, p.1-19. 2002.

GREILHUBER, J.; BORSCH, T.; MÜLLER, K.; WORBERG, A.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. **Plant Biology**, v.8, n.06, p.770-777,2006.

GUISANDE, C. et al., 2007. Bladderworts. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 58-68.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARPKE, D.; PETERSON, A. Non-concerted ITS evolution in Mammillaria (Cactaceae). **Mol. Phylogenet. Evol.** 41, 579–593, 2006.

HERSHKOVITZ, M. A.; ZIMMER, E. A. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. **Nucleic acids research**,v.24, n.15, p.2857-2867,1996.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, p.411-453. 1991.

HODAČ, L.; SCHEBEN, A. P.; HOJSGAARD, D.; PAUN, O.; HÖRANDL, E. ITS polymorphisms shed light on hybrid evolution in apomictic plants: A case study on the Ranunculus auricomus complex. **PloS one**, v. 9, n.7, p. e103003, 2014.

HOFMAN, J.; LAU, R.; DOOLITTLE, W. The number, physical organization and transcription of ribosomal RNA cistrons in an archaebacterium: *Halobacterium halobium*. **Nucleic acids res.**, v.7, p.1321-1333, 1979.

HŘIBOVÁ, E.; ČÍŽKOVÁ, J.; CHRISTELOVÁ, P.; TAUDIEN, S.; DE LANGHE, E.; DOLEŽEL, J. The ITS1-5.8 S-ITS2 sequence region in the Musaceae: structure, diversity and use in molecular phylogeny. **PLoS One**, v.6, n.3, p.e17863, 2011.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754–755, 2001.

IBARRA-LACLETTE, E.; ALBERT, V. A.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Is GC bias in the nuclear genome of the carnivorous plant *Utricularia* driven by ROS-based mutation and biased gene conversion?. **Plant signaling & behavior**, v.6, n.11, p.1631-1634, 2011a.

IBARRA-LACLETTE, E.; ALBERT, V. A.; PÉREZ-TORRES, C. A.; ZAMUDIO-HERNÁNDEZ, F.; DE J ORTEGA-ESTRADA, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transcriptomics and molecular evolutionary rate analysis of the bladderwort (*Utricularia*), a carnivorous plant with a minimal genome. **BMC Plant Biology**, v.11, n.1, p.101, 2011b.

IBARRA-LACLETTE, E.; LYONS, E., HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; PÉREZ-TORRES, C. A.; CARRETERO-PAULET, L.; CHANG, T. H.; FERNÁNDEZ-CORTÉS, A. Architecture and evolution of a minute plant genome. **Nature**, v.498, n.7452, p.94-98, 2013.

JOBSON, R.W.; ALBERT, V.A. Molecular rates parallel diversification contrasts between carnivorous plant sister lineages¹. **Cladistics**, v. 18, n. 2, p. 127-136, 2002

KAMEYAMA, Y.; TOYAMA, M.; OHARA, M. Hybrid origins and F1 dominance in the free-floating, sterile bladderwort, *Utricularia australis* f. *australis* (Lentibulariaceae). **American journal of botany**, v.92, n.3, p.469-476, 2005.

KAMEYAMA, Y.; OHARA, M. Predominance of clonal reproduction, but recombinant origins of new genotypes in the free-floating aquatic bladderwort *Utricularia australis* f. *tenuicaulis* (Lentibulariaceae). **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 119, p. 357-362, 2006.

KATO, K.; STANDLEY, D. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v.30, n.4, p.772-780, 2013.

KONDO, K. Chromosome numbers of some angiosperms in the United States. **Fyton**, v.29, n.1-2, p.55-58, 1972.

KRÓL, E.; PŁACHNO, B. J.; ADAMEC, L.; STOLARZ, M.; DZIUBIŃSKA, H.; TRĘBACZ, K. Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. **Annals of Botany**, v.109, n.1, 47-64, 2012.

LIAO, D. Concerted evolution: molecular mechanisms and biological implications. *Am. J. Hum. Genet.* v.64, p.24-30, 1999.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v. 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451–1452. 2009.

LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.

LIU, J. S.; SCHARDL, C. L. A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. **Plant molecular biology**, v.26, n.2, p.775-778, 1994.

MAI, J.C.; COLEMAN, A.W. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. **J. Mol. Evol.** v.44, p.258–271. 1997.

MAYOL, M.; ROSSELLÓ, J.A. Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*. **Mol. Phylogenet. Evol.** v.19, p.167–176, 2001.

METCALFE, J.R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons: Clarendon Press, **Oxford**, v. 2, p.991-994, 1972.

MICHAEL, T.; JACKSON, S. The first 50 plant genomes. **The Plant Genome**, v.6, n.2, 2013.

MIRANDA, V. F. O. D.; MARTINS, V. G.; FURLAN, A.; BACCI JR, M. Plant or fungal sequences? An alternative optimized PCR protocol to avoid ITS (nrDNA) misamplification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.1, p.141-152, 2010.

MUIR, G.; FLEMING, C.; SCHLÖTTERER, C. Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, n.2, p.112-119, 2001.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. A phylogeny of Lentibulariaceae based on sequences of *matK* and adjacent non-coding regions. **American Journal of Botany**, v. 87, p.145-146, 2000.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; THEISEN, I.; BARTHLOTT, W. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and the Lamiales. **Plant Biology**, v.6, n.04, p.477-490, 2004.

MÜLLER, K.; BORSCH, T. Phylogenetics of *Utricularia* and molecular evolution of the *trnK* intron in a lineage with high substitutional rates. **Plant Systematic and Evolution**, v.250, p.39-67, 2005.

MÜLLER, K.; BORSCH, T.; LEGENDRE, L.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Recent progress in understanding the evolution of carnivorous Lentibulariaceae (Lamiales). **Plant Biology**, v.8, n.6, p.748-757, 2006.

MUSTERS, W.; BOON, K.; VAN DER SANDE, C. A.; VAN HEERIKHUIZEN, H.; PLANTA, R. J. Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. **The EMBO journal**, v.9, n.12, p.3989, 1990.

NAGYLAKI, T. The evolution of multigene families under intrachromosomal gene conversion. **Genetics**, v.106, p.529–548, 1984.

NAWROCKI, E. P.; BURGE, S. W.; BATEMAN, A.; DAUB, J.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; FINN, R. D.. Rfam 12.0: updates to the RNA families database. **Nucleic acids research**, gku1063, 2014.

OCHIENG, J. W.; HENRY, R. J.; BAVERSTOCK, P. R.; STEANE, D. A.; SHEPHERD, M. Nuclear ribosomal pseudogenes resolve a corroborated monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* despite misleading hypotheses at functional ITS paralogs. **Molecular phylogenetics and evolution**, v.44, n.2, p.752-764, 2007.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; KELLOGG, E. A.; BREMER, B. Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: a case study from Naucleaeae (Rubiaceae). **Systematic Biology**, v.53, n.2, p.177-192, 2004.

ROSSELLO, J. A.; LAZARO, A., COSÍN, R.; MOLINS, A. A phylogeographic split in *Buxus balearica* (Buxaceae) as evidenced by nuclear ribosomal markers: when ITS paralogues are welcome. **Journal of Molecular Evolution**, v.64, n.2, p.143-157, 2007.

SAMBROOK, J; RUSSELL, D., Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. **New York: Cold Spring Harbor**.250p, 2001.

SONE, T.; FUJISAWA, M.; TAKENAKA, M.; NAKAGAWA, S.; YAMAOKA, S.; SAKAIDA, M.; FUKUZAWA, H. Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. **Plant molecular biology**, v.41, n.5, p.679-685,1999.

STÖVER, B, MÜLLER, K. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC bioinformatics**, v.11, n.1,p 1, 2010

SUGIURA, N. Further analysis of the data by Akaike's Information Criterion and the finite corrections. **Communications in Statistics, Theory and Methods** v.7, p13–26, 1978

SUH, Y.; THIEN, L. B.; REEVE, H. E.; ZIMMER, E. A. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. **American Journal of Botany**, p.1042-1055,1993.

TAYLOR, P. The Genus *Utricularia* – A Taxonomic Monograph. Kew Bulletin Additional Series XIV. **Royal Botanic Gardens**, Kew. London. 1989.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585–95, 1989.

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v.132, n.2, p.619-633, 1992.

VAN NUES, R. W.; RIENTJES, J. M.; VAN DER SANDE, C. A.; ZERP, S. F.; SLUITER, C.; VENEMA, J.; RAUÉ, H. A. Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.6, p.912-919, 1994.

VAN DER SANDE, C. A.; KWA, M.; VAN NUES, R. W.; VAN HEERIKHUIZEN, H.; RAUÉ, H. A.; PLANTA, R. J. Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. **Journal of molecular biology**, v.223, n.4, p.899-910,1992.

VELEBA, A., BUREŠ, P.; ADAMEC, L., ŠMARDA, P.; LIPNEROVÁ, I.; HOROVÁ, L. Genome size and genomic GC content evolution in the miniature genome-sized family Lentibulariaceae. **New Phytologist**, v.203, n.1, p.22-28, 2014.

WEI, X., WANG, Q, Recolonization and radiation in *Larix* (Pinaceae), evidence from nuclear ribosomal DNA paralogs. **Mol. Ecol.**, v.13, p. 3115–3123, 2004.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v.18, n.1, p.315-322,1990.

WOLF, M.; ACHTZIGER, M.; SCHULTZ, J.; DANDEKAR, T.; MÜLLER, T. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. **RNA** v.11, p.1616-1623, 2005:

XIAO, L.; MÖLLER, M.; ZHU, H. High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: Incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes. **Mol Phylogenet Evol**, v.55, p.168–177, 2010.

XU, J., XU, Y.; YONEZAWA, T.; LI, L.; HASEGAWA, M.; LU, F.; ZHANG, W. Polymorphism and evolution of ribosomal DNA in tea (*Camellia sinensis*, Theaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v.89, p.63-72, 2015.

ZHENG, X.Y.; CAI, D.Y.; YAO, L.H.; TENG, Y.W. Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus*. **Mol. Phylogenet. Evol.** v.48, p.892–903, 2008.

ZIMMER, E.; MARTIN, S.; BEVERLEY, S.; KAN, Y.; WILSON, A. Rapid duplication and loss of genes coding for the alphachains of hemoglobin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.77, p.2158–2162, 1980.

Apêndices

Apêndice A. Comprimento e conteúdo GC das regiões ITS1, 5,8S, ITS2 e região completa dos clones selecionados de *Utricularia gibba*.

CLONE	ITS1			5.8s			ITS2			RITS		
	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB
B1-1	60,22	39,23	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,61	37,39	575
B1-2	57,96	42,04	226	57,05	42,95	156	67,92	32,08	240	61,58	38,42	622
B1-3	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,23	32,77	238	62,54	37,46	574
B1-4	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,61	37,39	575
B1-5	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B1-6	61,45	38,55	179	57,69	42,31	156	67,65	32,35	238	63,00	37,00	573
B1-7	61,33	38,67	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,78	37,22	575
B1-8	60,56	39,44	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,54	37,46	574
B1-9	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,61	37,39	575
B1-10	61,11	38,89	180	57,69	42,31	156	67,65	32,35	238	62,89	37,11	574
B1-11	61,33	38,67	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,78	37,22	575
B1-12	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B1-13	61,45	38,55	179	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,83	37,17	573
B1-14	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,61	37,39	575
B1-15	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,23	32,77	238	62,54	37,46	574
B2-1	61,11	38,89	180	56,41	43,59	156	67,65	32,35	238	62,54	37,46	574
B2-2	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B2-3	61,33	38,67	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,78	37,22	575
B2-4	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B2-5	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,61	37,39	575
B2-6	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B2-7	60,56	39,44	180	56,41	43,59	156	67,65	32,35	238	62,37	37,63	574
B2-8	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B2-9	61,11	38,89	180	57,69	42,31	156	67,65	32,35	238	62,89	37,11	574
B2-10	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B2-11	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B2-12	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,23	32,77	238	62,54	37,46	574
B2-13	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B2-14	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B2-15	61,11	38,89	180	57,69	42,31	156	67,65	32,35	238	62,89	37,11	574
B4-4	60,77	39,23	181	57,69	42,31	156	67,65	32,35	238	62,78	37,22	575
B6-1	61,11	38,89	180	57,77	44,23	156	67,65	32,35	238	62,37	37,63	574
B6-2	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574

CLONE	ITS1			5.8s			ITS2			RITS		
	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB
B6-4	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B6-6	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,61	37,39	575
B6-7	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	68,07	31,93	238	62,89	37,11	574
B6-8	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B6-9	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,61	37,39	575
B6-10	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B6-11	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B6-12	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B6-13	61,11	38,89	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,72	37,28	574
B6-14	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,61	37,39	575
B6-15	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,61	37,39	575
C1-1	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-2	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-4	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-5	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-7	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-8	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-9	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-10	59,79	40,21	189	56,41	43,59	156	65,73	34,27	248	61,38	38,62	593
C1-12	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-13	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-14	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-15	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C1-16	59,47	40,53	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,51	38,49	595
C1-17	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C2-1	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C2-8	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C2-11	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C2-14	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,27	38,73	599
C2-15	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,27	38,73	599
C2-17	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C3-1	59,47	40,53	190	57,05	42,95	156	65,34	34,66	251	61,31	38,69	597
C3-4	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C3-5	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C3-6	59,47	40,53	190	57,05	42,95	156	65,34	34,66	251	61,31	38,69	597
C3-7	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C3-8	59,47	40,53	190	57,05	42,95	156	65,74	34,26	251	61,47	38,53	597
C3-9	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,27	38,73	599
C3-10	60	40	190	57,05	42,95	156	65,34	34,66	251	61,47	38,53	597
C3-11	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C3-12	59,28	40,72	194	56,41	43,59	156	65,46	34,54	249	61,1	38,90	599
C3-13	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599

CLONE	ITS1			5.8s			ITS2			RITS		
	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB
C3-14	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C3-15	60	40	190	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	62,07	37,93	588
C3-16	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C3-17	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C4-1	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	66,27	33,73	249	61,6	38,4	599
C4-2	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C4-3	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	66,27	33,73	249	61,44	38,56	599
C4-4	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C4-5	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C4-6	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C4-7	59,28	40,72	194	57,69	42,31	156	65,86	34,14	249	61,6	38,4	599
C4-9	58,76	41,24	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,27	38,73	599
C4-10	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	66,27	33,73	249	61,6	38,4	599
C4-11	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C4-12	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C4-14	58,76	41,24	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,27	38,73	599
C4-15	58,62	41,38	203	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,18	38,82	608
C4-16	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,27	38,73	599
C5-1	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	66,27	33,73	249	61,6	38,4	599
C5-4	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C5-6	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C5-7	58,76	41,24	194	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,1	38,9	599
C5-8	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C5-9	58,33	41,67	192	57,05	42,95	156	66,95	33,05	239	61,55	38,45	580
C5-10	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C5-11	59,79	40,21	180	57,05	42,95	156	65,34	34,66	251	61,41	38,59	596
C5-13	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
C5-14	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
D2-8	60,08	39,92	253	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	61,9	38,1	651
D3-1	60,32	39,68	189	56,41	43,59	156	65,86	34,14	249	61,62	38,38	594
D3-3	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,8	38,2	589
D3-5	60,32	39,68	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,78	38,22	594
D3-6	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	66,53	33,47	245	62,22	37,78	585
D3-8	59,79	40,21	189	57,69	42,31	156	65,86	34,14	249	61,78	38,22	594
D3-9	60,32	39,68	189	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,62	38,38	594
D3-10	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,8	38,2	589
D3-11	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,8	38,2	589
D3-13	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,8	38,2	589
D3-14	59,79	40,21	189	57,69	42,31	156	65,86	34,14	249	61,78	38,22	594
D3-16	60,47	39,53	253	57,05	42,95	156	67,08	32,92	243	62,12	37,88	652
D4-1	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	62,37	37,63	582
D4-2	60,32	39,68	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,78	38,22	594

CLONE	ITS1			5.8s			ITS2			RITS		
	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB
D4-3	60,47	39,53	253	57,05	42,95	156	65,85	34,15	246	61,68	38,32	655
D4-4	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,8	38,2	589
D4-5	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	66,53	33,47	245	62,22	37,78	585
D4-6	60,08	39,92	253	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	61,9	38,1	651
D4-7	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,97	38,03	589
D4-8	60,32	39,68	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,78	38,22	594
D4-9	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,08	34,92	252	61,66	38,34	592
D4-10	60,08	39,92	253	56,41	43,59	156	66,31	33,87	248	61,49	38,51	657
D4-11	59,71	40,29	206	56,41	43,59	156	65,46	34,54	249	68,21	38,79	611
D4-12	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,8	38,2	589
D4-13	60,32	39,68	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,78	38,22	594
D4-14	61,37	38,63	233	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,91	38,09	638
D4-16	60,08	39,92	253	56,41	43,59	156	66,31	33,87	248	61,49	38,51	657
D6-1	60,21	39,79	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,8	38,2	589
D6-2	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,97	38,03	589
D6-3	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,62	38,38	594
D6-4	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,8	38,2	589
D6-5	60,33	39,15	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,95	38,05	594
D6-7	60,32	39,68	189	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,62	38,38	594
D6-8	60,08	39,92	253	57,05	42,95	156	65,85	34,15	249	61,53	38,47	655
D6-9	61,04	38,96	231	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	62,32	37,68	629
D6-10	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,8	38,2	589
D6-11	60,32	39,68	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,78	38,22	594
D6-12	60,43	39,57	187	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,82	38,18	592
D6-13	60,08	39,92	253	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	61,9	38,1	651
D6-14	60,08	39,92	253	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	61,9	38,1	651
D6-16	60,32	39,68	189	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,62	38,38	594
D6-17	60,87	39,13	184	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,8	38,2	589
D7-2	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,32	34,68	248	61,2	38,8	598
D7-3	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,32	34,68	248	61,2	38,8	598
D7-4	59,09	40,91	176	57,05	42,95	156	67,5	32,5	240	62,06	37,94	572
D7-5	60,08	39,92	253	57,69	42,31	156	68,07	31,93	238	62,44	37,56	647
D7-6	61,67	38,33	180	57,05	42,95	156	66,81	33,19	238	62,54	37,46	574
D7-8	58,92	41,08	185	57,05	42,95	156	66,95	33,05	239	61,72	38,28	580
D7-10	61,67	38,33	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,89	37,11	574
D7-14	59,79	40,21	194	57,05	42,95	156	64,92	35,08	248	61,2	38,8	598
D7-15	61,67	38,33	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,83	37,17	573
D7-16	61,67	38,33	180	57,05	42,95	156	68,07	31,93	238	63,07	36,93	574
X11-4	60,33	39,67	184	56,41	43,59	156	65,73	34,27	248	61,56	38,44	588
X11-5	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,73	38,27	588
X11-6	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,73	38,27	588
X11-7	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,73	38,27	588

CLONE	ITS1			5.8s			ITS2			RITS		
	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB
X11-9	58,92	41,08	185	57,05	42,95	156	66,95	33,05	239	61,72	38,28	580
X11-10	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,73	38,27	588
X11-11	58,92	41,08	185	57,05	42,95	156	66,95	33,05	239	61,72	38,28	580
X11-12	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,73	38,27	588
X11-13	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,73	38,27	588
X11-14	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,99	34,01	247	61,84	38,16	587
X11-15	58,92	41,08	185	57,05	42,95	156	66,95	33,05	239	61,72	38,28	580
X11-16	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,73	38,27	588
X11-17	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,73	38,27	588
X12-1	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X12-2	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X12-3	60,87	39,13	184	56,41	43,59	156	64,94	35,06	251	61,42	38,58	591
X12-4	60,54	39,46	185	57,05	42,95	156	64,94	35,06	242	62,26	37,74	583
X12-5	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X12-6	60,87	39,13	184	56,41	43,59	156	64,94	35,06	251	61,42	38,58	591
X12-7	60,87	39,13	184	56,41	43,59	156	64,92	35,08	248	61,39	38,61	588
X12-8	59,49	40,51	195	57,05	42,95	156	66,14	33,86	251	61,63	38,37	602
X12-9	59,49	40,51	195	57,05	42,95	156	66	34	250	61,56	38,44	601
X12-10	60,11	39,89	183	57,05	42,95	156	65,61	34,39	253	61,66	38,34	592
X12-11	60,31	39,69	257	57,05	42,95	156	67,08	32,92	243	62,04	37,96	656
X12-13	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X12-15	57,48	42,52	214	57,05	42,95	156	66	34	250	60,81	39,19	620
X12-16	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X12-17	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	65,48	34,52	252	61,47	38,53	597
X13-1	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,62	38,38	594
X13-3	60,16	39,84	256	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	61,93	38,07	654
X13-4	59,24	40,76	184	57,05	42,95	156	65,48	34,52	252	61,32	38,68	592
X13-5	60,7	39,3	257	57,05	42,95	156	67,08	32,92	243	62,2	37,8	656
X13-6	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	66,53	33,47	245	62,05	37,95	585
X13-7	60,55	39,45	256	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	62,08	37,92	654
X13-8	59,49	40,51	195	57,05	42,95	156	65,48	34,52	252	61,36	38,64	603
X13-9	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	65,48	34,52	252	61,47	38,53	597
X13-10	60	40	190	56,41	43,59	156	65,86	34,14	249	61,51	38,49	595
X13-11	59,49	40,51	195	57,05	42,95	156	66	34	250	61,56	38,44	601
X13-12	60	40	190	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,24	37,76	588
X13-13	59,49	40,51	195	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,5	38,5	600
X13-14	60,39	39,61	255	57,05	42,95	156	65,32	34,68	248	61,46	38,54	659
X13-16	60	40	190	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	62,07	37,93	588
X13-17	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,47	595
X15-1	60	40	190	57,05	42,95	156	66,14	33,86	254	61,83	38,17	600
X15-2	60	40	190	57,05	42,95	156	66,14	33,86	254	61,83	38,17	600
X15-5	60	40	190	57,05	42,95	156	66,14	33,86	254	61,83	38,32	600

CLONE	ITS1			5.8s			ITS2			RITS		
	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB
X15-6	60,16	39,84	256	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	61,93	38,07	654
X15-7	60	40	190	57,05	42,95	156	66	34	250	61,74	38,26	596
X15-8	61,38	38,62	233	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	62,07	37,93	638
X15-11	58,57	41,43	210	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,14	38,86	615
X15-12	60	40	255	56,41	43,59	156	66,94	33,06	242	61,72	38,28	653
X15-15	60,16	39,84	256	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	61,93	38,07	654
X15-16	59,49	40,51	195	57,05	42,95	156	66	34	250	61,56	38,44	601
X15-17	60,16	39,84	256	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	61,93	38,07	654
X19-1	58,06	41,94	217	57,05	42,95	156	66	34	250	61	39	623
X19-2	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X19-5	58,06	41,94	217	57,05	42,95	156	66	34	250	61	39	623
X19-6	58,06	41,94	217	57,05	42,95	156	66	34	250	61	39	623
X19-7	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,55	38,45	593
X19-8	60,7	39,3	257	57,05	42,95	156	66,67	33,33	243	62,04	37,96	656
X19-9	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X19-10	59,02	40,98	183	57,05	42,95	156	64,94	35,06	251	61,02	38,98	590
X19-11	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X19-12	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	62,01	37,99	587
X19-13	59,02	40,98	183	57,05	42,95	156	64,94	35,06	251	61,02	38,98	590
X19-14	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X19-15	60,31	39,69	257	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	61,98	38,02	655
X19-16	60	40	190	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,68	38,32	595
X19-17	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	66,26	33,74	246	61,76	38,24	591
E1-2	61,09	38,91	257	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,44	37,56	655
E1-3	61,09	38,91	257	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,44	37,56	655
E1-5	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E1-6	58,76	41,24	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,27	38,73	599
E1-7	61,39	38,61	259	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,56	37,44	657
E1-10	61,26	38,74	253	57,05	42,95	156	67,07	32,93	246	62,44	37,56	655
E1-11	61,26	38,74	253	57,05	42,95	156	67,07	32,93	246	62,44	37,56	655
E1-12	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
E1-14	60,33	39,67	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,8	38,2	589
E1-16	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,62	38,38	594
E1-17	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E3-1	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E3-2	61,18	38,82	255	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,97	38,03	660
E3-3	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E3-4	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E3-7	59,78	40,22	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,63	38,37	589
E3-8	58,73	41,27	189	57,05	42,95	156	65,73	34,27	248	61,21	38,79	593
E3-9	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,46	34,54	249	61,27	38,73	599
E3-10	59,26	40,74	189	56,41	43,59	156	65,86	34,14	249	61,28	38,72	594

CLONE	ITS1			5.8s			ITS2			RITS		
	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB
E3-13	59,26	40,74	189	56,41	43,59	156	65,86	34,14	249	61,28	38,72	594
E3-14	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E3-15	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E3-16	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
E4-1	61,33	38,67	256	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,54	37,46	654
E4-2	61,33	38,67	256	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	62,39	37,61	654
E4-3	61,33	38,67	256	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	62,39	37,61	654
E4-4	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,62	38,38	594
E4-5	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E4-6	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E4-7	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E4-8	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E4-9	61,33	38,67	256	57,05	42,95	156	66,94	33,06	242	62,39	37,61	654
E4-10	59,78	40,22	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,63	38,37	589
E4-12	61,24	38,76	258	57,05	42,95	156	66,94	33,06	245	62,37	37,63	659
E4-13	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E4-15	61,54	38,46	260	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,61	37,39	658
E4-16	59,79	40,21	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,62	38,38	594
E4-17	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E5-1	61,09	38,91	257	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,44	37,56	655
E5-2	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E5-3	59,78	40,22	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,63	38,37	589
E5-4	59,78	40,22	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,63	38,37	589
E5-5	59,78	40,22	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,63	38,37	589
E5-6	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
E5-7	60,94	39,06	256	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,39	37,61	654
E5-8	60,94	39,06	256	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,39	37,61	654
E5-9	59,78	40,22	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,63	38,37	589
E5-10	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E5-11	58,55	41,45	193	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,2	38,8	598
E5-12	59,78	40,22	184	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,63	38,37	589
E5-13	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E5-14	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	67,23	32,77	238	61,9	38,1	588
E5-16	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E5-17	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E8-2	59,26	40,74	216	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,35	38,65	621
E8-3	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E8-4	61,39	38,61	259	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,56	37,44	657
E8-5	61,43	38,57	223	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,64	37,36	621
E8-7	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	67,23	32,77	238	62,43	37,57	575
E8-8	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	67,36	32,64	242	62,01	37,99	587
E8-9	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	65,06	34,94	249	61,6	38,4	586

CLONE	ITS1			5.8s			ITS2			RITS		
	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB	G+C	A+T	PB
E8-11	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E8-12	61,67	38,33	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,89	37,11	574
E8-13	61,67	38,33	180	57,05	42,95	156	67,65	32,35	238	62,89	37,11	574
E8-14	59,28	40,72	194	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,44	38,56	599
E8-15	60,77	39,23	181	57,05	42,95	156	65,06	34,94	249	61,6	38,4	586
E8-16	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594
E8-17	59,26	40,74	189	57,05	42,95	156	65,86	34,14	249	61,45	38,55	594

Apêndice B. Identidade das sequências contaminantes de *Utricularia gibba* verificadas pela ferramenta BLASTN

Clone	Categoria	Espécie	G.B Acesso	Cobertura (%)	Identidade (%)
B4-2	Bacteria	Uncultured <i>Exiguobacterium</i> sp.	AM949682.1	7	97
B4-5	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-6	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-7	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-8	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-9	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-10	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-11	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-12	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-13	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-14	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-15	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B4-16	Inseto	<i>Ishnura</i> sp.	AB706617.1	93	90
B5-1	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	98	83
B5-2	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	98	83
B5-3	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	98	83
B5-5	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	88	84
B5-6	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	88	84
B5-7	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	98	83
B5-8	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	98	83
B5-9	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	88	84
B5-10	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	88	85
B5-11	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	88	84
B5-12	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	88	84
B5-13	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	98	82
B5-14	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	98	83
B5-15	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	98	83
B5-17	Inseto	<i>Ischnura perparva</i>	FN356106.1	88	84
B6-3	Fungos	Uncultured soil fungus clone 167-12	DQ421216.1	22	96
B6-5	Fungos	Uncultured soil fungus clone 167-12	DQ421216.1	22	96
C1-3	Fungos	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	KT693727.1	100	99
C2-7	Fungos	<i>Cancellidium</i> sp. MDS-2015	KP975421.1	82	86
C2-4	Inseto	<i>Stenopsyche marmorata</i>	LC094265.1	26	90
C2-5	Inseto	<i>Stenopsyche marmorata</i>	LC094265.1	25	90
C2-6	Inseto	<i>Stenopsyche marmorata</i>	LC094265.1	25	90
C2-9	Inseto	<i>Stenopsyche marmorata</i>	LC094265.1	25	90
C2-10	Inseto	<i>Stenopsyche marmorata</i>	LC094265.1	25	90
C2-12	Inseto	<i>Stenopsyche marmorata</i>	LC094265.1	25	90
C2-13	Inseto	<i>Stenopsyche marmorata</i>	LC094265.1	25	90
C2-16	Inseto	<i>Stenopsyche marmorata</i>	LC094265.1	26	90
C4-8	Planta	<i>Solanum trifolium</i>	HQ856125.1	20	75

Clone	Categoria	Espécie	G.B Acesso	Cobertura (%)	Identidade (%)
C5-2	Inseto	<i>Pleosporales sp.</i>	HQ631059.1	100	98
C5-3	ALGA	<i>Tessellaria lapponica</i>	KP268681.1	32	93
C5-5	Fungos	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	KT693727.1	100	99
		Uncultured fungus isolate OTU			
C5-12	Fungos	57	KT328862.1	100	99
C5-15	Fungos	<i>Pleosporales sp.</i>	HQ631059.1	100	98
D2-1	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	81
D2-2	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	81
D2-3	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	81
D2-4	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	81	81
D2-5	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	80
D2-6	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	81
D2-9	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	81
D2-11	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	79	81
D2-12	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	82	80
D2-13	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	81
D2-14	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	80
D2-15	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	77	81
D2-16	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	80
D2-17	Inseto	<i>Ceriagrion melanurum</i>	FN356053.1	80	81
D3-2	Fungos	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	FN428910.1	90	99
D3-4	Fungos	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	FN428910.1	90	99
D3-7	Fungos	<i>Cryptococcus aff. gilvescens</i>	FN428943.1	79	91
D3-12	Fungos	<i>Cryptococcus aff. gilvescens</i>	FN428943.1	82	91
D7-9	Fungos	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KP701937.1	81	99
		Uncultured fungus clone			
D7-11	Fungos	CMH209	KF800300.1	74	94
D7-13	Fungos	Uncultured <i>Cryptococcus sp.</i>	HG936791.1	79	97
E1-8	Bacteria	<i>Rhodococcus equi</i>	HM114217.1	7	94
E1-9	Fungos	<i>Epicoccum sp.</i>	KR012889.1	75	93
E1-10	Fungos	Uncultured <i>Psiloglonium</i>	HG935427.1	80	99
E5-15	Fungos	Uncultured <i>Phaeosphaeria</i>	HG936174.1	79	98
E3-6	Fungos	Uncultured <i>Phaeosphaeria</i>	HG936174.1	81	98
E3-5	Fungos	<i>Mucoromycotina sp.</i>	JF414168.1	38	92
		Uncultured Ascomycota clone			
X11-3	Fungos	C32_A06	EU490096.1	81	96
X15-9	Fungos	<i>Hannaella sp.</i> YIM-HL1107	KT962991.1	64	99
X15-13	Fungos	<i>Epicoccum nigrum</i> strain G392	KR094461.1	82	99
X15-14	Fungos	<i>Epicoccum nigrum</i> strain G392	KR094461.1	82	99

Apêndice C. Alinhamento da região ITS completa (ITS1+5,8S+ITS2) dos clones de *Utricularia gibba*

