

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS
REPETIDAS DE DNA NO GENOMA DE PEIXES CICLÍDEOS DO
GÊNERO *CICHLA***

WELLCY GONÇALVES TEIXEIRA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-graduação
em Biologia Geral e Aplicada.**

BOTUCATU – SP

2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS
REPETIDAS DE DNA NO GENOMA DE PEIXES CICLÍDEOS DO
GÊNERO *CICHLA***

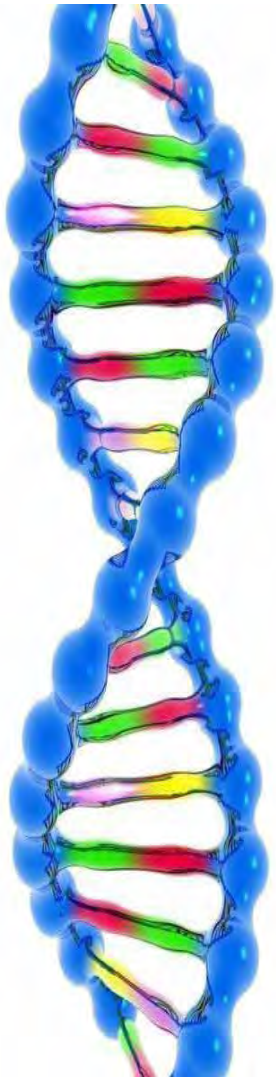
WELLCY GONÇALVES TEIXEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. CESAR MARTINS

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-graduação
em Biologia Geral e Aplicada.**

BOTUCATU – SP

2008



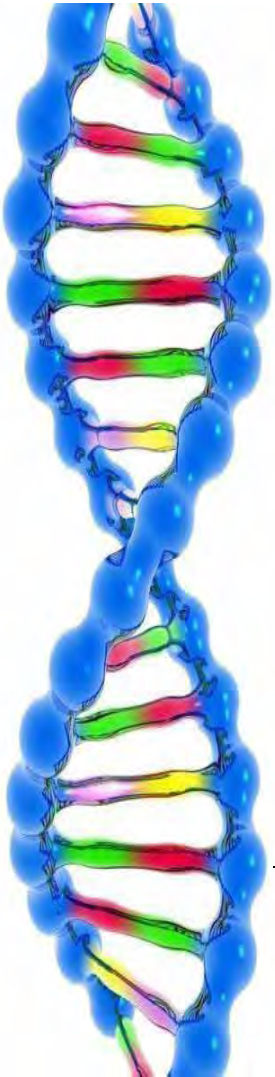
Dedicatória

*Ao desmedido amor dos meus pais Brandina
Teixeira de Oliveira e Sady Gonçalves de
Oliveira (in memorian).*

À torcida de meus irmãos Welldy e Wesley.

*Ao querido Marzio, pelo carinho, paciência e
apoio incondicional sempre me dado.*

*À minha persistência que nos momentos mais
difíceis me fez seguir a diante.*



Agradecimientos

É durante a realização de um trabalho que sentimos a necessidade de termos amigos que nos auxiliem, nos guiem e nos orientem. Aqui, expresso minha gratidão:

À Deus, pela certeza de que habitas em mim, tão certo quanto ar que eu respiro. Ao meu orientador Prof. Dr. Cesar Martins, por tudo o que me ensinou, me corrigiu, me orientou e pela convivência no dia a dia. A Profa. Dr. Adriane, pelo exemplo de pessoa, profissionalismo e pelas sugestões.

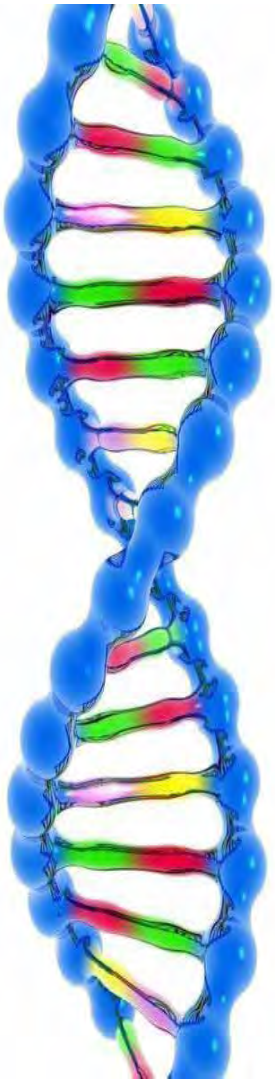
Aos Profs. Drs. Fausto Foresti e Claudio Oliveira, pelo exemplo como pesquisadores, por anos de pesquisas dedicados à genética de peixes. Ao Prof. Msc. Celso, pela confiança, pela amizade, pelos conselhos profissionais, enfim, pelo carinho paterno. Aos Professores Dr. Paulo Cesar Venere e Dr. Issakar Lima Souza pela amizade, conselhos e pelo incentivo em vir para Botucatu.

Aos colegas do recém criado Laboratório de Genômica Integrativa, Andréia Polleto, Carlos, Danilo, Guilherme (Kabelo) e Juliana e aos inúmeros companheiros do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes: Adriana, Andréia Alves, Emanuel, Fabio, Fernanda Alves, Guilherme, Gleisy, Gustavo, Heraldo, Jefferson, Juliano (Koala), Karina, Kátia, Kelly, Konrado, Lessandra, Lígia, Luciana, Marina, Marisa, Marina, Marlon, Marcio, Patrícia, Ricardo Paiva, Tatiane e Waldo.

Ao colaborador assíduo desse trabalho e conselheiro de todos os momentos, Alex Tadeu Ferreira. Ao Luiz e Fábio pelas valiosas dicas e pela amizade. À Irani e Daniela, pela amizade e eterna paciência em esclarecer minhas dúvidas. Aos técnicos do Laboratório, Renato Devidé e Ricardo Teixeira. Às minhas amigas e companheiras: Ana Jackeline, Beatriz, Érika, Cássia e Joseane.

Ao Laboratório de Genômica Integrativa, ao Departamento de Morfologia, à Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Universidade Estadual Paulista, pela estrutura cedida para a realização deste trabalho. Aos funcionários da pós-graduação Luciene, Maria Helena e Serginho, pela amizade, esclarecimentos em todas as solicitações. Também a todos os funcionários e professores do Departamento de Morfologia.

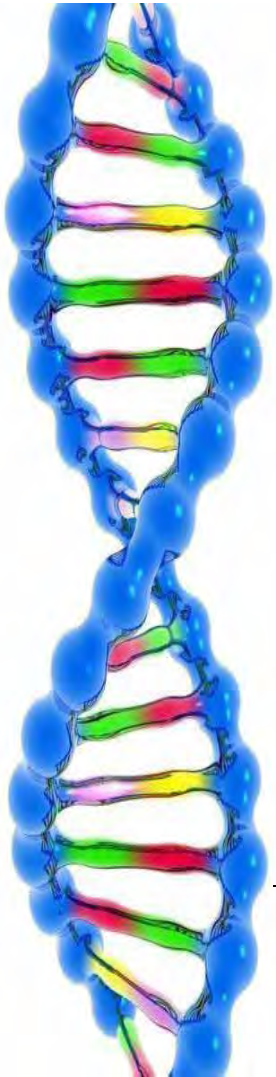
Enfim, a todos aqueles que me auxiliaram de alguma forma na elaboração desse trabalho. **Muito obrigada.**



Επίγραφε

Quando se vê já são seis horas!
Quando se vê, já é sexta-feira...
Quando se vê, já terminou o ano...
Quando se vê, passaram-se 50 anos!
Agora, é tarde demais para ser reprovado...
Se me fosse dado, um dia, outra oportunidade,
eu nem olhava o relógio
Seguiria sempre em frente e iria jogando, pelo caminho,
a casca dourada e inútil das horas...
Dessa forma eu digo
Não deixe de fazer algo
que gosta devido à falta de tempo,
a única falta que terá,
será desse tempo que
infelizmente não voltará mais.

Mario Quintana

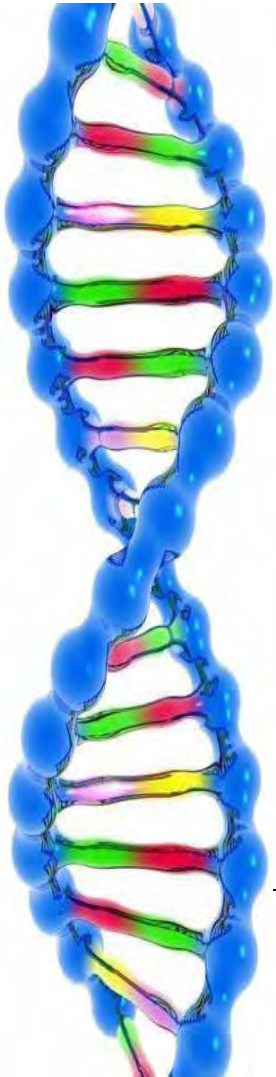


Resumo

RESUMO

O genoma dos organismos eucariotos apresenta-se organizado em seqüências simples e repetidas. As seqüências repetidas de DNA estão presentes em centenas a milhares de cópias dispersas ou agrupadas no genoma e localizam-se preferencialmente em regiões heterocromáticas, desempenhando papel relevante na organização do genoma desses organismos. Nesse sentido, a realização de estudos genéticos básicos sobre a organização genômica dessas seqüências repetidas é fundamental para uma melhor compreensão do seu papel biológico assim como o entendimento de sua dinâmica evolutiva entre os diversos grupos de vertebrados. Os Cichlidae constituem uma das mais especiosas famílias de peixes, com cerca de 3.000 espécies distribuídas pela América Central e do Sul, África, e sudeste da Índia. Este grupo passou por um rápido e extenso processo de radiação adaptativa ao longo dos tempos, constituindo-se em importantes entidades biológicas para a realização de estudos evolutivos. Dentre os Cichlidae, as espécies do gênero *Cichla* (tucunarés), com distribuição exclusiva na América do Sul, apresentam grande importância ecológica e econômica. No entanto, estudos genéticos envolvendo espécies desse gênero são ainda escassos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar seqüências repetidas de DNA no genoma de *Cichla kelberi*. Elementos repetidos de DNA foram isolados por PCR (elementos *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* e *Tc1*) e digestão enzimática (elemento *Tuc*), seqüenciados e mapeados cromossomicamente por FISH para o estudo de seu padrão de distribuição no genoma. O elemento *Tuc* apresentou elevada similaridade com seqüências do gene da transcriptase reversa de *Oryzias melastigma*, o que sugere tratar-se de um elemento retrotransponível. Análises comparativas do elemento *Tuc* a bancos de seqüência mostraram alta similaridade com seqüências repetidas no genoma de diversas espécies de vertebrados, incluindo peixes, anfíbios e mamíferos. Os resultados de FISH mostraram um acúmulo dos elementos obtidos preferencialmente nos centrômeros de todos os cromossomos do complemento e eventuais marcações teloméricas. Extensos segmentos intersticiais foram observados em alguns cromossomos para o elemento *Rex3*. Estes resultados mostram uma distribuição preferencial dos elementos repetidos de DNA principalmente nos centrômeros, sugerindo que tais seqüências devam desempenhar um papel importante na estrutura organizacional e funcional do centrômero e, conseqüentemente, do genoma desta espécie.

Palavras-chave: seqüências repetidas, Cichlidae, *Cichla kelberi*, retrotransposons, hibridação *in situ*, evolução.

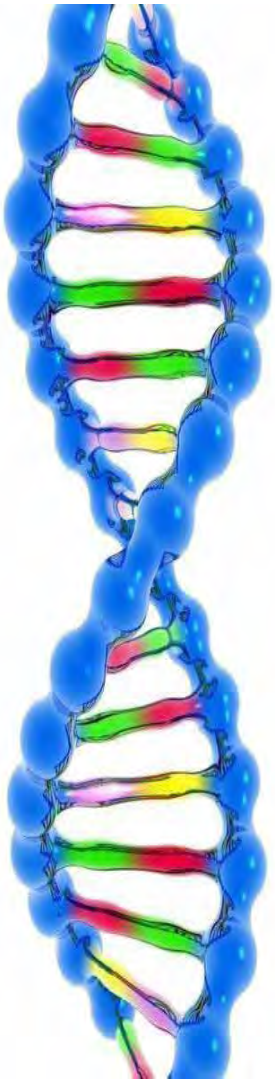


Abstract

ABSTRACT

The genome of eucaryote organisms is organized into single and repetitive sequences. The repetitive DNA sequences are represented by hundreds to thousands of dispersed or tandem-arrayed copies preferentially localized on the heterochromatic regions, having important function on the genome organization of the organisms. Therefore, the development of basic genetic studies about the genome organization of these repetitive sequences are fundamental to a better comprehension of their biologic role and the understanding of their evolutionary dynamics. The Cichlidae are one of the most diverse fish families, having about 3.000 species distributed around Central and South America, Africa and Southeast India. This group underwent a large and rapid process of adaptative radiation, becoming an important biological model. Among the Cichlidae, the species of the genera *Cichla* (tucunarés), with exclusive distribution in South America, have a significant economic and ecologic importance. However genetic studies on species of this genera are scarce. Therefore, this work had the aim to isolate and characterize repetitive DNA sequences of the genome of *Cichla kelberi*. Repetitive DNA sequences were isolated using PCR (elements *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* and *Tc1*) and restriction digestion (element *Tuc*), sequenced and their genome distribution determined by FISH. The *Tuc* element showed high similarity to sequences of reverse transcriptase gene of the fish *Oryzias melastigma*, which suggests that such element correspond to an retrotransposon element. Comparative analysis of the *Tuc* element to DNA sequence data bank showed high similarity with repetitive sequences in the genome of several vertebrates, including fishes, amphibians and mammals. Results of FISH showed an accumulation of obtained elements preferentially in centromeres of all chromosomes of the complement, and few telomeric blocks in some chromosomes. Large interstitial chromosome blocks were detected for *Rex3*. These results showed a preferential distribution of repetitive DNA elements mainly in centromeres, suggesting that these sequences should play an important role in the structure and functional organizational of centromere and, thus in the genome of this species.

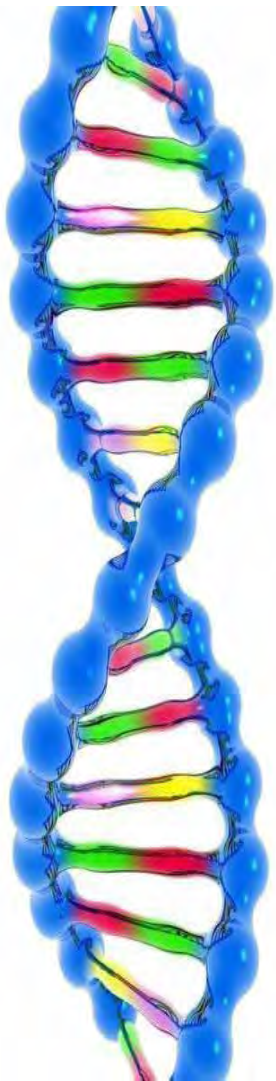
Key-Words: repetitive sequences, Cichlidae, *Cichla kelberi*, retrotransposon, *in situ* hybridization, evolution.



Lista de Figuras

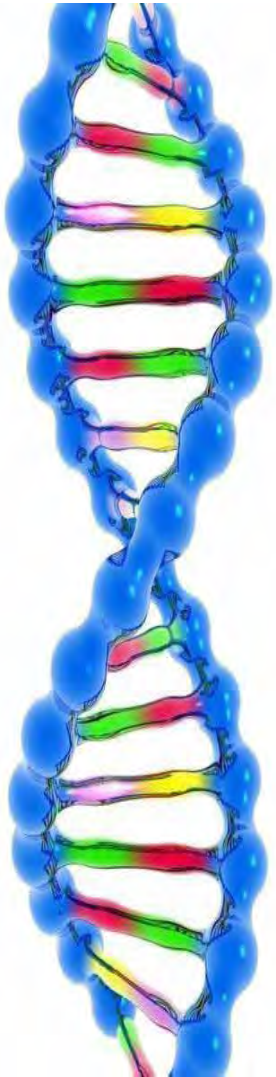
Figura 1: Organização do genoma eucarioto modificado de Farah, 2007	15
Figura 2: Representação de diferentes grupos de retrotransposons LTR e Não-LTR. LTR, repetição longa terminal; PR, protease; INT, integrase; RT, transcriptase reversa; RNase H, ribonuclease H; LINE, elemento nucleotídeo interpassado longo; SINE, elemento nucleotídeo interpassado curto. Modificado de Kumar e Bennetzen (1999).	21
Figura 3: Exemplar de <i>Cichla kelberi</i>	39
Figura 4: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o fragmento de restrição produzido pela digestão do DNA total de <i>Cichla kelberi</i> com a endonuclease <i>XbaI</i> . L- marcador de peso molecular em pares de bases. Amostras de 1 a 5 representam DNA genômico digerido com as enzimas <i>AluI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>MspI</i> , <i>XbaI</i> e <i>EcoRI</i> , respectivamente. A seta indica a banda produzida após a digestão com a <i>XbaI</i>	57
Figura 5: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando os produtos de PCR representativos de clones recombinantes obtidos a partir da banda de 650 pb produzida pela digestão com a enzima <i>XbaI</i> . L- marcador de peso molecular em pares de bases (marcador 1kb plus- Invitrogen). As amostras 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13 e 14 representam os clones positivos candidatos a conter o fragmento de DNA produto da digestão com a <i>XbaI</i>	58
Figura 6: Seqüências de fragmento de DNA isolado por restrição enzimática	60
Figura 7: Dendograma baseado nas análises de distância <i>p</i> obtido pelo programa ClustalW <i>online</i> a partir das seqüências Tuc isoladas e de seqüências obtidas do banco de dados do NCBI. Neste dendograma, o nome das seqüências corresponde espécies da tabela 9. A barra indica a distância genética e os valores de <i>bootstrap</i> encontram-se indicados nos nodos. Valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram omitidos.	64
Figura 8: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando produtos de PCR obtidos com os <i>primers</i> <i>Rex1</i> (a), <i>Rex3</i> (b) e <i>Rex6</i> (c) a partir do DNA genômico de representantes de <i>Cichla kelberi</i> (1-5), (1-8), (1-6). L – marcador de peso molecular em pares de bases.	65
Figura 9: Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, evidenciando os produtos de PCR obtidos a partir do <i>primer</i> <i>Tc1</i> para exemplares de <i>Cichla kelberi</i> (1-4). L- marcador de peso molecular em pares de bases.	70

Figura 10: Hibridação *in situ* fluorescente utilizando como sonda os retrotransposons *Rex1*(a), *Rex3*(b), *Rex6*(c), *Tc1*(d) e *Tuc* (e) nos cromossomos de *Cichla kelberi*..... 72



Lista de Tabelas

Tabela 1: Compilação de dados relacionados à localização cromossômica de DNAr 5S nos cromossomos dos peixes	27
Tabela 2: Compilação de dados relacionados ao isolamento e localização cromossômica de DNAs satélites nos cromossomos dos peixes.....	29
Tabela 3: Compilação de dados relacionados ao isolamento e localização cromossômica de elementos repetidos dispersos nos cromossomos dos peixes.....	31
Tabela 4: Espécies do gênero <i>Cichla</i> em ordem cronológica de descrição de acordo com Kullander e Ferreira (2006).....	36
Tabela 5: Sequências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos dos retrotransposons.	50
Tabela 6: Sequência do <i>primer</i> utilizado na amplificação dos fragmentos do transposon.	51
Tabela 7: Composição nucleotídica dos clones isolados de <i>Cichla kelberi</i> por restrição enzimática.....	61
Tabela 8: Similaridade obtida junto ao NCBI com os clones TucXba1, TucXba6 e TucXba11 isolados por restrição enzimática.....	62
Tabela 9: Similaridade encontrada para o elemento <i>Rex1</i> de <i>Cichla kelberi</i> em relação a outras espécies de peixes.....	67
Tabela 10: Similaridade encontrada para o elemento <i>Rex3</i> de <i>Cichla kelberi</i> em relação a outras espécies de peixes.....	68
Tabela 11: Similaridade encontrada para o elemento <i>Rex6</i> de <i>Cichla kelberi</i> em relação a outras espécies de peixes.....	69



Sumário

RESUMO

ABSTRACT

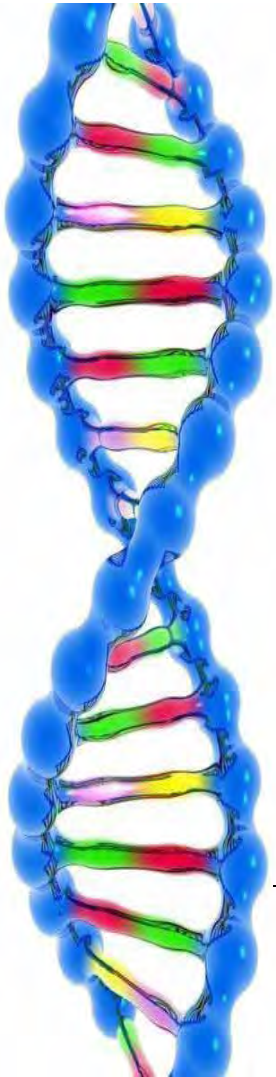
LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Seqüências repetidas de DNA.....	13
1.2. Classificação das seqüências repetidas.....	14
1.2.1. Seqüências repetidas em <i>tandem</i>	15
1.2.1.1. DNA satélite.....	15
1.2.1.2. Minissatélite.....	17
1.2.1.3. Microssatélite.....	17
1.2.2. Seqüências repetidas dispersas.....	19
1.2.2.1. Elementos da classe I.....	19
1.2.2.2. Elementos da classe II.....	24
1.3. Elementos repetidos de DNA e seu papel como marcadores físicos cromossômicos para os peixes.....	26
1.3.1. Genes ribossomais.....	26
1.3.2. Elementos repetidos em <i>tandem</i>	29
1.3.3. Elementos repetidos dispersos.....	31
1.4. Biologia e evolução dos Cichlidae.....	33
1.4.1. O gênero <i>Cichla</i>	35
2. OBJETIVOS.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1. Material Biológico.....	39
3.2. Métodos.....	40
3.2.1. Extração de DNA de tecidos.....	40
3.2.2. Visualização e quantificação do DNA em gel de agarose.....	41
3.2.3. Isolamento de seqüências repetidas por digestão enzimática.....	41
3.2.4. Purificação dos fragmentos de DNA presente em gel de agarose.....	42
3.2.5. Clonagem do DNA repetido.....	43
3.2.6. Amplificação por PCR do fragmento clonado.....	44

3.2.7. Mini-preparações para a purificação de plasmídios recombinantes (<i>Kit Wizard Plus Minipreps DNA Purification System-Promega</i>)	45
3.2.8. Sequenciamento	46
3.2.9. Isolamento de seqüências repetidas pela técnica de PCR.....	50
3.2.9.1. Amplificação dos retrotransposons <i>Rex1</i> , <i>Rex3</i> e <i>Rex6</i>	50
3.2.9.2. Amplificação do Transposon <i>Tc1</i>	51
3.2.10. Análise das seqüências.....	52
3.2.11. Obtenção dos cromossomos mitóticos através de preparações diretas	53
3.2.12. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência-FISH.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Isolamento e caracterização de seqüências repetidas no genoma de <i>Cichla kelberi</i> por restrição enzimática	57
4.2. Isolamento e caracterização de seqüências repetidas no genoma de <i>Cichla kelberi</i> por PCR.....	65
4.3. Mapeamento físico cromossômico por hibridação fluorescente <i>in situ</i> utilizando como sondas as seqüências <i>Rex1</i> , <i>Rex3</i> , <i>Rex6</i> , <i>Tc1</i> e <i>Tuc</i>	71
5. CONCLUSÕES	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
7. ANEXOS	86
ANEXO I	86
ANEXO II	88
ANEXO III.....	89
ANEXO IV	90
ANEXO V.....	95
ANEXO VI	99



Introdução

1.1. Sequências repetidas de DNA

O genoma dos organismos eucarióticos apresenta-se organizado em seqüências simples ou repetidas. DNAs cópia única ou com poucas cópias estão dispersos pelos cromossomos e compõem a maior parte dos genes funcionais de um organismo, embora algumas seqüências moderadamente repetidas também contenham genes (Lond e David, 1980). Já os DNAs repetidos constituem grandes frações do genoma eucarioto. As seqüências repetidas representam cerca de 95% do genoma de cebolas (Flavell *et al.*, 1974) e cerca de 50% ou mais do genoma humano (*The Genome International Sequencing Consortium*, 2001).

Durante muito tempo as seqüências repetidas de DNA foram consideradas “DNA lixo” (Doolittle e Sapienza, 1980) ou “DNA egoísta” (Nowak, 1994). Todavia, estudos têm demonstrado o equívoco desse conceito, já que várias funções têm sido atribuídas a essa classe de seqüências. Geralmente essas seqüências localizam-se em regiões pobres em genes, tais como as intergênicas e heterocromáticas, envolvendo em alguns casos até mesmo elementos transponíveis (Charlesworth *et al.*, 1994; Kidwell, 2002; Fisher *et al.*, 2004). Tem-se demonstrado que as seqüências repetidas são importantes na organização estrutural e variação do tamanho dos genomas (Schueler *et al.*, 2001), envolvendo-se em rearranjos cromossômicos como deleções, duplicações, inversões e translocações, responsáveis por grande parte da variação cariotípica de muitos grupos (Kidwell, 2002). Contudo, o papel mais importante dessas seqüências relaciona-se à manutenção e segregação do material nuclear, o que se infere, sobretudo em função de sua presença nos centrômeros e telômeros dos cromossomos de eucariotos.

A heterocromatina é encontrada nos centrômeros, telômeros e posições intersticiais ao longo dos braços cromossômicos. As seqüências repetidas presentes na heterocromatina centromérica desempenham um papel fundamental no comportamento dos cromossomos durante a divisão celular, devido a várias proteínas que se ligam por afinidade a estas seqüências (Csink e Henikoff, 1998). Além disso, a eucromatina, rica em genes, também pode conter algumas seqüências repetidas. No entanto, seqüências repetidas parecem causar mutações prejudiciais aos genes, sendo eventualmente eliminadas pela pressão seletiva (Deininger *et al.*, 2003). Além disso, vários estudos têm sugerido o envolvimento de seqüências repetidas nos processos de replicação do DNA (Li *et al.*,

2002), recombinação (Biet *et al.*, 1999), expressão gênica (Liu *et al.*, 2001) e diferenciação de cromossomos sexuais (Galetti Jr e Foresti, 1986, Parise-Maltempo *et al.*, 2007).

Considerando a gama de funções já assinaladas às seqüências repetidas, tornam-se claro o equívoco de um dia terem sido consideradas "DNA lixo". Adicionalmente, essas seqüências têm sido empregadas como ferramentas no estudo do genoma, prestando-se como marcadores cromossômicos para identificação de rearranjos, polimorfismos e contribuindo também em estudos de genética aplicada.

1.2. Classificação das seqüências repetidas

O DNA repetido é classificado em codificador e não-codificador. O codificador constitui as famílias multigênicas com grande número de cópias e possui função biológica bem definida. Um exemplo clássico é o das famílias multigênicas codificadoras de RNAs ribossomais (RNAr). Famílias multigênicas são constituídas por genes com notável similaridade estrutural, tanto no número quanto na organização de pares de bases, embora possam desempenhar funções diferentes. Acredita-se que essas famílias sejam formadas por uma série de duplicações durante sua evolução, e que o acúmulo de mutações ocorridas ao longo do tempo seja responsável pelas pequenas diferenças observadas hoje entre seus genes. Uma característica das famílias multigênicas é possuir considerável número de pseudogenes, muito semelhantes aos genes funcionais da mesma família, mas que perderam sua capacidade de expressão devido à mutações adquiridas (Farah, 2007). De acordo com Charlesworth *et al.* (1994) o DNA não-codificador (não transcrito) é composto por seqüências repetidas em *tandem* ou dispersas no genoma. As seqüências organizadas em *tandem* dividem-se em satélites, minissatélites e microssatélites, e as dispersas em transposons e retrotransposons (Figura 1).

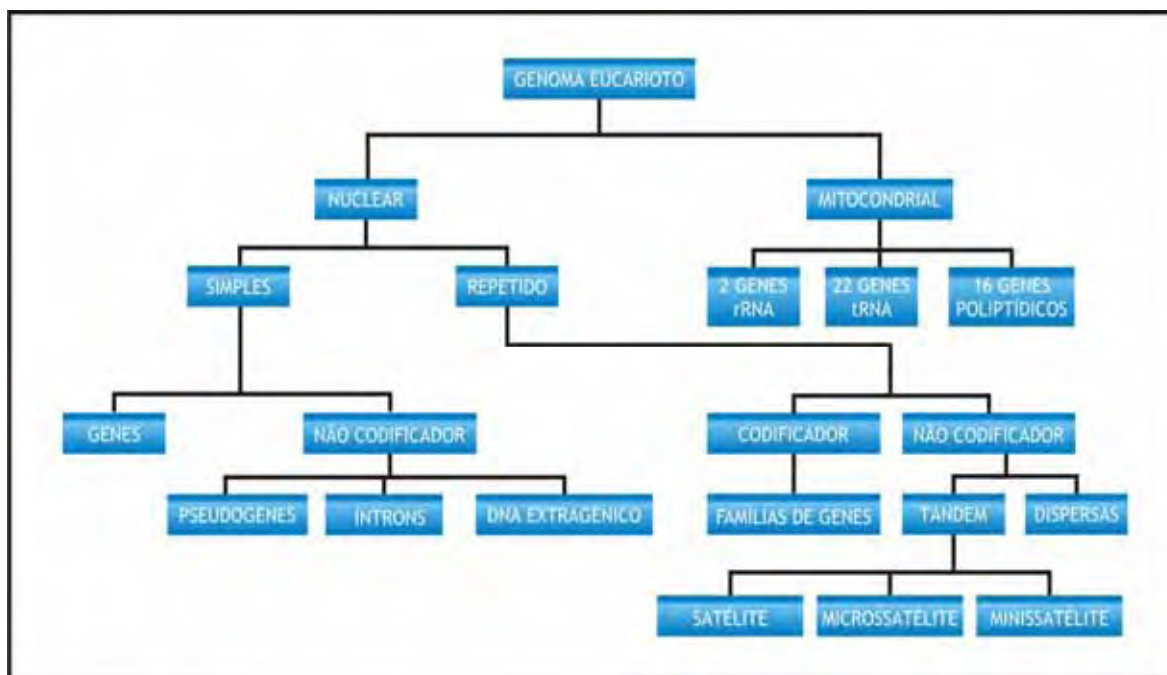


Figura 1. Organização do genoma eucarioto. Fonte: DNA Segredos & Mistérios (Farah, 2007).

1.2.1. Sequências repetidas em *tandem*

1.2.1.1. DNAs satélites

Sequências satélites são altamente repetidas, variando de 100 a 300 pb (pares de bases) de comprimento e de 1.000 a mais de 100.000 cópias no genoma. Em geral, localizam-se nas regiões terminais e centroméricas de um ou mais locos cromossômicos (Martins, 2006). Por possuírem densidade própria podem ser purificadas por centrifugação em gradiente de densidade de cloreto de Césio, constituindo frações “satélites” em relação ao restante do DNA genômico (Farah, 2007). Adicionalmente, vários trabalhos mostram que a distribuição dos DNAs satélites coincide com o padrão de bandamento C dos cromossomos (heterocromatina constitutiva), sugerindo que sejam um importante componente desta (Miklos, 1985).

O número de cópias de DNAs satélites é bastante variável. Existem cerca de 10.000 cópias do DNA satélite STR120 no genoma da soja *Glycine max* (Morgante *et al.*, 1997), 82.800 cópias do elemento PGH290 no genoma de *Drosophila guanche* (Bachmann *et al.*, 1989), 450.000 cópias do elemento PIM357 em espécies de besouro do gênero

Pimelia (Pons *et al.*, 1997) e 6.000.000 de cópias do DNA satélite RPCS no genoma do roedor *Ctenomys haigi* (Slamovits *et al.*, 2001). Em mamíferos, as seqüências satélites podem constituir de 5% a 30% do genoma, sendo notável que a proporção de seqüências satélites no genoma de uma espécie é bastante variável (Walsh, 2001).

Estudos comparativos de DNAs satélites mostraram que, em alguns casos, apesar de rápida divergência nucleotídica, algumas regiões contendo poucos nucleotídeos permaneceram conservadas entre DNAs satélites de espécies filogeneticamente distantes (Madsen *et al.*, 1994). O exemplo mais interessante é o das seqüências pertencentes à família alfa satélite, presente em todas as espécies de primatas investigadas (Haaf *et al.*, 1995). Trata-se de um DNA satélite com unidades de repetição de aproximadamente 170 pb que está presente no centrômero de todos os cromossomos da maioria das espécies de primatas, com exceção do Y (Haaf *et al.*, 1995). Em cada unidade de repetição de 170 pb, existe um elemento conservado de 17 pb, denominado de *CENP-B box*, que é usado como sítio de ligação de uma proteína centromérica específica, a *CENP-B*. Esta proteína se liga a uma proteína associada aos microtúbulos (*MAP*), que por sua vez, se liga aos microtúbulos do fuso (Therman e Susman, 1996). Esses fatos indicam que o DNA satélite alfa deve estar envolvido na formação do centrômero, contribuindo para a segregação dos cromossomos na mitose e meiose através de interações com proteínas centroméricas específicas (Willard, 2001). Notavelmente, a mesma seqüência foi encontrada nos DNAs satélites das espécies de roedores *Mus musculus* (Broccoli *et al.*, 1990) e *G. nigeriae* (Volobouev *et al.*, 1995). Tal fato evidencia seu papel na formação do centrômero e indica que o elemento *CENP-B box* deve estar sob seleção. Além disso, seqüências similares a estas foram encontradas em galinhas e até no peixe comumente conhecido como zebrafish (Li e Kirby, 2003).

Até o presente, nenhum trabalho demonstrou uma função geral que explique a presença de DNAs satélites no genoma. DNAs satélites não codificam proteínas. Conseqüentemente, DNAs satélites são coletivamente incluídos na porção não-codificante do genoma (Pages e Holmes, 1998). Existem casos em que DNAs satélites são claramente transcritos (Rojas *et al.*, 2000), mas a função destes transcritos, se existe, ainda não foi determinada. Até o presente, nenhum trabalho demonstrou uma função geral que explique a presença de DNAs satélites no genoma. Alguns transcritos de DNAs satélites de organismos tão variados como gafanhotos, salamandras e esquistossomos, possuem

atividade autocatalítica, na forma de riboenzimas capazes de auto-clivagem. No entanto, nenhuma função celular foi descrita para esta riboenzima.

1.2.1.2. Minissatélites

Seqüências repetidas arranjadas em cadeia, conhecidas como minissatélites ou seqüências com número variável de repetições (VNTR, *variable number of tandem repeats*), consistem de seqüências curtas (5 a 65 pb), geralmente envolvendo uma média de tamanho de cadeia de 0,5-30 Kb e são freqüentemente GC ricas presentes nas regiões eucromáticas dos genomas de vertebrados, fungos e plantas (Charlesworth *et al.*, 1994).

Os minissatélites foram descobertos durante a análise de seqüências de DNA do gene humano para insulina (Bell *et al.*, 1982). A localização dos minissatélites no DNA através da técnica de *Southern blot* mostrou que cada indivíduo apresenta um padrão particular com relação à quantidade e comprimento das cadeias de minissatélites o que levou Jeffreys *et al.* (1985) a se referir a essa técnica como impressão digital do DNA (*DNA fingerprint*).

Desde o desenvolvimento da técnica de *DNA fingerprint* (Jeffreys *et al.*, 1985) os pesquisadores têm reconhecido muitas aplicações para essa técnica nas análises de organismos aquáticos. O conhecimento destas regiões genômicas permitiu o desenvolvimento de marcadores que são mais polimórficos do que aqueles revelados pela análise convencional de isozimas ou por seqüências de DNA mitocondrial (Wright, 1993). Entre os peixes, o número de alelos identificados por locus varia de 2 a 52 (O'Reilly e Wright, 1995). Assim, os minissatélites têm sido empregados em uma grande série de análises em pesquisas básicas e aplicadas como mapeamento genômico, genética de populações e evolutiva, programas de seleção e melhoramento e em estudos de ecologia e preservação de espécies (Harris e Wright, 1995).

1.2.1.3. Microsatélites

Microsatélites, também referidos como seqüências simples repetidas (Tautz, 1989) foram descritos por três grupos de cientistas, como pequenas seqüências contendo de um a seis nucleotídeos que se repetem em *tandem* (Litt *et al.*, 1989, Tautz, 1989, Weber *et*

al., 1989). São classificados como perfeitos, imperfeitos ou compostos (Weber, 1989). Os perfeitos são aqueles em que o motivo se repete sem interrupção de um outro motivo ou seqüência. Os compostos são aqueles nos quais existe a repetição de mais de um tipo de motivo. Os imperfeitos são aqueles que apresentam outras seqüências além daquelas repetidas em *tandem*.

Embora na maioria das vezes sejam descritos como marcadores neutros, funções importantes de vários fenômenos biológicos têm sido atribuídas aos microssatélites. Exemplos dessas funções é a participação na organização da cromatina (Epplen *et al.*, 1996), na replicação do DNA (Li *et al.*, 2002), na recombinação (Biet *et al.*, 1999) e na expressão gênica (Liu *et al.*, 2001), dentre outras.

Os microssatélites são altamente polimórficos, uma vez que apresentam grande diversificação no tipo (mononucleotídeo a hexanucleotídeo) e no número de repetições encontradas nas diferentes espécies. Isto ocorre devido à alta taxa de mutação nessas regiões, variando de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por loco por geração (Ellegren, 2000), comparado a regiões codificantes do genoma, que apresentam taxas de mutação de 10^{-9} (Li, 1997).

Microssatélites são encontrados em muitos genomas, particularmente em eucariotos, sendo também relatados em menor quantidade em genomas procariotos. A maioria dos microssatélites (30 a 67%) apresenta a repetição em dinucleotídeos. Em vertebrados, a repetição mais freqüente é o dinucleotídeo AC. No genoma humano, dentre todos os motivos, o AT é o mais freqüente (Chistiakov *et al.*, 2006).

Os microssatélites localizam-se em maior proporção nas regiões não-codificantes do genoma, mas também ocorrem em regiões codificantes (Toth *et al.*, 2000). Isto pode ser atribuído à seleção negativa sobre mutações em regiões codificantes (Metzgar *et al.*, 2000). Mesmo assim, em humanos, a instabilidade de certas regiões de trinucleotídeos leva ao aparecimento de doenças tais como síndrome do X frágil, doença de Huntington, dentre outras (Brow e Brow, 2004).

A herança dos microssatélites é co-dominante, o que permite a distinção entre homozigotos e heterozigotos. Sua análise é baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que permite a utilização de pouca quantidade de DNA. Além disso, o arranjo das repetições forma unidades curtas que não ultrapassa a capacidade de extensão da PCR, possibilitando sua amplificação de DNAs degradados e de qualidade ruim. Todas essas características

fazem dos microssatélites ideais para estudos de mapeamento genômico, genética de populações, teste de paternidade, epidemiologia molecular, patologia e conservação de espécies (Chistiakov *et al.*, 2006).

1.2.2. Seqüências repetidas dispersas

Os elementos transponíveis (TEs) foram descobertos em 1950 por Bárbara McClintock, enquanto estudava grãos coloridos do milho indiano. Essa descoberta e a caracterização das propriedades genéticas desses elementos renderam-lhe o prêmio Nobel em 1983, somente após terem sido relatados no genoma de *D. melanogaster*, *E. coli*, *C. elegans* e também de humanos (Berg e Howe, 1989). Desde sua descoberta, os TEs têm-se mostrado presentes na maioria dos organismos, compondo grande parte das seqüências moderadamente repetidas de bactérias, fungos, plantas e animais. Podem apresentar desde poucas até centenas de cópias no genoma (Volf, 2006) representando aproximadamente 45% do genoma humano, 60% do genoma de *Zea mays* (milho), 77% de *Rana esculenta* (rã) e 40% de *Mus musculus* (camundongo). Entretanto, organismos unicelulares apresentam menor quantidade de TEs, sendo que em *Saccharomyces cerevisiae* apenas 3% a 5% do genoma é representado por esses elementos e em bactérias a proporção é ainda menor, ficando em cerca de 0,3% em *E. coli* (Biémont e Vieira, 2006).

A classificação desses elementos é feita de acordo com o tipo intermediário de transposição, sendo definidos como pertencentes à classe I aqueles que possuem intermediários de RNA e como pertencentes à classe II aqueles cujos intermediários são moléculas de DNA (Kidwell, 2002).

1.2.2.1. Elementos da classe I

Os elementos desta classe são conhecidos por retrotransposons. Eles movimentam-se através de um intermediário de RNA que é codificado para DNA pela enzima transcriptase reversa, produzida por eles mesmos, antes da sua nova inserção. Por sua vez, essa classe é subdividida em duas subclasses: os retrotransposons com LTR (longas repetições terminais) e os sem LTR (Capy *et al.*, 1998).

• Retrotransposons com LTR

São elementos estruturalmente similares aos retrovírus. Possuem longas repetições nucleotídicas nas extremidades 5'e 3'. De uma maneira geral, estas repetições terminais flanqueiam uma região central que contém três módulos abertos de leitura conhecidos por ORFs (*Open Reading Frame*). A seqüência das ORFs pode variar entre os elementos deste grupo. A primeira ORF refere-se ao gene *gag* que produz uma poliproteína que é processada em três proteínas maduras: a matriz, o capsídeo e o nucleocapsídeo. Essas três proteínas possuem similaridade aos componentes do capsídeo dos retrovírus. A outra ORF constitui-se do gene *pol* que codifica as enzimas necessárias à transposição do elemento: protease (Pr), transcriptase reversa (TR), RNaseH e integrase (Int). A última ORF está presente em algumas famílias desta classe, podendo ou não produzir uma proteína funcional, ela corresponde ao gene *env*, que codifica a proteína do envelope viral nos retrovírus (Capy *et al.*, 1998) (Figura 2).

De acordo com a seqüência codificante dentro da segunda ORF, esta subclasse de retroelementos pode ser dividida em duas subfamílias: *Ty1-copia* com a seqüência 5' Pr-Int-TR-RNaseH 3', e *Ty3-gypsy* com a seqüência 5'Pr-TR-RNaseH-Int 3'(Figura 2) (Capy *et al.*, 1998).

Os retrotransposons com LTR são encontrados em organismos eucariotos. Constituem aproximadamente 2% do genoma de *Drosophila* e mais que 40% do genoma de certas plantas.

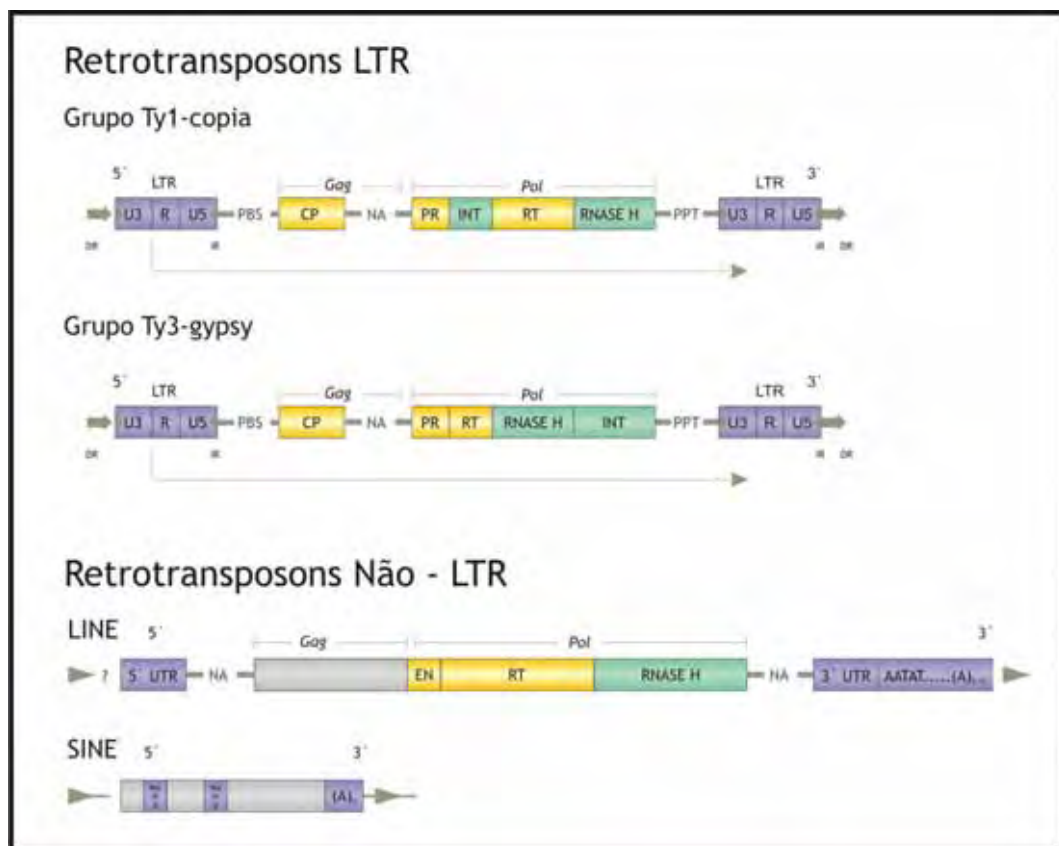


Figura 2: Representação de diferentes grupos de retrotransposons LTR e Não-LTR. **LTR**, repetição longa terminal; **PR**, protease; **INT**, integrase; **RT**, transcriptase reversa; **RNase H**, ribonuclease H; **LINE**, elemento nucleotídeo interpassado longo; **SINE**, elemento nucleotídeo interpassado curto. Modificado de Kumar e Bennetzen (1999).

• Retrotransposons sem LTR

Também chamados de retroposons, esta subclasse é dividida em duas superfamílias. A primeira inclui os elementos que não codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa e tem como principal componente os elementos curtos dispersos chamados de SINEs (*Short Interspersed Nucleotide Elements*). Na segunda estão os LINEs (*Long Interspersed Nucleotide Elements*), elementos que codificam as proteínas necessárias para a transcrição reversa. Tanto os elementos LINEs, quanto os SINEs têm sido encontrados em plantas, fungos e animais. Eles são encontrados em grande número de cópias nos genomas dos eucariotos.

Em geral, os SINEs possuem tamanho entre 100 a 500 pb (Fawcett *et al.*, 2006). Em vertebrados compõe duas superfamílias CORE-SINE e V SINE (Kazazian *et al.*, 2004). Em plantas sua distribuição é mais limitada, sendo encontradas famílias de SINEs do tipo AU (Fawcett *et al.*, 2006).

As seqüências repetidas do tipo SINE movimentam-se por retrotransposição com o auxílio de outros elementos móveis ativos, já que não codificam as enzimas necessárias para a sua própria mobilização, e são transcritos através de um promotor interno para RNA polimerase III (Fawcett *et al.*, 2006)..

Dentre os SINEs as seqüências do tipo *Alu* são as mais presentes no genoma primata. Estes elementos representam 5% a 10% do genoma deste grupo. Tem sido estimado que haja em torno de 1.000.000 cópias da família *Alu* no genoma humano (Biémont e Vieira, 2006). A família *Alu* é composta de seqüências curtas relacionadas de cerca de 300 pb em comprimento. As seqüências *Alu* se assemelham muito com aquelas do RNA 7S presentes nas partículas de reconhecimento de sinal que direcionam a maquinaria ribossomal da transcrição para a membrana do retículo. Acredita-se que durante a evolução este RNA citoplasmático foi copiado pela transcriptase reversa e integrado no genoma. No genoma de outros mamíferos também existe uma quantidade grande de SINEs. Por exemplo, no genoma da foca-do-porto há aproximadamente $1-3 \times 10^5$ cópias de seqüências do tipo SINE o que constitui cerca de 8,7% de genoma (Coltman e Wright, 1994).

O termo LINE foi inicialmente criado para descrever as seqüências de DNA repetidas longas dispersas no genoma dos mamíferos. Inicialmente, estes elementos foram classificados no grupo dos retroelementos de origem não viral, devido à presença de seqüências poliadeniladas terminais e ausência de LTRs. A estrutura dos LINES compreende duas fases abertas de leitura. A primeira codifica uma proteína semelhante à *gag* com sítio de ligação com RNA e propriedade chaperônica para ácidos nucléicos e a segunda fase aberta de leitura, uma proteína do tipo polimerase com atividade endonuclease e transcriptase reversa (Martin *et al.*, 2005).

LINES são encontrados em uma variedade de organismos incluindo protistas, plantas, insetos, moluscos e vertebrados. Em mamíferos o elemento LINE-1 é o mais freqüente. Aproximadamente 17% do genoma humano é composto por este tipo de

repetição, o que corresponde a 100.000 cópias, variando entre 50.000 – 100.000 cópias nos demais genomas (Han *et al.*, 2007).

A principal característica dos retrotransposons é a sua capacidade de se mover dentro do genoma, inserindo-se em novos sítios, próximos, ou até mesmo dentro de seqüências gênicas, podendo causar mutações de inserção, alteração da estrutura e função de genes, rearranjos cromossômicos, mudanças na regulação gênica e aumento exagerado do tamanho do genoma, podendo dessa forma servir como fonte de diversidade (Feschotte e Prithman, 2007).

As mutações provocadas por estes elementos são fontes de variabilidade genética e com isso afetam as seqüências genômicas provocando efeitos negativos ou benéficos no genoma de seus hospedeiros (Volff, 2006). Como exemplos prejudiciais no genoma têm-se várias doenças genéticas, sendo que destas, 0,5% a 1% representam doenças humanas como hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, tumores de esôfago e câncer de mama (Biémont e Vieira, 2006). Apesar de poder provocar danos ao genoma, esses elementos podem ser “domesticados” pelo hospedeiro, auxiliando o genoma em certas funções básicas como o fazem os elementos TART e Het-A em *Drosophilas*. Esses dois elementos realizam, atualmente, uma função celular básica semelhante a da enzima telomerase. Het-A e TART têm inserção preferencial nas regiões teloméricas dos cromossomos e, desta forma, eles mantêm constante o tamanho do cromossomo que durante o ciclo celular perde parte dessas regiões. Este é o melhor exemplo onde um elemento de transposição realiza uma função vital para o genoma hospedeiro (Kidwell e Lisch, 1997). Além disso, em mamíferos, estes elementos agem como moduladores na expressão de genes e contribuem para a inativação do cromossomo X (Volff, 2006).

Todo o aparato utilizado pelos elementos transponíveis é sintetizado na maioria das vezes pelo próprio elemento (elementos autônomos), mas em alguns casos ele pode utilizar as enzimas sintetizadas por outros elementos para realizar a sua movimentação (elementos não-autônomos). Os elementos transponíveis autônomos são capazes de realizarem sua transposição, ao contrário dos elementos não-autônomos, não pode transpor a si mesmo, mas sim na presença de um elemento autônomo da mesma família (Wessler, 2006).

Existem vários tipos de elementos de transposição. Temos como exemplos, os elementos *Ty* (em levedura), os elementos *copia*, *fold-back* e os elementos *P* encontrados em *Drosophila*, *Ac*, *Ds* e *Mu* caracterizados em milho, e os elementos retrovirais (Lewin, 2004).

Segundo alguns autores os elementos transponíveis são um exemplo de genes "egoístas". Essas seqüências podem não apresentar nenhuma vantagem seletiva para os genomas hospedeiros, mas podem sobreviver através da produção acurada de cópias. Quando a fonte original torna-se inativa do ponto de vista de transposição, um ou mais elementos de sua progênie podem continuar existindo ativamente no genoma (Smit, 1996).

1.2.2.2. Elementos da classe II

A classe II é constituída pelos elementos chamados de transposons. Os elementos dessa categoria são caracterizados pela presença de terminações repetidas invertidas e genes codificando para a enzima transposase (Charlesworth, 1994). Atualmente são reconhecidas dez famílias para tais elementos: *Tc1/mariner*, *haT*, elemento *P*, *MuDR/Fokdback*, *Cacta*, *PiggyBac*, *Pif/Harbinger*, *Merlin*, *Transib* e *Banshee* (Feschotte e Prithman, 2007).

O elemento repetido *Tc1* pertence a uma superfamília de transposons amplamente distribuído de protozoários a vertebrados, inclusive em muitas espécies de peixes teleósteos (Capriglione *et al.*, 2002). Esse elemento possui um gene para a enzima transposase que catalisa seu movimento e repetições terminais invertidas constituindo-se característica da maioria dos transposons (Miskey *et al.*, 2005). Apesar de extremamente difundido pelos organismos, a grande maioria deste elemento (*Tc1*) é inativa no genoma dos eucariotos (Miskey *et al.*, 2005) devido a vários eventos de mutações, deleções e inserções que causaram a sua inativação, tornando-o um componente permanente no genoma dos eucariotos (Pocwierz-Kotus, 2007).

Os transposons podem ser transpostos através de dois mecanismos de mobilização diferentes. No primeiro, (i) chamado de transposição replicativa, o elemento é copiado como parte de seu movimento, permanecendo uma cópia no sítio original, enquanto a outra é inserida em um novo sítio, contribuindo para um aumento do número de cópias do transposon. No segundo mecanismo (ii), que é conhecido como transposição não-

replicativa, o elemento sai do local antigo e se insere em um novo local sem nenhum aumento do número de cópias (Lewin, 2004).

Assim como outros elementos, a mobilidade dos transposons pode afetar a trajetória evolucionária de seus hospedeiros via alteração da função gênica através de inserção e indução de rearranjos cromossômicos. Assim, os transposons contribuem para originar diversidade alélica e para a criação de novos genes (Feschotte e Prithman, 2007).

Os transposons possuem a capacidade de causar mutações. Ao se transpor, podem afetar a expressão de genes. Quando a inserção desses elementos ocorre dentro de regiões promotoras, introns, regiões não traduzidas, podem contribuir para alterações na estrutura do gene, levando, dessa forma, a uma perda da função deste no organismo. Embora a maioria dessas mutações sejam prejudiciais, a transposição destes elementos tem levado a geração de novos alelos, a qual tem contribuído para uma ampla diversificação de espécies (Kapitonov e Jurka, 2006).

Até recentemente os transposons eram vistos como "DNA lixo" sem qualquer função importante. Porém, hoje sabe-se que geram mutações, modificam os padrões de expressão gênica, promovem rearranjos cromossômicos, desempenhando assim, um papel fundamental na trajetória evolucionária de seus hospedeiros (Feschotte e Prithman, 2007).

1.3. Elementos repetidos de DNA e seu papel como marcadores físicos cromossômicos para os peixes

1.3.1. Genes ribossomais

Os estudos cromossômicos desenvolvidos em peixes têm contribuído grandemente para o conhecimento do genoma dessa classe de vertebrados. A maioria das informações disponíveis concentra-se em análises citogenéticas básicas, sendo que um número pouco expressivo de trabalhos tem descrito seqüências de DNA e sua organização no genoma (Martins, 2006). Seqüências repetidas como SINEs, LINEs, DNAs satélites, minissatélites, microssatélites e genes repetidos em *tandem*, como os genes de RNAs ribossomais, têm sido descritas para diversas espécies de peixes. Essas seqüências podem ser utilizadas como marcadores cromossômicos úteis em estudos de evolução, bem como na organização do genoma como um todo (Martins, 2006).

Os primeiros trabalhos de mapeamento físico através das hibridações *in situ* utilizaram como sondas seqüências de DNA repetidas em *tandem*. Entre elas estão os genes que codificam os RNAs ribossomais 28S, 18S, 5,8S e 5S (Martins, 2006).

O RNAr é uma das moléculas de RNA mais abundante nas células, constituindo aproximadamente 80% de todo o RNA. Possui função catalítica e estrutural e formam a estrutura básica das subunidades ribossomais maiores e menores que catalizam a síntese de proteínas. Nos eucariotos superiores, os genes das subunidades ribossomais, apresentam-se organizados em duas famílias multigênicas (5S e 45S) as quais assumem uma distribuição em *tandem* no genoma. Os genes de RNAr tem sido amplamente estudados em uma variedade de plantas e animais, especialmente com relação a caracterização de espécies e populações, relações evolutivas e expressão gênica (Martins e Wasko, 2004). Em peixes, a localização cromossômica dos genes de RNAr 5S tem sido de grande importância para a compreensão da estrutura e organização das seqüências repetidas nos cromossomos (Martins e Galetti, 2001b).

A localização cromossômica dos genes RNAr 5S já foi descrita para mais de 67 espécies de peixes de diferentes ordens tais como Acipenceriformes, Anguiliformes, Cypriniformes, Characiformes, Salmoniformes, Perciformes e Tetraodontiformes (Martins e Wasko, 2004).

Tabela 1- Compilação de dados relacionados à localização cromossômica de DNAr 5S nos cromossomos dos peixes

Ordens e espécies	Número de locos de DNAr 5S	Localização cromossômica	Síntena dos locos DNAr 5S e 45S	Referências
Acipenseriformes				
<i>Acipenser naccarii</i>	4	Intersticial/ Telomérica	0	Fontana <i>et al.</i> , 1999, 2003
<i>Acipenser ruthenus</i>	2	Telomérica	0	Fontana 1999
<i>Acipenser fulvescens</i>	4	Intersticial	0	
<i>Acipenser sturio</i>	2	Intersticial	0	Tagliavini <i>et al.</i> , 1999; Fontana <i>et al.</i> , 2003.
<i>Acipenser stellatus</i>	2		Positivo	Fontana <i>et al.</i> , 2003
<i>Acipenser baerii</i>	4		Positivo	Fontana <i>et al.</i> , 2003
<i>Acipenser transmontanus</i>	4		Positivo	Fontana <i>et al.</i> , 2003
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	2	Intersticial		Fontana <i>et al.</i> , 2003
<i>Acipenser ruthenus</i>	2			Fontana <i>et al.</i> , 2003
<i>Acipenser oxyrinchus</i>	2	Região mediana		Fontana <i>et al.</i> , 2007
<i>Huso huso</i>	2		Positivo	Fontana <i>et al.</i> 1998, 2003
Anguilliformes				
<i>Anguilla Anguilla</i>	2	Intersticial	Negativo	Martinez <i>et al.</i> , 1996
<i>Anguilla rostrata</i>	2	Intersticial	Negativo	Nieddu <i>et al.</i> , 1998
<i>Conger conger</i>	2			Deiana <i>et al.</i> , 2006
Salmoniformes				
<i>Coregonus artedii</i>	2	Intersticial	Negativo	Sajdak <i>et al.</i> , 1998
<i>Coregonus zenithicus</i>		Intersticial	Negativo	Sajdak <i>et al.</i> , 1998
<i>Coregonus lavaretus</i>	2	Intersticial	Negativo	Jankun <i>et al.</i> , 2003
<i>Coregonus lavaretus</i>	6	Região distal		Rossi e Gornung, 2005.
<i>Coregonus peled</i>	2	Intersticial	Negativo	Jankun <i>et al.</i> , 2003
<i>Coregonus albula</i>	2	Intersticial	Negativo	Jankun <i>et al.</i> , 2003
<i>Hucho perryi</i>	2	Intersticial	Negativo	Fujiwara <i>et al.</i> , 1998
<i>Oncorhynchus masou</i>	8	Intersticial	Positivo	Fujiwara <i>et al.</i> , 1998
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	4-6	Intersticial	Positivo	Móran <i>et al.</i> , 1996
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	7	Porção proximal do braço curto		Stein <i>et al.</i> , 2001.
<i>Oncorhynchus keta</i>	Múltiplos pares inclusive o sexual			Phillips <i>et al.</i> , 2007.
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	2			Phillips <i>et al.</i> , 2007.
<i>Salmo salar</i>	3-4	Intersticial	Positivo	Pendas <i>et al.</i> , 1994
<i>Salmo trutta</i>	2	Intersticial	Negativo	Móran <i>et al.</i> , 1996
<i>Salvelinus fontinalis</i>	2	Intersticial	Negativo	Fujiwara <i>et al.</i> , 1998
<i>Salvelinus malma</i>				Phillips <i>et al.</i> , 2002
<i>Salvelinus confluentes</i>				Phillips <i>et al.</i> , 2002
<i>Salvelinus alpinus</i>				Phillips <i>et al.</i> , 2002
<i>Salvelinus namaycush</i>				Phillips <i>et al.</i> , 2002
<i>Hucho perryi</i>	8	Intersticial		Fujiwara <i>et al.</i> , 1998
<i>Thymallus thymallus</i>	6-7	Intersticial	Negativo	Jankun <i>et al.</i> , 2003
Cypriniformes				
<i>Acheilognathus tabira</i>	4	Intersticial Telomérica	Positivo	Inafuku <i>et al.</i> , 2000
<i>Carassius auratus langsdorfi</i>	2			Murakami e Fugitani 1998
<i>Cyprinus carpio</i>	4	Intersticial	Negativo	Inafuku <i>et al.</i> , 2000
<i>Danio rerio</i>	2	Intersticial	Positivo	Phillips e Reed 2000
<i>Rhodeos ocellatus</i>	2	Intersticial	Negativo	Kikuma <i>et al.</i> , 2000
Characiformes				
<i>Astyanax altiparanae</i>	2	Intersticial	Positivo	Almeida-Toledo <i>et al.</i> , 2002
<i>Astyanax lacustris</i>	2	Intersticial	Positivo	Almeida-Toledo <i>et al.</i> , 2002
<i>Astyanax fasciatus</i>	4	Intersticial	positivo/ negativo	Almeida-Toledo <i>et al.</i> , 2002
<i>Astyanax schubarti</i>	4	Intersticial	positivo/ negativo	Almeida-Toledo <i>et al.</i> , 2002

<i>Astyanax scabripinnis</i>	4	Intersticial	positivo/ negativo	Almeida-Toledo <i>et al.</i> , 2002
<i>Astyanax scabripinnis</i>	8	Intersticial	Negativo	Ferro <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon lundii</i>	4	Intersticial	Negativo	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon microlepis</i>	4	Intersticial	Negativo	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon orbignyianus</i>	4	Intersticial	Negativo	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon cephalus</i>	4	Intersticial	Negativo	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon</i> sp.	4	Intersticial	Negativo	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon brevicauda</i>	4	Intersticial	Negativo	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Brycon insignis</i>	4	Intersticial	Negativo	Wasko <i>et al.</i> , 2001
<i>Hoplias malabaricus</i>	2		Negativo	Born and Bertollo 2000
<i>Leporinus</i> cf. <i>elongatus</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 2001 ^a
<i>Leporinus elongatus</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 1999
<i>Leporinus friderici</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 1999
<i>Leporinus obtusidens</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 1999
<i>Leporinus reinhardti</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 2001 ^a
<i>Parodon hilarii</i>	4	Intersticial	Negativo	Vicente <i>et al.</i> , 2001
<i>Parodon tortuosus</i>	4	Intersticial	Negativo	Vicente <i>et al.</i> , 2001
<i>Parodon</i> sp.	4	Intersticial	Negativo	Vicente <i>et al.</i> , 2001
<i>Schizodon altoparanae</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 2000
<i>Schizodon borelli</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 2000
<i>Schizodon isognathum</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 2000
<i>Schizodon knerii</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 2000
<i>Schizodon nasutus</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 2000
<i>Schizodon vittatus</i>	4	Intersticial	Negativo	Martins e Galetti 2000
Perciformes				
<i>Coris julis</i>	4	Telomérica	Positivo	Mandrioli <i>et al.</i> , 2000
<i>Chromis insolata</i>	4	Telomérica	Negativo	Molina e Galetti 2002
<i>Chromis multilineata</i>				Molina e Galetti 2002
<i>Chromis flavicauda</i>	4	Intersticial	Negativo	Molina e Galetti 2002
<i>Ephinephelus marginatus</i>	2	Intersticial	Negativo	Sola <i>et al.</i> , 2000
<i>Gobius niger</i>	2	Intersticial	Negativo	Mandrioli <i>et al.</i> , 2001
<i>Micropterus salmoides</i>	2	Intersticial	Negativo	Deiana <i>et al.</i> , 2000
<i>Oreochromis niloticus</i>	6	Intersticial	Negativo	Martins <i>et al.</i> , 2002
Tetraodontiformes				
<i>Tetraodon fluviatilis</i>	2	Telomérica	Negativo	Mandrioli and Manicardi 2001
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	2	Intersticial	Negativo	Fischer <i>et al.</i> , 2000

^aModificado de Martins e Wasko, 2004

Como exemplo de mapeamento físico de DNAr, tem-se o trabalho realizado por Noleto *et al.* (2007) com Tetraodontiformes onde mapeou-se as seqüências 18S e 5S, obtidas de *Prochilodus argenteus* e *Leporinus obtusidens* respectivamente, nas espécies *Sphoeroides testudineus*, *Sphoeroides greeleyi* e *Cylichthys spinosus*. A utilização da sonda 18S revelou marcações simples nas três espécies. Já a sonda 5S revelou marcações simples nas espécies *S. greeleyi* e *S. testudineus* e marcações múltiplas na espécie *C. spinosus*. Os resultados obtidos com a utilização da sonda 5S sugerem que os sítios múltiplos observados em *C. spinosus* podem representar uma característica plesiomórfica (Noleto *et al.*, 2007), sendo assim um importante elemento para estudos filogenéticos neste grupo de espécies.

1.3.2. Elementos repetidos em *tandem*

Em peixes, entretanto, o número de informações a respeito da organização molecular dos DNAs satélites e de sua localização cromossômica vem crescendo nos últimos tempos. Essas informações podem ser mais bem compreendidas na tabela abaixo:

Tabela 2- Compilação de dados relacionados ao isolamento e localização cromossômica de DNAs satélites nos cromossomos dos peixes

Famílias e espécies	Tamanho (pb)	Localização cromossômica	Referências
Acipenseridae			
<i>Acipenser naccarii</i>	180	Centromérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1997 Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	180	Centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser baerii</i>	180	Centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser transmontanus</i>	180	Centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Acipenser ruthenus</i>	180	Centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
<i>Huso huso</i>	180	Centromérica	Lanfredi <i>et al.</i> , 2001
Adrianichthyidae			
<i>Oryzias latipes</i>	600	Sexo-específico	Matsuda <i>et al.</i> , 1998
Anostomidae			
<i>Leporinus elongatus</i>	174,729	Cromossomos Z e W	Nakayama <i>et al.</i> , 1994
<i>Leporinus obtusidens</i>	483	Pericentromérica	Koehler <i>et al.</i> , 1997
Channichthyidae			
<i>Chionodraco hamatus</i>	1000	Centromérica e telomérica	Capriglione <i>et al.</i> , 1994
Characidae			
<i>Astyanax scabripinnis</i>	51	Heterocromatinas	Mestriner <i>et al.</i> , 2000 Mantovani <i>et al.</i> , 2004
Cichlidae			
<i>Oreochromis niloticus</i>	237	Centromérica	Franck <i>et al.</i> , 1992 Oliveira e Wright, 1998
<i>Oreochromis niloticus</i>	1900	braço curto de quatro cromossomos	Franck e Wright, 1993; Oliveira e Wright, 1998
Cyprinidae			
<i>Carassius auratus langsdorfi</i>	137		Murakami e Fujitani, 1997
<i>Danio rerio</i>	180, 191	Centromérica	Ekker <i>et al.</i> , 1992; He <i>et al.</i> , 1992; Sola e Gornung, 2001
<i>Danio rerio</i>	200	Heterocromatina rica AT	Phillips e Reed, 2000
<i>Danio rerio</i>	92	Heterocromatina rica GC	Phillips e Reed, 2000
Erythrinidae			
<i>Hoplias malabaricus</i>	333-366	Centromérica	Haaf <i>et al.</i> , 1993
<i>Hoplias malabaricus</i>	356-360	Centromérica	Martins <i>et al.</i> , 2006
Gobiidae			
<i>Gobius cobitis</i>	332	Centromérica	Canapa <i>et al.</i> , 2002
<i>Gobius paganelus</i>	332	Centromérica	Canapa <i>et al.</i> , 2002
Heptapteridae			
<i>Imparfinis schubarti</i>	2	Telomérica	Vanzela <i>et al.</i> , 2002
Loricariidae			
<i>Rineloricaria latirostris</i>	2	Próximo NOR	Vanzela <i>et al.</i> , 2002
Parodontidae			
<i>Parodon hilarri</i>	200	Heterocromatina cromossomo W	terminal, Vicente <i>et al.</i> , 2003
Pimelodidae			
<i>Steindachneridion scripta</i>	2	Telomérica, dispersa	Vanzela <i>et al.</i> , 2002
Poeciliidae			
<i>Poecilia reticulata</i>	4	Cromossomo Y	Nanda <i>et al.</i> , 1990
Prochilodontidae			
<i>Prochilodus lineatus</i>	441	Pericentromérica	Jesus <i>et al.</i> , 2003
<i>Prochilodus lineatus</i>	900	pericentromérica e supranumerários	Jesus <i>et al.</i> , 2003
<i>Prochilodus lineatus</i>	5	Telomérica	Hatanaka <i>et al.</i> , 2002
<i>Prochilodus marggrawii</i>	5	Telomérica	Hatanaka <i>et al.</i> , 2002
Salmonidae			

<i>Salvelinus alpinus</i>	72, 127, 200, 400	Centromérica	Hartley e Davidson, 1994
<i>Salvelinus namaycush</i>	140	Centromérica	Reed e Phillips, 1995
<i>Salvelinus namaycush</i>	120	Centromérica	Reed e Phillips, 1995
<i>Salmo trutta</i>	359	NOR	Abuín <i>et al.</i> , 1996
<i>Salmo salar</i>	380, 442, 923	NOR	Goodier e Davidson, 1994; Abuín <i>et al.</i> , 1996
<i>Salmo salar</i>	260	Pericentromérica	
<i>Salmo salar</i>	42	Intersticial	Pérez <i>et al.</i> , 1999
<i>Salmo salar</i>	28	Telomérica, centromérica	pericentromérica, Pérez <i>et al.</i> , 1999
<i>Salmo salar</i>	34	Intersticial	Pérez <i>et al.</i> , 1999
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	939	Subtelomérica	Delvin <i>et al.</i> , 1991, 1998
Sparidae			
<i>Sparus aurata</i>	186	Centromérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1994
<i>Pagrus pagrus</i>	186	Subtelomérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1998
<i>Pagrus aurica</i>	186	Subtelomérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1998
<i>Pagellus erythrinus</i>	186	subtelomérica e telomérica	Garrido-Ramos <i>et al.</i> , 1998
Tetradontidae			
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	118	Pericentromérica	Crollius <i>et al.</i> , 2000
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	10	Heterocromatinas	Crollius <i>et al.</i> , 2000
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	100	Heterocromatinas	Fisher <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	104	Heterocromatinas	Fisher <i>et al.</i> , 2004
<i>Fugu rubripes</i>	118	Centromérica	Brenner <i>et al.</i> , 1993; Elgar <i>et al.</i> , 1999
Cyclostomata			
<i>Epatretus okinoseanus</i>	90	Intersticial	Kubota <i>et al.</i> , 1993
<i>Epatretus burgeri</i>	57 e 64	Intersticial	Kubota <i>et al.</i> , 2001
<i>Petromyzon marinus</i>		Centromérica e pericentromérica	Böan <i>et al.</i> , 1996

* Modificado de Martins, 2006

Martins *et al.* (2006) mapearam uma seqüência satélite centromérica nomeada 5SHindIII-DNA, a qual tem uma similaridade com o gene RNAr 5S e seus espaçadores no genoma de *Hoplias malabaricus*. Os experimentos de FISH demonstraram que repetições do gene RNAr 5S verdadeiro foram hibridados na posição intersticial de dois pares cromossômicos, enquanto que a seqüência 5SHindIII-DNA mostrou marcações na posição centromérica de nove pares cromossômicos. A presença da seqüência 5SHindIII-DNA nos centrômeros de vários cromossomos indica que esta família satélite provavelmente escapou da pressão seletiva que mantém a estrutura e organização do gene RNAr 5S e se tornou dispersa no genoma. Os autores sugeriram a hipótese de que esta seqüência tem sido mantida nas regiões centroméricas e que podem desempenhar um papel estrutural ou funcional na organização do centrômero.

Azevedo *et al.* (2005) isolaram, caracterizaram e mapearam a seqüência Al-HindIII na espécie *Achirus lineatus* (Pleuronectiformes), a qual é constituída por 204 pb, com predominância de pares de base AT (63,72%). Experimentos de hibridação em membrana demonstraram que este fragmento estava ausente nas espécies *A. declives*, *Gymnachirus nudus* e *Trinectes paulistanus*, indicando ser este um marcador molecular específico para *A. lineatus*. A hibridação *in situ* fluorescente demonstrou que esta família

de DNA satélite localiza-se na região centromérica de todos os cromossomos, sugerindo que a mesma possa estar associada a uma função específica nesta posição ou, alternativamente, podem apenas estar associadas a alguma seqüência centromérica e estarem evoluindo juntas.

As informações referentes às seqüências satélites mostram que as mesmas se encontram localizadas principalmente nas regiões centroméricas dos cromossomos e, como demonstrado para outros organismos, devem desempenhar papel importante na estrutura e função dos centrômeros dos peixes (Galetti e Martins, 2004).

1.3.3. Elementos repetidos dispersos

Apesar da maior parte do DNA repetido do genoma eucariótico ser composta de elementos transponíveis, os estudos de citogenética em peixes utilizando essas seqüências encontram-se ainda em fase inicial. Os resultados já obtidos sugerem que esses elementos podem contribuir bastante para o conhecimento da evolução do genoma nesse grupo de organismos. Alguns desses elementos já foram mapeados nos cromossomos de peixes (Tabela 3).

Tabela 3- Compilação de dados relacionados ao isolamento e localização cromossômica de elementos repetidos dispersos nos cromossomos dos peixes

Ordens e espécies	Tipo de Elementos	Localização cromossômica	Referências
Aulopiformes			
<i>Aulopus japonicus</i>		Cromossomo W	Ota <i>et al.</i> , 2003
Cypriniformes			
<i>Alburnus alburnus</i>	Gypse, Ty3	Cromossomo B	Ziegler <i>et al.</i> , 2003
Cyprinodontiformes			
<i>Xiphophorus maculatus</i>	XIR LTR-like	Cromossomo Y	Nanda <i>et al.</i> , 2000
Perciformes			
<i>Artedidraco shackletoni</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz, <i>et al.</i> , 2004
<i>Bovichtus angustifrons</i>	Rex1, Rex3	Disperso	
<i>Chionodraco hamatus</i>	Tc1-like	Pericentromérica, telomérica, intersticial	Capriglione <i>et al.</i> , 2002
<i>Chionodraco hamatus</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Dissostichus mawsoni</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Gobius niger</i>	Mariner-like	overlapping NORs	Mandrioli <i>et al.</i> , 2001
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Gymnodraco victori</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Neopagetopsis ionah</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Notothenia coriiceps</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Oreochromis niloticus</i>	CiLINE2	Cromossomo 1 e disperso	Oliveira <i>et al.</i> , 1999
<i>Oreochromis niloticus</i>	Ron1	Cromossomo 1 e disperso	Bryden <i>et al.</i> , 1998; Oliveira <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	Ron2	Disperso	Oliveira <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	On2318	Cromossomo 1 e disperso	Harvey <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	On239 Tc1-like	Centomérico, telomérico, disperso	Harvey <i>et al.</i> , 2003
<i>Patagonotothen tessellata</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus hansonii</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004

<i>Trematomus newnesi</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus bernacchii</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Trematomus pennellii</i>	Rex1, Rex3	Disperso	Ozouf-Costaz <i>et al.</i> , 2004
Tetraodontiformes			
<i>Tetraodon fluviatilis</i>	Mariner-like	NOR-associada heterocromatina	Mandrioli e Manicardi, 2001
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Dm-Line	Heterocromatinas	DaSilva <i>et al.</i> , 2002
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tc1-like	Heterocromatinas	DaSilva <i>et al.</i> , 2002
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Zebulon	Heterocromatinas	Bouneau <i>et al.</i> , 2003
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tol2	Heterocromatinas	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Buffy1	Cromossomos 4-5	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Rex3	Heterocromatinas	Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Babar	Heterocromatinas	Fischer <i>et al.</i> , 2004

*Modificado de Martins 2006

Estudos de hibridação *in situ* fluorescente com sondas de retrotransposons *Rex1* e *Rex3* foram realizados por Ozouf-Costaz *et al.* (2004) em 13 espécies de peixes da Antártica, pertencentes a cinco famílias da subordem Notothenioidei. As análises mostraram que o *Rex1* geralmente é menos abundante do que *Rex3* que, por sua vez, teve uma marcação mais intensa em algumas regiões específicas. Na espécie *Chionodraco hamatus*, o *Rex3* acumulou-se em áreas pericentroméricas do braço curto de alguns pares cromossômicos e em especial no braço longo do cromossomo Y, sugerindo que esta região possa corresponder ao braço curto de um dos autossomos envolvidos na fusão em *tandem* que deu origem a este cromossomo.

Parise-Maltempo *et al.* (2007), isolaram através de digestão enzimática do genoma de *Leporinus elongatus*, um elemento repetido do tipo disperso nomeado LeSpeI. O mapeamento físico demonstrou que este elemento está localizado nos cromossomos sexuais da espécie, revelando um sistema múltiplo do tipo $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$ para a mesma. Interessante se faz destacar que a descrição original indicava um mecanismo de cromossomos sexuais simples do tipo ZZ/ZW (Galetti Jr e Foresti, 1986).

A localização cromossômica do elemento transponível *Tc1* foi estudada na espécie Antártica *Chionodraco hamatus* (Notothenioidei). Esse elemento foi identificado em uma região heterocromática do cromossomo sexual Y e sua hibridação na região intersticial (Capriglione *et al.*, 2002) sugerindo que este cromossomo possa ter se originado por amplificação em cadeia ou fusão Robertsoniana (Morescalchi *et al.*, 1996).

Ferreira e Martins (2008) isolaram e caracterizaram seqüências repetidas no genoma de *Oreochromis niloticus* através da triagem de biblioteca de BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) para identificação de clones ricos em seqüências repetidas. Estes foram selecionados e utilizados como sondas para hibridação *in situ* e localizaram-se principalmente nas regiões centroméricas, teloméricas, além de quase toda a extensão do

primeiro par cromossômico, exceto em torno de sua região centromérica. Análises quantitativas da hibridação desses BACs entre machos e fêmeas revelaram diferenças no conteúdo de DNA do braço p entre os cromossomos X e Y, permitindo inferir que tal braço do cromossomo X possui maior quantidade de seqüências repetidas. Tais informações já haviam sido observadas previamente através do seqüenciamento e hibridação cromossômica do DNA microdissectado dos cromossomos X e Y feitos por Harvey *et al.* (2003). Esses resultados reforçam a proposição de que estes tipos de seqüências estejam envolvidos com a diferenciação cromossômica do sexo nesta espécie (Ferreira e Martins, 2008).

A riqueza de seqüências repetidas de DNA nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos das espécies de peixes sugerem que tais seqüências desempenham um papel importante na manutenção e evolução da estrutura cromossômica destas espécies. Seqüências repetidas estão presentes principalmente nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos e representam o principal componente das heterocromatinas da maioria das espécies.

1.4. Biologia e evolução dos Cichlidae

O grupo dos peixes é o mais antigo, numeroso e diverso dentre os vertebrados. Acredita-se que as espécies incluídas neste grupo representem a metade das espécies viventes reconhecidas de vertebrados, ou seja, aproximadamente 24.618 espécies válidas para um total de 48.170 (Nelson, 2006). Entretanto, este número pode ser ainda maior, pois a cada ano mais espécies são descritas.

A família Cichlidae, pertence à ordem Perciformes, está incluída entre as famílias de peixes com maior número de espécies (Nelson, 2006), sendo estimadas 3.000 espécies que estão distribuídas pela América Central e do Sul, Madagascar, Sudeste da Índia e África (Kocher, 2004).

A maior diversidade de espécies de Cichlidae é encontrada principalmente nos grandes lagos africanos (Trewavas, 1983). Este grupo de peixes tem atraído uma maior atenção dos pesquisadores, nos últimos anos, devido a sua rápida radiação adaptativa nos grandes lagos do leste da África, onde quase 2.000 espécies têm evoluído somente nos

últimos 10 milhões de anos (Kocher, 2004). O principal fator que promove este tipo de adaptação a novos ambientes é o fato de que eles se adaptam facilmente a condições extremas de habitats e nichos (Moyle e Cech Jr., 2000) Além disso, algumas espécies desta família têm uma grande importância para a aquicultura mundial. Estes peixes apresentam um colorido fascinante que torna as espécies de pequeno porte preferidas pelos aquarofilistas e as de grande porte são muito utilizadas na alimentação e pesca esportiva (Axelrod, 1996).

Segundo Sterba (1973), os ciclídeos são peixes de corpo alto, sendo que alguns apresentam a forma de disco. A grande maioria apresenta cabeça larga, sendo que em muitas espécies, na época reprodutiva, o macho exibe uma protuberância adiposa na testa, às vezes também presente na fêmea. A boca é protrátil e circundada por grossos lábios. Possuem as nadadeiras dorsal e anal com espinhos pungentes, na porção anterior e raios moles na porção posterior. De acordo com Britiski (1972) uma característica marcante dos representantes dessa família é a linha lateral interrompida. Sua porção superior se estende desde o opérculo até o início dos raios moles da dorsal, enquanto a porção inferior segue um pouco abaixo, como se houvesse ocorrido uma quebra. O cuidado parental, assim como a guarda de ovos e larvas são marcantes entre os indivíduos desta família, sendo este papel desempenhado principalmente pelas fêmeas. Os ciclídeos não apresentam um período reprodutivo bem definido e não apresentam dimorfismo sexual marcante, a não ser na época da reprodução, quando algumas características podem diferenciar os sexos (Feldberg, 2003).

Os ciclídeos sul-americanos estão organizados nas seguintes subfamílias: Retroculinae; Cichlinae; Astronotinae; Geophagine e Cichlasomatine. Kullander (1998) propôs uma nova filogenia para a família Cichlidae baseado em 91 caracteres morfológicos de 43 espécies sul-americanas e sete espécies do velho mundo. As subfamílias Etroplinae (Ciclídeos de Málaga na Índia) e Pseudocrenilabrinae (Ciclídeos Africanos) são grupos irmãos e formam um grupo irmão de todos os ciclídeos. Outra análise filogenética realizada na família Cichlidae, utilizando DNA mitocondrial, demonstrou que os ciclídeos neotropicais formam um grupo monofilético tendo como grupo basal Retroculus (Retroculinae). Além disso, demonstram portar significativamente níveis maiores de variação genética do que os africanos, apesar do menor número de espécies (Farias *et al.*,

2000). Acredita-se que os ciclídeos sul-americanos representem um grupo monofilético que migrou da África e a partir da América do Sul se espalharam pela América Central e do Norte (Murray, 2001).

Em se tratando do conhecimento do genoma das espécies de ciclídeos, os dados são poucos, e muito aquém do que já se conhece para o “pufferfish” (*Takifugu rubripes*) e o “zebrafish” (*Danio rerio*), os quais possuem a seqüência nucleotídica do seu genoma quase totalmente conhecida (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/zebrafish) (Aparício *et al.*, 2002). A maioria das informações existentes sobre genética da família Cichlidae está relacionada a análises da filogenia das espécies e estudos citogenéticos como a determinação do número diplóide. Este número diplóide está intimamente relacionado à distribuição geográfica das espécies, onde os ciclídeos africanos têm um número diplóide modal igual a 44 cromossomos e os da região Neotropical apresentam na sua maioria, 48 cromossomos (Feldberg *et al.*, 2003).

Apesar de ser a família mais estudada entre os Perciformes, somente, aproximadamente 135 espécies de ciclídeos foram analisadas citogeneticamente e foram encontrados números diplóides variando de 38 a 60 cromossomos. Não ocorre a presença de cromossomos sexuais, mas já foi relatada a existência de cromossomos Bs, ou supranumerários, para algumas espécies como, por exemplo, em *Crenicichla reticulata*, *Cichla monoculus* e *Cichla* sp. (Feldberg *et al.*, 2004).

1.4.1. O gênero *Cichla*

As espécies do gênero *Cichla* conhecidas popularmente como tucunaré, são piscívoras e têm sido utilizadas para peixamentos em barragens e açudes, por apresentar uma carne de excelente qualidade e também por serem animais de grande interesse econômico, principalmente para a aquariofilia. Foram introduzidas e encontram-se estabelecidas em diversas bacias hidrográficas brasileiras (Nascimento *et al.* 2001). A coloração apresenta-se extremamente variável nas espécies deste gênero, devido aparentemente a alterações ontogenéticas. O colorido brilhante dos indivíduos adultos está presumivelmente durante o período reprodutivo. Esta diversidade de coloração parece

causar grande dificuldade na identificação dos exemplares de *Cichla* (Kullander e Ferreira, 2006).

Este gênero foi primeiramente descrito por Schneider em 1801, baseado na descrição da espécie *Cichla ocellaris* e atualmente são conhecidas quinze espécies (Kullander e Ferreira, 2006) como apresentado na tabela abaixo:

Tabela 4- Espécies do gênero *Cichla* em ordem cronológica de descrição de acordo com Kullander e Ferreira (2006)

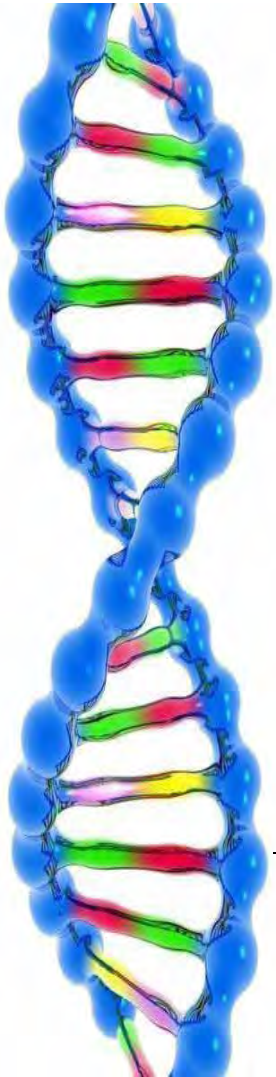
Espécie	Autor/ano
<i>Cichla ocellaris</i>	Schneider, 1801
<i>Cichla temensis</i>	Humboldt, 1821
<i>Cichla orinocensis</i>	Humboldt, 1821
<i>Cichla monoculus</i>	Agassiz, 1831
<i>Cichla nigromaculata</i>	Jardine, 1843
<i>Cichla intermédia</i>	Machado-Alisson, 1971
<i>Cichla kelberi</i>	Kullander e Ferreira, 2006
<i>Cichla pleiozona</i>	Kullander e Ferreira, 2006
<i>Cichla miriana</i>	Kullander e Ferreira, 2006
<i>Cichla melania</i>	Kullander e Ferreira, 2006
<i>Cichla piquiti</i>	Kullander e Ferreira, 2006
<i>Cichla thyrorus</i>	Kullander e Ferreira, 2006
<i>Cichla jariina</i>	Kullander e Ferreira, 2006
<i>Cichla pinima</i>	Kullander e Ferreira, 2006
<i>Cichla vazzoleri</i>	Kullander e Ferreira, 2006

Representantes do gênero *Cichla* são facilmente distinguidos de todos os outros ciclídeos sul-americanos pela forma da nadadeira dorsal: até o quinto espinho, há um aumento do tamanho destes, depois se observa um gradual decréscimo até o penúltimo espinho, sendo que o último é novamente longo e rigidamente ligado à porção mais mole da nadadeira, a qual é alta como a porção espinhosa anterior. Apresentam boca larga, com mandíbula e maxila proeminentes. Barras verticais escuras estão presentes em todas as

espécies de *Cichla*, constituindo-se de 1 a 4. A mandíbula é prognata e bem exposta. Um proeminente ocelo pode ser visualizado na base da nadadeira caudal (Kullander e Ferreira, 2006).

Cichla kelberi foi descrita recentemente e distingui-se das outras espécies mais semelhantes (*C. monoculus* e *C. pleiozona*) pela presença, nos adultos, de pequenas manchas claras na nadadeira anal e peitoral, e no lobo inferior da nadadeira caudal. Apresenta três barras verticais escuras nos flancos, uma barra occipital pronunciada nos indivíduos de maior porte e manchas escuras irregulares na região anterior do abdome. Possui de 76 a 83 escamas na fileira acima daquela que contém a linha lateral (fileira E1), sendo o número de escamas na E1 maior que em *C. monoculus* e menor que *C. pleiozona*. A distribuição geográfica da espécie são as bacias do rio Araguaia e baixo Tocantins e atualmente, em reservatórios do Rio Grande do Norte, Ceará, Minas Gerais e no rio Paraná, devido às translocações realizadas. Essa espécie, até então, era conhecida e confundida com *Cichla monoculus* (Kullander e Ferreira, 2006).

Apesar da importância do gênero *Cichla*, estudos que contemplem aspectos genéticos sobre os tucunares ainda são escassos. Dados disponíveis para o gênero tratam de estudos citogenéticos apenas para *Cichla monoculus* e *C. temensis* da região amazônica (Brinn et al., 2004). Dessa forma, avanços nos estudos genômicos utilizando ferramentas cromossômicas e de análise de DNA no gênero *Cichla*, se fazem necessários. Este tipo de análise mostra-se promissora para uma melhor compreensão dos mecanismos de evolução genômica e rearranjos cromossômicos que estiveram envolvidos durante a diversificação e história evolutiva das espécies do gênero *Cichla*.



Objetivos

2. OBJETIVOS

Devido à relevante importância de espécies de ciclídeos sul-americanos, como as espécies do gênero *Cichla*, o qual possui grande valor para a pesca e ecologia, um melhor conhecimento do genoma destas espécies mostra-se extremamente necessário. Dessa forma este trabalho teve por objetivos:

- Isolamento e a caracterização de seqüências repetidas de DNA e seu mapeamento nos cromossomos de espécies do gênero *Cichla*.



Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

Os exemplares de *Cichla kelberi* (Figura 3) (8 machos e 5 indivíduos) utilizados no presente estudo foram coletados no rio das Mortes, lagoa das Abelhas e lago Morto, na cidade de São Félix do Araguaia-MT, sendo amostrado também no rio Tietê (Barragem de Bariri, São Paulo).

A partir do material coletado foram preparadas suspensões celulares para análises de cromossomos mitóticos sendo também retiradas amostras de tecido (fígado, músculo, nadadeiras) fixadas e estocadas em álcool 100% a -20 °C, para posterior extração de DNA.

Os exemplares foram fixados em formol 4% e conservados em álcool 70% e posteriormente depositados na coleção do Laboratório de Biologia de Peixes do Departamento de Morfologia/UNESP/Botucatu com o seguinte número: 3292.

A identificação dos exemplares foi feita com base no trabalho de Kullander e Ferreira (2006).



Figura 3: Exemplar de *Cichla kelberi*.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Extração de DNA de tecidos

Esta técnica foi descrita por (Sambrook e Russel, 2001) e fundamentalmente envolve a purificação do DNA pela ação combinada de detergentes, proteinase K e RNase, lavagem com fenol/clorofórmio e posterior precipitação pelo cloreto de sódio e etanol, conforme descrito a seguir:

- a) Fragmentar os pedaços de fígado, brânquias e músculos (fixados em etanol) em cadinhos com N₂ líquido;
- b) Adicionar ao tecido 3,98 ml de solução digestão (NaCl 0,1M; Tris-HCL 0,01 M pH=8,0; EDTA 0,025M pH=8,0; SDS 0,5%; RNase 100 µg/ml; H₂O q.s.p.);
- c) Transferir o tecido macerado com 3,98 ml de solução de digestão para tubo Falcon de 15 ml;
- d) Colocar em banho-maria a 50 °C por meia hora. Passado esse tempo, cada tubo Falcon recebe 20 µL de proteinase K 100 µg/ml, permanecendo por mais duas horas no banho a essa temperatura;
- e) Retirar os tubos do banho-maria e adicionar 4 ml de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (50:48:2);
- f) Agitar os tubos (bem fechados) suavemente por cerca de 15 minutos, até misturar bem os componentes;
- g) Centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm;
- h) Transferir a camada superior do tubo (DNA) para tubos novos, tomando cuidado para não pegar a camada de proteínas;
- i) Acrescentar 0,2 volumes de NaCl 1M de acordo com o volume obtido no item anterior + 2 volumes de etanol 100% gelado e movimentar suavemente o tubo para precipitar o DNA;
- j) Centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm;
- k) Descartar o sobrenadante, acrescentar cerca de 4 ml de etanol 70% gelado e centrifugar como no item anterior;
- l) Descartar o sobrenadante e levar o tubo para a estufa a 37 °C por até 30 minutos. Deixar *overnight* até secar o DNA;
- m) Adicionar até 1 ml de água Milli-Q autoclavada. Deixar na bancada ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação.

3.2.2. Visualização e quantificação do DNA em gel de agarose

A integridade do DNA foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1% de acordo com a metodologia descrita por Sambrook & Russel (2001), como a seguir:

- a) Montar a placa de eletroforese;
- b) Diluir a agarose (Ultra Pure™ Agarose - Invitrogen Life Technologies) em um volume apropriado de tampão TAE 1x (Tris-ácido acético-EDTA) para que o gel fique em uma concentração de 1%;
- c) Aquecer a solução até que esta fique translúcida;
- d) Deixar a solução esfriar um pouco e aplicar no suporte da cuba de eletroforese horizontal; ajustar o pente na cuba e deixar a solução de agarose polimerizar; preencher a cuba de eletroforese com tampão TAE 1x;
- e) Preparar o DNA a ser aplicado utilizando 2 µL de tampão LB e realizar a aplicação no gel;
- f) Aplicar DNA marcador de peso molecular conhecido (1Kb Plus DNA Ladder) e submeter a eletroforese a 110V/150 mA por 1 hora;
- g) Corar o gel em solução de brometo de etídeo (10 mg/ml) diluída a 0.1% em tampão TAE 1x;
- h) Realizar a observação do gel em transiluminador (Hoefler UV-25), sob luz ultravioleta, e posteriormente a foto-documentação através do programa EDAS (*Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 - Kodak Digital Science ID*);
- i) Os pesos moleculares das amostras foram estimados através da comparação com o marcador.

3.2.3. Isolamento de seqüências repetidas por digestão enzimática

• Digestão com enzimas de restrição

O DNA genômico extraído de *Cichla kelberi* foi submetido a restrição enzimática com o intuito de serem identificadas bandas em gel de agarose contendo fragmentos repetidos de DNA. Para tanto, foram testadas 12 enzimas de restrição, sendo elas: *AfaI*, *AluI*, *BcII*, *BglII*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HaeIII*, *MspI*, *SspI*, *XbaI*.

O procedimento consistiu em:

- a) Colocar em um tubo estéril de 1,5 ml, para cada enzima de restrição, 30 µL de DNA genômico (100 ng/µL); 30U da enzima a ser utilizada; 10 µL de tampão de digestão e completar com água milli-Q para um volume final de 100 µL;
- b) Digerir *overnight* em banho-maria a 37 °C;

- c) Para precipitação e purificação do DNA digerido, acrescentar 2 μL de NaCl 5M gelado e 2 volumes de etanol (100%) gelado, agitar levemente e colocar em freezer a 76°C negativos por 1 hora;
- d) Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C ;
- e) Descartar o sobrenadante e acrescentar 300 μL de etanol 70% gelado;
- f) Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C ;
- g) Descartar o sobrenadante, deixar secar a temperatura de 37°C por aproximadamente 15 minutos e ressuspender em seguida em 12 μL de água milli-Q estéril;
- h) Aplicar o DNA digerido em gel de agarose 1% e submetê-lo a 50V/100 mA por 4 horas;
- i) Aplicar um marcador de peso molecular conhecido (1Kb Plus DNA Ladder), para posterior comparação.

3.2.4. Purificação dos fragmentos de DNA presente em gel de agarose

Para a purificação do fragmento de DNA produzido pela restrição enzimática, foi utilizado o kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo as especificações do fabricante:

- a) Pesar um tubo de 1.5 ml vazio e anotar o peso;
- b) Cortar a banda de interesse do gel de agarose, corado com brometo de etídeo (10 mg/ml) sob transiluminador ultravioleta, e colocá-la no tubo;
- c) Cortar o pedaço de gel em vários pedaços menores, utilizando uma tesoura ou uma pinça;
- d) Pesar novamente o tubo e calcular o peso do fragmento de agarose;
- e) Adicionar 10 μL de “Capture Buffer” para cada 10 mg de gel e misturar em vórtex;
- f) Incubar a 60°C em banho-maria até que a agarose dissolva (5-15 minutos);
- g) Centrifugar brevemente o tubo e coletar, com uma micropipeta, a amostra de agarose dissolvida;
- h) Transferir a amostra para uma coluna GFX colocada em um tubo coletor e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
- i) Centrifugar o tubo coletor com a coluna GFX a 10.000 rpm por 30 segundos;
- j) Descartar o líquido do tubo coletor e colocar a coluna GFX novamente no tubo coletor;
- k) Adicionar 500 μL de “Wash Buffer” (tampão de lavagem) à coluna GFX e centrifugar a 10.000 rpm por 30 segundos;
- l) Descartar o tubo coletor e transferir a coluna GFX para um novo tubo de 1.5 ml;
- m) Aplicar 50 μL de tampão de eluição TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0) diretamente sobre a fibra de vidro da coluna GFX;

- n) Incubar a amostra à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto para recuperar o DNA;
- o) Estocar o DNA purificado a -20 °C e estimar o produto final em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.2.5. Clonagem do DNA repetido

• Ligaç o com o vetor

Os fragmentos de DNA foram submetidos a clonagem sendo inseridos em vetores plasmidiais utilizando o kit pMOs *Blue* (Amershan Biosciences) seguindo as especifica es dos fabricantes, como a seguir:

- a) Preparar uma rea o de pK em tubo eppendorf com 2,5 µL de H₂O milli-Q, 1 µL do tamp o pK 10x, 0,5 µL de DDT 100 mM e 5 µL do produto a ser clonado;
- b) Incubar a 22 °C por 40 minutos;
- c) Aquecer a rea o a 75 °C por 10 minutos e colocar no gelo por 2 minutos;
- d) Acrescentar ao produto da rea o de pK 1 µL (50ng/µL) do vetor pBluescript II KS⁺ e 1 µL (4U) de DNA ligase;
- e) Incubar por um intervalo de 2 a 16 horas a 22 °C;
- f) Guardar em freezer a 20 °C negativos at  a transforma o em bact rias competentes.

• Transforma o de bact rias competentes *Escherichia coli* DH5a com os vetores plasmidiais recombinantes

- a) Colocar 50 µL de bact rias competentes (acondicionadas a -70 °C) em um tubo de 1.5 ml;
- b) Adicionar 4 µL da rea o de liga o (inserto-plasm deo), misturando cuidadosamente com uma micropipeta;
- c) Manter o tubo em gelo por 30 minutos;
- d) Aplicar um choque t rmico, aquecendo o tubo a 37 °C em banho-maria por exatamente 45 segundos;
- e) Colocar o tubo imediatamente no gelo e manter por 2 minutos;
- f) Adicionar 950 µL de meio LB l quido (peptona 1 %, NaCl 0,17 M, extrato de levedura 0,5 %, pH 7,5) a temperatura ambiente;
- g) Incubar a 37 °C por 1 hora, sob agita o a 225 rpm;
- h) Centrifugar por 5 segundos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;

- i) Espalhar o produto de transformação em placas de Petri estéreis com meio LB sólido (peptona 1 %, NaCl 0,17 M, extrato de levedura 0,5 %, ágar 1,5 %, pH 7,5), contendo 2 μ L de ampicilina (50 mg/ml) por mililitro de meio LB e 50 μ L de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-(D-galactoside) (50 mg/ml), para posterior seleção dos clones recombinantes (colônias brancas);
- j) Incubar as placas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37 °C durante 12-16 horas.

3.2.6. Amplificação por PCR do fragmento clonado

Os vetores foram submetidos a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para confirmar a presença do inserto, sendo utilizados os seguintes *primers*:

Primer	Seqüência nucleotídica
<i>M13F</i>	5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'
<i>M13R</i>	5' AGCGGATAACAATTCACACAGG 3'

Procedimento:

- a) Em um tubo estéril de 0,5 ml mantido no gelo, preparar a solução colocada na tabela abaixo de acordo com o número de reações desejado:

Água Milli-Q	16,75 μ L
dNTP (8mM)	1,25 μ L
Tampão 10X	2,5 μ L
<i>Primer M13F</i> (10 μ M)	1,25 μ L
<i>Primer M13R</i> (10 μ M)	1,25 μ L
MgCl ₂ (50mM)	0,75 μ L
<i>Taq polimerase</i> (5U/ μ L)	0,25 μ L
Volume total	24 μ L

- b) Colocar 24 μ L da solução preparada em um tubo estéril mantido no gelo de acordo com a tabela da alínea a;
- c) Adicionar 1 μ L do meio de cultura de cada amostra contendo a bactéria recombinante;
- d) Colocar os tubos no termociclador e executar o programa de amplificação, como apresentado abaixo:

Passos	Tempo/ T
1- Denaturação inicial do DNA	3'/95 °C
2- Denaturação do DNA	1'/95 °C
3- Anelamento dos <i>primers</i>	1'/50 °C
4- Extensão do DNA pela enzima <i>Taq polimerase</i>	2'/72 °C
5- Repetição dos passos de 2 a 4	35 vezes
6- Extensão final do DNA	2'/72 °C
7- Final	∞/4 °C

': minutos; ∞: por tempo indeterminado

- e) Alíquotas (três microlitros) do produto de PCR dos clones foram carregadas em gel de agarose 1% e posteriormente submetidas à eletroforese por uma hora a 120 volts.

3.2.7. Mini-preparações para a purificação de plasmídeos recombinantes (*Kit Wizard Plus Minipreps DNA Purification System- Promega*)

Os clones de DNA obtidos a partir da transformação e posteriormente amplificados pela PCR foram purificados por mini-preparações, através da técnica lise alcalina (Sambrook *et al.* 1989), como descrita a seguir:

- Colocar 1,5 ml do meio de cultura contendo as bactérias recombinantes em um eppendorf;
- Centrifugar a 10.000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente para que as bactérias fiquem no fundo do tubo. Retirar o sobrenadante;
- Ressuspender o material com 200 µL da solução de ressuspensão de células;
- Adicionar 200 µL de solução de lise celular e inverter os tubos 4 vezes;
- Acrescentar 200 µL de solução de neutralização aos tubos e inverter os tubos novamente por mais 4 vezes;
- Centrifugar o lisado a 10.000 rpm por 5 minutos em uma microcentrífuga;
- Para cada miniprep preparar uma minicoluna Wizard. Remover o plunger (parte de baixo rosqueável) e encaixar a minicoluna;
- Pipetar 1 ml de resina de purificação na seringa;
- Vagarosamente filtrar a mistura em minicoluna;
- Adicionar 2 ml de solução de lavagem (column wash solution) à seringa e empurrar a solução através da minicoluna;
- Transferir a minicoluna para um tubo de 1,5 ml e centrifugar a 10.000 rpm por 2 minutos;

- l) Transferir a minicoluna para outro tubo. Adicionar 40 μL de água para a minicoluna;
 m) Aguardar 1 minuto de incubação em temperatura ambiente;
 n) Centrifugar a 10.000 rpm por 20 segundos. Remover e descartar a minicoluna;
 o) Guardar o eppendorf definitivo.

3.2.8. Seqüenciamento

As amostras de DNA purificadas foram utilizadas em reações de seqüenciamento através do kit *DYEnamicTM Terminator Cycle Sequencing* (Amershan Bioscience). O protocolo consiste em:

Reação de Seqüenciamento

- a) Em um eppendorf mantido no gelo, para cada amostra a ser seqüenciada preparar a solução de seqüenciamento contendo:

Pré-Mix (Kit)	2 μL
<i>Primer F e R</i>	2 μL
DNA	Até 5 μL
Água Milli-Q	X μL
Volume total	9 μL

- b) Para desenvolver a reação de seqüenciamento foi utilizado o programa denominado M13Seq que consiste em:

Passos	Tempo/ °T
1- Ciclo inicial	2'/96 °C
2- 35 ciclos	45"/96 °C
	30"/ 50 °C
	4'/ 60 °C
	∞ / 4 °C

': minutos; ": segundo; ∞ : por tempo indeterminado

Remoção dos nucleotídeos não incorporados

Após a reação de amplificação (PCR) para seqüenciamento do DNA dos clones, realizou-se a limpeza dos produtos amplificados para retirada de dideoxinucleotídeos não incorporados, como descrito a seguir:

- a) Adicionar 1 μ L de acetato de sódio 1,5M/ EDTA 250 MM e 80 μ L de etanol 95% gelado em cada microtubo contendo o produto de seqüenciamento;
- b) Misturar no vórtex rapidamente e centrifugar a 4 °C por 30 minutos a 14.000 rpm. Remover o sobrenadante cuidadosamente por aspiração;
- c) Adicionar 400 μ L de etanol 70% gelado e, em seguida centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm;
- d) Descartar cuidadosamente o sobrenadante por aspiração, manter o material protegido da luz e secá-lo por cerca de 1 hora na estufa a 37 °C. O *pellet* seco pode ficar guardado por até 2 meses a 4 °C protegido da luz.

Limpeza e montagem das placas

As amostras amplificadas e purificadas foram analisadas em um seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer) de acordo com os procedimentos a seguir:

- a) Lavar as placas com detergente Extran 1%, enxaguar bem (aproximadamente 10 minutos) com água da torneira quente e, em seguida, enxaguar com 2,0 L de água Milli-Q a 85 °C. Colocar em suporte adequado para secagem;
- b) Colocar o cassete de montagem da placa sobre a bancada e sobre este a placa anterior. Sobre as bordas da placa anterior, colocar os espaçadores e, em seguida colocar a placa posterior. As anotações em relevo na placa devem ficar voltadas para fora;
- c) Alinhar as placas e deslizá-las até o encaixe de recorte da placa anterior com o pino existente na extremidade do cassete;
- d) Fechar as presilhas e colocar o adaptador onde será encaixada a seringa com gel de poliacrilamida.

Preparação e aplicação do gel de poliacrilamida

- a) Preparar o gel de poliacrilamida (5% Long Ranger, 6M Uréia, 1X TBE) como segue:

Uréia	18 g
Água Milli-Q	25 ml
Long Ranger 50%	5 ml
TBE 10X	5 ml
Persufato de amônio	250 μ L
TEMED	35 μ L

- b) Misturar os quatro primeiros reagentes e filtrar em membrana com poros de $\leq 0,45\mu\text{m}$. Adicionar o persufato e o TEMED no momento da aplicação do gel nas placas;
- c) Misturar suavemente a solução e, em seguida, transferir o gel para uma seringa de 50 ml, que deve ser imediatamente acoplada ao local de aplicação do gel para preenchimento das placas anteriormente preparadas;
- d) Aplicar o gel nas placas e, em seguida colocar o pente invertido no local apropriado entre as placas (lado oposto ao da aplicação);
- e) Esperar no mínimo 1 hora e 30 minutos para total polimerização;
- f) Remover o pente e lavar as placas sem retirá-las do cassete. As placas deverão estar completamente limpas, sem restos de poliacrilamida ou fragmentos de papéis utilizados para limpeza e secagem.

Preparação do Seqüenciador (aplicação das amostras e corrida)

- a) Preparar 1,5 L de TBE 1X para encher as cubas anódica e catódica;
- b) Colocar a cuba de cor âmbar na parte de baixo do seqüenciador, encaixar o cassete com as placas no seqüenciador e fechar as presilhas;
- c) Fechar a porta do seqüenciador e fazer um *Plate check* das placas para verificar se elas estão limpas;
- d) Encher as cubas com o tampão TBE 1X. Não se deve ultrapassar os limites marcados como máximo;
- e) Iniciar a pré-corrída para estabilização do meio e para atingir a temperatura de 51°C ;
- f) Durante a pré-corrída ressuspender as amostras em $4,0\ \mu\text{L}$ de tampão carregamento (Formamida: Blue dextran - 5:2). Passar os tubos pelo vórtex e denaturar as amostras por 5 minutos a 95°C . Colocá-las imediatamente no gelo após a denaturação;

-
- g) Após 10 minutos de corrida, aplicar de 40 μL de tampão de carregamento no gel. Fechar a porta e deixar correr por dois minutos. Abrir a porta e retirar o excesso de corante com a seringa cheia de tampão de corrida;
 - h) Colocar o pente de modo que toque todo o gel ao mesmo tempo, deslizando-o de forma que não se incline. Introduzi-lo apenas 2 mm no gel. Depois de introduzido não se pode ser removido, pois ocasionará vazamento das amostras;
 - i) Aplicar 0,8 μL de amostra nos pocinhos ímpares;
 - j) Fechar a porta do seqüenciador e esperar 5 minutos e aplicar o restante das amostras nos pocinhos pares, evitando assim a mistura das amostras;
 - k) Cancelar a pré-corrida;
 - l) Verificar o número de linhas, o tamanho da placa, a matriz adequada, o número de horas de corrida e importar a lista de amostras;
 - m) Iniciar a corrida;
 - n) Após o término da corrida (7 horas), posicionar as linhas sobre as amostras que aparecem na imagem do gel.

3.2.9. Isolamento de seqüências repetidas pela técnica de PCR

3.2.9.1. Amplificação dos retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*

Para obtenção de seqüências dos retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, foi utilizado o método de PCR, usando para tanto os respectivos *primers* *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, como mostra a tabela abaixo.

Tabela 5- Seqüências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos dos retrotransposons

Primers	Seqüências nucleotídicas	Referência
<i>Rex1</i>	RTX1-F1 5' TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC	Volf <i>et al.</i> 1999, 2000, 2001b
	RTX1-R3 5' TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC	
<i>Rex3</i>	RTX3-F3 5' CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG	Volf <i>et al.</i> 1999, 2000, 2001b
	RTX3-R3 5' TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT)	
<i>Rex6</i>	Rex6-Medf1 5' TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC	Volf <i>et al.</i> 2001a
	Rex6-Medr1 5' GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG	

Para amplificação dos retrotransposons foi utilizada a seguinte reação:

Água Milli-Q	19,15 µL
dNTPs (8Mm)	0,5 µL
Tampão 10X	2,5 µL
<i>Primer Forward</i> (10µM)	0,5 µL
<i>Primer Reverse</i> (10µM)	0,5 µL
MgCl ₂ (50Mm)	0,75 µL
<i>Taq polimerase</i> (5U/µL)	0,1 µL
DNA concentração	1,0 µL *
Volume total	25,0 µL

* Quantidade variável devido à concentração do DNA

Para a realização da reação foi utilizado o termociclador com a utilização do programa abaixo:

Passos	Tempo/ °T
1- Denaturação inicial do DNA	5'/95 °C
2- Denaturação do DNA	40"/95 °C
3- Anelamento dos <i>primers</i>	40"/55 °C
4- Extensão do DNA pela enzima <i>Taq polimerase</i>	2'/72 °C
5- Repetição dos passos 2 a 4	34 vezes
6- Extensão do DNA	5'/72 °C
7- Final	∞/4 °C

': minutos; ": segundo; ∞: por tempo indeterminado

Alíquotas (três microlitros) do produto de PCR dos retrotransposons foram carregados em gel de agarose 1%, posteriormente submetido à eletroforese por uma hora a 120 volts.

3.2.9.2. Amplificação do Transposon *Tc1*

Para obtenção de seqüências do transposon *Tc1*, também foi utilizado o método de PCR, usando para tanto o *primer Tc1*, como mostra a tabela abaixo:

Tabela 6- Seqüência do *primer* utilizado na amplificação dos fragmentos do transposon

Primer	Seqüência nucleotídica	Referência
<i>Tc1</i>	5' TAC AGT GCC TTG CAT AAG TAT TCA CC	Volff <i>et al.</i> ,1999,2000,2001b

Para amplificação do transposon *Tc1* foi utilizada a seguinte reação:

Água Milli-Q	14,0 µL
dNTP (8mM)	4,0 µL
Tampão 10X	2,5 µL
<i>Primer Tc1</i> (10µM)	1,5 µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5 µL
<i>Taq polimerase</i> (5U/µL)	0,5 µL
DNA concentração	1,0 µl *
Volume total	25,0 µL

* Quantidade variável devido à concentração do DNA

Para a realização da reação foi utilizado o termociclador com a utilização do programa abaixo:

Passos	Tempo/ °T
1- Denaturação inicial do DNA	5'/95 °C
2- Denaturação do DNA	1'/95 °C
3- Anelamento dos <i>primers</i>	1'/55 °C
4- Extensão do DNA pela enzima <i>Taq polimerase</i>	2'/68 °C
5- Repetição dos passos 2 a 4	30 vezes
6- Extensão do DNA	5'/68 °C
7- Final	∞/4 °C

': minutos; ∞: por tempo indeterminado

Alíquotas (três microlitros) do produto de PCR do transposon foram carregados em gel de agarose 1%, posteriormente submetido à eletroforese por uma hora a 120 volts.

3.2.10. Análise das seqüências

As seqüências nucleotídicas foram processadas retirando-se as regiões dos plasmídeos e foram submetidas a pesquisas em bancos de seqüências (DDJ, EMBL, GenBank), através do programa BLAST/N (*"Basic Local Alignment Search Tool"*) (Altschul *et al.*, 1990) para busca de seqüências nucleotídicas similares, através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA),

“website” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Posteriormente realizou-se as seqüências consensos no programa BioEdit (Hall, 1999). As seqüências dos clones foram alinhadas *online* utilizando-se o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), website <http://align.genome.jp/>. A composição dos clones foram examinadas com o auxílio do software BioEdit 7.0 (Hall, 1999). As seqüências obtidas dos retrotransposons foram analisadas através do programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia e Xie, 2001).

3.2.11. Obtenção dos cromossomos mitóticos através de preparações diretas

Os cromossomos mitóticos metafásicos foram obtidos de acordo com a metodologia adaptada para peixes por Bertollo *et al.* (1978), com alterações como descrita a seguir:

- a) Injetar intraperitonealmente colchicina 0,0025% na proporção de 0,1 ml para cada 100 g de peso do animal;
- b) Deixar o peixe em aquário bem aerado por 40 minutos. Em seguida sacrificá-lo e retirar a porção anterior do rim transferindo-a para uma solução hipotônica de KCl 0,075 M (6-8 ml);
- c) Divulsionar bem o tecido com o auxílio de uma seringa de vidro. Retirar o sobrenadante (suspensão celular) com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocar em tubo de centrifuga;
- d) Incubar a suspensão celular obtida em estufa a 37 °C por 23 minutos;
- e) Pré-fixar com 6 gotas de metanol: ácido acético (3:1) e ressuspender o material pipetando bem devagar por 100 vezes;
- f) Deixar descansar por 5 minutos, adicionar fixador até encher o tubo e ressuspender;
- g) Centrifugar por 10 minutos a 800 rpm. Desprezar o sobrenadante e completar para 6 ml com fixador pipetando por mais 100 vezes;
- h) Centrifugar por 10 minutos a 1.000 rpm, desprezar o sobrenadante e completar novamente para 6 ml de fixador, repetindo essa lavagem por mais duas vezes;
- i) Após a última lavagem, diluir o material acrescentando fixador, de forma que este apresente um aspecto um pouco turvo;
- j) Preparar as lâminas que deverão estar previamente aquecidas em banho-maria a 60 °C.

3.2.12. Hibridação *in situ* por fluorescência- FISH

As sondas dos retrotransposons *Rex1*, *Rex3*, *Rex6*, transposon *Tc1* obtidas através de PCR e *Tuc* obtida por digestão enzimática foram marcadas com biotina pela técnica de *nick translation*, segundo as instruções do fabricante (BioNickTM Labelling System- Invitrogen) e, posteriormente, procedeu-se à técnica de hibridação descrita por Pinkel *et al.*, 1986 com modificações apresentadas por Martins e Galetti, (2001).

Marcação das sondas

As sondas foram marcadas pelo método de nick translation utilizando o Kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen) como a seguir:

- a) Em um tubo eppendorf, mantido no gelo, preparar a solução descrita na tabela abaixo, para uma lâmina,

Mix dNTP 10x	1 μ L
DNA sonda (200ng// μ L)	1 μ L
Mix de enzima 10x	1 μ L
Água milli-Q	6 μ L
Volume total	9 μ L

- b) Misturar bem, centrifugar brevemente e incubar a 16 °C por duas horas;
- c) Adicionar 1 μ L de stop buffer, 1 μ L de acetato de sódio 3 M e 22 μ L de etanol 100% gelado;
- d) Misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer – 70 °C por 1 hora;
- e) Centrifugar por 15 minutos a 15.000 rpm a 4 °C;
- f) Descartar o sobrenadante e adicionar 50 μ L de etanol 70% gelado;
- g) Centrifugar por 5 minutos a 15.000 rpm a 4 °C;
- h) Descartar o sobrenadante com cuidado e deixar secar;
- i) Ressuspender em 16 μ L de água Milli-Q.

Tratamento das lâminas

As lâminas podem ser preparadas com os cromossomos com um dia de antecedência ou no momento do uso. Para cada lâmina:

- a) Colocar 100 μ L de RNase 40 μ g/mL (0,4 μ L de RNase 10 mg/mL e 99,6 μ L de 2xSSC) sobre a lamínula, aderir a lâmina sobre esta lamínula e deixar em câmara úmida (umidecida com 2xSSC) a 37 °C por 1 hora e 30 minutos;
- b) Lavar a lâmina duas vezes em 2xSSC durante 10 minutos cada;
- c) Desidratá-las em série alcoólica 70%, 85% e 100% gelado durante 10 minutos cada;

- d) Mergulhar a lâmina em formamida 70% em 2xSSC por 4 minutos a 70 °C (guardar a formamida para reutilizá-la no dia seguinte);
- e) Desidratar em série alcoólica 70%, 85% e 100% a – 20 °C por 5 minutos cada (este passo é muito importante, pois as lâminas devem ser passadas rapidamente da formamida para o álcool).
Deixar secar ao ar livre.

Solução de hibridação

Em um tubo eppendorf preparar a solução de hibridação, na proporção descrita abaixo:

Formamida (concentração final: 50%)	40 µL
Sulfato de dextrano (concentração final: 10%)	16 µL
20xSSC (concentração final: 2xSSC)	8 µL
Sonda biotinizada	16 µL
Volume total	80 µL

Submeter a solução de hibridação a denaturação da sonda a 95 °C por 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo.

Hibridação

Colocar 80 µL de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula. Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37 °C *overnight*.

Lavagens

Lavar em 2xSSC em temperatura ambiente apenas para tirar a lamínula e escorrer bem a lâmina sem deixar secar. Deste momento em diante as lâminas não podem secar:

- Lavar em formamida 50%/2XSSC por 15 minutos a 37 °C (utilizar a mesma solução do dia anterior – formamida 70% e transformá-la para 50%);
- Lavar em 2xSSC por 15 minutos a 37 °C por uma vez;
- Lavar em 2xSSC por 15 minutos à temperatura ambiente;
- Lavar em 4xSSC à temperatura ambiente (só para enxaguar).

Deteção e amplificação do sinal da sonda

- Sobre uma lamínula colocar 0,1µL de avidina-FITC 0,07% em 70 µL de tampão C (0,1 M de bicarbonato de sódio, pH 8,5 e 0,15 M de NaCl);

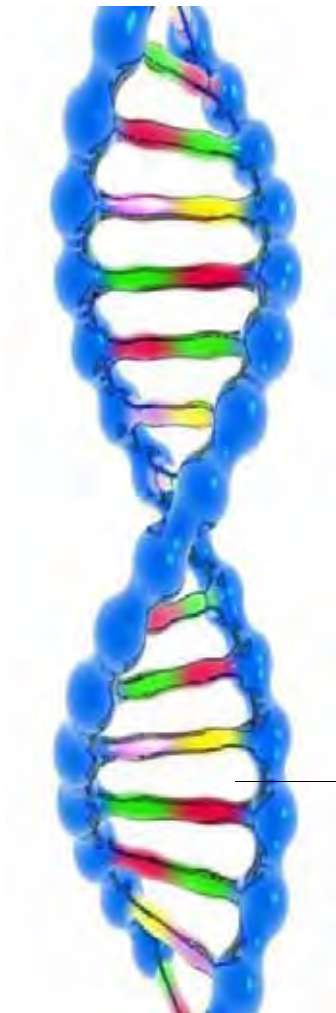
- b) Inverter a lâmina sobre esta lamínula e deixar por 1 hora em câmara úmida com 2xSSC a 37 °C;
- c) Após este tempo, lavar as lâminas 3 vezes por 5 minutos cada, com agitação, em tampão de bloqueio (NaHCO₃ 1.26% / citrato de sódio 0,018% / Triton 0,0386% em água destilada pH 8,0 e leite em pó desnatado 1%) recém-preparado a 42 °C. Escorrer a lâmina e secá-la por baixo;
- d) Sobre uma lamínula colocar 80 µL de anti-avidina biotina-conjugada 2,5% (2 µL de anti-avidina estoque em 78 µL de tampão de bloqueio), inverter a lâmina sobre a lamínula e deixar em câmara úmida com 2xSSC a 37 °C por 30 minutos;
- e) Novamente lavar em tampão de bloqueio três vezes por 5 minutos cada com agitação a 42 °C;
- f) Repetir os passos de (a) até (e);
- g) Aplicar novamente o FITC e fazer as lavagens como descrito no passo (e);
- h) Lavar em 4xSSC/Triton 2% duas vezes por 3 minutos cada com agitação;
- i) Lavar em 4xSSC/Triton 0,2% duas vezes por 3 minutos cada com agitação;
- j) Escorrer as lâminas e deixar secando ao ar.

Montagem das lâminas

Secar a lâmina e montar com iodeto de propídio na proporção de 20 µL de meio de montagem *antifading* com 0,7 µL de solução de iodeto de propídio a 50 µg/mL.

Processamento das imagens

Os cromossomos metafásicos mitóticos foram analisados em um fotomicroscópio de fluorescência Olympus BX 61. As imagens foram capturadas através de uma câmera digital (Olympus DP70) e do programa Image-Pro MC 6.0 e processadas através do programa Adobe Photoshop CS.



Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e caracterização de seqüências repetidas no genoma de *Cichla kelberi* por restrição enzimática

A extração de DNA a partir de tecidos fixados em álcool possibilitou obter DNAs de excelente qualidade para as amostras de tecidos analisadas.

Amostras de DNA genômico de *Cichla kelberi* foram submetidas ao processo de digestão enzimática e pôde-se observar a presença de uma banda de cerca de 650 pb visualizada por meio de eletroforese em gel de agarose, referente à amostra digerida pela enzima *XbaI* (Figura 4). Esta banda foi extraída do gel, purificada e inserida em vetor de clonagem por meio do kit *pMOs* e a construção recombinante resultante foi inserida em bactérias *Escherichia coli*.

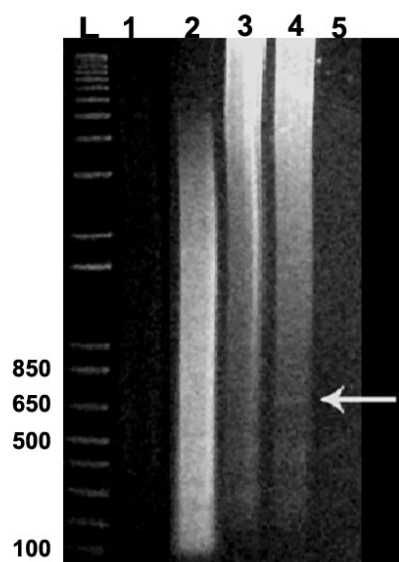


Figura 4: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o fragmento de restrição produzido pela digestão do DNA total de *Cichla kelberi* com a endonuclease *XbaI*. L- marcador de peso molecular em pares de bases. Amostras de 1 a 5 representam DNA genômico digerido com as enzimas *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, *XbaI* e *EcoRI*, respectivamente. A seta indica a banda produzida após a digestão com a *XbaI*.

A confirmação da presença de inserto nos plasmídeos recombinantes foi realizada através do método de PCR utilizando os *primers* *M13F* e *M13R*. O produto de PCR dos clones gerou fragmentos maiores e menores que 650 pb, como pode ser observado na figura 5. Os fragmentos maiores foram escolhidos, uma vez que os *primers* amplificam também pequenos segmentos dos plasmídeos que flanqueiam a região de inserção, demonstrando assim a presença do inserto.

Posteriormente, foram selecionados dez clones, sendo estes estocados em glicerol 25% e mantidos em freezer -70 °C.

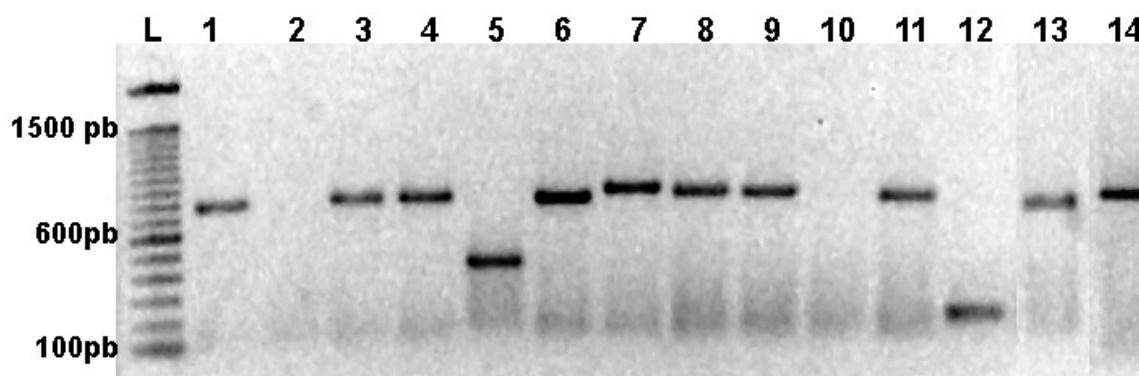


Figura 5: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando os produtos de PCR representativos de clones recombinantes obtidos a partir da banda de 650 pb produzida pela digestão com a enzima *XbaI*. L- marcador de peso molecular em pares de bases (marcador 1kb plus-Invitrogen). As amostras 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13 e 14 representam os clones positivos candidatos a conter o fragmento de DNA produto da digestão com a *XbaI*.

Os clones recombinantes de *Cichla kelberi* recuperados foram denominados TucXba1, TucXba3, TucXba4, TucXba6, TucXba7, TucXba9, TucXba11, TucXba13, TucXba14 e TucXba15 e submetidos a reações de seqüenciamento. Foram obtidas seqüências para oito clones como observado na figura 6.

TucXba-1

TCTATAAGAGCTGGACAGGGTTGTAAGGTCCTTAACCCATCACCAGGACTGGTAGGAG
 CCCTACAAAAATCTCCAACAGGTCCTGGTGTGAATGTCTCTGAACAAACGATCAGAA
 ACAGACTTCTTGAGGGTGGCCCTGAGGGCCAGACGTCCTCTAGCTCTGTGCTCACTGCCCCA
 GCACCATGGAGCCTGATTGGCATTGGCCATAGAATACCAGAATTGGCAGGTCCACCCTG
 GTGCCCTGTGCTTTTACAGATGAGAGCAGGTTCCACCTGAGCACATGTGATAGACGTGA
 AAGGGTCGGGAGAAGCCGTGGAGAACATTATGCCTGTAACAATGTTTCAGCATGACTGGTT
 TGGTGGTGGGTCAGTGTGATGGTCTGGGGAGGCATATCCATGGAGGGACGCACAGACCTTA
 CAGGGCAAGGCAGCGCCACCTGACTGCCTTTAGGTATCGCAATGAAATCCTTGGACCCA
 TTGTGAGACCCCTGCACTGGTGCAGTGGGTCTGGGTTCTCTGTTTCCAGCAATACCC
 AGCCTCATGTGTTGAGAGTATGCAGGCAGTTTCTAGATCCATATGACTAGTA

TucXba-3

GGAGCTCGGTACCCGGGGTCCCGATTCTAGAATACATCAGGCAAGGATGCTTTTTATTG
 CCTTTTCTCTTAATAAACTCCAGAGCAGCAACAATAAAGAGGAACCGCAGCTGGAA
 AGGTAATCATGTTTATCAGGCTAAATGAGTTTCTAAATATTAATATAACCATTATAGA
 TATTTCTATTATAGGCAGTAAAGATGAATAACATTAAGCTGACCTGTTTATGCAACAAAT
 GTTCTTATACATGAGAGTGTGTGATATTTAGTGTGAATAAATCTGCCGCTTACCTAG
 TAACGACTGCAGATGTGGAAGTGAAGCAGCAATAGTTGGTTTGTGCTGCGACAGATTGG
 CAGCCTGTCCAGGGTGCAGCTGAGATAGCCTCCAGTTTTCATGGAGTTCAAATTAAGAAA
 ATGTTTATATAGTTACTAATGTGTCTGATGAGACACACCTTGTGCATAAGGTCTCACTT
 TCACAGTGCATGCCGAAAGAAAATATTCCTTCACTATTTTGAAGTCACTAGTAAAC
 TGTGGTACTGTGCCATTAATGAAATCAATTTAAAGAAATTTTCCAGGGCACGGTAGCCT
 CAGTAACGTGATCCATATGACTAGTA

TucXba-4

CTCGGTACCGGGATCCGATCTAGATACATCAGGCAAGGATGCTTTTTATTGCCTTTTCT
 CTTTATAAACTCCAGAGCAGCAACAATAAAGAGGAACCGCAGCTGGAAAGGTAATC
 ATGTTTATCAGGCTAAATGAGTTTCTAAATATTTAATATAACCATTATAGATATTTCTA
 TTATAGCCAGTAAAGATGAATAACATTAAGCTGACCTGTTTATGCAACAAATTTCTTAT
 ACCATTGAGAGTGTGTGATATTTAGTGTGAATAAATCTGCCGCTTACCTAGTAACTGA
 CTGCAGATGTGGAAGTGAAGCAGCAATAGTTGGTTTGTGCTGCGACAGATTGGGCAGCCT
 GTCCAGGGTGCAGTGAAGATAGCCTCCAGTTTTCATGGAGTTCAAATTAAGAAAATGTT
 TATATAGTTACTAATGTGTCTGATGAGACACACCTTGTGCATAAGGTCTCACTTTTACA
 GTGCATGCCGAAAGAAAATATTCCTTCACTAATTTTGAAGTCACTAGTAAACTGT
 GGTGGACTGGYGGCCATTAATGAAATCAATTTAACAATTTTACCAGGGCCACGGGTA
 GCCCTCAGTTAACTGGGTGATCCAAAATATGATTAGTAAGATCCATAAAGTGCAGTTGC
 AGGCATGCAAGCCTTCCCTTAATGGTCTAGTGCAGTTGGGCGCAATCACGGTAAGGC
 GTTAAACG

TucXba-6

GTCCCTAGCCCCATCAGCAGGACTGGTTAGGAGCCTTACAAAATATTCTCCAACAGGTC
 ACTGGTGTGAATGTCTCTGAACAAACGATCAGAAACAGATTCTTGAGGGTGGCCCTGAGG
 GGCCAGAGCTCCTCTGCTCTGTCTCAACTGCCAGCACCATGGAGCCTGATTGGCATT
 TGCCATAGAATACCAGAATTGGCAGGTCCACCCTGGTGCCTGTGCTTTTACAGATGA
 GAGCAGGTTCCACCTGAGCACATGTGATAGACTGAAAGGGTCGGGAGAAGCCGTGGAGA
 ACATTATGCCTGTAACAATGTTTCAGCATGACTGGTTTGGTGGTGGGTCAGTGTGTTCTG
 GGGAGGCATATCCATGGAGGGACGCACAGACCTTACAGGGCAAGGCAGCGGGCACCTG
 ACTGCCCTTAGGTATCGCAATGAAATCCTTGGACCCATTGTGAGAACCTGCACCTGGTGA
 GTGGGTCTGGGGTTCCCTCCCTGGTTTACGACAATACCAGCCTCATGTGTTGAGAGTAT
 GCAGGCAGTTTCTAAGATCCATTATGAACAGTTAGAATCCCTAGAAGTGCAGCCTTGCA
 AAGCATGCAAGCCTTCCCTAATTAGTGGAGTGGGA

TucXba-7

ATTGANCTCGGTACCGGGAAATCCGATCTAGAGAGGCAACCGTCGATGCAGAAAGGTAGC
 TACAGGTTGTAGAGCAGCATGTGCTCCCATCCCATCTTTTTCAGGGGAGGCTTTGCCCT
 ATTTTAGCAAGGCGATGCTAAACTGCATACTGTAAATATTAACAGCAGCATGACTTCTTAA
 TAGAAGAGTCCCGGTGCTAAACTGGTCTGCCTGCAGTCTGACCTTTCCACCACTGAAAA
 AAATGTGCACATCATGAAGTGGAAAAATACAACAAGAAAGACCCAGGACTGTTGAGCAACT
 AGAATCCTCTATAGACAAGAAAGGACAACATTCCTCTCCAAAATCCAGCAACTTGC
 CTCCTCAGCTCCCAGAGTGTCTTAAAAAAGAGGGGATGCTACACAGTAGTGATCATGG
 CCTGTGCCAACTGTTTGGAGATGTGTGCTGCATTTAAATFCAAAATGAGCTAATATTT
 TTCTTAAACGGTACATTTTCCAGTTAAATATCTGATTTGTTTCTGTGTTCTATTTGT
 AAATAAATATGGAATTCATGAAGATGCAAAATCATTCATTCGTTTAAATTTACACTATA
 CACTGTGCCGAGCTTTTTCAGAATTGGGGTTTGTAAATCCACTGTGGTGGTGCACAGA
 GGANCCATATGACTAGTAG

TucXba-9

AATCCGATTATACACATTAGCACTACAATTAATCCAGACAACCTTAAAAAGAAAGGATAT
 CAAAGGCTGGGGAAAAATAACAGTGCAGCTGATATGAAATGTTTGAGATTAAATATAAT
 TTGTGACACCAAAAACAACCGGTTTTTCTGGGAACAAAAGCTCAGAGTGAGTAAGGGACT
 AGAGAAAGCACATCCCTCTTGACAAGGTCTAAAGGCCAGCACCTGTTTACACTAGAGGGC
 TCTTTGCTGACATAGTTTAGGTTATCGCTTAAAAGGAGACCAGTTAGTTTCCATTACCAT
 GGACCACAAAAGGGATAGTTAGGAAAAGGTGATAGAAAGCATAAGCCAATGCATATAC
 CAAATCTTTGGAGAGGAGACGAGAGGAGTGGAGTGGAGCGGAGAGGAGAGGAGAGGCC
 ACTTAAGAGTACCAAAAATAAGGTTGCCAGTCCATGTCTTTTAGTCAGCCACTCACCCA
 ATAATAAGCCAAGACAGCACAGGCCAAGGCCAACTGACACAAAAGAAATTCGAGATTA
 CCACGAGACTAACAAATCTGTTAAAATGGGGTTTTCAACAAAGTCAGCCTCAGTTACTT
 TCAAATTATCAGCGATTCTCGATTTCATAANGASTAGTAGAG

TucXba-11

TAAAAGCTGGACAGGGTTGTAAAAGGTCCTTAACCCAATCAAGCAGGACTGGTAGGATGC
 TCTACAAAATTAATCCCAACAGGTCAGTGGTGTGAATGTCTCTGAACAAACGATCAGAA
 ACAGACTTCTTGAGGGTGGCCTGAGGGCCAGACGTCTCTAGCTCTGTGCTCACTGCCCA
 GCACCATGGAGCCTGATTGGCATTGGCCATAGAATACCAGAATTGGCAGGTCACCACTG
 GTGCCCTGTGCTTTTACAGATGAGAGCAGGTTACCCCTGAGCACATGTGATAGACGTGA
 AAGGGTCGGGAGAACCCGTGGAGAACATTTATGCCTGTAACAATGTTTACGATGACTGGGT
 TTGGTGGTGGGTCAGTGAATGGTCTGGGGAGGCATATCCATGGAGGGACGCACAGACCTC
 TACAGGGCAAGGCAGCGGCACCCCTGACTGCCTTTAGGTATCGCAATTGAAATCCTTGGAC
 CCATTGGTGAACCCCTCACAGGTGCAGTTGCACCTGGGTTCTGGGGTTCCCGACCTT
 GGGCTGCCTGATGATTAACCAATCCAGCCAGTGTTTTAGATACATATTAAGTAAG
 ATCCTCTACAGTCCGACCTGCAAGCATTCAAGCTTACCCAATAGTGAGCCGTATCAGAGC
 TTGGAATAATCATTTCAGCAGTATTTGAACTTA

TucXba-15

ATCAGAGCTCGGTACCGGGGATCCGATCACACCTTCAGCGTTCGAGTGGAGTCCATGCCTT
 GATGGGTCAGGGCTGTTTTGCCAGCAAAAAGGGGGACCAACACAATATTAGGCAGGTGG
 TCATAATGTTATGACAATTCGGTATATATACACTTTGCATGACATTTTTGAAGAAGTCAT
 ATCAGCTGAGTCATTGCTACTGTGCAACAGTGAATTTTTGGTGAGTTTGTGTGTC
 AGAGTCAGAGAGCCGTGCTCTCTGCAAGTTCAGAGGTTTTGTACGGCGGCTCAATGAGTT
 TGTACTCTGTGGTACACGTTTTGGTGGAGGAACCAGACTGGATGTTGGAAGTAAGTCACA
 GTTAAAATAATTTATTTAGTATTTGTCTCTTAACGTTTTACTTGTCTGCTGGGAAT
 AGCAAGAAAAATAATATACTTTTTGTAAAATAAAATTAAGAAATTTACTGTATTCTCAA
 TGAATAACAGTCTGGTTTGAATAAATGGATATTAATAATACATTTTCCTTATTTTGAA
 ACATTAGAATAATCCGTACATTGAATGCTTAATTTATAATATTAATGGTTGAATTTTGAG
 GGTATCCATATGACTAGTAG

Figura 6: Sequências de fragmento de DNA isolado por restrição enzimática.

Os resultados destas análises mostraram uma predominância de nucleotídeos A-T para os clones TucXba3, TucXba4, TucXba7 e TucXba9, enquanto os clones TucXba1, TucXba6 e TucXba11 mostraram-se muito similares em suas seqüências e apresentaram um percentual médio de adenina e timina de 48,9% (Tabela 7).

Tabela 7- Composição nucleotídica dos clones isolados de *Cichla kelberi* por restrição enzimática

Clones	Tamanho (pb)	Composição nucleotídica AT (%)
TucXba1	592	48,1
TucXba3	627	62,2
TuXbac4	728	61,1
TucXba6	635	48,5
TucXba7	679	58,6
TucXba9	641	59,2
TucXba11	694	50,1
TucXba15	620	63,2

Posteriormente, foi realizada uma pesquisa em bancos de seqüências (DDBJ,EMBL, GenBank) através do programa BLAST/N (Altschul *et al.*, 1990) para a busca de seqüências nucleotídicas similares às seqüências isoladas. A comparação das seqüências dos clones TucXba1, TucXba6 e TucXba11 com as seqüências depositadas no GenBank mostrou alta similaridade destas seqüências com seqüências repetidas dispersas no genoma de peixes e anfíbios. Todos os segmentos que apresentaram similiaridade maior que 70% estão listados na tabela 8. O maior nível de similaridade ocorreu em relação ao peixe *Polypterus bichir* (cerca de 87%) e *Takifugu rubripes* (84% similaridade). Os fragmentos isolados apresentaram 82% de similaridade com seqüências flanqueadoras do gene da transcriptase reversa de *Oryzias melastigma*. Tal fato é um forte indício de que as seqüências repetidas isoladas representam um segmento de um elemento retrotransponível. Outro indício de tal afirmação é o fato de que esse segmento isolado apresenta-se disperso em diferentes regiões do genoma dos diferentes espécimes com os quais possuem similaridade (Tabela 8).

Tabela 8- Similaridade obtida junto ao NCBI com os clones TucXba1, TucXba6 e TucXba11 isolados por restrição enzimática

Espécies	Similaridade encontrada	N. acesso GenBank	Similaridade (%)
<i>Polypterus bichir</i>	Região repetida clone -22F22 localizada nas regiões de 47068 a 47590	AC126321	87
<i>Takifugu rubripes</i>	Cluster do gene HoxBa localizado nas regiões 81250 a 81173	DQ481665	84
<i>Oryzias melastigma</i>	Segmento flanqueia o gene da transcriptase reversa localizado nas regiões 2328 a 2055	DQ286655	82
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Segmento do clone CH213-60G7 localizado nas regiões 126051 a 125904	AC145764	81
<i>Astatotilapia burtoni</i>	Cluster do gene Hoxdb localizado nas regiões 18628 a 18904	EF594316	79
<i>Salmo salar</i>	Locus alpha/delta TCR do clone 39N03 localizado nas regiões 105217-105739	EF467298	77
	Região locus gamma TCR do clone 115J17 localizado nas regiões 165760 a 165238	EU221176	77
	Gene transposase Tc1-like localizado nas regiões 552 a 1074	EF685955	76
	Segmento do gene TAPBP região classe I do complexo histocompatibilidade localizado nas regiões 47610 a 48130	EF427379	77
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Intron do gene IFN2 localizado nas regiões 4656 a 4138	AM489416	76
	Região B class I MHC	AB162343	76
<i>Xenopus tropicalis</i>	Segmento do clone CH216-11K6 localizado nas regiões 1159 a 1678	AC146868	76
	Segmento do clone CH216-138M21 localizado nas regiões 93370 a 93868	AC147826	76
	Segmento do clone CH216-52F23 localizado nas regiões 142966 a 143385	AC166141	75

<i>Rivulus marmoratus</i>	Segmento do gene vitellogenin localizado nas regiões 1054 a 1434	AY279214	75
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Segmento do gene prolactina II localizado nas regiões 5855 a 6333	S66606	75
	Segmento do clone CH211-105F16	AL928837	73
<i>Danio rerio</i>	Segmento do clone DYEY-217K21 localizado nas regiões 43207 a 42747	BX072538	71
	Segmento do clone CH211 a 133F22 localizado nas regiões 155309 a 154880	BX649367	71

Para verificar as relações existentes entre as seqüências isoladas no presente trabalho com as obtidas no banco de dados do NCBI (Tabela 8) foi construído um dendrograma através do programa ClustalW *online* utilizando a distância p como parâmetro para as análises. O dendrograma obtido mostra claramente a presença de dois grandes grupos, denominados de “clado A” e “clado B”, e as três seqüências isoladas do genoma de *C. kelberi* se posicionam apenas no clado A (Figura 7). As seqüências isoladas mostraram-se mais relacionadas com as espécies *Astatotilapia burtoni* (Cichlidae) e *Polypterus bichir* (Polypteridae), constituindo um subgrupo dentro do clado A. A família Polypteridae pertence a uma ordem basal dentro dos Actinopterygii. Tal fato indica que tais seqüências são bem conservadas em muitos grupos dessa classe (Tabela 8). Alta similaridade do elemento *Tuc* foi encontrada também para a espécie de anfíbio, *Xenopus tropicalis*. Além disso, o elemento *Tuc* apresentou similaridade ainda com outras espécies de anfíbios como *Rana chensinensis* e com mamíferos como *Bos taurus* e humanos. A similaridade encontrada para as espécies de mamíferos corresponde a pequenos segmentos deste elemento, porém com similaridade acima de 80%. A presença da seqüência *Tuc* em diversos vertebrados indica que a origem deste elemento remonta a diversificação dos principais grupos de vertebrados. A divisão do dendrograma em dois grandes cladros (A e B) sugere que o elemento *Tuc* constitui duas subfamílias distintas de elementos retrotransponíveis presentes no genoma dos vertebrados, sugerindo que estudos mais detalhados das seqüências de base de seu DNA deverão ser empreendidos no sentido de elucidar integralmente a natureza e o padrão de distribuição dessas seqüências tanto em *C. kelberi* como em outros organismos vertebrados.

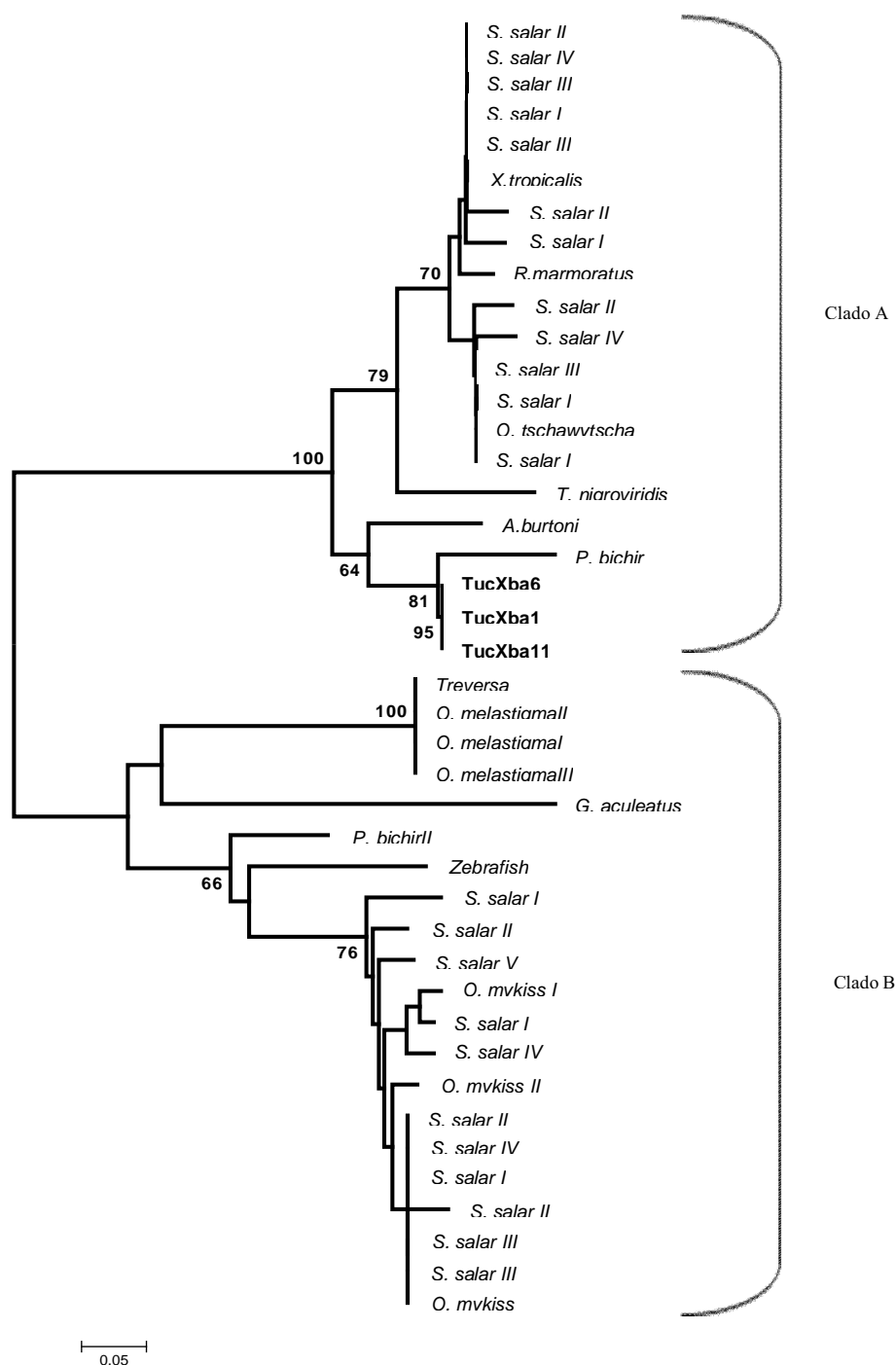


Figura 7: Dendrograma baseado nas análises de distância p obtido pelo programa ClustalW *online* a partir das seqüências *Tuc* isoladas e de seqüências obtidas do banco de dados do NCBI. Neste dendrograma, o nome das seqüências corresponde às espécies da tabela 9. A barra indica a distância genética e os valores de *bootstrap* encontram-se indicados nos nodos. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram omitidos.

4.2. Isolamento e caracterização de seqüências repetidas no genoma de *Cichla kelberi* por PCR

Seqüências dos retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram identificadas e isoladas do DNA genômico da espécie *Cichla kelberi* através de reações de PCR. Esses elementos apresentaram um tamanho de aproximadamente 600 pares de bases (Figura 8).

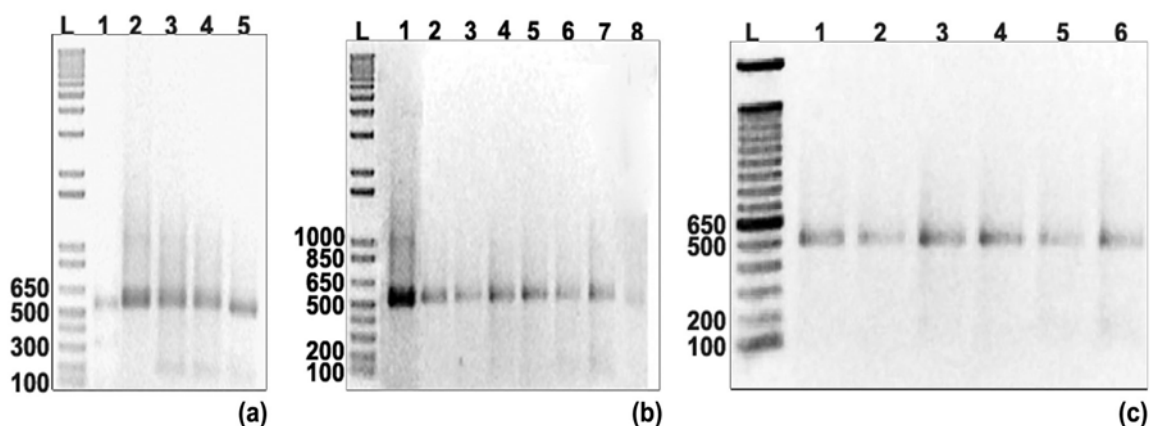


Figura 8: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando produtos de PCR obtidos com os *primers* *Rex1* (a), *Rex3* (b) e *Rex6* (c) a partir do DNA genômico de representantes de *Cichla kelberi* (1-5), (1-8), (1-6). L – marcador de peso molecular em pares de bases.

Os três conjuntos de *primers* utilizados mostraram-se bastante eficientes na amplificação de fragmentos de DNA por PCR. Os fragmentos de DNA obtidos foram seqüenciados e a análise comparativa desses fragmentos junto ao banco de dados do NCBI permitiu verificar que os fragmentos amplificados correspondiam a segmentos de elementos transponíveis da família *Rex*. Os *primers* utilizados no presente estudo já foram empregados no isolamento destes elementos em diversos grupos de peixes (Tabela 3). As seqüências obtidas foram submetidas a comparações através do sistema Blastn do NCBI para verificar a similaridade com outras seqüências já depositadas nesse banco de dados. As comparações possibilitaram detectar altos níveis de similaridade entre as seqüências isoladas e as seqüências de outras espécies de peixes já depositadas para estes elementos.

Foi possível verificar que os retrotransposons isolados *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* apresentaram alta similaridade com clones destes elementos com outras espécies de ciclídeos disponíveis nos bancos de dados do NCBI, como *Oreochromis niloticus*, *Cichlasoma labridens* e *Hemichromis bimaculatus* (Tabelas 9, 10 e 11). No entanto, alta similaridade também foi detectada em relação a outras espécies de peixes pertencentes a outras famílias e ordens. Os resultados apresentados para o elemento *Rex1*

evidenciam alta similaridade com espécies de peixes da ordem Perciformes, além de outras ordens (Tabela 9). Para os elementos *Rex3* e *Rex6* foram encontrados poucas espécies de Perciformes no banco de dados do NCBI que apresentaram similaridade (Tabela 10 e 11). Isso ocorre, provavelmente, porque ainda são poucos os estudos realizados com esses elementos dentro da ordem Perciformes, ou seja, ainda são poucas as seqüências desses elementos depositadas no banco de dados. Os resultados com *Rex3* e *Rex6* revelam uma grande similaridade com espécies de peixes da ordem Cyprinodontiformes, mostrando o quão conservado esses elementos se apresentam em peixes, assim como observado também para o elemento *Rex1*. O elemento *Rex6* é o elemento menos estudado dos três, sendo escassos trabalhos com esse elemento e conseqüentemente poucos são os dados depositados no NCBI (Volf *et al.*, 2001c). Estas observações corroboram aquelas encontradas por Volf *et al.* (2000) e Ozouf-Costaz *et al.* (2004), mostrando a ampla distribuição dos elementos *Rex* nos peixes.

As seqüências *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* obtidas de *Cichla kelberi* no presente trabalho e de outras espécies de peixes na base de dados do NCBI foram alinhadas através do programa DAMBE. O alinhamento das seqüências foi realizado em duas etapas. Primeiramente as seqüências *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* de *Cichla kelberi* foram alinhadas independentemente com aquelas da mesma natureza obtidas de outras espécies de ciclídeos já depositadas no NCBI, constantes das tabelas 9, 10 e 11. Em uma segunda etapa os segmentos de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* foram alinhados em conjunto com todas as espécies constantes nas tabelas 9, 10 e 11.

O alinhamento das seqüências *Rex1* e *Rex6* (Anexos I e III) de *C. kelberi* com a dos demais peixes ciclídeos evidenciou que aproximadamente 71% dos sítios compartilhados entre eles são conservados, ao passo que o alinhamento das seqüências *Rex3* (Anexo II) dos mesmos mostrou que apenas 39% dos sítios compartilhados são conservados. Esses dados indicam claramente que as seqüências dos retroelementos *Rex1* e *Rex6*, correspondentes a segmentos dos genes de transcriptase reversa, encontram-se mais conservadas entre os espécimes de peixes analisados em relação às seqüências do retroelemento *Rex3*.

O alinhamento das seqüências *Rex1* e *Rex6* (Anexos IV e VI) de *C. kelberi* com as mesmas de todas as outras espécies analisadas (Tabelas 9 e 11) mostrou que, respectivamente, 37% e 55% dos sítios compartilhados entre elas são conservados, ao passo que o alinhamento das seqüências *Rex3* (Anexo V) das mesmas evidenciou que apenas 26% das bases compartilhadas correspondem a sítios conservados do gene da transcriptase reversa. Como anteriormente descrito, percebe-se que as seqüências *Rex3* de *C. kelberi* são mais variáveis que as seqüências *Rex1* e *Rex6* tanto de outros ciclídeos quanto dos demais peixes analisados pelo presente trabalho.

Tabela 9- Similaridade encontrada para o elemento *Rex1* de *Cichla kelberi* em relação a outras espécies de peixes

Espécies	Similaridade encontrada	N. acesso GenBank	Similaridade (%)
<i>Cichlasoma labridens</i>	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Cil-2	AJ288467	89
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Cil-3	AJ288469	89
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Cil-1	AJ288470	88
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Cil-4	AJ288468	88
<i>Oreochromis niloticus</i>	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Orn-5	AJ288473	87
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Orn-1	AJ288471	86
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Orn-4	AJ288476	86
<i>Hemichromis bimaculatus</i>	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Heb-1	AJ288480	85
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Heb-2	AJ288478	85
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Heb-4	AJ288479	85
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Heb-5	AJ288481	85
<i>Anguilla japonica</i>	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Anj-2	AJ288465	76
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Anj-3	AJ288466	76
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Anj-1	AJ288464	75
<i>Takifugu rubripes</i>	Gene HBA3	AY170464	75
<i>Trematomus newnesi</i>	Retrotransposon não-LTR <i>Rex1b</i>	AY331098	75
	Retrotransposon não-LTR <i>Rex1a</i>	AY331097	73
<i>Anguilla anguilla</i>	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Ana	AJ288463	74
<i>Notothenia coriiceps</i>	Retrotransposon não-LTR <i>Rex1a</i>	AY331095	74
	Retrotransposon não-LTR <i>Rex1b</i>	AY331096	74
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	Retrotransposon não-LTR <i>Rex1a</i>	AY331099	74
	Retrotransposon não-LTR <i>Rex1b</i>	AY331100	73
<i>Dissostichus mawsoni</i>	Retrotransposon não-LTR <i>Rex1b</i>	AY331102	73
	Retrotransposon não-LTR <i>Rex1b</i>	AY331101	72
<i>Batrachocottus baikalensis</i>	Genes orf1 e orf2	U18939	73
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Bab1	AJ288461	72
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Bab-2	AJ288459	72
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Ximj3	AJ288451	72
<i>Fundulus</i> sp.	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Fun3	AJ288485	72
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Fun1	AJ288484	72
<i>Oryzias latipes</i>	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Orl-2	AY288455	72
	Retrotransposon <i>Rex1</i> , clone <i>rex1</i> -Orl-4	AJ288456	72

Tabela 10- Similaridade encontrada para o elemento *Rex3* de *Cichla kelberi* em relação a outras espécies de peixes

Espécies	Similaridade encontrada	N. acesso GenBank	Similaridade (%)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , clone <i>rex3</i> -Ore3	AJ400369	90
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , clone <i>rex3</i> -Ore5	AJ400370	90
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , clone <i>rex3</i> -Ore1	AJ400368	89
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , clone <i>rex3</i> -Ore4	AJ400372	89
<i>Cichlasoma labridens</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Cic4	AJ400375	87
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Cic2	AJ400373	87
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Retrotransposon não-LTR <i>Rex3</i>	AJ621035	82
	Retrotransposon não-LTR <i>Rex3</i>	AJ312226	81
<i>Esox lucius</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Eso2	AJ400446	81
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Eso4	AJ400445	81
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Eso3	AJ400444	80
<i>Fugu rubripes</i>	Gene (Pcnx11) pecanex	AF154413	81
<i>Batrachocottus baikalensis</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Bot4	AJ400359	81
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Retrotransposons <i>Rex3</i> , <i>Rex2</i> , <i>Rex1</i> , sequência completa	AY298859	80
<i>Xiphophorus helleri</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Xih2	AJ400391	80
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Xih6	AJ400395	80
<i>Poecilia mexicana</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Pom2	AJ400380	80
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Pom1	AJ400385	79
<i>Poecilia formosa</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Pof5	AJ400379	80
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Pof3	AJ400382	80
<i>Gambusia affinis</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Gam2	AJ400408	80
<i>Phallichthys amates</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Pha4	AJ400407	80
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Pha2	AJ400413	80
<i>Oryzias latipes</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Ory3	AJ400430	80
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Ory6	AJ400431	80
<i>Fundulus</i> sp.	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> , Fun2	AJ400377	79
<i>Zebrafish</i>	Sequência completa com clone DKEY-24C17	CR628327	79
<i>Heterandria bimaculata</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Het6	AJ400388	79
<i>Poecilia latipinna</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Pol1	AJ400386	79
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , sequência <i>rex3</i> -Pol2	AJ400383	79

<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Seqüência completa com clone CH213-10I3	AC146680	78
<i>Cyprinus carpio</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , seqüência <i>rex3</i> - Cyp3	AJ400453	78
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , seqüência <i>rex3</i> -Cyp4	AJ400450	78
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , seqüência <i>rex3</i> -Cyp2	AJ400448	77
<i>Siniperca chuatsi</i>	Retrotransposon <i>Rex3</i> , seqüência <i>rex3</i> -Sin2	AJ400439	76
	Retrotransposon <i>Rex3</i> , seqüência <i>rex3</i> -Sin5	AJ400441	75

Tabela 11- Similaridade encontrada para o elemento *Rex6* de *Cichla kelberi* em relação a outras espécies de peixes

Espécies	Similaridade encontrada	N. acesso GenBank	Similaridade (%)
<i>Cichlasoma labridens</i>	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Cla-2	AJ293549	87
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Cla-1	AJ293548	78
<i>Oreochromis niloticus</i>	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> -Oni-1	AJ293545	80
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> -Oni-2	AJ293546	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Oni-3	AJ293547	78
<i>Poecilia Formosa</i>	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Pfo-2	AJ293534	81
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> -Pfo-5	AJ293537	81
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> -Pfo-6	AJ293538	81
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> -Pfo-4	AJ293536	80
<i>Heterandria bimaculata</i>	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> -Hbi-6	AJ293544	80
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Hbi-2	AJ293540	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Hbi-4	AJ293542	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Hbi-5	AJ293543	79
<i>Gambusia affinis</i>	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Gaf-2	AJ293528	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> -Gaf-3	AJ293526	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> , Gaf-4	AJ293530	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Gaf-5	AJ293531	79
<i>Poeciliopsis gracilis</i>	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Pgr-1	AJ293523	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Pgr-2	AJ293524	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Pgr-3	AJ293525	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Pgr-4	AJ293526	79
<i>Oryzias latipes</i>	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Ola-5	AJ293522	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Ola-3	AJ293520	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Ola-1	AJ293518	78
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Xma-5	AJ293516	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> - Xma-6	AJ293517	79
	Retrotransposon <i>Rex6</i> , clone <i>rex6</i> -Xma-2	AJ293513	79
<i>Takifugu rubripes</i>	Gene <i>dmd</i>	AJ544599	77

<i>Tetraodon nigroviridis</i>	DNA repetido clone C0AA29L14	AJ457054	70
	Retrotransposon <i>Rex6</i>	AJ621034	69

Outro elemento transponível obtido por PCR a partir do DNA genômico de *Cichla kelberi* foi o elemento *Tc1*. A análise do produto de PCR deste elemento, a partir do *primer Tc1*, permitiu identificar uma banda de aproximadamente 450 pb visualizada por meio de eletroforese em gel de agarose (Figura 9).

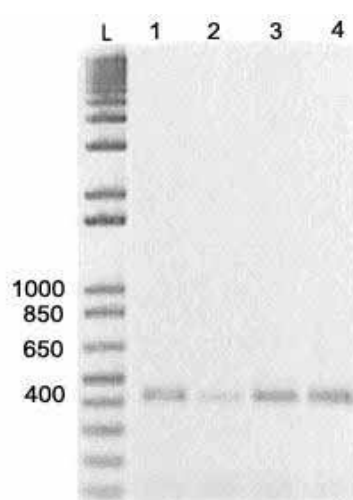


Figura 9: Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, evidenciando os produtos de PCR obtidos a partir do *primer Tc1* para exemplares de *Cichla kelberi* (1-4). L- marcador de peso molecular em pares de bases.

4.3. Mapeamento físico cromossômico por hibridação *in situ* fluorescente utilizando como sondas as seqüências *Rex1*, *Rex3*, *Rex6*, *Tc1* e *Tuc* .

Os produtos das reações de PCR de *Rex1*, *Rex3*, *Rex6*, *Tc1* e *Tuc* foram utilizados como sondas para o mapeamento físico nos cromossomos de *Cichla kelberi*. A hibridação *in situ* das seqüências *Rex1* e *Rex6* mostrou sinais abundantes nas regiões centroméricas de todos os cromossomos do cariótipo (Figura 10a e 10c, respectivamente). O elemento *Rex3* apresentou-se distribuído preferencialmente na região centromérica dos pares cromossômicos, mas também em extensos segmentos intersticiais de alguns deles, ocorrendo ainda eventuais marcações teloméricas (Figura 10b). O transposon *Tc1* encontrou-se distribuído predominantemente na região centromérica de todos os pares cromossômicos (Figura 10d). O elemento *Tuc* apresentou eventuais sinais nos centrômeros dos cromossomos e também algumas marcações intersticiais em alguns deles (Figura 10e)

Figura 10: Hibridação *in situ* fluorescente utilizando como sonda os retrotransposons *Rex1*(a), *Rex3*(b), *Rex6*(c), transposon *Tc1*(d) e *Tuc* (e) nos cromossomos de *Cichla kelberi*.

Os resultados apresentados são semelhantes aos obtidos para *Rex3* em *Tetraodon nigroviridis* (Fischer *et al.*, 2004) e para *Rex1* e *Rex3* em espécies de peixes antárticos da subordem Notothenioidei (Ozouf-Costaz *et al.*, 2004). Em *Tetraodon nigroviridis* *Rex3* localiza-se principalmente em regiões pericentroméricas e heterocromáticas, além de sinais menos intensos em regiões intersticiais. Trabalhos como o de Ozouf-Costaz *et al.* (2004), demonstraram que para a maioria das espécies da subordem Notothenioidei, o elemento *Rex3* apresentou uma distribuição homogênea e mais abundante do que *Rex1*, com sinais em todos os cromossomos e algumas regiões particulares de acúmulo. Além disto, o retrotransposon *Rex3* localizou-se também no braço longo do cromossomo Y na espécie *Chionodraco hamatus*.

Esse padrão de distribuição é diferente do observado para humanos, no qual as seqüências repetidas ocupam regiões eucromáticas, e está mais relacionado à distribuição dos elementos transponíveis observada em *Drosophila melanogaster* e *Arabidopsis thaliana* (Fischer *et al.*, 2004). Acredita-se que em peixes os retrotransposons encontram-se compartimentalizados e aglomerados nas regiões heterocromáticas dos cromossomos (Volf *et al.*, 2003). No entanto, uma alta pressão seletiva sobre estes elementos em regiões ricas em genes já foi sugerida, levando-se em consideração a capacidade destes elementos se transporem causando mutações através dos eventos de mobilização. Entretanto, o processo de mobilização dos TEs no genoma pode acarretar conseqüências muitas vezes irreversíveis, indo desde deleções, substituições e inserções de nucleotídeos até rearranjos gênicos e cromossômicos (Kidwell e Lisch, 1997).

A localização cromossômica do retrotransposon *Zebulon* foi estudada na espécie *Tetraodon nigroviridis*. Este elemento também apresenta sinais de hibridação em regiões heterocromáticas, nos braços curtos dos cromossomos subtelocêntricos e regiões pericentroméricas. Quando co-hibridizado com o retrotransposon *Rex3* no genoma de *T. nigroviridis*, evidenciou-se sinais dos dois elementos (*Rex3* e *Zebulon*) sobrepondo-se, mostrando que o sítio de hibridação é comum a ambos. Além disso, esses elementos encontram-se presentes em grande quantidade nas regiões heterocromáticas (Bouneau *et al.*, 2006).

Grande parte das famílias de TEs descritas para teleósteos está presente no genoma dos baiaacús *T. nigroviridis* e *T. rubripes* (Bouneau *et al.*, 2006). Os retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* representam uma enorme quantidade e estão presentes em uma enorme diversidade no genoma dos peixes (Volf *et al.*, 2000, 2001a, 2001b). Algumas cópias de *Rex3* estão associadas a regiões codificantes, o que poderia representar um fator importante para a evolução do genoma em teleósteos causando modificação dos níveis de expressão ou especificidade dos genes vizinhos (Volf *et al.*, 1999). O retrotransposon *Rex6* possui elevada similaridade com seqüências de mesma natureza de outras espécies de teleósteos (Volf *et al.*, 2001b). Os trabalhos descritos na literatura indicam uma

forte conservação destes elementos nas regiões heterocromáticas dos cromossomos. Tal fato, sugere que estes elementos devem desempenhar papéis fundamentais nas regiões heterocromáticas, como manutenção da estrutura centromérica, contribuindo evidentemente para a evolução dos organismos eucariotos.

O padrão de acúmulo desses elementos no genoma é observado em diversos outros grupos de peixes (ver Fischer *et al.*, 2004; Ozouf-Costaz *et al.*, 2004; Bouneau *et al.*, 2006). Também a localização preferencial de retrotransposons em regiões heterocromáticas tem sido observada freqüentemente no genoma de outros grupos animais (ver Dimitri e Junakovic, 1999, Bartolomé *et al.*, 2002). As regiões heterocromáticas pobres em genes podem servir como reservatórios de elementos retrotransponíveis funcionais ou degenerados. Trabalhos como de Dimitri e Junakovic (1999) relatam que o acúmulo de elementos transponíveis na heterocromatina está relacionado com a especificidade do elemento, ou da família do elemento. Este mesmo elemento pode ser encontrado em regiões divergentes, sugerindo que isso é determinado por algum tipo de interação entre cada família de transposon e o genoma hospedeiro.

Apesar da maior parte do DNA repetido do genoma eucariótico ser composta de elementos transponíveis, os estudos citogenéticos em peixes utilizando essas seqüências encontram-se ainda em fase inicial. Os resultados já obtidos sugerem que esses elementos podem contribuir bastante para o conhecimento da evolução do genoma nesse grupo de organismos. Os resultados do nosso trabalho revelam que esses elementos podem contribuir para o conhecimento da evolução do genoma dos peixes. Estudos realizados nos mostram a variedade de elementos móveis que estão sendo descobertos, não apenas em peixes, mas em todos os eucariotos, devido ao grande número de genomas sequenciados por completo nos últimos anos. Portanto, avanços nos estudos genômicos utilizando ferramentas cromossômicas se fazem necessários sobre o genoma de peixes, principalmente para ciclídeos, uma vez que estas espécies possuem uma enorme importância tanto biológica como econômica.

Além da presença principalmente na região centromérica dos elementos estudados, sinais dispersos nos cromossomos para os elementos *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* e *Tc1* estiveram sempre presentes, bem como dois pequenos blocos intersticiais no primeiro par do complemento cromossômico (Figura 10). Esses resultados estão em concordância com os observados por Capriglione *et al.*, (2002), os quais relatam que os estudos de hibridação *in situ* com o elemento *Tc1* na espécie *Chionodraco hamatus* (Notothenoidei), mostraram que esse elemento estava preferencialmente localizado nas regiões heterocromáticas (pericentromérica ou telomérica) e raramente intersticiais nos cromossomos.

Com base em dados prévios de bandamento C em outras espécies do gênero *Cichla* (Brinn *et al.* 2004), a distribuição de heterocromatina está restrita principalmente às regiões centroméricas e

teloméricas dos cromossomos. Os dados obtidos para a distribuição cromossômica dos elementos repetidos aqui analisados estão de acordo com os dados de citogenética clássica. No entanto, grandes segmentos cromossômicos eucromáticos, como observados para os cromossomos 2 e 3, parece conter grandes quantidades do elemento *Rex3*.

Na heterocromatina é encontrada uma enorme variedade de seqüências repetidas, mais notavelmente seqüências satélites. Infere-se que nesta região tenha poucos genes, e uma reduzida taxa de recombinação, levando ao acúmulo de seqüências repetidas. O melhor exemplo documentado acontece em *Drosophila melanogaster* onde os elementos transponíveis formam clusters proeminentes na heterocromatina. Em ramster, metade dos elementos *IAP* acumulam-se na heterocromatina, incluindo todo o cromossomo Y. Este acúmulo de seqüências repetidas pode ser observado também em milho (Dimitri e Junakovic, 1999).

A riqueza de seqüências repetidas nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos de *Cichla kelberi* sugerem que tais seqüências desempenham um papel importante na manutenção e evolução da estrutura cromossômica desta espécie. Seqüências repetidas estão presentes principalmente nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos e representam o principal componente das heterocromatinas da maioria das espécies de peixes estudadas.



Conclusões

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que:

1. As seqüências isoladas por digestão enzimática do DNA genômico de *Cichla kelberi* corresponde possivelmente ao segmento de um elemento retrotransponível conservado no genoma dos vertebrados.

2. Os elementos *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* e *Tc1* estão presentes no genoma de *Cichla Kelberi* e estão organizados principalmente nas heterocromatinas centroméricas.



Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v.215, p.403-410, 1990.

APARÍCIO, S.; CHAPMAN, J.; STUPKA, E.; PUTNAM, N. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. **Science**, v.297, p.1301-1310, 2002.

AXELROD, H.R. **The most complete colored lexicon of cichlids**. 2nd Edition. TFH Publications. NJ, USA. p.864, 1986

AZEVEDO, M.F.C.; OLIVEIRA, C.; MARTINS, C.; WASKO, A.P.; FORESTI, F.. Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). **Genetica**, v.125, p.205-210, 2005.

BACHMANN, L.; RAAB, M.; SPERLICH, D. Satellite DNA and speciation. A species specific satellite DNA of *Drosophila guanche*. **Z. Zool. Syst. Evolut. Forsch.**, v.27, p. 84-93, 1989.

BARTOLOMÉ, C.; MASIDE, X.; CHARLESWORTH, B. On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. **Mol Biol. Evol.**, v.19, n.6, p.926-937, 2002.

BELL, G.E.; SELBY, M.J.; RUTTER, W.J. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeated sequences. **Nature**, v.295, p.31-35, 1982.

BERG, D.E.; HOWE, M.M. Mobile DNA. **American Society for Microbiology**, Washington, DC. 1989.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v.443, p.521-524, 2006.

BIET, E.; SUN, J.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. **Nucl. Acid. Res.**, v.27, p.596-600, 1999.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Citotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz. J. Genet.**, v.1, p.103-120, 1978.

BOUNEAU, L.; FISCHER, C.; OZOUF-COSTAZ, C.; FROSCHAUER, A.; JAILON, O.; COUTANCEAU, J.P.; KÖRTING, C.; WEISSENBACH, J.; BERNOT, A.; VOLFF, J.N. An active non-

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informações e documentação- Referências- Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Res.**, p.1-9, 2006.
- BRINN, M.N.A.; PORTO, J.I.R.; FELDEBERG, E. Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. **Hereditas**, v.141, p. 252-257, 2004.
- BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**, Faculdade de Saúde Pública da USP- Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura, p.79-108, 1972.
- BROCCOLI, D.; MILLER, O.J.; MILLER, D.A. Relationship of mouse minor satellite DNA to centromere activity. **Cell. Genet.**, v.54, p.182-186, 1990.
- BROW, L.Y.; BROW, S.A. Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. **Trends Genet.**, v.20, p.51-58, 2004.
- CAPY, P.; BAZIN, C.; HIGUET, D.; LANGRIN, T.. Dynamics and Evolution of Transposable Elements. Austin, TX: Springer-Verlag. 1998.
- CAPRIGLIONE, T.; ODIERNA, G.; CAPUTO, V.; CANAPA, A. OLMO, E. Characterization of a Tc1-like transposon in the Antarctic ice-fish, *Chionodraco hamatus*. **Gene**, v.295, p.193-198, 2002.
- CHARLESWORTH, B.; SNEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolution dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v.371, p.215-220, 1994.
- CHISTIAKOV, A.D.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, A.M.F. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v.255, p.1-29, 2006.
- COLTMAN, D.W.; WRIGHT, J.M. Can SINES: a family of tRNA-derived retroposons specific to the superfamily Canoidea. **Nucl. Acid. Res.**, v.22, p.2726-2730, 1994.
- CSINK, A.K.; HENIKOFF, S. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. **Trends Genet.**, v.14, n.5, p.200-204, 1998.
- DEININGER, P.L.; MORAN, J.V.; BATZER, M.A.; KAZAZIAN, JR.H.H.. Mobile elements and mammalian genome evolution. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.13, p.651-658, 2003.
- DIMITRI, P.; JUNAKOVIC, N. Revising the selfish DNA hypothesis New evidence on accumulation of transposable elements in heterocromatin. **Trends Genet.**, v.15, p.123-124, 1999.

- DOOLITTLE, W.F.; SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**, v.284, p.601-603, 1980.
- ELLEGREN H. Microsatellites mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends Genet.**, v.16, p.551-558, 2000.
- EPPLEN, J.T.; KYAS, A.; MAULER, W. Genomic simple repetitive DNA are targets for differential binding of nuclear proteins. **FEBS Lett.**, v.389, p.92-95, 1996.
- FARAH, S.B. Decifrando o genoma humano. In: **DNA Segredos e Mistérios**, p.155-202, 2007.
- FARIAS, I.P.; ORTI, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A.. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical assemblage. **J. Mol. Evol.**, v.48, p.703-711, 2000.
- FAWCETT, J.A.; KAWAHARA, T.; WATANABE, H.; YASUI, Y. A SINE family widely distributed in the plant Kingdom and its evolutionary history. **Plant Mol. Biol.**, v.61, n.3, p.505-514, 2006.
- FLAVELL, R.B.; BENNETT, M.D.; SMITH, J.B.; SMITH, D.B. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. **Biochemical Genetics** v.12, p.257-269, 1974.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; BERTOLLO, L.A.C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. **Fish adaptations**. Science Publishers, Inc. New Dehli & New York, p.285-308, 2003.
- FELDBERG, E.; PORTO, J.I.R.; ALVES-BRINN, M.N.; MENDONÇA, M.N.C.; BEZAQUEM, D.C. B chromosomes in Amazonia cichlid species. **Cytogenet. Gen. Res.**, v.106, p.195-198, 2004.
- FERREIRA, I.A.; MARTINS, C. Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. **Micron**, p.1-8, 2008.
- FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annu. Rev. Genet.**, v.41, p.331-368, 2007.
- FISHER, C.; BOUNEAU, L.; COUTANCEAU, J.P.; WEISSENBACH, J.; VOLFF, J.N.; OZOUF-COSTAZ, C. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Gene**, v.336, p.175-184, 2004.
- GALETTI JR., P.M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus*_(Pisces, Anostomidae). **Cytogenet. Cell Genet.**, v.43, p.43-46, 1986.

- GALETTI JR., P.M.; MARTINS, C. Contribuição da hibridação *in situ* para o conhecimento dos cromossomos dos peixes. In: **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ed. M.Guerra. Editora da SBG. p.61-88, 2004.
- HAAF, T.; MATER, A.G.; WIENBERG, J.; WARD, D.C. Presence and abundance of CENP-B box sequences in great apes subsets of primate-specific α -satellite DNA. **J. Mol. Evol.**, v.41, p.487-491, 1995.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.**, v.41, p.95-98, 1999.
- HAN, K.; KONKEL, M.K.; XING, J.; WANG, H.; LEE, J.; MEYER, T.J.; HUANG, C.T.; SANDIFER, E.; HERBERT, K.; BARNES, E.W.; HUBLEY, R.; MILLER, W.; ARIAN, F.A.; ULLMER, S.B.; BATZER, M.A.. Mobile DNA in old world monkeys: A glimpse through the rhesus macaque genome. **Science** v.316, p.238-240, 2007.
- HARRIS, A.S.; WRIGHT, J.M. Nucleotide sequence and genomic organization of cichlids fish minisatelites. **Genome**, v.38, p.177-184, 1995.
- HARVEY, S.C.; BOONPHAKDEE, C.; CAMPOS-RAMOS, R.; EZAZ, M.T.; GRIFFIN, D.K.; BROMAGE, N.R.; PENMAN, D.J. Analysis of repetitive DNA sequences in the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*. **Cytogenet. Gen. Res.**, v.101, p.314-319, 2003.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, v.314, p.67-74, 1985.
- KAPITONOV, V.V.; JURKA, J. Self-synthesizing DNA transposons in eukariotes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.103, p.4540-4545, 2006.
- KAZAZIAN, H.H.JR. Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science**, v.12, p.1626-1632, 2004.
- KIDWELL, M.G.; LISCH, D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.94, p.7704-7711, 1997.
- KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v.115, p.49-63, 2002.
- KOCHER, T.D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. **Nature**, v.5, p.288-298, 2004.

- KULLANDER, S.O. A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes) In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.; LUCENA, C.A.S. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes, Part 5. EDIPUCRS. RS, Brasil. p.461-498, 1998.
- KULLANDER, S.O.; FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v.17, n.4, p.289-398, 2006.
- KUMAR, A.; BENNETZEN, J.L. Plant retrotransposons. **Annu. Rev. Genet.** v.33, p.479-532, 1999.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** v.5, p.150-163, 2004.
- LEWIN, B. Retrovirus and retroposons. In: **Genes VIII**. Carlson G. Ed: Pearson Prentice Hall. NJ. p.493-509, 2004.
- LI, W.H.. Molecular Evolution. **Sinauer Associates Sunderland**, p.177-213, 1997.
- LI, Y.C.; KORD, A.B.; FAHIMA, T.; BERLES, A.; NERO, E.. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453-2465, 2002.
- LI, Y.X.; KIRBY, M.L. Coordinated and conserved expression of aliphoid repeat and aliphoid repeat-tagged coding sequence. **Devel. Dyn.**, v.228, p.72-81, 2003.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. v.44, 397-401, 1989.
- LIU, Z.; LI, P.; KOCABAS, A.; KARSI, A.; JU, Z. Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. **Biochem. Biophys. Res. Commum** v.289, p.317-324, 2001.
- MADSEN, C.S.; BROOKS, J.E.; KLOET, E.; KLOET, S.R. Sequence conservation of an avian centromeric repeated DNA component. **Genome**, v.37, p.351-355, 1994.
- MARTIN, S.L.; CRUCEANU, M.; BRANCIFORTE, D.; WAI-LUN, L.I.P.; KWOK, S.C.; HODGES, R.S.; WILLIAMS, M.C. LINE-1 retrotransposition requires the nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein. **J. Mol. Biol.**, v.348, p.549-561, 2005.
- MARTINS, C.; GALETTI JR., P.M. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? **Genetica**, v.111, p.439-446, 2001.

- MARTINS, C.; GALLETI JR., P.M.. Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: **FISH- conceitos e aplicações na citogenética**. Ed. Guerra M. Sociedade Brasileira de Genética. p.61-88, 2004.
- MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: **Focus on Genome Research** (Ed. CR Williams) Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA. p.335-363, 2004.
- MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: **Fish Cytogenetics**. Eds: PISANO, E; OZOUF-COSTAZ, C; FORESTI, F.; KAPOOR BG. Science Publisher, Inc., USA. 2006.
- MARTINS, C.; FERREIRA, I.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; GALETTI JR.,P.M.. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v.127, p.133-141, 2006.
- MADSEN, C.S.; BROOKS, J.E.; KLOET, E.; KLOET, S.R. Sequence conservation of an avian centromeric repeated DNA component. **Genome**, v.37, p.351-355, 1994.
- METZGAR, D.; BYTOF, J.; WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. **Genome Res.**, v.10, p.72-80, 2000.
- MIKLOS, G.L.G. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. **Mol. Evol. Genet.**, p.241-321, 1985.
- MISKEY, C.; IZSVAK, Z.; KAWAKAMI, K.; IVICS, Z. DNA transposons in vertebrate functional genomics. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.62, p.629-641, 2005.
- MORESCALCHI, A.; CAPRIGLIONE, T.; LANNA, R.; MORESCALCHI, M.A.; ODIERNA, G.; OLMO, E. Genome structure in notothenioid fish from the Ross Sea. **Proceedings of the Third Meeting on Antarctic Biology** p.365-379, 1996.
- MORGANTE, M.; JURMAN, I.; SHI, L.; ZHU, T.; KEIM, P.; RAFALSKI, J.A.. The STR120 satellite DNA of soybean: organization, evolution and chromosomal specificity. **Chromosome Res.**, v.5, p.363-373, 1997.
- MOYLE, P.B.; CECH-JUNIOR, J.J. **Fishes: an introduction to ichthyology**. 4ª edição. Upper Saddle River: Prentice-Hall. 2000.
- MURRAY, A.M. The fossil record and biogeography of the Cichlidae (Actinopterygii, Labroidei). **Biological Journal of the Linnean Society**,v.74, p.517-532, 2001.

- NASCIMENTO, F.L.; CATELA, A.C.; MORAES, A.S. Distribuição espacial do tucunaré, *Cichla* sp. (Pisces, Cichlidae), peixe amazônico introduzido no Pantanal, Brasil.- Bol. Pesq. Desen. EMBRAPA Pantanal v.24, p.1-15, 2001.
- NELSON, J.S. Fishes of the world. 4rd Edition. John Wiley & Sons Inc. NY, USA. 601p, 2006.
- NOLETO, R.B.; VICARI, M.R.; CIPRIANO, R.R.; ARTONI, R.F.; CESTARI, M.M.. Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). **Genetica**, v.130, p.133-138, 2007.
- NOWAK, R. Mining treasures from “junk DNA”. **Science**, v.263, p.608-610, 1994.
- O' RELLY, P.; WRIGHT, J.M. The evolving technology of DNA fingerprint and its application to fisheries and aquaculture. **J. Fish Biol.** v.47, p.29-55, 1985.
- OZOUF-COSTAZ, C.; BRANDT, J.; KORTING, C.; PISANO, E.; BONILLO, C.; COUTANCEAU, J-P.; J-N. VOLFF. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. **Antartic Science**. v.16, n.1, p.51-57, 2004.
- PAGE, R.D.M.; HOLMES, E.C. Molecular evolution: a phylogenetic approach. **Blackwell Science**. 1998.
- PARISE-MALTEMPI, P.P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenet. Gen. Res.**, v.116, n.3, p.218-223, 2007.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc. Nat. Acad. Sc.** v.83, p.2934-2938, 1986.
- POCWIERZ-KOTUS, A.; BURZYNSKI, A.; WENNE, R.. Family of Tc1-like elements from fish genomes and horizontal transfer. **Gene** v.390, p.243-251, 2007.
- PONS, J.; BRUVO, B.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E.; PLOHL, M.; UGARKOVIC, D. Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Gene**, v.205, p.183-190, 1997.
- ROJAS, A.A.; VAZQUEZ-TELLO, A.; FERBEYRE, G.; VENANZETTI, F.; BACHMANN, L.; PAQUIN, B.; SBORDONI, V.; CEDERGREN R.. Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from *Dolichopoda_cave* crickets. **Nucleic Acids Res**, v.28, n.20, p.4037-4043, 2000.

- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning. A laboratory manual.** 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning. A laboratory manual.** 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- SCHUELER, M.G.; HIGGINS, A.W.; RUDD, M.K.; GUSTASHA, W.K.; WILLARD, H.. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. **Science**, v.294, p.109-115, 2001.
- SLAMOVITS, C.H.; COOK, J.A.; LESSA, E.P.; ROSSI, S.M. Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South America Tuco-tucos (genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontinae): a phylogenetic approach. **Mol. Biol. Evol.**, v.9, p.1708-1719, 2001.
- SMIT, A.F.A. The origin of interspersed repeats in the human genome. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.6, p.743-748, 1996.
- STEPHAN, M.F.; CHO, S. Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. **Genetics**, v.136, p.333-341, 1994.
- STERBA G. **Freshwater fishes of the world.** T.F.H. Publications, USA 1-2: 877. 1973.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.** v.17, p.6463-6471, 1989.
- THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, p.860-921, 2001.
- THERMAN, E.; SUSMAN, M.. Cromosomas humanos: estrutura, comportamento y efectos. 3^a edição. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto-SP, Brasil. 1996.
- TREWAVAS, E. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. London. British Museum (Natural History). 1983.
- TOTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatélites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res.**, v.10, p.967-981, 2000.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positions- specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic. Acids Res.**, v.22, p.4673-4680, 1994.

- VOLOBOUEV, V.; VOGT, N.; VIEGAS-PÉRQUIGNOT, E.; MALFOY, B.; DUTRILLAUX, B. Characterization and chromosomal location of two repeated DNAs in three *Gerbillus* species. **Chromosoma**, v.104, p.252-259, 1995.
- VOLFF, J-N.; KORTING, C.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Mol. Biol. Evol.**, v.16, p.1427–1438, 1999.
- VOLFF, J-N.; KORTING, C.; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Mol. Biol. Evol.** v.17, p.1673–1684, 2000.
- VOLFF, J-N.; KÖRTING, C.; FROSCHAUER, A.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **J. Mol. Evol.**, v.52, p.351–360, 2001a.
- VOLFF, J-N.; HORNING, U.; SCHARTL, M. Fish retroposons related to the *Penelope* element of *Drosophila virilis* define a new group of retrotransposable elements. **Mol. Genet. Genomics**, v.265, p.711–720, 2001b.
- VOLFF, J-N.; KÖRTING, C.; FROSCHAUER, A.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **J. Mol. Evol.**, v.52, p.351-360, 2001c.
- VOLFF, J-N.; BOUNEAU, L.; OZOUF-COSTAZ, C.; FISCHER, C. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. **Trends in Genetica**, v.19, p.674-678, 2003.
- VOLFF, J-N. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. **BioEssays**, v.28, p.913-922, 2006.
- XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. **J. Heredity**, v.92, p.371-373, 2001.
- WALSH, J.B. Genome Evolution: Overview. **Enciclopedia of life sciences**. . 2001.
- WEBER J.L.; MAY P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.**, v.44, n.3, p.388-396, 1989.
- WESSLER, S.R. Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.103, n.47, p.17600-17601, 2006.
- WILLARD, H.F. Evolution and function of alpha satellite DNA. **Pathol. Biol.**, v.49: 390. 2001.
- WRIGHT, J.M. DNA fingerprint of fishes. In: The biochemistry and molecular biology of fishes. Elsevier Press, Amsterdam, p.57-91, 1993.



Anexos

```

C. labridensCil-1 GACTCTGCCGTAGTTGGCCTCATCACAGATGAGGATGACGCAGAGTACAGACAGTGGACTCA
C. labridensCil-4 GACTCTCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAGAGGACTCA
O. niloticusOrn-5 GACTCTGCCATAGTCCGCCTCATCACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAGTGGACTCT
O. niloticusOrn-1 GACTCTGCCATAGTCCGCCTCATCACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAGTGGACTCT
O. niloticusOrn-4 GACTCTGCCATAGTCCGCCTCATCACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAGTGGACTCT
H. bimaculatusHeb-1 GACTCTGCCATAGTCCGCCTCATCACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAGTGGACTCT
H. bimaculatusHeb-2 GACTCTGCCATAGTCCGCCTCATCACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAGTGGACTCT
H. bimaculatusHeb-4 GACTCTGCCATAGTCCGCCTCATCACAGG-GAGGACGACTCAGAGTACAGACAGTGGACTCT
H. bimaculatusHeb-5 GACTCTGCCATAGTCCGCCTCATCACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAGTGGACTCT
***** ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

          320          330          340          350          360          370
Rex1      |---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
C. labridensCil-2 GGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCTGATCAATGCTGCTTAAAC -AAGGAGC
C. labridensCil-3 GGACTTTGTGGAAGTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCTGATCAATGCTGCTAAAACCAAGGAGC
C. labridensCil-1 GGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCTGATTAACGCTGCTAAAACCAAGGAGC
C. labridensCil-4 GGACTTTGTGGGATGGTGCCAGCGGAACCACCTCCTGATCAACGCTGCTAAAACCAAGGAGC
O. niloticusOrn-5 GGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCACCTGCTGATCAACGCCGGGAAAACCAAGGAGT
O. niloticusOrn-1 GGACTTTGTGACTGGTGTCAGCAGAACCACCTGCTGATCAACACCGGGAAAACCAAGGAGT
O. niloticusOrn-4 GGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCACCTGCTGATCAACGCCGGGAAAACCAAGGAGT
H. bimaculatusHeb-1 GGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCACCTGCTGATCAATGTCGGGAAAACCAAGGAGT
H. bimaculatusHeb-2 GGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCACCTGCTGATCAACACCGGGAAAACCAAGGAGT
H. bimaculatusHeb-4 GGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCACCTGCTGATCAACACCGGGAAAACCAAGGAGT
H. bimaculatusHeb-5 GGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCACCTGCTGATCAACGCCGGGAAAACCAAGGAGT
***** ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

          380          390          400          410          420          430
Rex1      |---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
C. labridensCil-2 TTGTGGTGGATTTCGGCAGGTGCAGACCCAACACACTGAACCGGTTAAACATTCAGGG -AGT
C. labridensCil-3 TGGTGGTGGATTTCGGCAGCGCAGACCCACCACACTGGCACCGGTGAACATCCAGGG -ACT
C. labridensCil-1 TGGTGGTGGATTTCACAGGCGCAGACCCACCACACTGACACCGGTGAACATCTAGGG -AGT
C. labridensCil-4 TGGTGGTGGATTTCGGCAGCGCAGACCCACCACACTGGCACCGGTGAACATCCAGGG -AGT
O. niloticusOrn-5 TGGTGGTGGACTTCGGGAGACGCAGACCCACCACACTGACACCGGTGAACATCCAGGG -AGT
O. niloticusOrn-1 TGGTGGTGGACTTCGGGAGACGCAGACCCACCACACTGACACCGGTGAACATCCAGGG -AGT
O. niloticusOrn-4 TGGTGGTGGACTTCGGGAGACGCAGACCCACCACACTGACACCGGTGAACATCCAGGG -AGT
H. bimaculatusHeb-1 TGGTGGTGGATTTCGGGAGACGCAGACCCACCACACTGACACTGGTAAACATCCAGGG -AGA
H. bimaculatusHeb-2 TGGTGGTGGATTTCGGGAGATGCAGACCCACCACACTGACACCGGTAAACATCCAGGG -AGT
H. bimaculatusHeb-4 TGGTGGTGGATTTCGGGAGACGCAGACCCACCACACTGACACCACTGAACATCCAGGG -AGT
H. bimaculatusHeb-5 TGGTGGTGGATTTCGGGAGACGCAGACCCACCACACTGACACCACTGAACATCCAGGG -AGT
* ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** **

          440          450          460          470          480          490
Rex1      |---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
C. labridensCil-2 GGATATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTAC -TGGTGTTCACCTGAACAATAAAATGGAC
C. labridensCil-3 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTGAACAATAAACTGGAC
C. labridensCil-1 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTGAACAATAAACTGGAC
C. labridensCil-4 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTGAACAATAAGACTGGAC
O. niloticusOrn-5 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTGAATAATAAACTGGAC
O. niloticusOrn-1 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTGAATAATAAACTGGAC
O. niloticusOrn-4 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTGAATAATAAACTGGAC
H. bimaculatusHeb-1 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTAAATAATAAGCTAGAC
H. bimaculatusHeb-2 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTAAATAATAAGCTAGAC
H. bimaculatusHeb-4 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTAAATAATAAGCTAGAC
H. bimaculatusHeb-5 GG-ACATTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTAAATAATAAGCTAGAC
** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** * ** **

          500          510          520          530          540
Rex1      |---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
C. labridensCil-2 TGGACTCACAACTTTCTTACAGAGGGTCAGACCATTTTGGGAGGGAAA
C. labridensCil-3 TGG-----ACTCA -ATCACTGATGCGC-----TCTACAGGAAGG-TC-
C. labridensCil-1 TGG-----ACTCGCAACTGATGCGC-----TTTACAGGAAGG-TC-
C. labridensCil-4 TGG-----ACTCATAACTGATGCGC-----TCTACAGGAAGGGTC-
O. niloticusOrn-5 TGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TT-ACAGGAAGG-TC-
O. niloticusOrn-1 TGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TTTACAGGAAGGGTC-
O. niloticusOrn-4 TGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TTTACAGGAAGG-TC-
H. bimaculatusHeb-1 TGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TTTACAGGAAGGTT-
H. bimaculatusHeb-2 TGG-----AGCCACAGCACTGATGCTC-----GTTACAGGAAGGGTC-
H. bimaculatusHeb-4 TGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TTTACAGGAAGGTT-
H. bimaculatusHeb-5 TGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----GTTACAGGAAGGGTC-
** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** **

```

ANEXO II: Alinhamento da seqüência *Rex3* de *C. kelberi* com as das demais espécies de ciclídeos da tabela 12, incluindo-se os gaps.

```

          10      20      30      40      50      60
Rex3      ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
O.niloticusOre3 TTTT-----TTTGGGAGTCAACACCACAGGAAAGTCCGACTTATTGCCGGCAATACGGAC
O.niloticusOre5 ---CCCATCTTTAAGAAGGGAGACCCGGAGGGTGTGTTCCAACACAGGGGG-TCACACTCCT
O.niloticusOre1 ---CCCATCTTTAAGAAGGGAGACCCGGAGGGTGTGTTCCAACACAGGGGGATCACACTCCT
O.niloticusOre4 ---CCCATCTTTAAGAAGGGGGACCCGGACGGTGTGTTCCAACATAGGGGGATCACACTCCT
C.labridensCic4 ---CCCATCTTTAAGAAGGGAGACCCGGAGGGTGTGCTCCAACCTTCGGGGGATCACACTAT
C.labridensCic2 ---CCCATCTTTAAGAAGGGAGACCCGGAGGGTGTGCTCCAACCT-TTCGGGGATCACACTCCT
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          70      80      90      100     110     120
Rex3      --|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
O.niloticusOre3 CAAGTCTCGCTGCGGTTGTACAGGGACTGAATGGCCCGCAACAATGGGCGAGACACCCCAT
O.niloticusOre5 CAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTGTGAAAGGAG-AGTTCGTCCTGTTAGTCGAA
O.niloticusOre1 CA-CCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTGTGAAAGGAG-AGTTCGTCCTGTTAGTCGAA
O.niloticusOre4 CAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTGTGAAAGGAG-AGTTCGTCCTGTTAGTCGAA
C.labridensCic4 CAGCCTCCCGGTAAGGTCTATGCCAGGGTGTGAAAGGAG-GGTGCGTCCGTTAGTCGAA
C.labridensCic2 CAGTCTCCCGGTAAGGTGTATGCCAAGGTGTGAAAGGAG-GGTGCGTCCGTTAGTCGAA
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          130     140     150     160     170     180
Rex3      |----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
O.niloticusOre3 ACTCCCG--CAGCACCTCCCA--CAGGATACCCCGAGGGAGCGGTGCAATG--CCTTCTCCA
O.niloticusOre5 CCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCCTGGTTCGCGGAACACTGGACCAGCTCTT
O.niloticusOre1 CCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCCTGGTTCGCGGAACACTGGACCAGCTCTT
O.niloticusOre4 CCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCCTGGTTCGCGGAACACTGGACCAGCTCTT
C.labridensCic4 CCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCCTGGTTCGCGGAACACTGGACCAGCTCTT
C.labridensCic2 CCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCCTGGTTCGCGGAATGCTGGACCAGCTCTT
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          190     200     210     220     230     240     2
Rex3      ---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
O.niloticusOre3 AGTCCACA--AAACACATGTAGACTGGATGGGCAAACTCCACGCACACT-CAAATATCCTC
O.niloticusOre5 TATCCTCTCAAGGATACTTGAGGGTGCATGGGAGTTTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTG
O.niloticusOre1 TATCCTCTCAAGGATACTTGAGGGTGCATGGGAGTTTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTG
O.niloticusOre4 TATCCTCTCAAGGATACTTGAGGGTGCATGGGAGTTTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTG
C.labridensCic4 TGTCCTCTCGAGGATATTCGAGTATGTGTGGGAGTTTGCCCAACCAGTCTACATGTGCTTTG
C.labridensCic2 TATCCTCTCAAGGATATTCGAGTGTGCGTGGAAAGTTTGCCCAACCAGTCTACATGTGCTTTG
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          260     270     280     290     300     310
Rex3      -|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
O.niloticusOre3 GAGA---GGATAAAGAGCTGGTCCAGTGTCCCGACCAGGACGAAAACCGCATTGTTCCCTCT
O.niloticusOre5 TGGACTTGAGAGAGGCATTTCGACC-GTGTCCCT---CGGGGTGTCTGTGGGAGGTGTTGCG
O.niloticusOre1 TGGACTTGAGAGAGGCATTTCGACC-GTGTCCCT---CGGGGTGTCTGTGGGAGGTGTTGCA
O.niloticusOre4 TGGACTTGAGAGAGGCATTTCGACC-GTGTCCCT---CGGGGTGTCTGTGGGAGGTGTTGCG
C.labridensCic4 TGGACTTGAGAGAGGCATTTCGACC-GCACCC-----A--TACTGCA
C.labridensCic2 TGGACTTGAGAGAGGCATTTCGACC-GTGTCCCT---CG-----GGTCTGCG
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          320     330     340     350     360     370
Rex3      ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
O.niloticusOre3 TGAATCTGAGGTTGACTAACAGAGGACCCCTCCTTCCAGCACCCCTGGCATAACCTTACCGG
O.niloticusOre5 GGAGTATGGGGT-TCTGGCCATTGCTACGGGCCATT-CGATCCCTAT-ACAACCGTTGCAA
O.niloticusOre1 GGAGTATGGGGT-TCTGGCCATTGCTACGGGCCATT-TGATCCCTAT-ACAACCGTTGCAA
O.niloticusOre4 GGAGTATGGGGTGTCTGGCCATTGCTACGGGCCATT-CGATCCCTAT-ACAACCGTTGCAA
C.labridensCic4 GGAGCATGGGGTGTCTGGCCCGTTGTTGGGGCCATT-CAGTCCCTGT-ACAACCGCAGTGA
C.labridensCic2 GGAGTATGGGGTGTCTGGCCCGTTGTTGAGGCCATT-CAGTCCCTGT-ACAACCGCAGTGA
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          380     390     400     410     420     430
Rex3      --|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
O.niloticusOre3 GGAGGCTGAGGAGTGTGATCCCCGATAGTTGGACACACCCTCCGGTCTCCCTCTTAAAGAT
O.niloticusOre5 G-AGTTTG---GTTTCGATGCGGCAATAA--GTCGAACTC--GT-TCCCGTGGGTGAT
O.niloticusOre1 G-AGTTTG---GTTTCGATGCTGGCAATAA--GTCGAACTC--GT-TTCTGGTGGGTGAT

```

```

O.niloticusOre4 G-AGCTTG----GTTCCGATTGCCGTCAATAA--GCTGGACTC--AT-TCCCGGTGGGTGAT
C.labridensCic4 G-AGCTTG----GTCGGTATAGCCAGCAATAA--GTCGGACTC--AT-TTCCTGTGGGTGTT
C.labridensCic2 G-AGCTTG----GTCCGTATAGCCAGTAATAA--GTCGGATTCC--GT-TTCCTGTGGGTGTT
* ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                440          450
                |----|----|----|----|
Rex3            GGGGACCACCACCCCGTTGAA
O.niloticusOre3 GGGCTC-----
O.niloticusOre5 GGGCTC-----
O.niloticusOre1 GGGCTC-----
O.niloticusOre4 GGGCTC-----
C.labridensCic4 GGACTC-----
C.labridensCic2 GGACTC-----
** *

```

ANEXO III: Alinhamento da seqüência *Rex6* de *C. kelberi* com as das demais espécies de ciclídeos da tabela 13, incluindo-se os gaps.

```

                10      20      30      40      50      60
Rex6            -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
C.labridensCla2 GGGAAATTCGGATTAAAAACATACTGGAGCTCCACAACCAAGTGCCTGGCATTATACCGGAAA
O.niloticusOni2 -----
O.nloticusOni1 -----
O.niloticusOni3 -----
C.labridensCla1 -----

                70      80      90      100     110     120
Rex6            -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
C.labridensCla2 CATTGTGCCGATGCTGGAAGGTCCCAGATCAAT---GGATACGCCCCCAAAGTG-TTGAG
O.niloticusOni2 -----CTGGAAGT-CCCGAGGTCAAAATGGGACACGCCCCCAAGGGTGGTTGAG
O.nloticusOni1 -----CTGGAAGT-CCTGAGGTCAAAATGGGAGACGCCCCCAAGGGTGGTTGAG
O.niloticusOni3 -----CTGGAAGT-TCCGAGGTCAAAATGGGAGACGCCCCCAAGGGTGGTTGAG
C.labridensCla1 -----CTGGAAG-CCCAAGATCAAAGTGGGACACGCCCCACAGGGGTGATGGAG
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                130     140     150     160     170     180
Rex6            -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
C.labridensCla2 A-CAACGAGGCTAAGATC-TGTGGGA-TTCCAGATACAGACAGATAGACTTGTGATGGCGAA
O.niloticusOni2 AATAACCAAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATATAGACGCACAAAATGGTGGTGGCTAA
O.nloticusOni1 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATACAGACAGACAAAATGCTGGTGGCTAA
O.niloticusOni3 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATACAGACAGACAAAATGGTGGTGGCTAA
C.labridensCla1 AATGACTGAGCTAAGACCCCTGAGGGTCTTC-AGATACAGATGGACAAAATGGTGGTGGCTAA
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                190     200     210     220     230     240     2
Rex6            -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
C.labridensCla2 CCAACCGGACATCGTAGTGGTGGACAAACAAGGGAAGACAGTCTGATGATAGACGTTGCGA
O.niloticusOni2 CCAACCGGACATCGTAGTGGTGGACAAACAAGGGAAGAAAGTCTGATGATAGACATGCAAA
O.nloticusOni1 CCAACCGGACATAGTGGTGGAGAGAAACAGAAAGATGGCTGTAGTGTAGATGTAGCAG
O.niloticusOni3 CCAACCGGACATAGTGGTGGTAGACAAACAGAAAGACGCGCTGATGATCGATGTAGCGG
C.labridensCla1 CCAACCGGACAT---CGTAGT-----TCCGTAGTGTAGACGTAGCAA
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                260     270     280     290     300     310
Rex6            -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
C.labridensCla2 TACCAAGTGACGGCAACATCAGGAAGAAGGAACATGAGAAGCTTGATAAATACCAAGGGCTC
O.niloticusOni2 TACCAAGTGACAGGAACATCAAGAAAGGAAGAACACGAGAAGCTTGATAAATACCTAGGGCTC
O.nloticusOni1 TTCCGAATGACAGCAACAT-AGAAAGAAGGAACACGAGAAGCTGGAGAAAATACCAAGGGCTC
O.niloticusOni3 TTCCGAATGACAGCAACATCAGGAAGAAGGAACACGAGAAGCTGGAGAAAATGCAAGGGCTC
C.labridensCla1 TACCAAGTGACAGGAACATCAAGACGAAAGGAACACGAGAAGCTG-----CCAAGGGCTG
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                320     330     340     350     360     370
Rex6            -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
C.labridensCla2 AGAGAAGAACTGGAAAGGATGTGGAAATGAAGGTGACAGTGGTCCCGTGGTAATCGGAAC
O.niloticusOni2 AGAGAAGAACTCGAGAGGACGTGGAGGGTGAAGGTAACGGTGGTCCCGTGGTAATCGGAGC
O.nloticusOni1 AGAGAAGAACTCGAGAGGATGTGGAGGGTGAAGGTAACGGTGGTCCCGTGGTAATCGGAGC

```



```

O.niloticusOni3 AGAGAAGAGCTTGAGAAGATGTGGAGGTGAAGGTGACGGTGGTCCCAGTGGTAAATCAGAAC
C.labridensCla1 AGAGAAGAGCTAGAGAGGATGTGAAAGGTGAAGGCAACAGTGGTCCCCGTGGTAAATCAGAAC
*****

          380       390       400       410       420       430
Rex6          |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ACTCGGGGCGAGTGACCCCAA-----GTGGCTACAGCAGATTCTTGGAAATAACATCTG
C.labridensCla2 ACTCGGGGCGAGTGACCCCAAAGTTGGGAGAGTGGCTCCAGCAGATTCTTGGAAACAACATCCG
O.niloticusOni2 ACTAGGTGCGGTGACTCCCAAGCTAGGCGAGTGGCTCCAGCAGATCCCGGGAACGACATCCG
O.nloticusOni1  ACTAGGTGCGAGTGACCTCCAAGCTAATCAAGTGGCTCCAGCAGATCCCAAGGATCAACATCCG
O.niloticusOni3 ACTAGGTGTGTTGACTCCCAAGCTAGACGAGTGGCTCCAGCAGATCCCAAGGAAACAACATTGG
C.labridensCla1 CCTCGAGGCAATGACCCCAAACACTAGAACAGTGGTCCAGGAGATTCCAGGAAACGACATCCG
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          440       450       460       470       480       490
Rex6          |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AGATCTCTGTCCAGAAGAGCGCAATACTGGGAACAGCTAAGATACTGTGCAGGACCCCTCAAG
C.labridensCla2 AGATCTCTGTCCAGAAGAGCGCAATACTGGGAACAGCTAAGATACTGTGCAGGACCCCTCAAG
O.niloticusOni2 AGATCTCTGTCCAGAAGAGCGCAGTCTGGGAACAGCTAAGATACTGTGCAGGACCCCTCAAG
O.nloticusOni1  AGATCTCTGTCCAGAAGAGCGCAGTCTTAGGAACAGTTAAGATACTGTGCAGGACCCCTCAAG
O.niloticusOni3 AGATCTCTGTCCAGAAGAGTGCAGTCTGGGAAAAGCTAAGATACTGTGCAGGACCCCTCAAG
C.labridensCla1 AGATCTCTGTCCAGAAGAGCGCAGTCTTAGGAACGGCTAAGATACTGTGCAGGACCCCTCAAG
*****

          500       510       520       530       540       550       5
Rex6          |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CTCCAGGCTCTGGTAGAGGACCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCA
C.labridensCla2 CT-----
O.niloticusOni2 C-----
O.nloticusOni1  CT-----
O.niloticusOni3 CT-----
C.labridensCla1 CT-----
*

          60       570       580       590       600       610       620
Rex6          |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCCACCTAAATA
C.labridensCla2 -----
O.niloticusOni2 -----
O.nloticusOni1  -----
O.niloticusOni3 -----
C.labridensCla1 -----

          630
Rex6          |-----|-----|-----|
GCTTGGCGTATCAA
C.labridensCla2 -----
O.niloticusOni2 -----
O.nloticusOni1  -----
O.niloticusOni3 -----
C.labridensCla1 -----

```

ANEXO IV: Alinhamento da sequência *Rex1* de *C. kelberi* com as das demais espécies de peixes da tabela 11, incluindo-se os gaps.

```

          10       20       30       40       50       60
Rex1          |-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CCTCTATCACATTATTTCTGAGGGACAA-GCTGGAGCTGTCAGGAG--TGGACCACCACATG
C.labridensCil-2 -ATCCAGC-CAGGACTTGTGAGGGACAA-GTCTGAGTTGTCAGGAG--TGGACAACCACATG
C.labridensCil-3 -ATCCAGC-CAGGACTTCTGAGGGACAA-GTGGGAGTTGTCAGGAG--TGGACAACCACATG
C.labridensCil-1 -ATCCAGC-CAAGACTTCTGAGGGACAA-GCTGGAGCTGTCAGGAG--TGAACCACCACATG
C.labridensCil-4 -ATCCAGC-CAGGACTTCTGAGGGACAA-GTTGGAGTTGTCAGGAG--TGGACAACCACATG
O.niloticusOrn-5 -ATCCAGC-CACGACTTCTGAGGGACAA-GCTAGAGCTATCGGGAG--TGGACCACCACATG
O.niloticusOrn-1 -ATCCAGC-CACGACTTCTGAGAGACAA-GCTGGAGCTATCGGGAG--TGGACCACCACATG
O.niloticusOrn-4 -ATCCAGC-CACGACTTCTGAGAGACAA-GCTGGAGCTATCGGGAG--TGGACCACCACATG
H.bimaculatusHeb-1 -ATCCAGC-CACAACTCCTGAGAGACAA-GCTGGAGCTATCAGGAG--TTGACCACCACATG
H.bimaculatusHeb-2 -ATCCAGC-CACGACTCCTGAGAGACAA-GCTGGAGCTATCCGGAG--TGGACCACCACATG
H.bimaculatusHeb-4 -ATCCAGC-CACGACTCCTGAGAGACAA-GCTGGAGCTATCCGGAG--TGGACCACCACATG
H.bimaculatusHeb-5 -ATCCAGC-CACAACTCCTGAGAGACAA-GCTGGAGCTATCAGGAG--TGGACCACCACATG
A.japonicaAnj-1 -ATACAGC-CTGCGCTTCTGAGGGACAA-GTTGGACCACAGGGG--TGGACCACCACCTC
A.japonicaAnj-2 -ATACAGC-CTATGCTTCTGAGGGACAA-GTTGGAGCGCACAGGGG--TGGACCACCACCTC
A.japonicaAnj-3 -ATACAGC-CTGCGCTTCTGAGGGACAA-GTTGGACCACAGGGG--TGAACCACCACCTC
T.newnesiRex1-lb -ATCCAGC-CCCCGCTCTGGGGGACAA-GCTGCAGCTC-TCGGGGG-TGGATCACCACCTT
T.newnesiRex1-la -ATCCAGC-CCCCGCTCTGGGGGACAA-GCTGCAGCTC-TCGGGGG-TGGATCACCACCTC
A.anguillaAna -ATACAGC-CTGCGCTTTTGGAGGGACAA-GTTGGACCACAGGGG--TGAACCACCACCTC
N.coriiicepsRex1b -ATCCAGC-CCCCGCTCTGGGGGACAA-GCTGCAGCTC-TCGGGGG-TGGATCACCACCTC

```

N. coriicepsRexla --ATCCAGC-CCCTGCTCCTGGGGGACAA-GCTGCAGCTC-TCGGGGG-TGGATCACCACCTC
 G. acuticepsRexla --ATCCAGC-CCCCGCTCCTGGGGGACAA-GCTGCAGCTC-TCGGGGG-TGGATCAACACCTC
 G. acuticepsRex1b -----GGATCA-----C-----CACCTC
 D. mawsoniRex1b -----ACAAGGCTGCAGCTGGTTCGGGGGGTGGATCACCACCTC
 D. mawsoniRex1b -----C-CCCCTCCCGGGGACMA--GCTGCAGCTA-TCGGGGG-TGGACTACTACCTC
 B. baikalensisorf12 -----TTGCTTCTGAGGGACAA-GCTGGAGCAGACCGGGG--TGGACCACACCTC
 B. baikalensisBab-1 --ATTCAGC-CTTTGCTTCTGAGGGACAA-GCTGGAGCAGACCGGGG--TGGACCACACCTC
 B. baikalensisBab-2 --ATTCAGC-CTTTGCTTCTGAGGGACAA-GCTGGAGCAGACCGGGG--TGGACCACACCTC
 O. latipesOrl-2 --ATTCAGC-CGCTGCTCCTGAGGGACAA-GTTGGTGCACATGGGCG--TGGACCAGCATCTG
 O. latipesOrl-4 --ATTCAGC-CGCTGCTCCTGAGGGACAA-GTTGGTGCACATGGGCG--TGGACCAGCATCTG
 * * *

70 80 90 100 110 120
 --|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
 Rex1 TCCAGTGGATACTGGACTACCTCACTGG-CGCCCACAGTATGTGAG-ACACAGGGCTGTGT
 C. labridensCil-2 TCCAGTGGATACTGGACTACCTCACTGACC GCCCACAGTACGTGAGGACACAGGGCTGTGT
 C. labridensCil-3 TCCAGTGGATACTGGACTACCTCACTGACC GCCCACAGTACGTGAGGTCACAGGGCTGTGT
 C. labridensCil-1 TCCACTGGATACTGGACTACCTCACTGACTGCCACAGTACGTGAGGACACAGGGCTGCGT
 C. labridensCil-4 TCCAGTGGATACTGGACTGCCTCACTGACC GCCCACAGTACGTGAGGACACAGGGCTGTGT
 O. niloticusOrn-5 TCCAGTGGATACTGGACTACCTCACAGAACGCCACAGTATGTGAGGTCACAGGGCTGTGT
 O. niloticusOrn-1 TCCAGTGGATACTGGACTACCTCACAGAACGCCACAGTATGTGAGGTCACAGGGCTGTGT
 O. niloticusOrn-4 TCCTAGTGGATACTGGACTACCTCACAGAACGCCACAGTATGTGAGGTCACAGGGCTGTGT
 H. bimaculatusHeb-1 TCCCATGGATATTGGACTACCTCACAGAACGCCACAGTATGTGAGGTCACAGGGCTGTGT
 H. bimaculatusHeb-2 TCCCATGGATATTGGACTACCTCACAGAACGCCACAGTATGTGAGGTCACAGGGCTGTGT
 H. bimaculatusHeb-4 TCCCATGGATATTGGACTACCTCACAGAACGCCACAGTATGTGAGGTCACAGGGCTGTGT
 H. bimaculatusHeb-5 TCCCATGGATATTGGACTACCTCACAGAACGCCACAGTATGTGAGGTCACAGGGCTGTGT
 A. japonicaAnj-1 ACAGCATGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTATGTGAGGATACAGGACTGTGA
 A. japonicaAnj-2 ACAGCATGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTATGTGAGGATACAGGGCTGTGA
 A. japonicaAnj-3 ACAGCATGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTATGTGAGGATACAGGACTGTGA
 T. newnesiRex1-1b ACCTCCTGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTATGTGAGGACACAGGAGTGTCA
 T. newnesiRex1-1a ACCTCCTGTATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTACGTGAGGACACAGGAGTGTCA
 A. anguillaAna ACAGCATGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTATGCGAGGATACAGGACTGTGA
 N. coriicepsRex1b ACCTCCTGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTACGTGAGGACACAGGAGTGTCA
 N. coriicepsRexla ACCTCCTGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTACGTGAGGACACAGGATTGTCA
 G. acuticepsRexla ACCTCCTGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTACGTGAGGACACAGGAGTGTCA
 G. acuticepsRex1b ACCTCCTGGATCCTGG---ACCTCACAAACGCCACAGTACGTGAGGACACAGGAAATGTCA
 D. mawsoniRex1b ACCTCCTGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTACGTGAGGACACAGGAGTGTCA
 D. mawsoniRex1b ACCTCCTGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTACATGAGGACACAGGAGTGTCA
 B. baikalensisorf12 ACCTCCTGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTATGTGCGGATACGGGACTGTGA
 B. baikalensisBab-1 ACTGCATGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTATGTGCGGATACGGGAGTGTGA
 B. baikalensisBab-2 ACTGCATGGATCCTGGACTACCTCACAAACGCCACAGTATGTGCGGATACGGGAGTGTGA
 O. latipesOrl-2 TCTGCATGGATGCTGGACTACCTCTCAAACGCCAGGACAGTACGTGAGGTCCTGCCACTGTGA
 O. latipesOrl-4 TCTGCATGGATGCTGGACTACCTCTCAAACGCCAGTACGTGAGGTCCTGCCACTGTGA
 *

130 140 150 160 170 180
 |---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
 Rex1 CTCC-ACAGGCTGGTCTGCA-TACTGGGGCC-CCAGGGAAGTGTGCTGGCACCCTTCCTCT
 C. labridensCil-2 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACGGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGGCACCGTTCCCTCT
 C. labridensCil-3 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACGGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGGCACCGTTCCCTCT
 C. labridensCil-1 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACGGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGGCACCGTTCCCTCT
 C. labridensCil-4 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACGGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGGCACCGTTCCCTCT
 O. niloticusOrn-5 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACGGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGGCACCGTTCCCTCT
 O. niloticusOrn-1 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACGGGGGCCCC-ACAGGGAAGTGTGCTGGCACCGTTCCCTCT
 O. niloticusOrn-4 CTCTGATACACTGGTCTGCAGTACAGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGGCACCGTTCCCTCT
 H. bimaculatusHeb-1 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACGGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGGCACCGTTCCCTCT
 H. bimaculatusHeb-2 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACAGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGACACTGTTCCCTCT
 H. bimaculatusHeb-4 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACAGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGGCACTGTTCCCTCT
 H. bimaculatusHeb-5 CTCTGACAGGCTGGTCTGCAGTACGGGGGCCCCACAGGGAAGTGTGCTGGCACCGTTCCCTCT
 A. japonicaAnj-1 GTCCGACACCGTTGTCTGCAGCAGGGGGTCTGG-----GGTTTGTCTCCCTTCCCTCT
 A. japonicaAnj-2 GTCCAAATGGTTGTCTGCAGCAGGGGGCCCCGAGGGAACAGTTCTGGCTCCCTTCCCTCT
 A. japonicaAnj-3 GTCCGACATGGTTGTCTGCAGCAGGGGGCCCCGAGGGAACAGTTCTGGCTCCCTTCCCTCT
 T. newnesiRex1-1b ATCAGACACCATCATCAGCAGTAAGGGGGCCCCACAGGGGACCGTGTGGCACCGTTCCCTCT
 T. newnesiRex1-1a ATCAGACACCATCATCAGCAGTACGGGGGCCCCAGGGGACCGTGTGGCACCGTTCCCTCT
 A. anguillaAna GTCCGACAAAGTTGTCTGCAGCAGGGGGTCTGG-----GTTCTGGCTCCCTTCCCTCT
 N. coriicepsRex1b ATCAGACACCATCATCAGCAGTACGGGGGCCCCAGGGGACCGTGTGGCACCGTTCCCTCT
 N. coriicepsRexla ATCAGACACCATCATCAGCAGTACAGGGGCCCCAGGGGACCGTGTGGCACCGTTCCCTCT
 G. acuticepsRexla ATCAGACACCATCATCAGCAGTACGGGGGCCCCAGGGGACCGTGTGGCACCGTTCCCTCT
 G. acuticepsRex1b ATCAGACACCATCATCAGCAGTACGGGGGCCCCAGGGGACCGTGTGGCACCGTTCCCTCT
 D. mawsoniRex1b ATCAGACACCATCATCAGCAGTACGGGGGCCCCAGGGGACCGTGTGGCACCGTTCCCTCT
 D. mawsoniRex1b ATCAGACACCATCATCAGCAGTACGGGGGCCCCAGGGGACCGTGTGGCACCGTTCCCTCT
 B. baikalensisorf12 GTCAGATCGGGTGTCTGTCAGCAGGGGGCTCCACAGGGAACCGTTCTGGCTCCATTCCCTGT
 B. baikalensisBab-1 GTCAGATCGGGTGTCTGTCAGCAGGGGGCTCCACAGGGAACCGTTCTGGCTCCATTCCCTGT
 B. baikalensisBab-2 GTCAGATCGGGTGTCTGTCAGCAGGGGGCTCCACAGGGAACCGTTCTGGCTCCATTCCCTGT
 O. latipesOrl-2 GTCTGACATGATGCTTAAACACAGGAGCACCGCAGGGAACAGTTCTGGCTCCCTGCTGT
 O. latipesOrl-4 GTCAGATATGATGCTGTAACACAGGAGCACCGCAGGGAACAGTTCTGGCTCCCTGCTGT
 *

```

190      200      210      220      230      240      2
---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
Rexl    TCACC-TCTACACTGCATACTTCTCCATCAACTCCCCAC-CTGGCATCTACAGAAATTCTCT
C. labridensCil-2 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCACCACGCTGCCATCTGCAGAAGTTCTCT
C. labridensCil-3 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCCCCACGCTGCCATCTGCAGAAGTTCTCT
C. labridensCil-1 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCCCCACGCTGCCATCTGCAGACGTTCTCT
C. labridensCil-4 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCACCACGCTGCCATCTGCAGAAGTTCTCT
O. niloticusOrn-5 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCCCCACGCTGCCACCTACAGAAGTTCTCT
O. niloticusOrn-1 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCCCCACGCTGCCACCTACAGAAGTTCTCT
O. niloticusOrn-4 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCCCCACGCTGCCACCTACAGAAGTTCTCT
H. bimaculatusHeb-1 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCCCCACGCTGCCACCTACAGAAGTTCTCT
H. bimaculatusHeb-2 TCACCCCTTACACTGCAGAAATCTTCATCAACTCCCCACGCTGCCACCTACAGAAGTTCTCT
H. bimaculatusHeb-4 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCCCCACGCTGCCACCTACAGAAGTTCTCT
H. bimaculatusHeb-5 TCACCCCTTACACTGCAGACTTCTCCATCAACTCCCCACGCTGCCACCCACAGAAGTTCTCT
A. japonicaAnj-1    TCACCCCTTACACTGCAGACATCACACACAACCTCAGTAACTGCCACCTGCAAAAAGTTCTCT
A. japonicaAnj-2    TCACCCCTTACACTGCAGACTTTCACGCACAACCTCAGTAACTGCCACCTGCAAAAAGTTCTCT
A. japonicaAnj-3    TCACCCCTTACACTGCAGACTTTCACGCACAACCTCAGTAACTGCCACCTGCAAAAAGTTCTCT
T. newnesiRexl-1b   TCACCCCTTACACTGCAGACTTTCACCCACAACACTGCAACTGTCACCTGCAGAAGTTCTCT
T. newnesiRexl-1a   TCACCCCTTACACTGCAGACTTTCACCCACAACACTGCAACTGTCACCTGCAGAAGTTCTCT
A. anguillaAna      TCACCCCTTACACTGCAGACATCACACACAACCTCAGTAACTGCCACCTGCAAAAAGTTCTCT
N. coriicepsRexlb   TCACCCCTTACTCTGCAGACTTTCACCCACAACACTGCAACTGTCACCTGCAGAAGTTCTCT
N. coriicepsRexla   TCACCCCTTACTCTGCAGACTTTCACCCACAACACTGCAACTGTCACCTGCAGAAGTTCTCT
G. acuticepsRexla   TCACCCCTTACACTGCAGACTTTCACCCACAACACTGCAACTGTCACCTGCAGGAGTTCTCT
G. acuticepsRexlb   TCACCCCTTACACTGCAGACTTTCACCCACAACACTGCAACTGTCACCTGCAGAAGTTCTCT
D. mawsoniRexlb     TCACCCCTTACACTGCAGACACCCACCAACACTGCAACTGTCACCTGCAGAAGTTCTCT
D. mawsoniRexlb     TCACCCCTTACACTGCAGACTTTCACCCACAACACTGCAACTGTCACCTGCAGAAGTTCTCT
B. baikalensisorf12 TCTCCATTTACACTCGGACTTTAAACACAACCTTGCCTGCAACTGCCACCTGCAAAAAGTTCTCT
B. baikalensisBab-1 CCTCCATTTACACTCGGACTTTAAACACAACCTTGCCTGCAACTGCCACCTGCAAAAAGTTCTCT
B. baikalensisBab-2 CCTCCATTTACACTCGGACTTTAAACACAACCTTGCCTGCAACTGCCACCTGCAAAAAGTTCTCT
O. latipesOrl-2     TCACCTGTCTACACCGCAGACTTTCATGTCCAGCTCAGCATCTGTCACCTGCAGAAGTTCTCA
O. latipesOrl-4     TCACCTGTCTACACCGCAGACTTTCATGTCCAGCTCAGCATCTGTCACCTGCAGAAGTTCTCG
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                50      260      270      280      290      300      310
-|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
Rexl    GACGACTCTGCCATA-TCGGGCTCATCAGGATGAGGATGACT-CGAGTACAGACAG-----
C. labridensCil-2 GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
C. labridensCil-3 GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGATTACTCGGAGTACAGACAG-----
C. labridensCil-1 GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGATGAGGATGAGGACGAGTACAGACAG-----
C. labridensCil-4 GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
O. niloticusOrn-5 GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
O. niloticusOrn-1 GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
O. niloticusOrn-4 GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
H. bimaculatusHeb-1 GACGACTCTGCCATAGTTCGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
H. bimaculatusHeb-2 GACGACTCTGCCATAGTTCGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
H. bimaculatusHeb-4 GACGACTCTGCCATAGTTCGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
H. bimaculatusHeb-5 GACGACTCTGCCATAGTTCGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
A. japonicaAnj-1    GATGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
A. japonicaAnj-2    GATGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
A. japonicaAnj-3    GATGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
T. newnesiRexl-1b   GATGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
T. newnesiRexl-1a   GATGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
A. anguillaAna      GATGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
N. coriicepsRexlb   GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
N. coriicepsRexla   GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
G. acuticepsRexla   GATGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
G. acuticepsRexlb   GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
D. mawsoniRexlb     GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
D. mawsoniRexlb     GACGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
B. baikalensisorf12 GACGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
B. baikalensisBab-1 GACGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
B. baikalensisBab-2 GACGACTCTGCAATCATCGGCCTCATCAGATGGGGATGACAGGGAGTACAGAGAT-----
O. latipesOrl-2     GATGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
O. latipesOrl-4     GATGACTCTGCCCTAGTTGGCCTCATAACAGGTGAGGACGACTCAGAGTACAGACAG-----
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                320      330      340      350      360      370
----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
Rexl    ----TGGACTCAGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCTGATCAATGCTGCTT
C. labridensCil-2  ----AGGACTCAGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCTGATCAACGGTCTTA
C. labridensCil-3  ----AGGACTCAGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCTGATCAATGCTGCTA
C. labridensCil-1  ----TGGACTCAGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCTGATTAACGCTGCTA
C. labridensCil-4  ----AGGACTCAGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCTGATCAACGGTCTTA
O. niloticusOrn-5  ----TGGACTCTGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCCACCTGCTGATCAACCGGGGA
O. niloticusOrn-1  ----TGGACTCTGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCCACCTGCTGATCAACCGGGGA
O. niloticusOrn-4  ----TGGACTCTGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCCACCTGCTGATCAACCGGGGA
H. bimaculatusHeb-1 ----TGGACTCTGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCCACCTGCTGATCAATGCTGGGA
H. bimaculatusHeb-2 ----TGGACTCTGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCCACCTGCTGATCAACCGGGGA

```

H.bimaculatusHeb-4 ----TGGACTCTGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCACTGCATCAACACCGGGA
H.bimaculatusHeb-5 ----TGGATCTGGACTTTGTGGACTGGTGCCAGCAGAACCACTGCATCAACGCGCGGGA
A.japonicaAnj-1 ----CTGACACAGGGCTTTGTGGACTGGTGCCAGCTGAACCCGCTCCAGCTCAATGCAGGGA
A.japonicaAnj-2 ----CTGACCCAGGGCTTTGTGGATTGGTGCCAGTGGAACTGCCTCCAGCTCAATGCAGGGA
A.japonicaAnj-3 ----CTGACCCAGGGCTTTGTGGATTGGTGCCAGTGGAACTGCCTCCAGCTCAATGCAGGGA
T.newnesiRexl-1b ----CTGACGCAGGACTTACCCCTCTGGTGCCAGAGGAACCACCTCCGGCTCAACGCAGCGA
T.newnesiRexl-1a GGAGCTGACGCAGGACTTACCCCTCTGGTGCCAGAGGAACCACCTCCAGCTCAACGCAGCAA
A.anguillaAna ----CTGACCCAGGGCTTTGTGGACTGGTGCCAGCTGAACCCGCTCCAGCTCAATGCAGGGA
N.coriiicepsRex1b ----CTGACGCAGGACTTACCCCTCTGGTGCCAGAGGAACCACCTCCAGCTCAACGCAGCGA
N.coriiicepsRex1a ----CTGACGCAGGACTTACCCCTCTGGTGCCAGAGGAACCACCTCCAGCTGAATGCAGCGA
G.acuticepsRex1a ----CTGACGCAGGACTTACCCCTCTGGTGCCAGAGGAACCACCTCCAGCTGAACAGCAGCGA
G.acuticepsRex1b ----CTAACGCAGGACTTACCCCTCTGGTGCCAGAGGAACCACCTCCAGCTAAACGCAGCAA
D.mawsoniRex1b ----CTGACGCAGGACTTACCCCTCTGGTGCCAGAGGAACCACCTCCAGCTCAACGCAGCGA
D.mawsoniRex1a ----CTGACGCAGGACTTACCCCTCTGGTGCCAGAGGAACCACCTCCAGCTCAACGCAGCGA
B.baikalensisorf12 ----CTTAATCAGGACTTTTAGGATGGTGCCAGCGGAACCGCTCCAGATAAACTCCAGTA
B.baikalensisBab-1 ----CTTAATCAGGACTTTTAGGATGGTGCCAGCGGAACCGCTCCAGATAAACTCCAGTA
B.baikalensisBab-2 ----CTTAATCAGGACTTTTAGGATGGTGCCAGCGGAACCGCTCCAGATAAACTCCAGTA
O.latipesOrl-2 ----CTGATTGAGAACTTTGTGGACTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCAGATTAAATGCAGGGA
O.latipesOrl-4 ----CTGATTGAGAACTTTGTGGACTGGTGCCAGCGGAACCACCTCCAGATTAAATGCAGGGA

* *

380 390 400 410 420 430

Rex1
AAAC-AAGGAGCTTGTGGTGGATTTCGCGAGGTGCAGACCCAAC---ACACTGAACCCGGTTA
C.labridensCil-2 AAACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTCGCGAAGCGCAGACCCACC---ACACTGGCACCGGTG
C.labridensCil-3 AAACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTCAGACGGCGCAGACCCACC---ACACTGACACCCGGTG
C.labridensCil-1 AAACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTCGCGAGGCGTGACCCACC---ACACTGACACCCGGTG
C.labridensCil-4 AAACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTCGCGAAGCGCAGACCCACC---ACACTGGCACCGGTG
O.niloticusOrn-5 AAACCAAGGAGTTGGTGGTGGACTTCCGGAGACGCAGACCCACC---ACACTGACACCCGGTG
O.niloticusOrn-1 AAACCAAGGAGTTGGTGGTGGACTTCCGGAGACGCAGACCCACC---ACACTGACACCCGGTG
O.niloticusOrn-4 AAACCAAGGAGTTGGTGGTGGACTTCCGGAGACGCAGACCCACC---ACACTGACACCCGGTG
H.bimaculatusHeb-1 AAACCAAGGAGTTGGTGGTGGATTTCGCGAGACGCAGACCCACC---ACACTGACACTGGTA
H.bimaculatusHeb-2 AAACCAAGGAGTTGGTGGTGGATTTCGCGAGATGCAGACCCACC---ACACTGACACCCGGTA
H.bimaculatusHeb-4 AAACCAAGGAGTTGGTGGTGGATTTCGCGAGACGCAGACCCACC---ACACTGACACCCAGTG
H.bimaculatusHeb-5 AAACCAAGGAGTTGGTGGTGGATTTCGCGAGACACAGACCCACC---ACACTGACACCCAGTG
A.japonicaAnj-1 AAACCAAGCAGCTGGTGGTGGCTTCCGAAGGTGTAAACACTTCTCTCTCCCATACCAGTG
A.japonicaAnj-2 AAACCAAGGAGCTGGTGGTGGACTTCCGAAGGTGCCAACACTCT---CCTCTATACCAGTG
A.japonicaAnj-3 AAACCAAGGAGCTGGTGGTGGACTTCCGAAGGTGCCAACACTCG---CCTCTATACCAGTG
T.newnesiRexl-1b AGACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTCAGACGGCGCCAACACTCC---CCCCGACACCAGTG
T.newnesiRexl-1a AGACCAAGGAACTGGTGGTGGACTTTCAGACGGCGCACAACACTCC---CCCCGACACCAGTG
A.anguillaAna AAACCAAGGAGCTGGTGGTGGACTTCCGAAGGTGTAAACACTTCTCTCTCCCATACCAGTG
N.coriiicepsRex1b AGACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTCAGACGGCGCACAACACTCC---CCCCGACACCAGTG
N.coriiicepsRex1a AGACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTCAGACGGCGCACAACACTCC---CCCCGACACCAGTG
G.acuticepsRex1a AGACCAAGGAGCTGGTGGTGGATTTCAGACGGCGCACAACACTCC---CCCCGACACCAGTG
G.acuticepsRex1b AGACCAAGGAACTGGTGGTGGACTTTCAGACGGCGCACAACACTCC---CCCCGACACCAGTG
D.mawsoniRex1b AGACCAAGGAACTGGTGGTGGATTTCAGACGGCGCACAACACTCC---CCCCGACACCAGTG
D.mawsoniRex1a AGACCAAGGAACTGGTGGTGGATTTCAGACGGCGCACAACACTCC---CCCCGACACCAGTG
B.baikalensisorf12 AGACCAAGGAGCTGGTGGTGGACTTCCGCGGGGCAAACGCTCT---CCTCCGCTACCATTTG
B.baikalensisBab-1 AGACCAAGGAGCTGGTGGTGGACTTCCGCGGGGCAAACGCTCT---CCTCCGCTACCATTTG
B.baikalensisBab-2 AGACCAAGGAGCTGGTGGTGGACTTCCGCGGGGCAAACGCTCT---CCTCCGCTACCATTTG
O.latipesOrl-2 AAACCAAGGAGCTGGTGGTAGACTTTACAGGCACACTCACTCT---ACAATAGCACCAGTG
O.latipesOrl-4 AAACCAAGGAACCGGTGGTGGACTTTCACAGGCACACTCACTCT---ACAATAGCACCAGTG

440 450 460 470 480 490

Rex1
AAATTCAGGG-AGTGA-TATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTAC-TGGGTGTTACCTT
C.labridensCil-2 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
C.labridensCil-3 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
TACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
C.labridensCil-1 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
C.labridensCil-4 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
O.niloticusOrn-5 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
O.niloticusOrn-1 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
O.niloticusOrn-4 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
H.bimaculatusHeb-1 AACATCCAGGG-AGAGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
H.bimaculatusHeb-2 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
H.bimaculatusHeb-4 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
H.bimaculatusHeb-5 AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATAGTGGACTCTTATAAGTACCTGGGTGTTACCTT
A.japonicaAnj-1 AACATCCAGGG-AATGG--ACATTTGAGATGGTGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT
A.japonicaAnj-2 AACATCCAGGGGAATGGTGAATTTGAGATGGTGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT
A.japonicaAnj-3 AACATCCAGGG-AATGG--AAATTTGAGATGGTGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT
T.newnesiRexl-1b AACATCCAGGG-AGTGG--ACATTTGAGATTTGGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT
T.newnesiRexl-1a AACCTCCAGGG-AGCGG--ACATTTGAGATTTGGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT
A.anguillaAna AACATCCAGGG-AGCAG--ACATTTGAGATTTGGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT
N.coriiicepsRex1b AACATCCAGGG-AGCAG--ACATTTGAGATTTGGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT
N.coriiicepsRex1a AACATCCAGGG-AGCAG--ACATTTGAGATTTGGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT
G.acuticepsRex1a AACATCCAGGG-AGCTG--ACATTTGAGATTTGGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT
G.acuticepsRex1b AACATCCAGGG-AGCGG--TCATTTGAGATTTGGAATCTTACAAGTACCTGGGTGTTACCTT

```

D.mawsoniRex1b AACATCCAGGG-AGCAG--ACATTGAGATTGTGAAATCTTACAAATACCTGGGTGTTCATCT
D.mawsoniRex1b AACATCCAGGG-AACGG--ACATTGAGATTGTGAAATCTTACAAATACCTGGGTGTTCATCT
B.baikalensisorf12 AGCATCCAGGG-ACTGG--ACATTGAGATGGTGACATCTTACAAGTACCTGGGTGTTCACTT
B.baikalensisBab-1 AGCATCCAGGG-ACTGG--ACATTGAGATGGTGACATCTTACAAGTACCTGGGTGTTCACTT
B.baikalensisBab-2 AGCATCCAGGG-ACTGG--ACATTGAGATGGTGACATCTTACAAGTACCTGGGTGTTCACTT
O.latipesOrl-2 AACATCCAAGG-AAGGG--ACATAGAGAGAGTGGATTTCATACAAGTACTTGGGTGTTCACCT
O.latipesOrl-4 AACATCCTAGG-AAGGG--ACATTGAGAGAGTGGATTTCATACAAGTACTTGGGTGTTCACCT
    * *      * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

          500      510      520      530      540      550      5
    ---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
Rex1
C.labridensCil-2 GAACAATAAAATGGACTGGACTCACAA-CCTTTCCTTACAGAGGGTACAGACCATTTTGGGG
C.labridensCil-3 GAACAATAAACTGGACTG-----ACTCA-ATCACTGATGCGC-----TCTACAGGA
C.labridensCil-1 GAACAATAAACTGGACTGG-----ACTCACAACACTGATGCGC-----TTTACAGGA
C.labridensCil-4 GAACAATAGACTGGACTGG-----ACTCATAACACTGATGCGC-----TCTACAGGA
O.niloticusOrn-5 GAATAATAAACTGGACTGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TT-ACAGGA
O.niloticusOrn-1 GAATAATAAACTGGACTGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TTTACAGGA
O.niloticusOrn-4 GAATAATAAACTGGACTGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TTTACAGGA
H.bimaculatusHeb-1 AAATAATAAGCTAGACTGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TTTACAGGA
H.bimaculatusHeb-2 AAATAATAAGCTAGACTGG-----AGCCACAGCACTGATGCTC-----GTTACAGGA
H.bimaculatusHeb-4 AAATAATAAGCTAGACTGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----TTTACAGGA
H.bimaculatusHeb-5 AAATAATAAGCTAGACTGG-----AGCCACAACACTGATGCTC-----GTTACAGGA
A.japonicaAnj-1 GAATAATAAACTGGACTGG-----ACTGACAATACAAAGGCAC-----TATATAAGA
A.japonicaAnj-2 GAATAATAAACTGGACTGG-----ACTGACAATACAAATGCAC-----TATATAAGA
A.japonicaAnj-3 GAATAATAAACTGGACTGG-----ACTGACGATACAAATGCAC-----TATATAAGA
T.newnesiRex1-1b GAAGAATAAACTGGACTGG-----ACTGATCATTCTGCTGCTC-----TGCACAAGA
T.newnesiRex1-1a GAACAATAAACTGGAATGG-----ACTGATAATTCGCTGCTC-----TGTACAAGA
A.anguillaAna GAATAATAAACTGAACTGG-----ACTGACAATACAAAGGCAC-----TATATAAGA
N.coriicepsRex1b GAACAATAAACTGGACTGG-----ACTGATAATTCGCTGCTC-----TGTACAAGA
N.coriicepsRex1a GAACAATAAACTGGACTGG-----ACTGATAATTCGCTGCTC-----TGTACAAGA
G.acuticepsRex1a GAACAATAAACTGGACTGGCTGGACTGGACTGGACTGATAATTTTGCTGCTC-----TGTACAAGA
G.acuticepsRex1b GAACAATAAACTGGACTGG-----ACTGATAATTCGCTGCTC-----TGTACAAGA
D.mawsoniRex1b GAACAATGAACTGGACTGG-----ACTGATAATTCGCTGCTC-----TGTACAAGA
D.mawsoniRex1b GAACAATAGACTGGACTGG-----ACTGATAATTCGCTGCTC-----TGTACAAGA
B.baikalensisorf12 GAACAATAAACTGGACTGG-----TCCGACCACGCGCATGCGC-----TTTATAAAA
B.baikalensisBab-1 GAACAATAAACTGGACTGG-----TCCGACCACGCGCATGCGC-----CCTATAAAA
B.baikalensisBab-2 GAACAATAAACTGGACTGG-----TCCGACCACGCGCATGCGC-----TTTATAAAA
O.latipesOrl-2 CAACAATAAACTGGACTGG-----TCACACAATACAGAAGCAC-----TGTACAAAA
O.latipesOrl-4 CAACAATAAACTGGACTGG-----TCACACAATACAGAAGCAC-----TGTACAAAA
    ** ***      * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

          60      570      580
    -|---|---|---|---|
Rex1
C.labridensCil-2 AGGGAAA-----
C.labridensCil-3 AGG-TC-----
C.labridensCil-1 AGG-TC-----
C.labridensCil-4 AGGGTC-----
O.niloticusOrn-5 AGG-TC-----
O.niloticusOrn-1 AGGGTC-----
O.niloticusOrn-4 AGG-TC-----
H.bimaculatusHeb-1 AGGTTC-----
H.bimaculatusHeb-2 AGGGTC-----
H.bimaculatusHeb-4 AGGTTC-----
H.bimaculatusHeb-5 AGGGTC-----
A.japonicaAnj-1 AAGGRC-----
A.japonicaAnj-2 AAGGGA-----
A.japonicaAnj-3 AAGGAC-----
T.newnesiRex1-1b AGGGAC-----
T.newnesiRex1-1a AGGGAC-----
A.anguillaAna AAGGAC-----
N.coriicepsRex1b AGGGAC-----
N.coriicepsRex1a AGGGAC-----
G.acuticepsRex1a AGGGAC-----
G.acuticepsRex1b AGGGAC-----
D.mawsoniRex1b AGGGAC-----
D.mawsoniRex1b AGGGACC-----
B.baikalensisorf12 AGGGACAGAGCAGACTCTTTCTGCTG
B.baikalensisBab-1 AGGGAC-----
B.baikalensisBab-2 AGAGAC-----
O.latipesOrl-2 AAGGAC-----
O.latipesOrl-4 AAGGAC-----

```

ANEXO V: Alinhamento da sequência *Rex3* de *C. kelberi* com as das demais espécies de peixes da tabela 12, incluindo-se os gaps.

	10	20	30	40	50	60	
	---	---	---	---	---	---	---
Rex3	-----TTTTTTTTTTTGGGAGTCAACACCACAGGAAAGA						
O. niloticusOre3	-----CCCATCTTTAAGAAGGGAGACCCGGAGGGTGTG						
O. niloticusOre5	-----CCCATCTTTAAGAAGGGAGACCCAGAGGGTGTG						
O. niloticusOre1	-----CCCATCTTTAAGAAGGGAGACCCGGAGGGTGTG						
O. niloticusOre4	-----CCCATCTTTAAGAAGGGGACCCGGACCGTGTG						
C. labridensCic4	-----CCCATCTTTAAGAAGGGAGACCCGGAGGGTGTG						
C. labridensCic2	-----CCCATCTTTAAGAAGGGAGACCCGGAGGGTGTG						
T. nigroviridisRex3	CCGCGGGATGGCAGACCAGGGTGGTGGTCCCTCTTTTAAAGAAGGGGACCCGGAGGATGTG						
T. nigroviridisRex3	-----TCTTTTAAAGAAGGGGACCCGGAGGATGTG						
E. luciTsEso2	-----CCTCTTTTAAAGAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
E. lucisEso4	-----CCTCTTTTAAAGAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
E. luciTsEso3	-----CCTCTTTTAAAGAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
B. baikalensisBot4	-----CCCATCTTCAAGAAGGGGACCCGGAGAGTGTG						
X. helleriXih2	-----CCCTGTTCAAAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
P. mexicanaPom1	-----CCCTGTTTAAAAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
P. mexicanaPom2	-----CCCTGTTTAAAAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
P. formosaPof5	-----CCCTGTTTAAAAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
P. formosaPof3	-----CCCTGTTTAAAAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
G. affinisGam2	-----ACCTGTTCAAAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
P. amatesPha4	-----CCCTGTTCAAAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
P. amatesPha2	-----CCTGTTCAAAAGGGGAC - GGAGGGTGTG						
O. latipesOry3	-----CCCTCTTTAAGAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
O. latipesOry6	-----CCCTCTTTAAGAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
H. bimaculataHet6	-----CCCTGTTCAAAATGGGGACCCGGAGGGTGTG						
P. latipinnaPol2	-----CCCTGTTTAAAAAGGGGACCCGGAGGGTGTG						
C. carpioCyp3	-----CCTCTTTTCAAGAAGGGGACCCGGAGGGTGGG						
				* * *	*	* * *	*
	70	80	90	100	110	120	
	---	---	---	---	---	---	---
Rex3	GTCCGACTTATTGCCGCAATACGGACCAAGCTCTCGCTCGGGTTGTACAGGGACTGAATGG						
O. niloticusOre3	TTCCAACTACAGGGG-TCACACTCCTCAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTGTGG						
O. niloticusOre5	TTCCAACTACAGGGGATCACACTCCTCAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTGTGG						
O. niloticusOre1	TTCCAACTACAGGGGATCACACTCCTCA - CCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTGTGG						
O. niloticusOre4	TTCCAACTATAGGGGATCACACTCCTCAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTGTGG						
C. labridensCic4	CTCCAACTTTCCGGGGATCACACTACTCAGCCTCCCGGTAAGGTCTATGCCAGGGTGTGG						
C. labridensCic2	CTCCAACT - TTCGGGGATCACACTCCTCAGCCTCCCGGTAAGGTCTATGCCAGGGTGTGG						
T. nigroviridisRex3	TTCCAACTATAGGGGATCACACTCCTCAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATTAGGGTACTGG						
T. nigroviridisRex3	TTCCAACTATAGGGGATCACACTCCTCAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATTAGGGTACTGG						
E. luciTsEso2	TTCCAACTATAGGGGATCACACTTCTCAGCCTCCCGGAAAGTCTATGCCAGGGTCTGG						
E. lucisEso4	TTCCAACTATAGGGGATCACACTTCTCAGCCTCCCGGAAAGTCTATGCCAGGGTACTGG						
E. luciTsEso3	TTCCAACTATAGGGGATCACACTTCTCAGCCTCCCGGAAAGTCTATGCCAGGGTCTGG						
B. baikalensisBot4	CTCAAATATCGGGTATCACACTACTCAGCCTCCCGGAAAGTCTATGCCAGGGTGTGG						
X. helleriXih2	CTCCAATTATAGAGGGTACACTCTTAAGCCTCCCTGGCAAGGTCTATTAGGGTCTCTGG						
P. mexicanaPom1	CTCCAA --- TAGGGG - TCACACTCTTAAGCCTCCCTGGTAAGGTCTATTAGGGTCTCTGG						
P. mexicanaPom2	CTCCAA - TACAGGGGTCACACTCTTAAGCCTCCCTGGTAAGGTCTATTAGGGTCTCTGG						
P. formosaPof5	CTCCAATTACAGGGGTCACACTCTTAAGCCTCCCTGGTAAGGTCTATTAGGGTCTCTGG						
P. formosaPof3	CTCCAATTACAGGGGTCACACTCTTAAGCCTCCCTGGTAAGGTCTATTAGGGTCTCTGG						
G. affinisGam2	CTCCAATTATAGGGGTCACACTCTTAAGCCTCCCTGGCAGGTCTATTAGGGTCTCTGG						
P. amatesPha4	CTCCAATTATAGAGGGTACACTCTTAAGCCTCCCGGCAAGGTCTATTAGGGTCTCTGG						
P. amatesPha2	TTCCAACTACAGGGGAATTACACTCCTCAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTACTGG						
O. latipesOry3	TTCCAACTACAGGGGAATTACACTCCTCAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTACTGG						
O. latipesOry6	TTCCAACTACAGGGGAATTACACTCCTCAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTACTGG						
H. bimaculataHet6	CTCCAATTACAGGGGTCACACTCTTAAGCCTCCCTGGCAAGGTCTATTAGGGTCTCTGG						
P. latipinnaPol2	CTCCAATTACAGGGGTCACACTCTTAAGCCTCCCTGGTAAGGTCTATTAGGGTCTCTGG						
C. carpioCyp3	TTCCAACTACAGGGGATCACACTCCTCAGCCTCCCTGGGAAAGTCTATGCCAGGGTACTGG						
	*	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
	130	140	150	160	170	180	
	---	---	---	---	---	---	---
Rex3	CCCGCAACAATGGCCAGACACCCATACTCCCG -- CAGCACCTCCCA -- CAGGATACCCCG						
O. niloticusOre3	AAAGGAG - AGTTCGTCGGTTAGTCGAACCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCC						
O. niloticusOre5	AAAGGAG - AGTTCGTCGGTTAGTCGAACCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCC						
O. niloticusOre1	AAAGGAG - AGTTCGTCGGTTAGTCGAACCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCC						
O. niloticusOre4	AAAGGAG - AGTTCGTCGGTTAGTCGAACCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCC						
C. labridensCic4	AAAGGAG - GGTGCGTCCGTTAGTCGAACCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCC						
C. labridensCic2	AAAGGAG - GGTGCGTCCGTTAGTCGAACCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCC						
T. nigroviridisRex3	AGAGGAG - GGTCCCGGATAGTCGAACCTCAGATTACAGGAGGACAGTGTGTTTTCGTCC						
T. nigroviridisRex3	AGAGGAG - GGTCCCGGATAGTCGAACCTCAGATTACAGGAGGACAGTGTGTTTTCGTCC						
E. luciTsEso2	AGAGGAG - AATACGGCCGATAGTAGAACCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCC						
E. lucisEso4	AGAGGAG - AATACGGCCGATAGTAGAACCTCGGATACAGGAGGAACAATGCGGTTTTCGTCC						

E. luciTsEso3	AGAGGAG-AATACGGCCGATAGTAGAACCTCGGATTCAGGAGGAACAGTGTGTTTTCGTCC
B. baikalensisBot4	AACGGAG-GCTCCGACCGTTTGTGCGAACCTCGGATTCAAGGAAGACAGTGCAGGGTTTCGTCC
X. helleriXih2	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTGAACCTCGGATTCAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
P. mexicanaPom1	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
P. mexicanaPom2	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
P. formosaPof5	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
P. formosaPof3	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
G. affinisGam2	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
P. amatesPha4	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
P. amatesPha2	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
O. latipesOry3	AGAGGAG-AGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGACAACAGTGCAGTTTCCGTCC
O. latipesOry6	AGAGGAG-AGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGAACAACAGTGCAGTTTCCGTCC
H. bimaculataHet6	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTGAACCTCGGATTCAAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
P. latipinnaPol2	AGAGGAG-GGTCCGTCCGATAGTTCGAACCTCGGATTCAAGGAAGAGCAGTGTGTTTTCGTCC
C. carpioCyp3	AGAGGAG-AATTCAGCCGATAGTTCGAACCTTGATTTCAGGAAGAACATGCAGTTTTCGTCC
	* * * * *
	190 200 210 220 230 240 2
	--- --- --- --- --- --- --- ---
Rex3	AGGGAGCGGTCGAATG--CCTTCTCCAAGTCCACA--AAACACATGTAGACTGGATGGGCAA
O. niloticusOre3	TGGTCGCGGAACACTGGACCAGCTCTTTATCCTCTCAAGGATACTTGAGGGTGCATGGGAGT
O. niloticusOre5	TGGTCGCGGAACACTGGACCAGCTCTTTATCCTCTCAAGGATACTTGAGGGTGCATGGGAGT
O. niloticusOre1	TGGTCGCGGAACACTGGACCAGCTCTTTATCCTCTCAAGGATACTTGAGGGTGCATGGGAGT
O. niloticusOre4	TGGTCACGGAACACTGGACCAGCTCTTTATCCTCTCAAGGATACTTGAGGGTGCATGGGAGT
C. labridensCic4	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTTTATCCTCTCAAGGATACTTGAGGGTGCATGGGAGT
C. labridensCic2	TGGTCGTGGAATGCTGGACCAGCTCTTTATCCTCTCAAGGATACTTGAGGGTGCATGGGAGT
T. nigroviridisRex3	TGGACGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
T. nigroviridisRex3	TGGACGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
E. luciTsEso2	GGGCCGTGGAACACTGGACCAGCTCTATACCCTCTACGGGGTGTGGAGGGTTCATGGGAGT
E. lucisEso4	GGGCCGTGGAACACTGGACCAGCTCTATACCCTCTACGGGGTGTGGAGGGTTCATGGGAGT
E. luciTsEso3	GGGCCGTGGAACACTGGACCAGCTCTATACCCTCTACGGGGTGTGGAGGGTTCATGGGAGT
B. baikalensisBot4	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTTTACCCTTGCCAGGGATACTGGAGGGTCTTGGGAGT
X. helleriXih2	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
P. mexicanaPom1	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
P. mexicanaPom2	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
P. formosaPof5	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
P. formosaPof3	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
G. affinisGam2	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
P. amatesPha4	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
P. amatesPha2	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
O. latipesOry3	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTATCTAGGGTGCATGGAGGGTTTGTGGGAGT
O. latipesOry6	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTATCTAGGGTGCATGGAGGGTTTGTGGGAGT
H. bimaculataHet6	TGGTCGTGGAACACTGTACCAGCTTTACACCCTCAGCAGGATCCTGGAGGGTGCATGGGAGT
P. latipinnaPol2	TGGTCGTGGAACACTGGACCAGCTCTACACCCTCAGCAGGGTCTTGAGGGTGCATGGGAGT
C. carpioCyp3	CGGTTATGGAACACTGGACCAGCTTTATACCCTCACGGGGTACGGAGGGTTCATGGGAGT
	** ** ** ** ** ** * * * *
	50 260 270 280 290 300 310
	- --- --- --- --- --- --- --- ---
Rex3	ACTCCCAACGACT--CAAATATCTCGAGA--GGATAAAGAGCTGGTCCAGTGTCCCGA
O. niloticusOre3	TTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
O. niloticusOre5	TTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
O. niloticusOre1	TTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
O. niloticusOre4	TTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
C. labridensCic4	TTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GCACCC--
C. labridensCic2	TTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
T. nigroviridisRex3	TTGCCCAACCAATCCACATGTGTTTTGTGGATTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
T. nigroviridisRex3	TTGCCCAACCAATCCACATGTGTTTTGTGGATTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
E. luciTsEso2	TTGCCCAACCAGTCCACATGTGTTTTGTGGATTGGAGAAGGCATTTCGACA--GTGTCCCT--
E. lucisEso4	TTGCCCAACCAATCCACATGTGTTTTGTGGATTGGAGAAGGCATTTCGACT--GTGTCCCT--
E. luciTsEso3	TTGCCCAACCAATCCACATGTGTTTTGTGGATTGGAGAAGGCATTTCGACT--GTGTCCCT--
B. baikalensisBot4	TTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GGTCCCT--
X. helleriXih2	TCGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
P. mexicanaPom1	-CGCCCAACCGGTCTACATGTGTTTTCGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
P. mexicanaPom2	TCGCCCAACCGGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
P. formosaPof5	TCGCCCAACCGGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
P. formosaPof3	TCGCCCAACCGGTCTACATGTGTTTTGTGGA--TTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
G. affinisGam2	TCGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
P. amatesPha4	TCGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTGTCCCT--
P. amatesPha2	TCGCCCAACCGGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGA--GCATTTCGACC--GTGTCCCT--
O. latipesOry3	TCGCTCATCCAGTCCATATGTGTTTTGTGGATTGGAGAAGGCATTTCGACC--GCATCCCT--
O. latipesOry6	TCGCTCATCCAGTCCATATGTGTTTTGTGGATTGGAGAAGGCATTTCGACC--GCATCCCT--
H. bimaculataHet6	TTGCCCAACCAGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCGACC--GTATCCCT--
P. latipinnaPol2	TCGCCCAACCGGTCTACATGTGTTTTGTGGACTTGGAGAAGGCATTTCACACC--GTGTCCCT--
C. carpioCyp3	TTGCCCAACCAATCCACATGTGTTTTGTGGATTGGAGAAGGCATTTCGACC--ATGTCCCT--
	* * * * * * * * * *
	320 330 340 350 360 370

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Rex3          CCAGGACGAAAACCGCATTGTTCCTCTTGAATCTGAGGTCGACTAACAGAGGACCCCTCCTT
O.niloticusOre3 -CGGGGTGTCCTGTGGGAGGTGTTCGGGGAGTATGGGGT-TCTGGCCCATTTGCTACGGGCCA
O.niloticusOre5 -CGGGGTGTCCTGTGGGAGGTGTTCGGGGAGTATGGGGTGTCTGGCCCATTTGCTACGGGCCA
O.niloticusOre1 -CGGGGCGTCTGTGGGAGGTGTTCGAGGAGTATGGGGT-TCTGGCCCATTTGCTACGGGCCA
O.niloticusOre4 -CGGGGTGTCCTGTGGGAGGTGTTCGGGGAGTATGGGGTGTCTGGCCCATTTGCTACGGGCCG
C.labridensCic4 -----A--TACTGCAGGAGCATGGGGTGTCTGGCCCGTTGTTGCGGGCCA
C.labridensCic2 -CG-----GGTCTCGGGAGTATGGGGTGTCTGGCCCGTTGTTGCGGGCCA
T.nigroviridisRex3 -CGGGGAGTCCTCTGGGGGGTACTCCGGGAGTATGGAGTGTCTGGCCCTCTGTTACAGGCTG
T.nigroviridisRex3 -CGGGGAGTCCTCTGGGGGGTACTCCGGGAGTATGGAGTGTCTGGCCACCTGTTACAGGCTG
E.luciTsEso2 -CGCGGCATCTTGTGGAGGGTGTCTCGGGAATATGGGGTCTGGGTCTTTGCTAAGGGCTG
E.lucisEso4 -CGCGGCATCTTGTGGAGGGTGTCTGGGGAATATGGGGTCTGGGTCTTTGCTAAGGGCTG
E.luciTsEso3 -CGCGGCATCTTGTGGAGGGTGTCTGGGGAATATGGGGTCTGGGTCTTTGCTAAGGGCTG
B.baikalensisBot4 -CGGGGATTTTTGTGGGGGGTGTCTCGGGAGTATGGTGTGCCGACCCGTTGCAACGGGCCA
X.helleriXih2 -CGGGGAGCCCTGTGGGGGGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCCCTTTGATACGGGCTG
P.mexicanaPom1 -AGGGGGGCTTTGTGGGGGGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCCCTTTGATACGGGCTG
P.mexicanaPom2 -AGGGGGGCTTTGTGGGGGGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCCCTTTGATACGGGCTG
P.formosaPof5 -AGGGGGGCTTTGTGGGGGGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCTTTGATACGGGCTG
P.formosaPof3 -AGGGGGGCTTTGTGG--GGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCCCTTTGATACGGGCTG
G.affinisGam2 -CGGGGAGCCCTGTGGAGGGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCTTTGATACGGGCTG
P.amatesPha4 -CGGGGAGCCCTGTGGGAGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCCCTTTGATACGGGCTG
P.amatesPha2 -CGGGGATCCTTGTGGGGGGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCCCTTTGATACGGGCTG
O.latipesOry3 -CGTGGCATCTGTGGGGGGTGTCTGGGAGTATGGGGTCCGGGGAGCCCTTACTGAGGGCTG
O.latipesOry6 -CGTGGCATCTGTGGGGGGTGTCTGGGAGTATGGGGTCCGGGGAGCCCTTACTGAGGGCTG
H.bimaculataHet6 -CTGGGAGCCCTGTGGGGGGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCCCTTTGATACGGGCTG
P.latipinnaPol2 -AGGGGGGCTTTGTGGGGGGTCTCCGGGAGTATGGGGTACCGGGCCCTTTGATACGGGCTG
C.carpioCyp3 -CGTGGCCCTCTGTGGGGGGTGTCTCCGGGAGTATGGGGTCCGGGGCCCTCTGTTAAGGGCTG

```

* * * * *

```

          380      390      400      410      420      430
--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Rex3          TTCAGCACCCCTGGCATAACCTTACCAGGGGAGGCTGAGGAGTGTGATCCCCCGATAGTTGGAC
O.niloticusOre3 TT-CGATCCCTAT-ACAACCGTTGCAAG-AGTTTG---GTTCCGATGCGCGCAATAA--G
O.niloticusOre5 TT-CGATCCCTAT-ACAACCGTTGTAAG-AGTTTG---GTTCCGATGCGCGCAATAA--G
O.niloticusOre1 TT-TGATCCCTAT-ACAACCGTTGCAAG-AGTTTG---GTTCCGATAGCCAGCAATAA--G
O.niloticusOre4 TT-CGATCCCTAT-ACAACCGTTGCAAG-AGTTTG---GTTCCGATGCGCGCAATAA--G
C.labridensCic4 TT-CAGTCCCTGT-ACAACCGCAGTGAG-AGCTTG---GTCGGTATAGCCAGCAATAA--G
C.labridensCic2 TT-CAGTCCCTGT-ACAACCGCAGTGAG-AGCTTG---GTCGGTATAGCCAGCAATAA--G
T.nigroviridisRex3 TC-CGCTCTCTGT-ACAACCGGTGTCAG-AGCTTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
T.nigroviridisRex3 TC-CGCTCTCTGT-ACAACCGGTGTCAG-AGCTTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
E.luciTsEso2 TC-AGTCCCTGT-AAAACCGAAGCAGG-AGCTTG---GTCTGCATGCGCGGCAGTAA--G
E.lucisEso4 TC-AGTCCCTGT-ACAACCGAAGCAGG-AGCTTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
E.luciTsEso3 TC-AGTCCCTGT-ACAACCGAAGCAGG-AGCTTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
B.baikalensisBot4 TC-CGGTCTCTGT-ACG-CGCAGTAGG-AGCTGT---GTTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
X.helleriXih2 TC-AGTCCCTGT-ATGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
P.mexicanaPom1 TC-AGTCCCTGT-ACGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
P.mexicanaPom2 TC-AGTCCCTGT-ACGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
P.formosaPof5 TC-AGTCCCTGT-ACGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
P.formosaPof3 TC-AGTCCCTGT-ACGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
G.affinisGam2 TC-AGTCCCTGT-ATGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
P.amatesPha4 TC-AGTCCCTGT-ACGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
P.amatesPha2 TC-AGTCCCTGT-ACGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
O.latipesOry3 TC-CGGTCTCTGT-ATGACCGGAGTAGG-AGCTTG---GTTCCGATAGCCGGCAATAG--G
O.latipesOry6 TC-CGGTCTCTGT-ATGACCGGAGTAGG-AGCTTG---GTTCCGATAGCCGGGCAGTAA--G
H.bimaculataHet6 TC-AGTCCCTAT-ATGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
P.latipinnaPol2 TC-AGTCCCTGT-ACGACCGGTGTCAG-AGTCTG---GTCCGATGCGCGGCAGTAA--G
C.carpioCyp3 TC-CGGTCCCTGT-ATGACCGAAGCAGG-AGCTTG---GTTAGCATGCGCGGCAGTACATG

```

* * * * *

```

          440      450      460      470      480      490
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Rex3          ACACCCCTCCGGTCTCCCTCTTAAAGATGGGGACCACCACCCCGTTGAA-----
O.niloticusOre3 TCGAACTC--GT-TCCCGGTGGGTGATGGGCTC-----
O.niloticusOre5 TCGGACTC--GT-TTCTGGTGGGTGATGGGCTC-----
O.niloticusOre1 TCGGACTC--GT-TCCCGGTGGGTGATGGGCTC-----
O.niloticusOre4 CTGGACTC--AT-TCCCGGTGGGTGATGGGCTC-----
C.labridensCic4 TCGGACTC--AT-TTCTGTGGGTGTTGGACTC-----
C.labridensCic2 TCGGATTC--GT-TTCTGTGGGTGTTGGACTC-----
T.nigroviridisRex3 TCGAACTC--GT-TCCCAGTGAGGGTGGACTCCGCCAGGGCTGCCCTTTGTCACCGATTCT
T.nigroviridisRex3 TCGAACTC--GT-TCCCAGTGAGGGTGGACTCCGCCAGGGCTGCCCTTTGTCACCGATTCT
E.luciTsEso2 TCAGACTT--GT-TCCCAGTGCATGTTGGACTC-----
E.lucisEso4 TCAGACTT--GT-TCCCAGTGCATGTTGGACTC-----
E.luciTsEso3 TCAGACTT--GT-TCCCAGTGCATGTTGGACTC-----
B.baikalensisBot4 -GAGATAC--GT-TCCCGGTGGGTGTTGC-CTC-----
X.helleriXih2 TCGGGCTC--GT-TTCCCGTGGAGTGGACTC-----
P.mexicanaPom1 TCGGGCTC--GT-TTCCCGTGGAGTGGACTC-----
P.mexicanaPom2 TCGGGCTC--GT-TTCCCGTGGAGTGGACTC-----
P.formosaPof5 TCGGGCTC--GT-TTCCCGTGGAGTGGACTC-----

```

```

P.formosaPof3      TCGGGCTC--AT-TTCCGGTGAGAGTTGGACTC-----
G.affinisGam2     TCGGGCTC--GT-TTCCGGTGAGAGTTGGACTC-----
P.amatesPha4      TCGGGCTC--AT-TTCCGGTGAGAGTTGGACTC-----
P.amatesPha2      TCGGGCTC--GT-TTCCGGTGAGAGTTGGACTC-----
O.latipesOry3     TCAGACCT--GT-TCCCGGTCCACGTTGGACTC-----
O.latipesOry6     TCAGACCT--GT-TCCCGGTCCACGTTGGACTC-----
H.bimaculataHet6 TCGGGCTC--GT-TTCCGGTGAGAGTTGGACTC-----
P.latipinnaPol2   TCGGGCTT--GT-TTCCGGTGAGAGTTGGACTT-----
C.carpioCyp3      TTGGACTC-----

```

```

                    500
                    ---|----|----
Rex3                -----
O.niloticusOre3    -----
O.niloticusOre5    -----
O.niloticusOre1    -----
O.niloticusOre4    -----
C.labridensCic4    -----
C.labridensCic2    -----
T.nigroviridisRex3 G-----
T.nigroviridisRex3 GTTCATAACTTTT
E.luciTsEso2       -----
E.lucisEso4        -----
E.luciTsEso3       -----
B.baikalensisBot4 -----
X.helleriXih2      -----
P.mexicanaPom1     -----
P.mexicanaPom2     -----
P.formosaPof5      -----
P.formosaPof3      -----
G.affinisGam2     -----
P.amatesPha4      -----
P.amatesPha2      -----
O.latipesOry3     -----
O.latipesOry6     -----
H.bimaculataHet6  -----
P.latipinnaPol2   -----
C.carpioCyp3      -----

```

ANEXO VI: Alinhamento da sequência *Rex6* de *C. kelberi* com as das demais espécies de peixes da tabela 13, incluindo-se os gaps.

```

          10      20      30      40      50      60
Rex6      GGGAAATTCGGATTTAAAAACATACTGGAGCTCCACAACCAAGTGCTGGCATTATACCGGAAA
C.labridensCla2 -----
O.niloticTsOni2 -----
O.nloticusOni1 -----
O.niloticusOni3 -----
C.labridensCla1 -----
P.formosaPfo2_ -----
P.formosaPho4 -----
P.formosaPho6 -----
H.bimaculataHbi6 -----
H.bimaculataHbi2 -----
H.bimaculataHbi4 -----
G.affinisGaf2 -----
G.affinisGaf3 -----
P.gracilisPgr3 -----
P.gracilisPgr2 -----
P.gracilisPgr1 -----
O.latipesOla5 -----
O.latipesOla3 -----
O.latipesOla1 -----
X.maculatusXma5 -----
X.maculatusXma2 -----
T.rubripesdmd -----

          70      80      90      100     110     120
Rex6      CATTGTGCCGATGCTGGAAGGTCCCCAGATCAAT--GGATACGCCCCCAAAAGTG-TTGAG
C.labridensCla2 -----CTGGAAGT-CCCGAGGTCAAATGGGACACGCCCCCAAGGGTGGTTGAG
O.niloticTsOni2 -----CTGGAAGT-CCTGAGGTCAAATGGGAGACGCCCCCAAGGGTGGTGGAG
O.nloticusOni1 -----CTGGAAGT-TCCGAGGTCAAATGGGAGACGCCCCCAAGGGTGGTGGAG
O.niloticusOni3 -----CTGGAAG--CCCAAGATCAAAGTGGGACACGCCCCACAGGGTGTATGGAG
C.labridensCla1 -----CTAGAAGT-CCTGAGGTCAAATGGGATTTGCCCCACCGGGTGGT----
P.formosaPfo2_ -----CTGGAAAC-CCCGAGGTCAAATGGGGGACACCCCAAGGTGGTGGAG
P.formosaPho4 -----CTGGAAGC-CCCGAGGTCAAATGGGGGACACCCCAAGGTGGTGGAG
P.formosaPho6 -----CTGGAAGC-CCCGAGGTCAAATGGGGGACACCCCAAGGTGGTGGAG
H.bimaculataHbi6 -----CTGGAAGC-CCCGAGATCGAAGTGGGGAACACCCCAAGGTGGTGGAG
H.bimaculataHbi2 -----CTGGAAGC-CCCGAGATCGAAGTGGGGAACACCCCAAGGTGGTGGAG
H.bimaculataHbi4 -----CTGGAAGC-CCCGAGATCGAAGTGGGGAACACCCCAAGGTGGCGGAG
G.affinisGaf2 -----CTGGAACC-CCCAAGATCAAAGTGGGAAACACCCCAAGGTAGTGGAG
G.affinisGaf3 -----CTGGA AAC-CCCGAGATCAAAGTGGGAAACACCCCAAGGTGGTGGAG
P.gracilisPgr3 -----CTGGA AAC-CCCGAGATCAAAGTGGGAAACACCCCAAGGTGGTGGAG
P.gracilisPgr2 -----CTGGA AAC-CCCGAGATCAAAGTGGGAAACACCCCAAGGTGGTGGAG
P.gracilisPgr1 -----CTGGA AAC-CCCGAGATCAAAGTGGGAAACACCCCAAGGTGGTGGAG
O.latipesOla5 -----CTGGA AAC-CCCAAGGTCAAATGGGACACACCTCCAAGGTGGTAGAG
O.latipesOla3 -----CTG- AAAC-CCCAAGGTCAAATGGGAAACACCTCCAAGGTGGTAGAG
O.latipesOla1 -----CCTG- AAAC-CCCAAGGTCAAATGGGAAACACCTCCAAGGTGGTAGAG
X.maculatusXma5 -----CTGGA AAC-CCCGGATCAAAGTGGGAAACACCCCAAGGTGGCGGAG
X.maculatusXma2 -----CTGGA AAC-CCCGGATCAAAGTGGGAAACACCCCAAGGTGGCGGAG
T.rubripesdmd -----

          130     140     150     160     170     180
Rex6      A-CAACGAGGCTAAGATC-TGTGGGA-TTCCAGATACAGACAGATAGACTTGTGATGGCGAA
C.labridensCla2 AACTACAGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATACAGACAGACAAACTTGTGGTGGCTAA
O.niloticusOni2 AATAACCAAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATATAGACGCACAAAATGGTGGTGGCTAA
O.nloticTsOni1 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATACAGACAGACAAAATGCTGGTGGCTAA
O.niloticusOni3 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATACAGACGGACAAAATGGTGGTGGCTAA
C.labridensCla1 AATGACTGAGCTAAGACCCTGAGGGTCTTC-AGATACAGATGGACAAAATGGTGGTGGCTAA
P.formosaPfo2_ AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAAAGATGGTAATGGCGAA
P.formosaPho4 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGAC AAGTGGTAAATGGCGAA
P.formosaPho6 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAAAATGGTAATGGCGAA
H.bimaculataHbi6 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAAAATGGTAATGGCGAA
H.bimaculataHbi2 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAAAATGGTAATGGCGAA
H.bimaculataHbi4 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAAAATGGTAATGGCGAA
G.affinisGaf2 AATGCCAGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAAATCCAGACAGACAGAATGGTAATGGCAAAA
G.affinisGaf3 AATGCCAGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAGAATGGTAATGGCGAAA
P.gracilisPgr3 AATGCCAGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAGAATGGTAATGGCGAAA
P.gracilisPgr2 AATGCCAGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAGAATGGTAATGGCGAAA
P.gracilisPgr1 AATGACCGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAGAATGGTAATGGCGAAA
O.latipesOla5 AATGAGAGGGCAAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACTGATAGGATGGTAATGGCAAAA
O.latipesOla3 AATGAGAGGGCAAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACTGATAGGATGGTAATGGCAAAA
O.latipesOla1 AATGAGAGGGCAAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACTGATAGGATGGTAATGGAGAAA

```

```

X.maculatusXma5 AACGCCAGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAAAATGGTAATGGCGAA
X.maculatusXma2 AACGCCAGAGCTAAGATCCTGTGGGACTTCCAGATCCAGACAGACAAAATGGTAATGGCGAA
T.rubripesdmd -----CATGG-----TCCAGATCCAGACTGACAAGATGATGGTCGCCAA
                **      * * * * *      * *      * *      * *
                190      200      210      220      230      240      2
---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
Rex6 CCAACCGGACATCGTAGTGGTGGACAACAAGGGAAGACAGTCGTAG-----TGATAG
C.labridensCla2 CCAACCGGACATCGTAGTGGTGGACAACAAGGGAAGAAAGTCGTGG-----TGATAG
O.niloticusOni2 CCAACCGGACATAGTGGTGGAAAGAGAAACAGAAAGATGGCTGTAG-----TGATAG
O.niloticusOni1 CCAACCGGACATAGTGGTGGTGGACAACAAGGGAAGACGGCCGTAG-----TGATCG
O.niloticusOni3 CCAACCGGACAT-----AGACAATAGAAAGACGCTGTAG-----TGTTAG
C.labridensCla1 CCAACCGGACATC--CGTAGTG-----TCCGTAG-----TGATAG
P.formosaPfo2_ CCAACCGGACATGTGGTGGTGGATAAAGAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGGTGG
P.formosaPho4 CCAACCGGACATGTGGTGGTGGATAAAGAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGGTGG
P.formosaPho6 CCAACCGGACATGTGGTGGTGGATAAAGAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGGTGG
H.bimaculataHbi6 CCAACCGGACATGTGGTGGTGGATAAAGAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGGTGG
H.bimaculataHbi2 CCAACCGGACATGTGGTGGTGGATAAAGAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGGTGG
H.bimaculataHbi4 CCAACCGGACATGTGGTGGTGGATAAAGAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGGTGG
G.affinisGaf2 CCAACCGGACATAGTGGTGGATAAACAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGTTAG
G.affinisGaf3 CCAACCGGACATGTGGTGGATAAACAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGTTAG
P.gracilisPgr3 CCAACCGGACATGTGGTGGATAAACAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGTTAG
P.gracilisPgr2 CCAACCGGACATGTGGTGGATAAACAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGTTAG
P.gracilisPgr1 CCAACCGGACATGTGGTGGATAAACAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGTTAG
O.latipesOla5 CCAACCGGACATGTGGTGGATAAAGAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGTTAG
O.latipesOla3 CCAACCGGACATGTGGTGGATAAAGAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGTTAG
O.latipesOla1 CCAACCGGACATGTGGTGGATAAAGAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGTTAG
X.maculatusXma5 CCAACCGGACATGTGGTGGATAAACAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGATAG
X.maculatusXma2 CCAACCGGACATGTGGTGGATAAACAACAGAGGAAAGCCGTTG-----TGATAG
T.rubripesdmd CCAGCCTGACATAGTGGTGGATAAACAACAGAGGAAAGATATATGTAGCAACACCGGTGATAT
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                50      260      270      280      290      300      310
-|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
Rex6 ACGTTGCGATACCAAGTGACGGCAACATCAGGAAGAAGGAACATGAGAAGCTTGATAAATAC
C.labridensCla2 ACATTTGCAATAACCAAGTGACAGGAACATCAAGAAGAAGGAACACGAGAAGCTTGACAAATAC
O.niloticusOni2 ATGTAGCAGTTCGGAATGACAGCAACAT-AGAAAGAAGGAACACGAGAAGCTGGAGAATAC
O.niloticusOni1 ATGTAGCGGTTCCGAATGACAGCAATATCAGGAAGAAGGAACACGAGAAGCTGGAGAAATGC
O.niloticusOni3 ATGTAGC-GTTCCAAATGACAGCAACATCAGGAAGAAGGAACATGAGAAGCTTGAAAAATAC
C.labridensCla1 ACGTAGCAATACCAAGCGAAAGTAACATCAAGACGAAGGAACACGAGAAGCTG-----C
P.formosaPfo2_ ATGTAGCAATACCAAGTGACCAACATCAGGAAAAAGGAGCATGAGAAACTGGAGAAATAC
P.formosaPho4 ATGTAGCAATACCAAGTGACCAACATCAGGAAAAAGGAGCATGAGAAACTGGAGAAATAC
P.formosaPho6 ATGTAGCAATACCAAGTGACCAACATCAGGAAAAAGGAGCATGAGAAACTGGAGAAATAC
H.bimaculataHbi6 ATGTAGCAATACCAAGTGACCAACATCAGGAAAAAGGAGCATGAGAAACTGGAGAAATAC
H.bimaculataHbi2 ATGTAGCAATACCAAGTGACCAACATCAGGAAAAAGGAGCATGAGAAACTGGAGAAATAC
H.bimaculataHbi4 ATGTAGCAATACCAAGTGACCAACATCAGGAAAAAGGAGCATGAGAAACTGGAGAAATAC
G.affinisGaf2 ATGTAGCAATACCAAGTGACTGCAACATCAGGAAAAAGGAGCATGAAAACTGAGAGAAATAC
G.affinisGaf3 ATGTAGCAATACCAAGCGATTGCAACATCAGGAAAAAGGAGCACGAGAAACTGGAGAAATAC
P.gracilisPgr3 ATGTAGCAATACCAAGCGATTGCAACATCAGGAAAAAGGAGCACGAGAAACTGGAGAAATAC
P.gracilisPgr2 ATGTAGCAATACCAAGTGATTGCAACATCAGGAAAAAGGAGCACGAGAAACTGGAGAAATAC
P.gracilisPgr1 ATGTAGCAATACCAAGCGATTGCAACATCAGGAAAAAGGAGCACGAGAAACTGGAGAAATAC
O.latipesOla5 ATGTGGCAGTGCCAAGCGATGGAAACATCAGGAAGAAGGAACATGAGAAACTGGAGAAATAC
O.latipesOla3 ATGTGGCAGTGCCAAGCGATGGAAACATCAGGAAGAAGGAACATGAGAAACTGGAGAAATAC
O.latipesOla1 ATGTGGCAGTGCCAAGCGATGGAAACATCAGGAAGAAGGAACATGAGAAACTGGAGAAATAC
X.maculatusXma5 ATGTAGCAATACCAAGCGACTGCAACATCAGGAAAAAGGAGCACGAGAAACTGAGAGAAATAC
X.maculatusXma2 ATGTAGCAATACCAAGCGACTGCAACATCAGGAAAAAGGAGCACGAGAAACTGAGAGAAATAC
T.rubripesdmd ATGTAGCAATCCCGAGTGATAGCAACATCAGGAAGAAGGAACACGAGAAGCTGGAGAAATAC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                320      330      340      350      360      370
---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
Rex6 CAAGGGCTCAGAGAAGAACTGGAAAGGATGTGGAAGATGAAGGTGACAGTGGTCCCGTGGT
C.labridensCla2 CTAGGGCTCAGAGAGCAGCTGGAAGGATGTGGAAGATGAAGGCAACAGTGGTCCCGTGGT
O.niloticusOni2 CAAGGGCTCAGAGAAGAGCTCGAGAGGACGTGGAGGGTGAAGGTAACCGTGGTCCCGTGGT
O.niloticusOni1 CAAGGGCTCAGAGAAGAGCTCGAGAGGATGTGGAAGGTGAAGGTAACCGTGGTCCCGTGGT
O.niloticusOni3 CAAGGGCTCAGAGAAGAGCTTGAGAAGATGTGGAAGGTGAAGGTGACCGTGGTCCCGTGGT
C.labridensCla1 CAAGGGCTGAGAGAAGAGCTGAGAGGATGTGGAAGGTGAAGGTAACCGTGGTCCCGTGGT
P.formosaPfo2_ CAGGGCTCAGAGAGGAAGTGGAGAAGGCTGGAAGGTGAAGACCACAGTGGTGCCTGTGGT
P.formosaPho4 CAGGGCTCAGAGAGGAAGTGGAGAAGGCTGGAAGGTGAAGACCACAGTGGTGCCTGTGGT
P.formosaPho6 CAGGGCTCAGAGAGGAAGTGGAGAAGGCTGGAAGGTGAAGACCACAGTGGTGCCTGTGGT
H.bimaculataHbi6 CAGGGCTCAGAGAGGAAGTGGAAAAGACCTGGAAGGTGAAGACCACAGTGGTGCCTGTGGT
H.bimaculataHbi2 CAGGGCTCAGAGAGGAAGTGGAAAAGACCTGGAAGGTGAAGACCACAGTGGTGCCTGTGGT
H.bimaculataHbi4 CAGGGCTCAGAGAGGAAGTGGAAAAGACCTGGAAGGTGAAGACCACAGTGGTGCCTGTGGT
G.affinisGaf2 CAGGGCTTAAGGGAGGAAGTGGAGAGGGCTGGAAGGTGAAGACCACAGTGGTGCCTGTGGT

```



```

H.bimaculataHbi2 ACCCTCAAGCT-----
H.bimaculataHbi4 ACCCTCAAGCT-----
G.affinisGaf2 ACCCTCAAGCT-----
G.affinisGaf3 ACCCTCAAGCT-----
P.gracilisPgr3 ACCCTCAAGCT-----
P.gracilisPgr2 ATCCTCAAGCT-----
P.gracilisPgr1 ACCCTCAAGCT-----
O.latipesOla5 ACCCTCAAGCT-----
O.latipesOla3 ACCCTCAAGCT-----
O.latipesOla1 ACCCTCAAGCT-----
X.maculatusXma5 ACCCTCAAGCT-----
X.maculatusXma2 GCCCTCAAGCT-----
T.rubripesdmd ACCCTCAGACTCCCAGGCCTCTGGTAGAGGACCCGAGTCTGAAGGAAGGAGG-----
          ***** *

```

```

          60          570          580          590          600          610          620
-|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
Rex6      GGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTC

```

```

C.labridensCla2 -----
O.niloticusOni2 -----
O.nloticusOni1 -----
O.niloticusOni3 -----
C.labridensCla1 -----
P.formosaPfo2_ -----
P.formosaPho4 -----
P.formosaPho6 -----
H.bimaculataHbi6 -----
H.bimaculataHbi2 -----
H.bimaculataHbi4 -----
G.affinisGaf2 -----
G.affinisGaf3 -----
P.gracilisPgr3 -----
P.gracilisPgr2 -----
P.gracilisPgr1 -----
O.latipesOla5 -----
O.latipesOla3 -----
O.latipesOla1 -----
X.maculatTsXma5 -----
X.maculatTsXma2 -----
T.rubripesdmd -----

```

```

          630          640
----|----|----|----|---
Rex6      ACCTAAATAGCTTGGCGTATCAA
C.labridensCla2 -----
O.niloticusOni2 -----
O.nloticusOni1 -----
O.niloticusOni3 -----
C.labridensCla1 -----
P.formosaPfo2_ -----
P.formosaPho4 -----
P.formosaPho6 -----
H.bimaculataHbi6 -----
H.bimaculataHbi2 -----
H.bimaculataHbi4 -----
G.affinisGaf2 -----
G.affinisGaf3 -----
P.gracilisPgr3 -----
P.gracilisPgr2 -----
P.gracilisPgr1 -----
O.latipesOla5 -----
O.latipesOla3 -----
O.latipesOla1 -----
X.maculatusXma5 -----
X.maculatusXma2 -----
T.rubripesdmd -----

```