



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Maryanna Cristiano Simão

Os elementos de transposição NLTR *BS* e *Helena* estão
associados a eventos de transferência horizontal em
Drosofilídeos?

São José do Rio Preto, SP

2017

Maryanna Cristiano Simão

Os elementos de transposição NLTR *BS* e *Helena* estão
associados a eventos de transferência horizontal em
Drosofilídeos?

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc: 131530/2015-1

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Marcia
Aparecida Carareto

São José do Rio Preto, SP

2017

Simão, Maryanna Cristiano.

Os elementos de transposição NLTRs BS e Helena estão associados a eventos de transferência horizontal em Drosophilídeos? / Maryanna Cristiano Simão. -- São José do Rio Preto, 2017

109 f. : il.

Orientador: Claudia Marcia Aparecida Carareto

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular. 2. Drosófila - Genética. 3. Retroelementos.
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 575:577.23

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Maryanna Cristiano Simão

Os elementos de transposição NLTR *BS* e *Helena* estão
associados a eventos de transferência horizontal em
Drosofilídeos?

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biociências, junto ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências, do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc: 1530/2015-1

Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a Claudia Marcia Aparecida Carareto
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn
UFMG – Belo Horizonte

Prof. Dr. Luis Gustavo da Conceição Galego
UFTM - Uberaba

São José do Rio Preto, SP
23 de fevereiro de 2017

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Evolução Molecular do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, com bolsa do Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnológico (CNPq) e auxílio financeiro da FAPESP.

"If you know you are on the right track, if you have this inner knowledge, then nobody can turn you off... No matter what they say"

- Barbara McClintock

Dedico esse trabalho à *Helena (in memoriam)*,
minha amiga, minha avó e minha maior saudade.

Agradecimentos

Aos meus pais Sylas e Lucelaine, pelas inúmeras oportunidades que me deram, pelo apoio e por nunca me deixarem desistir dos meus objetivos, mesmo que muitas vezes isso tenha significado eles renunciarem a seus próprios desejos.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Claudia Marcia Aparecida Carareto, pela oportunidade, pelos ensinamentos e incentivo, pela paciência comigo e com o meu jeito desorganizado, e por ter me incentivado a continuar sempre em frente. Meu maior agradecimento é ter aprendido com ela o que é e o que não é correto e que não existem caminhos curtos e fáceis e sim caminhos certos e errados.

Aos meus irmãos Junior e Maraynna, toda a minha admiração.

Aos meus parceiros, Bruno e Raphael, que me trouxeram a contradição e conflitos, que me ensinaram que a clareza só vem depois do caos, e necessariamente, do caos interior.

Aos amigos do Laboratório de Evolução Molecular Adriana, Elaine, Camila, Cecília, Elias, Wellington, Joice, Marjorie, Raduan, Izabella, Edoardo, obrigada por todas as discussões e conhecimentos obtidos com vocês e pela ajuda em alguns momentos difíceis. Dos quais destaco, os ensinamentos da Elaine e Adriana, o companheirismo da Camila e Cecília, as risadas em meio ao caos com o Edoardo, e a Izabella que me mostrou o valor de ter paciência.

Aos meus amigos do PET-Biologia e à Tutora Prof^a Dr^a Claudia Regina Bonini-Domingos, minha participação nesse grupo foi fundamental para a formação do ser que eu sou hoje.

Aos meus amigos do Ibilce, nos quais destaco Fernando, Talles, Geisla, Talita, Julia, Marina, Lucas, Carlos, Gabriel, Mayk, e Olavo por todos os momentos únicos que passamos juntos, pela inspiração e por me darem força para continuar sempre.

À Profª Drª Lilian Madi-Ravazzi por ter me concedido as linhagens de *Z. ornatus*, *Z. sepsoides* e *Z. africanus*, fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof Dr Jean David por ter me concedido as linhagens de *Z. nigranus*, *Z. camerounensis*, *Z. bogoriensis*, *Z. gabonicus* e *Z. davidi*, sem as quais não seria possível o desenvolvimento do presente trabalho

À Universidade de Lyon e a pesquisadora Annabelle Haudry, por ter disponibilizado 19 genomas de *Drosophila* e três de *Zaprionus*, fundamentais para a execução do trabalho

Por fim, agradeço a comissão da Semana da Biologia de 2011, por ter convidado a Profª Drª Claudia Marcia Aparecida Carareto para ministrar uma palestra, e por acaso me deram oportunidade de conhecer, estudar e trabalhar com algo que eu adoro: evolução molecular e elementos de transposição.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo investigar se os retrotransposons sem LTRs (NLTRs) Helena e BS estiveram envolvidos em eventos de transferência horizontal (HT) durante a diversificação concomitante pela qual passaram as espécies do subgrupo melanogaster, do grupo melanogaster de Drosophila, e do subgênero Zaprionus, na África Tropical. O modo de transposição dos elementos NLTRs, sem a formação de um DNA intermediário, é utilizado para explicar a escassez de relatos de HT desse tipo de elemento. Estudos anteriores evidenciaram alta taxa de HT de retrotransposons com LTRs em espécies dos dois grupos citados, o que fundamentou a hipótese que essas espécies passaram por uma fase permissiva à ocorrência de HT em decorrência da sobreposição geográfica e temporal que sofreram durante sua diversificação. Para testar essa hipótese, uma região do gene da transcriptase reversa dos retrotransposons sem LTRs Helena e BS foi utilizada para investigar a ocorrência de HT entre as espécies. As sequências foram obtidas de linhagens de Zaprionus, via sequenciamento, após amplificação e clonagem, e via análises in silico nos genomas de Drosophila disponíveis nos bancos de dados, ou via sequenciamento de genomas de espécies de Drosophila e de Zaprionus. Foram realizadas análises evolutivas (análises de divergência e estimativa dos tempos de divergência entre as sequências) e filogenéticas (inferência bayesiana e verossimilhança máxima), bem como análises de network para estimar as relações de parentesco entre as sequências e, assim, testar a hipótese de HT. Os resultados mostraram que existe (i) distribuição irregular dos dois elementos nos gêneros Zaprionus e Drosophila, (ii) alta similaridade entre as sequências das espécies do complexo melanogaster e do subgênero Zaprionus, (iii) incongruências entre as filogenias dos elementos e das espécies hospedeiras, e (iv) tempos de divergência entre as sequências dos dois elementos de espécies do subgênero Zaprionus e do complexo melanogaster inferiores aos tempos de divergência das espécies. Esses resultados fundamentam a hipótese de ocorrência de transferência dos retrotransposons NLTRs Helena e BS entre as espécies do complexo melanogaster de Drosophila e do subgênero Zaprionus, durante a diversificação concomitante das espécies na África Tropical, no período do Mioceno Tardio.

Palavras chaves: *retrotransposons sem LTRs, LINEs, transferência lateral, Zaprionus, Drosophila*

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate whether the retrotransposons without LTRs (NLTRs) Helena and BS were involved in horizontal transfer (HT) events during the concomitant diversification of the species of the melanogaster subgroup of the Drosophila melanogaster group, and the subgenus Zaprionus, in Tropical Africa. The mode of transposition of the NLTRs, without the formation of a DNA intermediate, is used to explain the scarcity of HT reports of this type of element. Previous studies evidenced a high HT rate of LTRs retrotransposons in species of the two groups above cited, which supported the hypothesis that these species went through a permissive phase to the occurrence of HT, as a result of the geographical and temporal overlap that they suffered during their diversification. To investigate this hypothesis, a region of the reverse transcriptase gene of the NLTR retrotransposons Helena and BS was used to investigate the occurrence of HT between the species. Sequences were obtained from Zaprionus strains, via sequencing, after amplification and cloning, and via in silico analyzes in the Drosophila genomes available in the databases, or via sequencing of Drosophila and Zaprionus genomes. Evolutionary (divergence analyses and estimation of divergence times between sequences) and phylogenetic (Bayesian inference and maximum likelihood) analyses were performed, as well as network analyses to estimate the evolutionary relationships between the sequences and, thus, to test the hypothesis of HT. The results showed that there is (i) irregular distribution of the two elements in the genera Zaprionus and Drosophila, (ii) high similarity between the sequences of the melanogaster complex and the Zaprionus subgenus, (iii) incongruities between the phylogenies of the elements and host species, and iv) times of divergence between the sequences of the two species elements of the subgenus Zaprionus and the melanogaster complex inferior to the times of divergence of the species. These results support the hypothesis of HT of the retrotransposons NLTRs Helena and BS between the species of the Drosophila melanogaster complex and the subgenus Zaprionus, during the concomitant diversification of the species in Tropical Africa in the late Miocene period.

Keywords: *non-LTR retrotransposons, LINEs, lateral transfer, Zaprionus, Drosophila*

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. Material e Métodos	26
3. 1. Análises <i>in silico</i>	27
3.1.1. Busca das sequências nos bancos de dados.....	27
3. 1.2. Montagem De Novo e anotação de TEs pelo método DNAPipeTE	31
3.2. Análises <i>in vitro</i>	33
3.2.1. Sequenciamento dos elementos <i>Helena</i> e <i>BS</i> em <i>Zaprionus</i>	34
3.3. Análises evolutivas.....	35
3.3.1 Análises filogenéticas	35
3.3.2 Tempos de divergência	36
4. Resultados	37
4.1. Análises <i>in silico</i> em genomas do grupo <i>melanogaster</i> de <i>Drosophila</i>	38
4.2. Análises <i>in silico</i> dos elementos <i>Helena</i> e <i>BS</i> em genomas do subgênero <i>Zaprionus</i>	40
4.3. Análises <i>in vitro</i> dos elementos <i>Helena</i> e <i>BS</i> em espécies do subgênero <i>Zaprionus</i>	41
4.4. Divergência genética dos elementos <i>Helena</i> e <i>BS</i>	42
4.5. Inferências filogenéticas e tempos de divergência entre sequências.....	44
4.6. Análises de <i>Network</i>	49
5. Discussão	52
5.1. O elemento <i>Helena</i>	54
5.2. O elemento <i>BS</i>	57
5.3. Condições para ocorrência de transferência horizontal.....	59
6. Conclusões	61
7. Referências Bibliográficas	63
8. Apêndices	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Elementos de transposição

▪ *Características e classificação*

Elementos de transposição (TEs) são sequências repetitivas que possuem a capacidade de se movimentar e de se inserir em outros locais do genoma. Essas sequências móveis são agrupadas hierarquicamente em duas Classes (Classes I e II), que se diferenciam quanto à utilização de um passo de transcrição reversa em seu processo de mobilização, subclasses (apenas para os TEs da Classe II), ordens, superfamílias, famílias e subfamílias (WICKER et al., 2007).

Os elementos da Classe I, também denominados retrotransposons, mobilizam-se via um mecanismo denominado *copy and paste*, em que o intermediário de RNA é transcrito de uma cópia genômica e então transcrito reversamente em DNA por uma transcriptase reversa, codificada pelo TE. Devido ao fato de que a cada ciclo completo de replicação é produzida uma nova cópia do TE que se insere em outro local do genoma, esses TEs realizam uma transposição replicativa. De acordo com Wicker et al. (2007), os retrotransposons podem ser agrupados em cinco ordens, cujos representantes se diferenciam em dois grupos quanto à presença ou não de longas repetições terminais diretas, as LTRs (do Inglês: *Long Terminal Repeats*). Três ordens incluem TEs com LTRs (Retrotransposons com LTRs, elementos *DIRS-like* e *Penelope-like*), e duas, TEs sem LTRs (NLTRs), (LINEs, do Inglês: *Long Interspersed Nuclear Elements*, e SINEs, do Inglês: *Short Interspersed Nuclear Elements*).

Os elementos da Classe II, que utilizam um mecanismo de transposição sem a ocorrência da formação de uma molécula de RNA intermediária, podem ser agrupados em duas Subclasses (Subclasse I: TIR e *Crypton*; Subclasse II: *Helitron* e *Maverick*) que se diferenciam pelo número de fitas de DNA clivadas durante o processo de transposição, resultando em transposição conservativa, na qual as duas fitas são clivadas, e a sequência excisada se insere um novo sítio, ou replicativa, em que apenas uma fita é clivada, envolvendo seu deslocamento da fita e formação de uma estrutura *Rolling-circle*, originando uma segunda cópia do transposon (WICKER et al., 2007).

Neste trabalho foram estudados dois TEs pertencentes à Ordem LINE, os elementos *Helena* e *BS*. Os LINEs são elementos longos, com cerca de 5 a 9 kb, amplamente distribuídos

no domínio Eukarya. Caracterizam-se por possuírem duas ORFs (do Inglês, *Open Reading Frame*) e serem autônomos, ou seja, são capazes de catalisarem sua própria mobilização. A ORF 2 (*pol*) codifica uma transcriptase reversa (RTase) e uma nuclease essenciais para a transposição (OSTERTAG; KAZAZIAN, 2005). Os LINEs estão agrupados em cinco superfamílias: *R2*, *L1*, *RTE*, *I* e *Jockey*, e cada superfamília apresenta subdivisões em muitas famílias (WICKER et al., 2007). Os elementos *Helena* e *BS* pertencem à família *Jockey*. O elemento *Helena* foi descrito em *Drosophila virilis* por Petrov (1995), enquanto que *BS* teve seu primeiro relato no mesmo ano por Udomkit et al. (1995), em *D. melanogaster*.

O primeiro elemento *Helena* no grupo *melanogaster* de *Drosophila*, foi descrito inicialmente em *D. simulans* o qual apresentava 4.912 pb (REBOLLO et al., 2008); por outro lado, o elemento *BS* completo, descrito, em *D. melanogaster*, apresentava 5.126 pb (UDOMKIT et al. 1995). Como LINEs que são, ambos apresentam longas caudas poli-A, uma característica dos LINEs, e a segunda ORF é altamente similar nos dois elementos.

Dentre as características dos TEs, destaca-se a habilidade de movimentação, tanto dentro do genoma de uma espécie, como entre genomas de espécies diferentes. A movimentação dentro dos genomas foi a propriedade dos TEs que propiciou sua descoberta por Barbara McClintock (1941, 1948, 1949, 1950) e essa propriedade tem sido extensivamente estudada desde a década de 70.

Assim como as demais sequências dos genomas de todos os organismos, os elementos de transposição podem evoluir por transferência vertical (VT), isto é, serem transmitidos de pais para filhos de forma sexual ao longo das gerações, ou pela reprodução assexuada para as células filhas. Contudo, existe outra forma de transferência de sequências genéticas entre os organismos, a transferência horizontal (HT), pela qual, genes e outras sequências encontradas nos genomas são transferidos de forma não-sexual entre espécies distintas. Os elementos de transposição se destacam no cenário de estudos sobre HT, uma vez que sua mobilidade, característica intrínseca de tais sequências, facilita a movimentação dentro e entre genomas (SCHAACK et al., 2010).

▪ *Ciclo evolutivo*

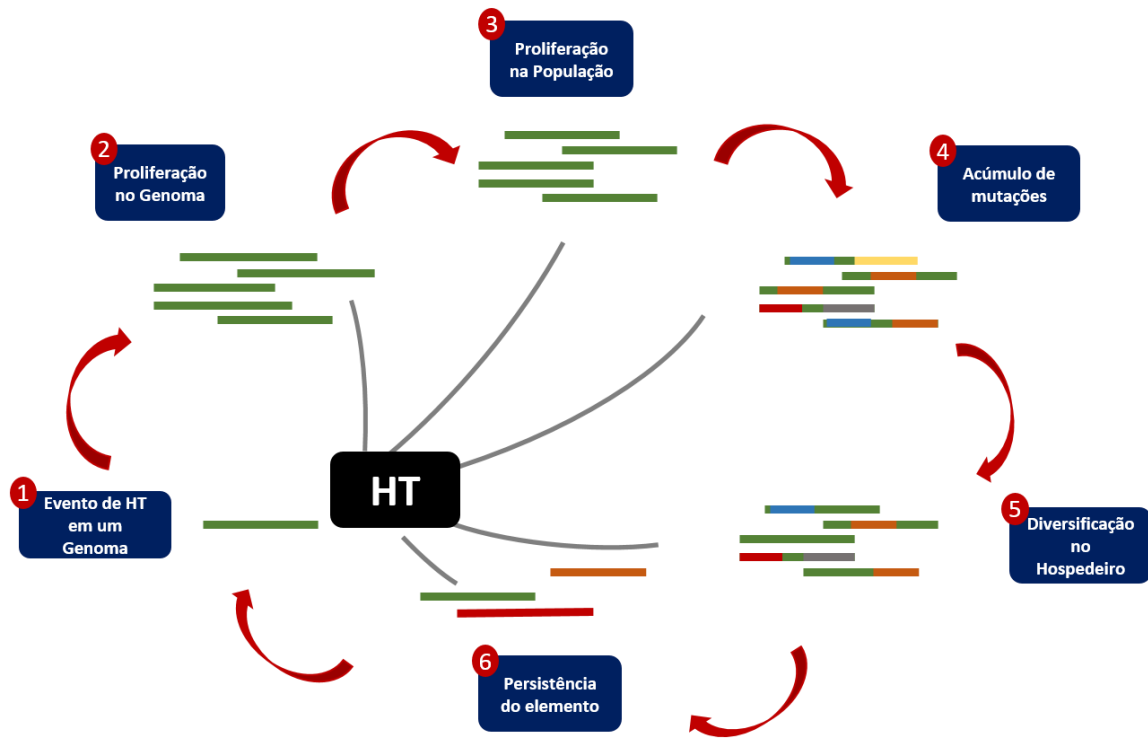
Os TEs apresentam um ciclo evolutivo composto por três fases principais, que consistem em origem, proliferação e inativação. A origem de um elemento no genoma pode ocorrer por três processos: (i) *de novo*, processo caracterizado pela recombinação entre elementos pré-existentes no genoma, (ii) introgressão entre espécies intimamente relacionadas, decorrente de hibridização, ou ainda, (iii) por HT intermediada por vetores (CAPY et al., 1998).

Após a introdução, os TEs podem colonizar o genoma, iniciando a fase de proliferação, uma etapa importante para a manutenção dessas sequências no genoma hospedeiro. Durante esse processo, podem ocorrer mutações, devido às inserções do TE em outros locais do genoma, ou mesmo devido às excisões. Além disso, a proliferação dos TEs pode levar à recombinação homóloga, promovendo reorganização genômica, em decorrência de deleções, duplicações, inversões e translocações resultantes desse processo (GRIFFITHS et al., 2008).

Logo após a introdução em um novo genoma podem ocorrer explosões de transposição, evento caracterizado por um aumento significativo do número de cópias do elemento em decorrência da ausência de mecanismos de regulação do TE no novo genoma hospedeiro. Essas explosões podem ocorrer também em períodos posteriores, frequentemente associadas a estresse genômico ou ambiental (BIÉMONT, 1994). Desse modo explosões de transposição, podem estar associadas à colonização de novos habitats, seguida de irradiação adaptativa (REBOLLO et al., 2010). O aumento do número de cópias de um elemento no genoma pode acarretar consequências deletérias, uma vez que os TEs podem se inserir dentro de regiões reguladoras, ou dentro de éxons, fundamentais para o funcionamento do organismo (KIDWELL et al., 1977). Entretanto, a explosão de transposição pode também resultar em mudanças favoráveis, aumentando as potencialidades de novos domínios e regiões reguladoras que podem ser utilizadas pelo genoma hospedeiro (FESCHOTTE, 2008). Assim, a fase de proliferação pode ou não ser bem-sucedida.

Após a fase de proliferação ocorre a dispersão do TE pela população, e o acúmulo de mutações ao longo das gerações. Durante essa fase ocorre a diversificação do elemento até o final do ciclo, em que o TE pode persistir no genoma por muitas gerações, ou ser extinto em decorrência da perda de mobilidade, resultante de processos regulatórios pré e pós-transcricionais e degradação estrutural (ALMEIDA; CARARETO, 2005). Ao longo do ciclo, em qualquer fase, o TE poderá ser transferido horizontalmente para outras espécies (Figura 1).

Figura 1. Esquema do ciclo evolutivo de um TE. 1 – Um evento de HT; 2 – Posteriormente à invasão do TE em um novo genoma, ocorre a proliferação do mesmo; 3 – No processo de proliferação do TE no genoma pode ocorrer a dispersão do elemento na população; 4 – Acúmulo de mutações ao longo do tempo; 5 – Como decorrência do acúmulo de mutações o TE pode se diversificar; 6 – O TE pode permanecer no genoma, ou ser perdido, sendo que a ocorrência de eventos de HT pode ocorrer em todas as fases do ciclo evolutivo dos TEs.



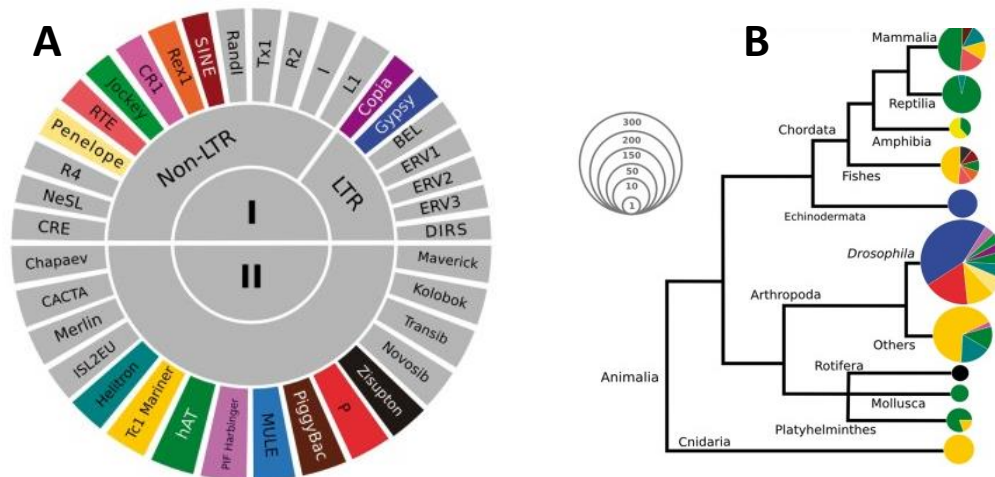
▪ Transferência horizontal

O movimento de material genético entre genomas, tanto para genes como para TEs, tem sido amplamente descrito em procariotos (DOOLITTLE, 1999); contudo, em eucariotos, é um fenômeno menos frequente (ANDERSON, 2005). Não obstante, HT em eucariotos de sequências móveis tem sido crescentemente relatada nas duas últimas décadas, particularmente envolvendo TEs de drosofilídeos e outros insetos (revisado em LORETO et al., 2008; CARARETO, 2011; WALLAU et al., 2012; ORTIZ; WALLAU, 2015; DIAS et al., 2016). Tais eventos são difíceis de serem seguramente inferidos, pois é necessário comprovar que características inerentes ao ciclo evolutivo dos TEs, tais como degeneração de sequências, perda estocástica e diferentes taxas de evolução não são responsáveis pelos padrões que sugerem HT (CUMMINGS, 1994; CAPY, 1998; LORETO et al., 2008; CARARETO, 2011; WALLAU et al., 2012).

A documentação da ocorrência de HT de TEs em eucariotos é relativamente recente. O primeiro e melhor caracterizado caso de HT em eucariotos é referente ao elemento *P*, um transposon de DNA, que apresenta 2.9 kb (DANIELS et al., 1990). O elemento foi transferido horizontalmente de *D. willistoni* para *D. melanogaster* recentemente. Propõe-se que o evento de HT ocorreu após a década de 1960, uma vez que linhagem de *D. melanogaster* coletadas antes de 1960 não apresentavam sequências do elemento em seus genomas. As evidências que corroboram a hipótese de HT do elemento *P*, consistem em: (i) alta similaridade entre as sequências do elemento *P* de *D. willistoni* e *D. melanogaster*, espécies divergiram a mais de 50 milhões de anos e compartilham elementos P com apenas um nucleotídeo de diferença, fato inesperado com a filogenia das espécies, (ii) a quase ausência do elemento *P* canônico em outras espécies do subgrupo *melanogaster*, (iii) a ocorrência de uma sobreposição espaço-temporal recente entre espécies de *D. melanogaster* e *D. willistoni* (DANIELS et al, 1990; CAPY et al, 1994). Cabe ressaltar que o elemento *P* canônico dentro do subgrupo *melanogaster* era restrito apenas ao genoma de *D. melanogaster*, contudo, atualmente foi reportada a HT recente do elemento de *D. melanogaster* para *D. simulans*. (KOFLEER et al., 2015).

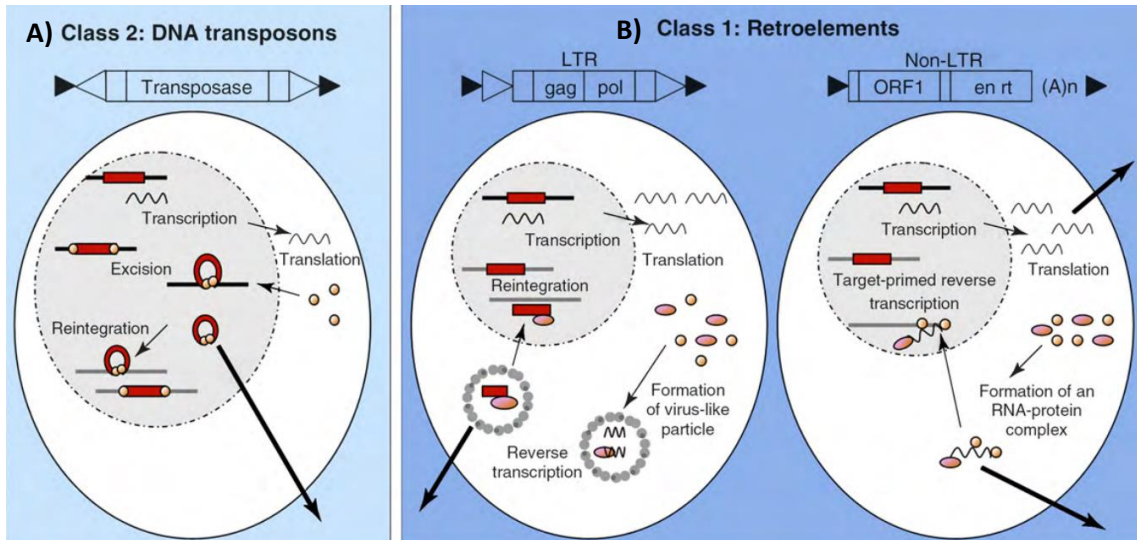
A frequência da ocorrência de HT está diretamente relacionada com as ordens de TEs (Figura 2), uma vez que os casos reportados de eventos de HT envolvendo elementos NLTRs são considerados raros, em comparação aos de Transposons de DNA e aos Retrotransposons com LTRs. Dentre os 214 casos publicados até 2010, 103 e 97 casos envolveram transposons de DNA e retrotransposons com LTRs, respectivamente, e apenas 14 de retrotransposons NLTRs (SCHAACK et al., 2010). Para espécies de drosofilídeos, dos 113 casos relatados, apenas seis envolvem elementos NLTRs (CARARETO, 2011).

Figura 2. A: Classificação dos TEs de acordo Kapitonov e Jurka (2008), B: Proporções de casos de HT em grupos em que já foram reportadas sua ocorrência. Fonte: Wallau et al. (2012).



A baixa frequência de casos de HT envolvendo NLTRs é uma peculiaridade de tais sequências, provavelmente em decorrência do modo de transposição desses TEs. Enquanto os Transposons de DNA e retrotransposons com LTRs formam um intermediário de DNA no citoplasma durante o processo de transposição, os NLTRs nunca formam uma molécula intermediária de DNA livre, já que são transcritos reversamente no seu sítio alvo de inserção, por meio de um mecanismo denominado *Target-primed reverse transcription* (LUAN et al., 1993; FINNEGAN, 1997), esquematizado na Figura 3. Em *Drosophila*, apenas quatro retrotransposons NLTRs foram associados a eventos de transferência horizontal: os elementos *I* (*D. simulans* / *D. melanogaster*), *jockey* (*D. melanogaster* / *D. funebris*), *F* (*D. melanogaster* / *D. yakuba*) e *doc* (*D. melanogaster* / *D. yakuba*) (revisado em LORETO et al., 2008). Somados aos 10 casos reportados em outros organismos, totalizam menos que 10% dos casos de HT já relatados em eucariotos (SORMACHEVA et al., 2012; IVANEVIC et al., 2013; EL BAIDOURI et al., 2014; SHARMA; PRESTING; 2014; GALLUS et al., 2015; SUH et al., 2016).

Figura 3. Mecanismos de transposição de TEs: A) Esquema do ciclo de transposição de transposons de DNA, B) Esquema do ciclo de transposição de retrotransposons, à esquerda retroelementos com LTRs e à direita retroelementos sem LTRs. Fonte: Schaack; Gilbert; Feschotte (2010).



1.2. Ocorrência de HT em Drosofilídeos

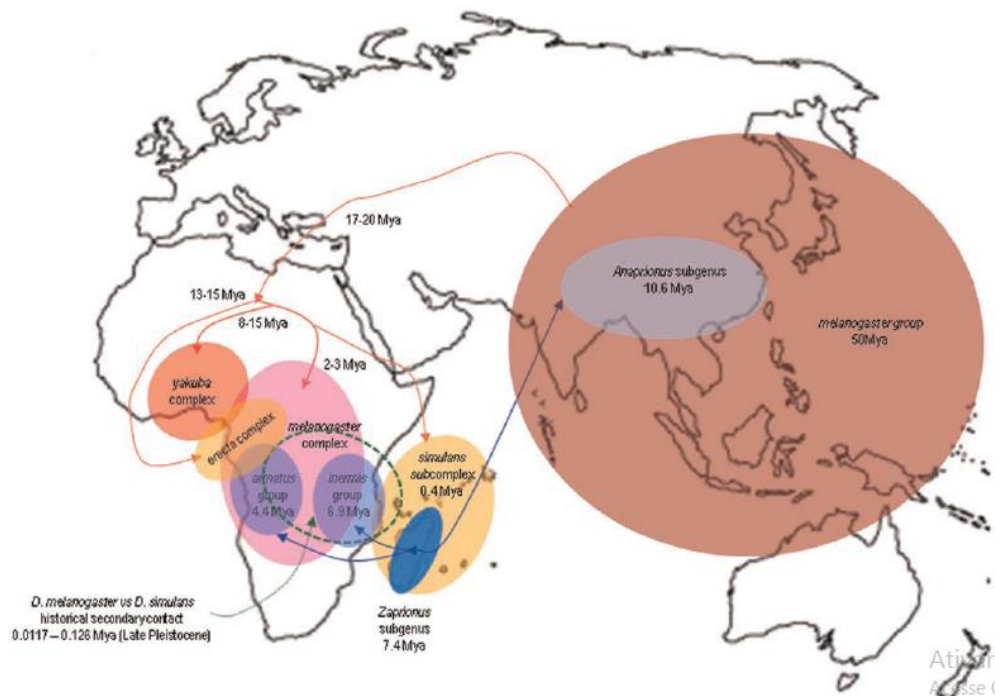
Dos 214 casos de HT descritos em eucariotos, 137 envolvem drosofilídeos (64%), particularmente entre espécies do gênero *Drosophila*. Essa preponderância de eventos de HT provavelmente se deve ao fato que no gênero *Drosophila* estão alguns dos mais famosos casos de HT descritos, como também pelos recursos genômicos disponíveis para este grupo. O enviesamento de amostragem taxonômica em projetos de sequenciamento genômico total pode tornar difícil inferir padrões de HT em grupos sub-representados (SCHAACK et al., 2012). Mesmo entre drosofilídeos existem grupos ainda pouco estudados, e dentre eles destacam-se as espécies do gênero *Zaprionus*.

▪ Origem geográfica do subgênero *Zaprionus* e do subgrupo *melanogaster*

O gênero *Zaprionus*, que pertence à família Drosophilidae, se originou nos períodos médio e tardio do Mioceno (há cerca de 13 milhões de anos), na região Oriental (Figura 4, revisado em CARARETO, 2011), e é dividido em dois subgêneros: *Anaprionus*, de origem asiática e *Zaprionus*, de origem africana. São duas as hipóteses para a origem do subgênero

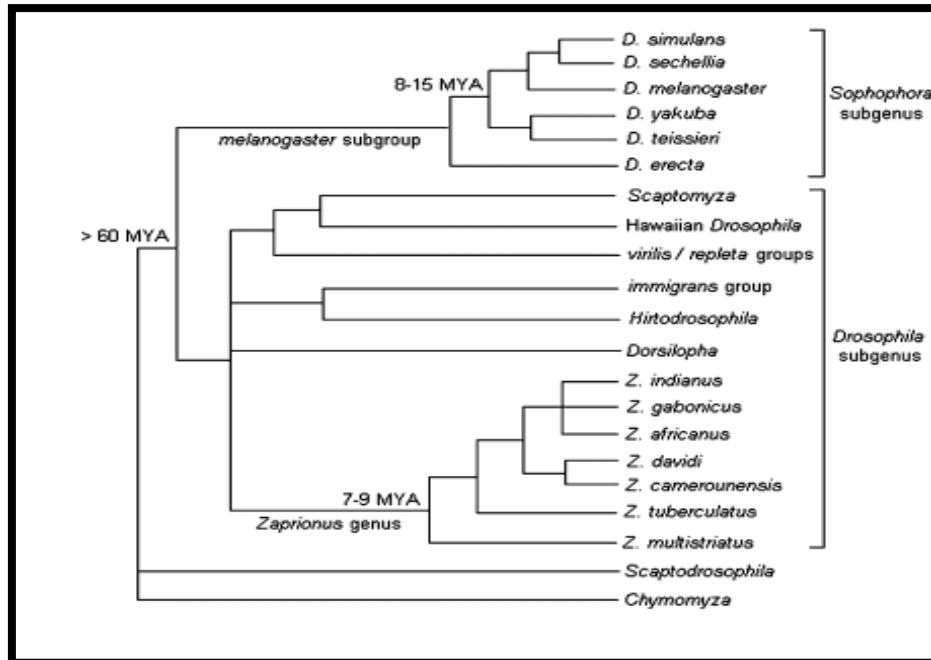
Zaprionus. De acordo com a primeira hipótese, propõe que o gênero teria se dispersado a partir da Ásia, via Oriente Médio, e sofrido um processo de irradiação adaptativa na África, principalmente depois da formação do Grande Vale do Rift e do Mar Vermelho, no Mioceno Tardio (cerca de 7 milhões de anos atrás). A segunda hipótese, por sua vez, assume a possibilidade de a dispersão ter ocorrido no sentido da Ásia para as ilhas do Oceano Índico. Essa hipótese é apoiada por uma mudança climática relacionada ao surgimento de chuvas sazonais nas ilhas do Oceano Índico, há cerca de 8 milhões de anos, que teria favorecido a colonização das ilhas por drosofilídeos. Após esse evento, teria ocorrido a migração de uma linhagem para o continente africano (há cerca de 4 milhões de anos) (YASSIN et al., 2008).

Figura 4. Reconstrução gráfica da biogeografia histórica dos três complexos de espécies (*erecta*, *yakuba* e *melanogaster*) do subgrupo *melanogaster* do grupo *melanogaster* do gênero *Drosophila* (cores avermelhadas) e dos dois grupos de espécie do subgênero *Zaprionus* do gênero *Zaprionus* (cores azuladas). As idades da colonização do continente africano e diversificação são indicadas em milhões de anos. A área demarcada em verde representa o retorno à simpatria das *D. melanogaster* and *D. simulans* depois da especiação da primeira na África Central, e da segunda, em Madagascar e ilhas do Oceano Índico (revisado em CARARETO, 2011).



O posicionamento filogenético do gênero *Zaprionus* tem sido revisto nos últimos anos e já é consenso que as espécies do gênero formam um grupo monofilético dentro do gênero *Drosophila*, mais relacionado ao subgênero *Drosophila* do que ao subgênero *Sophophora* (RUSSO et al., 1995; TATARENKOV et al., 1999; ROBE, 2008; DA LAGE et al., 2007; YASSIN et al., 2008a; CARARETO, 2011; RUSSO et al., 2013). Contudo, o exato relacionamento de *Zaprionus* com os grupos de *Drosophila* ainda não está completamente definido; contudo, uma proposta consenso é apresentada na Figura 5.

Figura 5. Filogenia simplificada do posicionamento de *Zaprionus* no gênero *Drosophila* e tempos de divergência de acordo Kwiatowski e Ayala (1999) e Tamura et al. (2004a, b).



Outro grupo de espécies que também se originou na África, a partir de ancestrais asiáticos, é o subgrupo *melanogaster* de *Drosophila* (grupo *melanogaster*, subgênero *Sophophora*) (Figuras 4 e 5). Esse subgrupo evoluiu a partir de uma população fundadora *proto-melanogaster* que chegou ao continente africano entre ~ 17 e 20 milhões de anos proveniente da região biogeográfica Oriental (LACHAISE et al., 2004). Lachaise e Silvain (2004) propuseram a existência de três centros de especiação no continente africano, responsável pela formação de três complexos de espécies do subgrupo *melanogaster*. As espécies dos complexos *erecta* (*D. erecta* e *D. orena*) e *yakuba* (*D. yakuba*, *D. teissieri* e *D. santomea*) evoluíram na região oeste, a partir da linhagem *melanogaster* ancestral comum, entre 13 a 15 milhões de anos e 8 a 15 milhões de anos atrás, respectivamente. No complexo *melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia* e *D. mauritiana*), *D. melanogaster* evoluiu a partir de uma linhagem ancestral entre 2 e 3 milhões de anos atrás na África Central e, posteriormente, o ancestral do subcomplexo *simulans* (*D. simulans*, *D. sechellia* e *D. mauritiana*), aparentemente, surgiu a partir de um mesmo evento de divisão, em aproximadamente 400 mil anos atrás, colonizando Madagascar e ilhas do Oceano Índico (revisão em CARARETO, 2011). Contudo, é necessário destacar que outros estudos produziram estimativas diferentes para a divergência no subgrupo *melanogaster*. Por exemplo, os tempos estimados para a divergência entre *D. melanogaster* e

D. simulans variam de 0,8 a 5,4 milhões de anos (CACCONI et al., 1988; RUSSO et al., 1995; SHARP; LI, 1999; TAMURA et al., 2004; CUTTER, 2008). Entre os pares *D. melanogaster* e *D. simulans* versus *D. erecta* e *D. orena* ou, entre *D. melanogaster* e *D. simulans* versus *D. yakuba* e *D. teissieri*, a divergência estimada foi respectivamente de 12,6 e 12,8 milhões de anos (TAMURA et al., 2004). Por outro lado, Russo et al. (1995) haviam estimado o tempo de divergência entre *D. melanogaster* / *D. yakuba* em cerca de metade desse valor, cerca de 6 milhões de anos.

1.3. Transferência horizontal de TEs entre *Zaprionus* e *Drosophila*

Os dados biogeográficos acima apresentados sugerem que as espécies do subgrupo *melanogaster* e do subgênero *Zaprionus* compartilharam espaço e tempo durante a diversificação na África Tropical. É razoável supor também, nesse caso, que as espécies dos dois subgêneros apresentassem algum grau de sobreposição de nichos, como sítios de acasalamento e reprodução. Essas sobreposições foram utilizadas como argumento para explicar as altas taxas de transferência horizontal (HT) de TEs encontradas entre espécies do subgrupo *melanogaster* e do subgênero *Zaprionus* (SETTA et al., 2009, 2011). Devido às características biogeográficas de tais espécies, os autores propuseram a hipótese de ocorrência de um estado de permissividade para HTs entre as espécies do subgênero *Zaprionus* e as do subgrupo *melanogaster* durante a diversificação de ambos os grupos de espécies, na África Tropical. Contudo, como nos dois trabalhos acima citados não foram investigados retrotransposons NLTRs, formula-se aqui a hipótese de que o estado permissivo teria facilitado também a transferência desse tipo de elementos, menos propensos a HT. Essa proposta é reforçada por um estudo recente que propõe que a frequência de HT envolvendo retrotransposons pode aumentar devido a aproximação de relações ecológicas entre as espécies (WANG; LIU, 2016). Esses autores mostraram alta frequência de HTs entre *L. vannamei*, uma espécie de crustáceo ancestral, com outras espécies de invertebrados aquáticos, e propuseram que relações como predação podem ter favorecido a ocorrência dos eventos. As espécies dos gêneros *Zaprionus* e *Drosophila*, não apresentam relações de predação, contudo o compartilhamento geográfico e temporal, e possivelmente a similaridade de nichos ecológicos, entre os gêneros durante a diversificação (YASSIN et al., 2008) pode ter papel importante na ocorrência de possíveis eventos de HT.

Como a hipótese de HTs envolvendo NLTRs implica em um estado permissivo para troca horizontal de sequências entre espécies que compartilharam um período recente de diversificação na África Tropical, para se testar efetivamente a hipótese devem ser investigadas não apenas espécies dos dois grupos que compartilharam espaço e tempo durante sua diversificação (espécies do subgrupo *melanogaster* e subgênero *Zaprionus*), mas, também, espécies dos mesmos grupos que não apresentaram sobreposição espacial e temporal (espécies asiáticas do grupo *melanogaster* e do subgênero *Anaprionus*, também asiático). Os elementos *Helena* e *BS*, dois retrotransposons NLTRs com história de transferência vertical dentro do gênero *Drosophila* (GRANZOTTO et al., 2009; GRANZOTTO et al., 2011) foram selecionados para testar essa hipótese. Para isso, foram investigadas quanto à presença dos elementos *Helena* e *BS* ao menos uma espécie representante de cada grupo, subgrupo e complexo de espécies do grupo *melanogaster* e do gênero *Zaprionus* com genomas sequenciados (*Drosophila* e *Zaprionus*), ou com linhagens disponíveis para aquisição (*Zaprionus*).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo teve por objetivo investigar se os elementos NLTR *Helena* e *BS* estiveram envolvidos em eventos de HT entre drosofilídeos do subgrupo *melanogaster* de *Drosophila* e do gênero *Zaprionus* durante a diversificação de na África Tropical.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Verificar a ocorrência do elemento *Helena* e *BS* em espécies do subgênero *Zaprionus* e do grupo *melanogaster* ainda não investigadas;
- 2) Analisar a diversidade de sequências dos elementos investigados, em espécies dos gêneros *Drosophila* e *Zaprionus*.
- 3) Inferir as relações filogenéticas entre as sequências *Helena* e *BS* dentro e entre os dois grupos de espécies;
- 4) Datar a ocorrência da sequência ancestral comum mais recente dos elementos *Helena* e *BS* compartilhadas pelas espécies dos dois grupos;
- 5) Identificar espécies envolvidas em transferências horizontais dos elementos *Helena* e *BS*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas sequências *in silico* dos elementos *Helena* e *BS* tanto de espécies de *Drosophila* (Tabelas 1 e 2), como de espécies de *Zaprionus* (Tabela 5), e também sequências obtidas de material *in vitro*, apenas para *Zaprionus* (Tabela 3).

Para as análises *in silico* foram obtidas sequências dos elementos *Helena* e *BS*, por três diferentes modos: (i) busca em genomas públicos nos bancos de dados (<http://flybase.bio.indiana.edu/blast/>), (ii) obtenção de sequências geradas por meio de sequenciamento *Next Generation*, e anotadas pelo método DNAPipeTE, em 19 genomas do grupo *melanogaster* de *Drosophila* e três genomas de espécies do subgênero africano *Zaprionus*. (iii) busca direta e extração dos respectivos elementos em três genomas de *Zaprionus* (*Z. indianus*, *Z. africanus*, *Z. gabonicus*). As sequências obtidas em (ii) e os genomas utilizados (iii), foram disponibilizados pela Dra. Annabelle Haudry, pesquisadora da Universidade de Lyon.

3.1. Análises *in silico*

3.1.1. Busca de sequências em bancos de dados

Foram realizadas buscas de sequências dos elementos *Helena* e *BS* em 13 genomas de espécies do grupo *melanogaster* disponíveis no banco de dados do Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/blast/>) e nos genomas disponibilizados que ainda não haviam sido investigados (Tabelas 1 e 2). Os doze genomas inicialmente sequenciados de *Drosophila* já haviam sido investigados quanto à ocorrência do elemento *Helena* (GRANZOTTO et al., 2009) e as sequências foram disponibilizadas para este estudo.

Para a busca de sequências homólogas aos elementos *Helena* e *BS*, nas espécies de *Drosophila*, foram utilizadas como *query*, sequências referências completamente caracterizada do elemento *Helena* de *D. simulans* (4.912 pb; REBOLLO et al., 2008), e do elemento *BS* de *D. melanogaster* (5,126 pb; UDOMKIT et al., 1995), usando BLASTN (Altschul et al., 1990). As comparações entre a *query* e os genomas de *Drosophila* foram realizadas com o HSPs (High Scoring Pairs), dentro do algoritmo BLAST, com E-value $\leq 1e^{-10}$. As sequências correspondentes aos três melhores *hits* BLAST foram selecionadas e estendidas para incluir 3

kb das regiões flanqueadoras 5' e 3'. A sequência mais conservada foi considerada como a sequência referência dos elementos *Helena* e *BS* de cada genoma. A seguir, utilizando a sequência referência de cada espécie, foi feita uma busca por sequências *Helena* e *BS* em cada genoma. Foram retidos, para análise posterior, os *hits* iguais ou superiores a 300 pb, e com identidade igual ou superior a 80%, adotando o critério de Wicker et al. (2007), que estabelece que sequências que apresentam similaridade igual ou maior que 80%, em ao menos 80% de sua sequência codificante, ou dentro das regiões terminais repetidas, ou ambas, são classificadas como pertencentes à mesma família de TEs.

Tabela 1. Espécies do grupo *melanogaster* com genomas sequenciados nas quais foram identificadas sequências do elemento *Helena* (<http://flybase.bio.indiana.edu/blast/>).

Subgrupo	Complexo	Espécie	Origem geográfica	Acesso
<i>melanogaster</i>	<i>yakuba</i>	<i>D. yakuba</i> *	África Ocidental	AF012049.1/AF012050.1/AF012048.1
	<i>yakuba</i>	<i>D. teissieri</i>	África Ocidental	AF012047.1/AF012051.1
	<i>erecta</i>	<i>D. erecta</i> *	África Ocidental	scaffold_4845_2218646_2221251
	<i>erecta</i>	<i>D. orena</i>	África Ocidental	AF012037.1
	<i>melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i> *	África Central	AF012031.1/AF012030.1
		<i>D. simulans</i> *	Madagascar / Ilhas do Oceano Índico	AF012033.1/AF012034.1/AF012035.1/AF012032.1
		<i>D. mauritiana</i>	Ilhas Mauritius	AF012043.1/AF012039.1/AF012038.1
		<i>D. sechellia</i> *	Ilhas Seychelles	AF012045.1/AF012044.1
<i>ananassae</i>	<i>ananassae</i>	<i>D. ananassae</i> *	Sul da Ásia / Indonésia	scaffold_12984_435983_440038
<i>biarmipes</i>	-	<i>D. biarmipes</i>	Sul da Ásia	-
<i>biplectinata</i>	-	<i>D. biplectinata</i>	Sul da Ásia	AFFE02006809.1_Contig6814
<i>elegans</i>	-	<i>D. elegans</i>	Ásia Oriental	-
<i>eugracilis</i>	-	<i>D. eugracilis</i>	Sul da Ásia / Indonésia	-
<i>ficuspila</i>	-	<i>D. ficuspila</i>	Sul da Ásia	-
<i>kikkawai</i>	-	<i>D. kikkawai</i>	Sul da Ásia	-
<i>rhopaloo</i>	-	<i>D. rhopaloo</i>	Sul da Ásia	-
<i>takahashii</i>	-	<i>D. takahashii</i>	Ásia Oriental	-

*: identificados por Granzotto *et al.* (2009)

Tabela 2. Espécies do grupo *melanogaster* com genomas sequenciados nas quais foram identificadas sequências do elemento *BS* (<http://flybase.bio.indiana.edu/blast/>).

Subgrupo	Complexo	Espécie	Origem geográfica	Acesso
<i>melanogaster</i>	<i>yakuba</i>	<i>D. yakuba</i> *	África Ocidental	
	<i>yakuba</i>	<i>D. teissieri</i>	África Ocidental	
	<i>erecta</i>	<i>D. erecta</i> *	África Ocidental	
	<i>erecta</i>	<i>D. orena</i>	África Ocidental	Dere_sc_4929_7756378, Dere_sc_4770_5228867, Dere_sc_4820_2761673, Dere_sc_4820_9973341 X77571.1, D.mel_3L_1850806, D.mel_3RHet_1484, D.mel_3RHet_2330, D.mel_2LHet_3560
	<i>melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i> *	África Central	
		<i>D. simulans</i> *	Madagascar / Ilhas do Oceano Índico	D.sim_chrU_1762568_1763533
		<i>D. mauritiana</i>	Ilhas Maurítius	
		<i>D. sechellia</i> *	Ilhas Seychelles	Dsec_super_176_76677_80870, Dsec_super_133_20980_24575, Dsec_super_1002_4604_5931
<i>ananassae</i>	<i>ananassae</i>	<i>D. ananassae</i> *	Sul da Ásia / Indonésia	
<i>biarmipes</i>	-	<i>D. biarmipes</i>	Sul da Ásia	-
<i>biplectinata</i>	-	<i>D. biplectinata</i>	Sul da Ásia	
<i>elegans</i>	-	<i>D. elegans</i>	Ásia Oriental	-
<i>eugracilis</i>	-	<i>D. eugracilis</i>	Sul da Ásia / Indonésia	-
<i>ficuspila</i>	-	<i>D. ficuspila</i>	Sul da Ásia	AFFG02008401.1_1_5555
<i>kikkawai</i>	-	<i>D. kikkawai</i>	Sul da Ásia	-
<i>rhopaloea</i>	-	<i>D. rhopaloea</i>	Sul da Ásia	-
<i>takahashii</i>	-	<i>D. takahashii</i>	Ásia Oriental	-

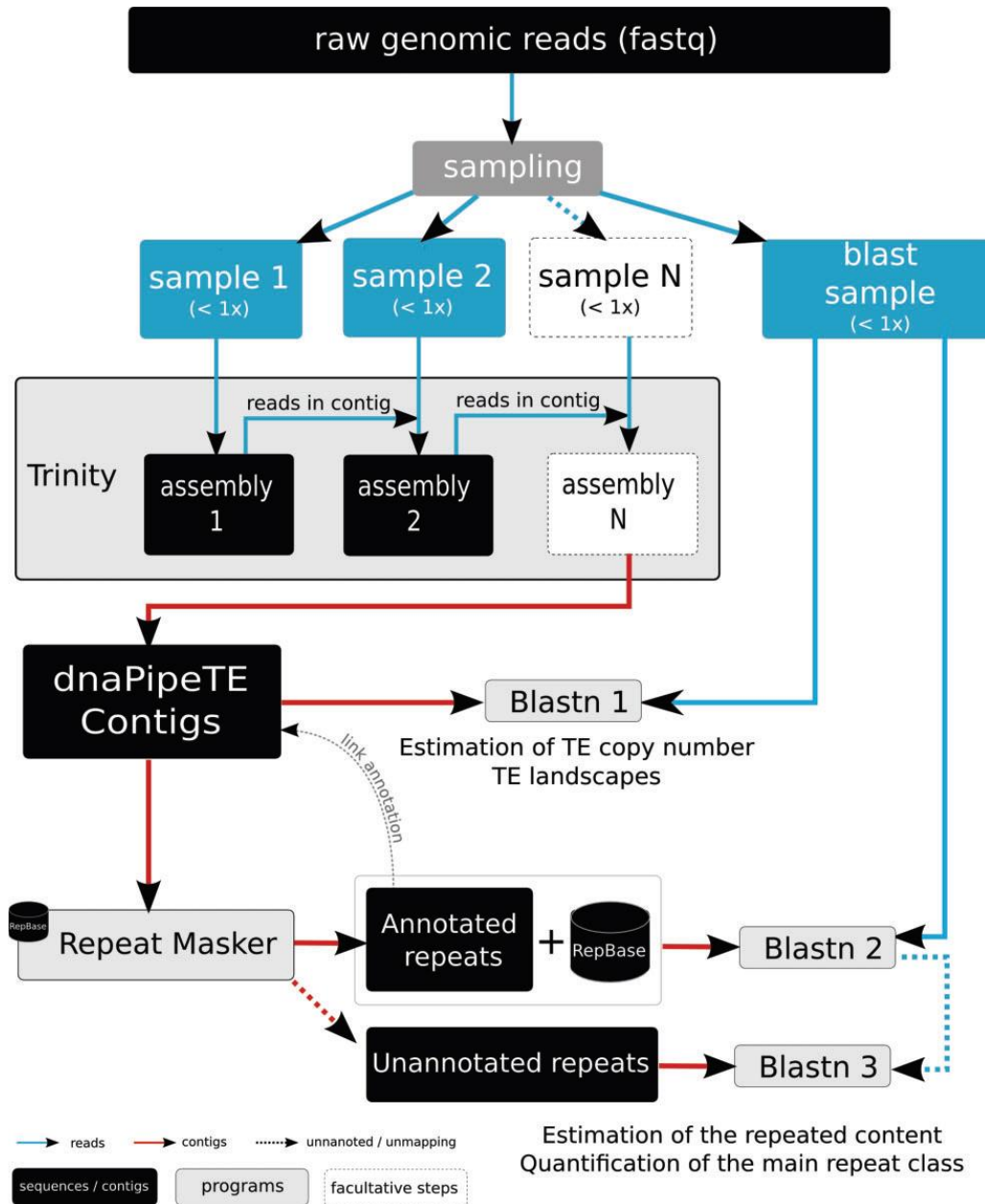
*: identificados por Granzotto *et al.* (2009)

3.1.2. Montagem *de novo* e anotação de TEs pelo método DNAPipeTE

A anotação dos elementos *Helena* e *BS* nos diferentes genomas de drosofilídeos foi realizada em colaboração com a Dra. Annabelle Haudry, utilizando método denominado DNAPipeTE, que consiste em um método De Novo Assembly e Pipeline de anotação de TEs (GOUBERT et al., 2015). O centro do DNAPipeTE é a utilização do programa *Trinity*, originalmente projetado para utilização de dados produzidos por RNA-seq, com a finalidade de montar dados de baixa cobertura. Adicionado ao *Trinity*, esse *pipeline* utiliza os bancos de dados Repbase e RepeatMasker (RM) para montagem automática das sequências repetitivas.

O primeiro passo do *pipeline* do DNAPipeTE é a realização de leituras genômicas no formato FASTQ que são amostradas. Posteriormente, ocorre a montagem, utilizando iterações do *Trinity*. É importante ressaltar que, em cada iteração, as leituras previamente montadas são adicionadas ao próximo passo para melhorar a montagem de repetição. Em um terceiro momento, os *contigs* montados são anotados utilizando o RepeatMasker, por fim, todos os *contigs* são comparados entre si para estimar a abundância de cada sequência montada. Ocorre então um segundo BLAST, onde a mesma amostra é sucessivamente comparada contra os *contigs* anotados, a partir do Repbase (Figura 6). Dessa forma, o método permite rápida montagem e anotação precisa de sequências repetitivas, a partir de uma pequena amostragem de material genômico disponível.

Figura 6. Pipeline do método DnaPipeTE. 1- Leituras genômicas no formato FASTQ são amostradas. 2 - Montagem de repetições é realizada usando *Trinity*. 3- Para cada iteração, as leituras previamente montadas são adicionadas ao próximo exemplar para melhorar a montagem. 4- Os *contigs* montados são anotados usando RM. 5 - todos os *contigs* são comparados pelo BLAST para estimar a abundância de cada sequência obtida. 6 - um segundo BLAST é realizado, a mesma amostra é sucessivamente comparada contra os *contigs* anotados do Repbase. Fonte: Goubert et al., 2015.



3.2. Análises *in vitro*

Nas análises *in vivo* foram investigadas 11 espécies do gênero *Zaprionus*, a partir de linhagens obtidas das coleções do “UC San Diego *Drosophila* Stock Center” (<https://stockcenter.ucsd.edu/info/welcome.php>) ou nos estoques pertencentes ao Laboratório de Evolução Molecular do IBILCE/UNESP (Tabela 3). Do subgênero *Anapriionus*, apenas a espécie *Z. bogoriensis* (sn *Z. multiestriatus*) estava disponível para análise.

Tabela 3. Espécies de *Zaprionus* que foram utilizadas no trabalho, sua classificação taxonômica e a origem geográfica e procedência da linhagem.

Subgênero	Grupo	Subgrupo	Complexo	Espécie	Origem da linhagem	Procedência da linhagem	
<i>Anapriionus</i> (<i>Asiático</i>)				<i>Z. bogoriensis</i>	Bangalore, Índia	520002752.00*	
<i>Zaprionus</i> (<i>Africano</i>)	<i>inermis</i>	<i>tuberculatus</i>	<i>sepsoides</i>	<i>Z. sepsoides</i>	Congo, África	500002744.02*	
			<i>tuberculatus</i>	<i>Z. tuberculatus</i>	Nigéria, África	500010001.06*	
	<i>vittiger</i>			<i>davidi</i>	<i>Z. davidi</i>	Ilha de São Tomé	<i>Cedida por Jean David</i>
				<i>indianus</i>	<i>Z. indianus</i>	Florianópolis,	<i>Cedida por Jean David</i>
				<i>gabonicus</i>	<i>Z. gabonicus</i>	Gabon, África	500002755.00*
				<i>africanus</i>	<i>Z. africanus</i>	Gabon, África	500022754.00*
				<i>ornatus</i>	<i>Z. ornatus</i>	Congo, África	500022749.00*
	<i>vittiger</i>			<i>camerounensis</i>	<i>Z. camerounensis</i>	Tanzânia, África	500011010.01*
				<i>nigranus</i>	<i>Z. nigranus</i>	Ilha de São Tomé	<i>Cedida por Jean David</i>
				<i>Z. inermis</i>	Camarões, África	500002746.00*	

* Linhagens adquiridas no UC San Diego *Drosophila* Stock Center

3.2.1. Sequenciamento dos elementos *Helena* e *BS* em espécies de *Zaprionus*

Para as espécies da *Zaprionus* cujos genomas não estavam sequenciados foram realizadas reações de amplificação e sequenciamento dos elementos *Helena* e *BS*, por meio de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada elemento.

Para amplificação dos elementos *Helena* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores DsechF-5'AGGATTTGTCATGCCACGCT3' e DsechR-5'TGTTTGGTGCTGCCATGTGT3', que amplificam uma sequência de 640 pb do gene da transcriptase reversa (RTase) do elemento completo de *D. sechellia*. Uma vez padronizada a concentração do DNA, foi realizada a reação de amplificação por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Essa reação foi realizada sob as seguintes condições: 200 ng de DNA genômico, 0,625 mM de cada dNTP, 0,8mM MgCl₂, 10 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq Platinum polimerase (Invitrogen) em tampão 1X. A reação de amplificação foi realizada de acordo com a seguinte ciclagem: desnaturação a 95°C, por 5 minutos, seguidos de 24 ciclos de 95°C, por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e, enfim, a extensão final a 72°C por 10 minutos.

As reações de amplificação para obtenção de sequências do elemento *BS* foram realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores DmelF-5' TGAAGAGAGCCCTGAATCGT3' e DmelR-5' GTGAAGCAGGGATTGATGGT3', que amplificam uma sequência de 774 pb do gene da transcriptase reversa (RTase) do elemento completo de *D. melanogaster*. Essa reação foi realizada sob as seguintes condições: 200 ng de DNA genômico, 0,625 mM de cada dNTP, 0,8mM MgCl₂, 10 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq Platinum polimerase (Invitrogen) em tampão 1X. A reação de amplificação foi realizada de acordo com a seguinte ciclagem: desnaturação a 95°C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos de 95°C, por 2 minutos, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e enfim a extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos de ambos TEs obtidos nas reações das PCRs foram purificados com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e clonados com o kit TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Três a 10 clones foram selecionados aleatoriamente e sequenciados no sequenciador automático in ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), Departamento de Tecnologia da UNESP de Jaboticabal usando os oligonucleotídeos M13F e M13R.

3.3. Análises evolutivas

3.3.1. Análises filogenéticas

As sequências utilizadas foram alinhadas usando os algoritmos MAFFT (KATOHI et al., 2002) e o programa “*Clustal W Multiple Alignment*” do “*BioEdit Sequence Alignment Editor V. 7.0.9.0*” (HALL, 1999). Os alinhamentos foram utilizados para realizar as inferências filogenéticas por Neighbor-Joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), utilizando o programa MEGA7 (TAMURA et al., 2007). Nessas análises, foi utilizado o método de *bootstrap* para a validação da robustez da filogenia, utilizando 1.000 réplicas de reamostragem (TOURASSE; LI, 2000). Também foi utilizada Inferência Bayesiana (BI), por meio do programa BEAST v16.1 (DRUMMOND et al., 2012), utilizando o teste de suporte filogenético *a posteriori*, derivado do método bayesiano. Esse método consiste em um cálculo de uma probabilidade *a posteriori* de confiabilidade dos ramos, utilizando uma amostragem de 100.000 árvores, um *burnin* de cerca de 10% do valor total de árvores produzidas e modelo de substituição Kimura-2 parâmetros (KIMURA, 1980) para o elemento *BS* e Tamura-Nei (TAMURA e NEI, 1993), para o elemento *Helena*, de acordo com a ferramenta Find Best DNA Model (MEGA 7).

As relações evolutivas entre as sequências nucleotídicas foram também inferidas por meio do programa *Network*, utilizando o algoritmo *Median Joining* (BANDELT et al., 1999) com os parâmetros padrões. Análises de *network* se tornaram uma importante ferramenta no estudo de TEs. As redes construídas a partir dos alinhamentos apresentam peculiaridades não encontradas nas análises filogenéticas: (i) mostram as sequências ancestrais no centro da rede e as derivadas nas extremidades; (ii) ilustram o grau de diversidade de sequências, uma vez que sequências muito similares se agrupam; (iii) apresentam vetores intermediários, que representam sequências inferidas por não terem sido amostradas, ou por terem sido perdidas durante a evolução, evento muito comum no ciclo evolutivo dos TEs. Esses vetores podem também representar o estado ancestral de uma cópia, cenário totalmente plausível uma vez que a partir do momento que o elemento se transpõe, passa a evoluir independentemente no genoma (CORDAUX et al., 2004).

Foram reconstruídas também as relações filogenéticas entre as sequências dos genes da citocromo oxidase subunidade 2 (COII) e da alpha-amylase (*Amyrel*) das espécies do subgênero

Zaprionus e do subgrupo *melanogaster* de *Drosophila*, utilizadas nesse trabalho, com o objetivo de construir uma árvore das espécies hospedeiras dos TEs. Para isso, as sequências dos genes foram concatenadas, e a árvore filogenética foi reconstruída pelo método de máxima verossimilhança, com a utilização do modelo de substituição de nucleotídeos *General Time Reversible* (GTR). O número de acesso das sequências *Amyrel* no Genebank são os seguintes: *Z. camerounensis* (EF458332.1), *Z. davidi* (EF458323.1), *Z. indianus* (EF458322.1), *Z. ornatus* (EF458321.1), *Z. tuberculatus* (AY736524.1), *Z. sepsoides* (AY736523.1), *Z. bogoriensis* (AY736516.1), *D. melanogaster* (NM_057914.4), *D. santomea* (AY736503.1), *D. simulans* (XM 002081767.2), *D. sechellia* (XM 002034125.1), *D. erecta* (XM 00197591.2), *D. yakuba* (XM 002092144.2), *D. teissieri* (AF039557.2), *D. orena* (U96158.2), *D. mauritiana* (AY7366503.1). As sequências do gene *Amyrel* para *Z. gabonicus* e *Z. africanus* foram obtidas diretamente nos genomas deste trabalho. O número de acesso das sequências COII no são os seguintes: de *Z. nigranus* (EF453698.1), *Z. camerounensis* (EF453699.1), *Z. davidi* (EF453704.1), *Z. indianus* (EF632396.1), *Z. ornatus* (EF453710.1), *Z. tuberculatus* (EU595373.1), *Z. sepsoides* (GU597495.1), *Z. bogoriensis* (GQ352278.1), *Z. gabonicus* (EF632399.1), *Z. africanus* (EF632398.1), *D. melanogaster* (KP731174.1), *D. santomea* (DQ382821.1), *D. simulans* (AF200849.1), *D. sechellia* (AF200831.1), *D. erecta* (GQ244453.1), *D. yakuba* (DQ382818.1), *D. teissieri* (DQ382819.1), *D. orena* (AY75269.1), *D. mauritiana* (AF474081.1).

3.3.2. Tempos de divergência

Os tempos de divergência das sequências dos elementos *BS* e *Helena*, a partir da sequência ancestral mais recente compartilhada pelas espécies, foram estimados utilizando-se uma estimativa bayesiana, por meio do programa BEAST v16.1 (DRUMMOND et al., 2012). Para a calibração da árvore filogenética foi utilizada a taxa de substituição neutra de nucleotídeos em *Drosophila* ($r=0,016/\text{sítio}/\text{milhões de anos}$, SHARP; LI, 1989).

4. RESULTADOS

4.1. Análises *in silico* em genomas do grupo *melanogaster* de *Drosophila*

As sequências dos elementos *Helena* e *BS* foram obtidas tanto pelo método DNAPipeTE, como pela busca direta dos elementos nos genomas disponíveis. A busca e verificação dos elementos *Helena* e *BS* nos genomas disponíveis, utilizando o método DNAPipeTE, apresentou resultados concordantes com análises anteriores (GRANZOTTO et al., 2009; GRANZOTTO et al., 2011). Posteriormente, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências de referência correspondentes de cada elemento, para uma estimativa das respectivas identidades.

Tabela 4. Espécies de *Drosophila* nas quais os elementos *Helena* e *BS* foram encontrados pelo método DNAPipeTE e por buscas em genomas públicos, número de cópias (NC) e identidade (ID). A identidade entre as sequências obtidas pelos DNAPipeTE, e nos genomas públicos, com as sequências referência de cada elemento (*D. simulans*, para o elemento *Helena*, e *D. melanogaster* para o elemento *BS*) foi obtida utilizando a ferramenta *Blast 2 - sequences*

Grupo	Subgrupo	Complexo	Espécie	Presença	NC	ID	
					<i>Helena</i> e <i>BS</i>	<i>Helena</i> <i>BS</i>	
<i>melanogaster</i>	<i>melanogaster</i>	<i>yakuba</i>	<i>D. yakuba</i>	<i>Helena/BS</i>	2 5	93 94	
			<i>D. santomea</i>	-		-	
		<i>erecta</i>	<i>D. erecta</i>	<i>Helena/BS</i>	1 10	93 93	
			<i>melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>Helena/BS</i>	2 5	94 97
		<i>D. simulans</i>		<i>Helena/BS</i>	7 7	98 96	
		<i>D. mauritiana</i>		<i>Helena</i>		95	
		<i>D. sechellia</i>		<i>Helena/BS</i>	6 4	95 94	
		<i>D. ananassae</i>		<i>Helena</i>	2	74	
		<i>biarmipes</i>	-	<i>D. biarmipes</i>	-	-	
		<i>biplectinata</i>	-	<i>D. biplectinata</i>	<i>Helena/BS</i>	3 2	77 70
		<i>elegans</i>	-	<i>D. elegans</i>	-	-	
		<i>eugracilis</i>	-	<i>D. eugracilis</i>	-	-	
		<i>ficuspila</i>	-	<i>D. ficuspila</i>	<i>BS</i>	4	65
				<i>D. malerkotliana</i>	-	-	
		<i>kikkawai</i>	-	<i>D. kikkawai</i>	-	-	
		<i>rhopaloa</i>	-	<i>D. rhopaloa</i>	-	-	
				<i>D. suzukii</i>	-	-	
<i>D. miranda</i>	-			-			
<i>takahashii</i>		<i>D. takahashii</i>	-	-			

O elemento *Helena* foi encontrado em *D. melanogaster*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. ananassae*, *D. biplectinata*. Essas sequências apresentaram diferentes estados de conservação, com sequências mais conservadas em *D. simulans*, *D. mauritiana* e *D. sechellia*, e sequências altamente degradadas e pequenas em *D. melanogaster* e *D. yakuba*. As menores sequências encontradas foram as de *D. mauritiana* e *D. sechellia* com 201 pb e, a maior de *D. simulans* com 2.135 pb. As sequências do elemento *Helena* referentes às espécies de *Drosophila* que se diversificaram na Ásia, apresentaram identidade (ID) inferior a 80%, que de acordo com Wicker et al. (2007), não pertenceriam à mesma família que as encontradas nas demais espécies. Neste trabalho, observam-se que somente as sequências dos

elementos *Helena* e *BS* pertencentes a espécies que se diversificaram na África apresentam identidade superior a 80% às sequências referências (Tabela 4).

O elemento *BS* foi encontrado pelo método DNAPipeTE em *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*. As sequências apresentaram diferentes níveis de conservação e tamanho, desde sequências com tamanho bem reduzido (214 pb), em *D. erecta*, até sequências maiores (2.135 pb) em *D. simulans*, com alta identidade média entre as cópias. Destaca-se, ainda, que elemento *BS* foi encontrado nos genomas *D. ficusphila* (4.268 pb) e *D. bipectinata* (4.159 pb) disponíveis pelo Flybase, mas não foram encontrados nos genomas analisados pelo DNAPipeTE (Tabela 4).

4.2. Análises *in silico* dos elementos *Helena* e *BS* em genomas do subgênero *Zaprionus*

Foi encontrada apenas uma cópia do retrotransposon *Helena* nos genomas sequenciados das espécies *Z. indianus* e *Z. gabonicus*, cópias essas de pequeno tamanho (*Z. indianus*: 445 pb; *Z. gabonicus*: 266 pb), mas com alta identidade (93% em ambos genomas) com a sequência referência do elemento de *D. simulans* (Tabela 5). Diferentemente do elemento *Helena*, foram encontradas diversas cópias do elemento *BS* nos três genomas de *Zaprionus* investigados. Foram identificadas 11 cópias em *Z. africanus*, 36 em *Z. indianus* e 35 em *Z. gabonicus* (Tabela 5). As sequências do elemento *BS* encontradas nos genomas de *Zaprionus* apresentaram alto grau de conservação, e sequências de diversos tamanhos, variando de 198 bp em *Z. gabonicus* a 4125 em *Z. indianus*. Destaca-se que em *Z. indianus* e *Z. gabonicus* foram encontradas sequências com todos os domínios de um elemento LINE completo, portanto essas sequências são putativamente ativas.

Tabela 5. Número de cópias (NC), tamanho e identidade (ID) entre a sequência referência de *BS* de *D. melanogaster* e as sequências do elemento *Helena*, obtidas pelo método de sequenciamento do DNAPipeTE, para as espécies de *Zaprionus*.

Espécies	NC	Tamanho	ID
	<i>Helena</i> <i>BS</i>	<i>Helena</i> <i>BS</i>	<i>Helena</i> <i>BS</i>
<i>Z. indianus</i>	1 36	445 286 - 4125	93 92
<i>Z. gabonicus</i>	1 35	266 198 - 3958	93 92
<i>Z. africanus</i>	0 11	390 - 1254	92

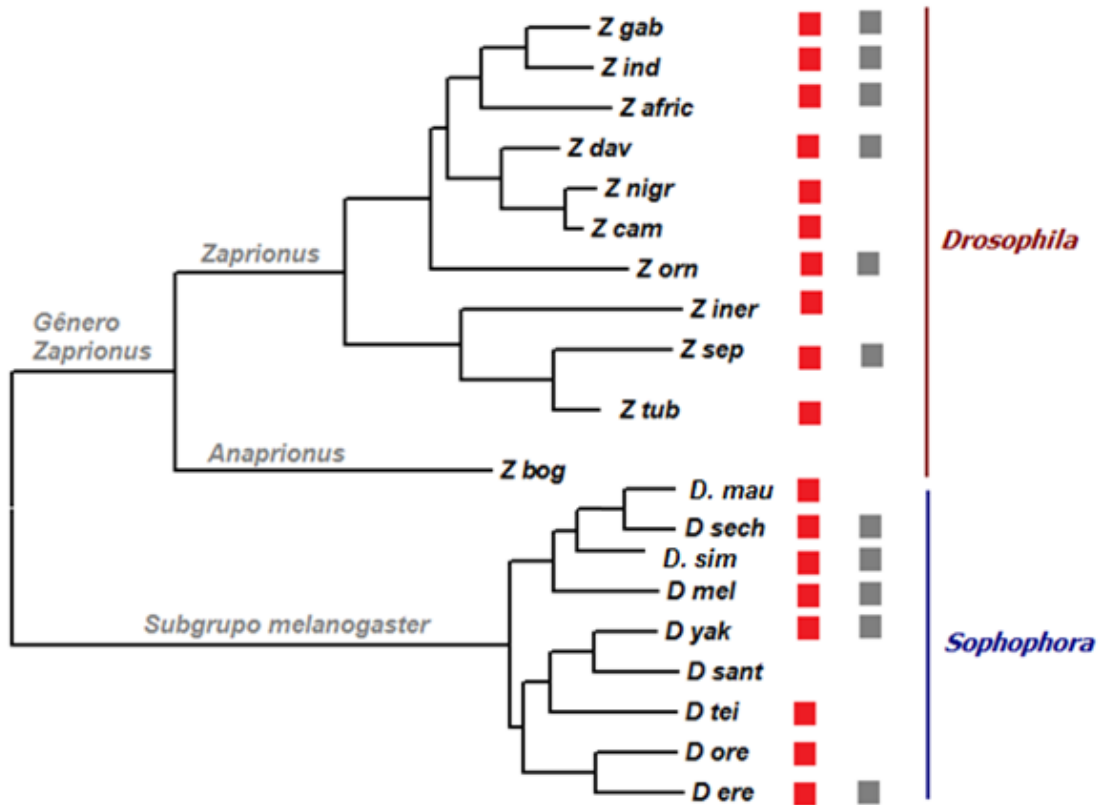
4.3. Análises *in vitro* dos elementos *Helena* e *BS* em espécies do subgênero *Zaprionus*

Foram amplificadas sequências do gene da transcriptase reversa do elemento *Helena* em 10 das 11 espécies de *Zaprionus* testadas (*Z. indianus*, *Z. tuberculatus*, *Z. nigranus*, *Z. gabonicus*, *Z. davidi*, *Z. ornatus*, *Z. sepsoides*, *Z. camerounensis*, e *Z. africanus*, *Z. inermis*). Destaque-se amplificação de uma sequência do elemento *Helena* em *Z. africanus*, não encontrada nas análises *in silico* fato que pode ser explicado por se tratarem de linhagem diferentes como também e da baixa cobertura dos genomas disponibilizados. Adicionalmente, o elemento *Helena* também não foi encontrado no genoma da espécie asiática *Z. bogoriensis*. As sequências são apresentadas no Apêndice 1.

Para o elemento *BS*, foram amplificadas sequências do elemento *BS* em seis das 11 espécies de *Zaprionus* testadas (*Z. indianus*, *Z. gabonicus*, *Z. davidi*, *Z. ornatus*, *Z. sepsoides*, e *Z. africanus*) (Apêndice 2).

Na Figura 7 é apresentada uma filogenia das espécies de *Zaprionus* e do subgrupo *melanogaster* de *Drosophila*, que foi reconstruída com sequências dos genes *Amyrel* e *COII*, pelo método de verossimilhança máxima, para representar a ocorrência dos elementos *Helena* e *BS* nas espécies estudadas neste trabalho.

Figura 7. Relações filogenéticas reconstruídas com sequências dos genes *Amyrel* (nuclear) e COII (mitocondrial) obtidas no GeneBank para as espécies do subgênero *Zaprionus* e do subgrupo *melanogaster* de *Drosophila*. Na extremidade dos ramos são representadas as ocorrências do elemento *Helena* (quadrado vermelho) e do elemento *BS* (quadrado cinza) nos genomas das espécies. Sendo que *D.ore*: *D. orena*, *D.mel*: *D. melanogaster*, *D.ere*: *D. erecta*, *D.mau*: *D. mauritiana*, *D.sec*: *D.sechellia*, *D.sim*: *D. simulans*, *D.tei*: *D. teissieri*, *D. san*: *D. santomea*, *D.yak*: *D. yakuba*, *Z.cam*: *Z. camerounensis*, *Z. dav*: *Z. davidi*, *Z.gab*: *Z. gabonicus*, *Z.ind*: *Z. indianus*, *Z.iner*: *Z. inermis*, *Z.nig*: *Z.nigranus*, *Z.orn*: *Z. ornatus*, *Z.sep*: *Z. sepsoides*, *Z.tub*: *Z. tuberculatus*, *Z. bog*: *Z. bogoriensis*.



4.4. Divergência genética dos elementos *Helena* e *BS*

As análises de divergência, estimadas pela distância p (distância par-a-par) mostrou valores muito baixos, tanto para o elemento *Helena* (distância média: 0,124), como para *BS* (distância média: 0,088), entre as espécies do grupo *melanogaster* e as espécies de subgênero *Zaprionus*. Os valores das distâncias são apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente para os elementos *Helena* e *BS*.

A divergência entre as sequências do elemento *Helena* (Tabela 6) variou para as espécies de *Zaprionus* entre 0,002 (entre espécies de *Zaprionus* estreitamente relacionadas, como *Z. indianus* e *Z. gabonicus*) a 0,087 (entre espécies mais distantemente relacionadas, como *Z. tuberculatus* e *Z. davidi*). Notavelmente, comparando-se a divergência entre as sequências das espécies dos dois gêneros, para alguns pares de espécies, os valores de distância

foram menores do que entre as próprias espécies do subgênero *Zaprionus*, como entre *D. sechellia* e *Z. ornatus* (0,019), ou *D. sechellia* e *Z. gabonicus* (0,066), em comparação ao par *Z. ornatus* e *Z. davidi* (0,081) ou *Z. ornatus* e *Z. inermis* (0,089). As distâncias mais elevadas para as sequências do elemento *Helena* entre as espécies de *Drosophila* e *Zaprionus* são relativas às comparações das sequências de *D. ananassae* e *D. bipectinata* com as espécies de *Zaprionus*, 0,257 a 0,293 e 0,228 a 0,253, respectivamente.

Tabela 6. Médias de distâncias p entre as sequências do elemento *Helena* para as espécies analisadas. A análise envolveu 84 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par sequência. Houve um total de 481 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas em MEGA 7. Sendo que *D.ore*: *D. orena*, *D.mel*: *D. melanogaster*, *D.ere*: *D. erecta*, *D. ana*: *D. ananassae*, *D. bip*: *D. bipectinata*, *D.mau*: *D. mauritiana*, *D.sec*: *D.sechellia*, *D.sim*: *D. simulans*, *D.tei*: *D. teissieri*, *D.yak*: *D. yakuba*, *Z.cam*: *Z. camerounensis*, *Z. dav*: *Z. davidi*, *Z.gab*: *Z. gabonicus*, *Z.ind*: *Z. indianus*, *Z.iner*: *Z. inermis*, *Z.nig*: *Z. nigranus*, *Z.orn*: *Z. ornatus*, *Z.sep*: *Z. sepsoides*. *Z.tub*: *Z. tuberculatus*

	<i>D.ore</i>	<i>D.mel</i>	<i>D.ere</i>	<i>D.ana</i>	<i>D.bip</i>	<i>D.mau</i>	<i>D.sec</i>	<i>D.sim</i>	<i>D.tei</i>	<i>D.yak</i>	<i>Z.cam</i>	<i>Z.dav</i>	<i>Z.gab</i>	<i>Z.ind</i>	<i>Z.iner</i>	<i>Z.nig</i>	<i>Z.orn</i>	<i>Z.sep</i>	<i>Z.tub</i>
<i>D.ore</i>																			
<i>D.mel</i>	0,119																		
<i>D.ere</i>	0,104	0,112																	
<i>D.ana</i>	0,262	0,265	0,294																
<i>D.bip</i>	0,243	0,245	0,256	0,193															
<i>D.mau</i>	0,110	0,060	0,091	0,269	0,228														
<i>D.sec</i>	0,104	0,055	0,088	0,262	0,230	0,031													
<i>D.sim</i>	0,106	0,058	0,092	0,268	0,232	0,033	0,030												
<i>D.tei</i>	0,117	0,108	0,118	0,275	0,250	0,101	0,100	0,101											
<i>D.yak</i>	0,117	0,112	0,122	0,278	0,250	0,108	0,106	0,109	0,025										
<i>Z.cam</i>	0,084	0,083	0,081	0,257	0,228	0,063	0,065	0,058	0,087	0,095									
<i>Z.dav</i>	0,108	0,100	0,099	0,293	0,253	0,081	0,084	0,078	0,099	0,108	0,059								
<i>Z.gab</i>	0,101	0,078	0,085	0,272	0,242	0,067	0,066	0,057	0,088	0,095	0,052	0,076							
<i>Z.ind</i>	0,102	0,078	0,084	0,267	0,241	0,068	0,068	0,058	0,087	0,094	0,051	0,078	0,002						
<i>Z.iner</i>	0,118	0,086	0,110	0,284	0,261	0,090	0,089	0,086	0,105	0,111	0,082	0,102	0,086	0,086					
<i>Z.nig</i>	0,099	0,096	0,088	0,270	0,240	0,075	0,077	0,069	0,097	0,104	0,015	0,064	0,060	0,061	0,090				
<i>Z.orn</i>	0,106	0,061	0,085	0,264	0,230	0,023	0,019	0,028	0,099	0,107	0,063	0,081	0,065	0,067	0,089	0,076			
<i>Z.sep</i>	0,113	0,087	0,102	0,268	0,238	0,076	0,075	0,074	0,098	0,105	0,073	0,091	0,072	0,071	0,098	0,082	0,074		
<i>Z.tub</i>	0,113	0,093	0,097	0,273	0,253	0,073	0,072	0,070	0,092	0,102	0,070	0,087	0,067	0,068	0,093	0,079	0,065	0,062	

O mesmo padrão de baixa divergência foi observado para o elemento *BS* (Tabela 7), quando comparadas as sequências de *Z. indianus* e *Z. gabonicus* (0,005), e entre espécies mais distantemente relacionadas, como *Z. davidi* e *Z. sepsoides* (0,077). Da mesma forma que para o elemento *Helena*, também são muito baixas, e inesperadas as distâncias entre as espécies dos dois gêneros, uma vez que as distâncias entre as sequências *BS* de *D. sechellia* e *Z. sepsoides* (0,068), ou *D. simulans* e *Z. indianus* (0,069), são menores do que entre espécies de *Zaprionus* mais distantemente relacionadas, como *Z. davidi* e *Z. sepsoides* (0,077) ou de *Drosophila*, como *D. melanogaster* e *D. bipectinata* (0,309). As distâncias mais elevadas entre as sequências do elemento *Helena* amostradas nas espécies de *Drosophila* e *Zaprionus* são relativas às

comparações das sequências de *D. bipectinata* e *D. ficusphila* com as espécies de *Zaprionus*, 0,318 a 0,355 e 0,328 a 0,350, respectivamente.

Tabela 7. Médias de distâncias p entre as sequências do elemento *BS* nas espécies analisadas. A análise envolveu 75 sequências de nucleótidos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par sequência. Houve um total de 762 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas em MEGA 7. Sendo que *D.mel*: *D. melanogaster*, *D.ere*: *D. erecta*, *D. fic*: *D. ficusphila*, *D. bip*: *D. bipectinata*, *D.sec*: *D.sechellia*, *D.sim*: *D. simulans*, *Z.cam*: *Z. camerounensis*, *Z. dav*: *Z. davidi*, *Z.gab*: *Z. gabonicus*, *Z.ind*: *Z. indianus*, *Z.orn*: *Z. ornatus*, *Z.sep*: *Z. sepsoides*, *Z.afr*: *Z. africanus*.

	<i>Z.ind</i>	<i>Z.gab</i>	<i>Z.afr</i>	<i>Z.sep</i>	<i>Z.dav</i>	<i>Z.orn</i>	<i>D.mel</i>	<i>D.sim</i>	<i>D.sec</i>	<i>D.ere</i>	<i>D.bip</i>	<i>D.fic</i>
<i>Z.ind</i>												
<i>Z.gab</i>	0,005											
<i>Z.afr</i>	0,016	0,017										
<i>Z.sep</i>	0,054	0,055	0,053									
<i>Z.dav</i>	0,016	0,018	0,032	0,077								
<i>Z.orn</i>	0,026	0,027	0,037	0,077	0,011							
<i>D.mel</i>	0,078	0,079	0,083	0,069	0,098	0,102						
<i>D.sim</i>	0,069	0,070	0,074	0,065	0,085	0,089	0,058					
<i>D.sec</i>	0,073	0,074	0,079	0,068	0,106	0,109	0,062	0,036				
<i>D.ere</i>	0,183	0,184	0,189	0,187	0,205	0,216	0,179	0,188	0,189			
<i>D.bip</i>	0,318	0,319	0,324	0,327	0,348	0,355	0,309	0,325	0,329	0,333		
<i>D.fic</i>	0,328	0,330	0,334	0,344	0,341	0,350	0,337	0,343	0,349	0,338	0,226	

4.5. Inferências filogenéticas e tempos de divergência entre sequências

As relações filogenéticas entre as sequências dos elementos *Helena* (Figura 8) e *BS* (Figura 9) foram inferidas pelos métodos Neighbor-joining (não apresentados), Máxima Verossimilhança (ML, Figuras Suplementares) e Inferência Bayesiana (BI), as quais apresentaram resultados concordantes para os dois elementos.

Foram utilizadas 83 sequências para as análises do elemento *Helena*, sendo 21 do grupo *melanogaster* de *Drosophila* e 62 do subgênero *Zaprionus*. Dentre as sequências de *Drosophila* estão incluídas as obtidas por GRANZOTTO et al. (2011), sendo uma de *D. melanogaster*, uma de *D. simulans*, três de *D. sechellia*, três de *D. erecta*. A análise Bayesiana (Figura 8), realizada com as sequências do gene da transcriptase reversa do elemento *Helena* mostra a formação de dois clados principais; no clado mais basal encontram-se clusterizadas as sequências das espécies do grupo *melanogaster* menos derivadas, que evoluíram na Ásia (*D. ananassae* e *D. bipectinata*), em um agrupamento com alto suporte (99%). O segundo clado inclui todas as sequências pertencentes às espécies que diversificaram na África (subgênero *Zaprionus* e subgrupo *melanogaster*), as quais se clusterizam com suporte de 100%. Esse agrupamento é

inesperado, pois não é concordante com a filogenia das espécies, já que as sequências *Helena* das espécies do complexo *melanogaster* são mais proximamente relacionadas com as das espécies do subgênero *Zaprionus* (suporte: 85%) do que com as sequências das espécies do seu subgrupo (complexo *erecta*: *D. erecta* e *D. orena*, e complexo *yakuba*: *D. yakuba* e *D. teissieri*), e com as das espécies asiáticas do grupo *melanogaster* (*D. ananassae* e *D. bipectinata*). O clado que inclui as sequências do complexo *melanogaster* e do subgênero *Zaprionus* é subdividido em dois, um basal que agrupa apenas sequências de *Zaprionus* (*Z. davidi*, *Z. nigranus*, *Z. camerounensis*) com suporte igual a 98% e outro que se subdivide em dois clados internos (suporte: 81%); um deles incluindo apenas sequências de *Zaprionus* (*Z. indianus*, *Z. gabonicus* e *Z. sepsoides*, *Z. camerounensis*), enquanto que no outro clado (suporte: 79%) se clusterizam as sequências de *Helena* de espécies do complexo *melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* e *D. sechellia*) e de duas espécies de *Zaprionus* (*Z. ornatus* e *Z. africanus*), com suporte igual a 100%. Este clado ainda se agrupam as sequências de *Z. inermes*. A árvore gerada pelo método de Máxima Verossimilhança é concordante para as incongruências apresentadas (Figura Suplementar 1).

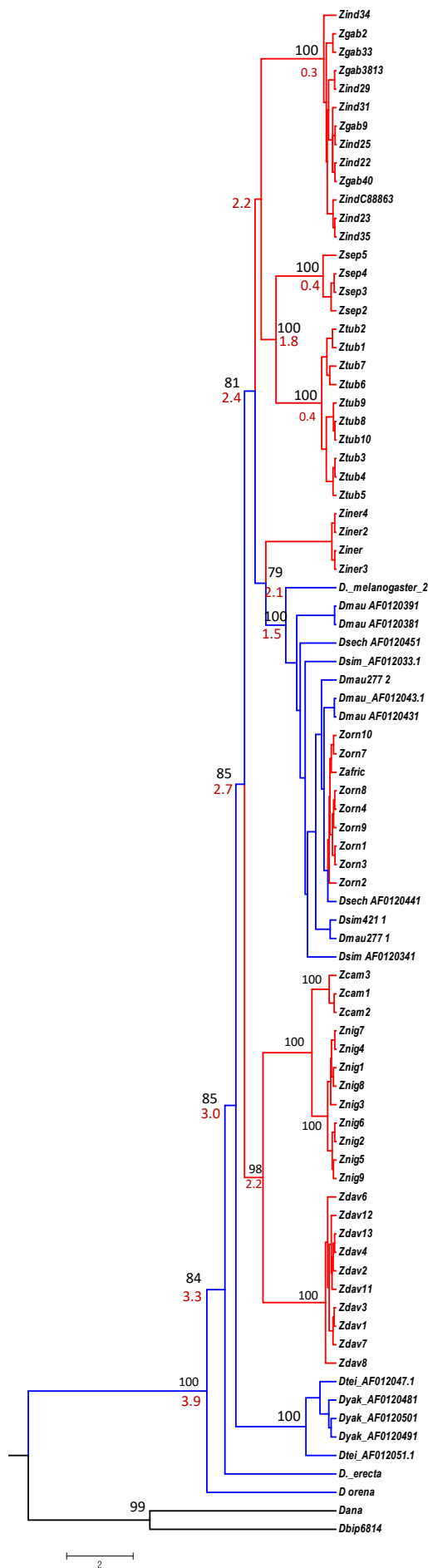
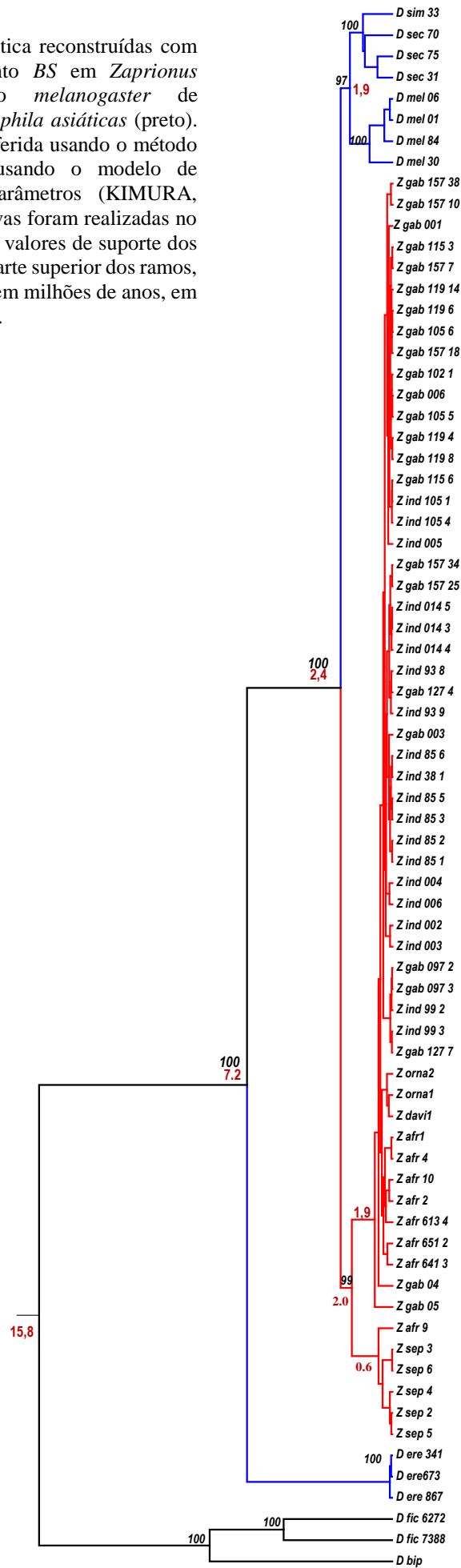


Figura 8. Árvore filogenética reconstruídas com as sequências do elemento *Helena* em *Zaprionus* (vermelho), no subgrupo *melanogaster* de *Drosophila* (azul), e *Drosophila* asiáticas (preto). A história evolutiva foi inferida pelo método de Análise Bayesiana, usando o modelo de substituição Tamura-Nei (TAMURA e NEI, 1993). As análises evolutivas foram realizadas no programa BEAST v16.1. Os valores de suporte dos clados são indicados em preto na parte superior dos ramos e o tempo de divergência, em milhões de anos, em vermelho, na parte inferior.

A análise Bayesiana realizada com as sequências do gene da transcriptase reversa do elemento *BS* (Figura 9), assim como para o elemento *Helena*, mostrou a formação de dois cladogramas principais: um deles inclui as sequências de espécies do grupo *melanogaster* de *Drosophila* que divergiram na Ásia (*D. ficusphila* e *D. bipectinata*), com suporte: 100%, e o outro, que inclui as sequências das espécies do subgrupo *melanogaster* (exceto do complexo *yakuba*, no qual não foram encontradas sequências da RT de *BS*), do complexo *melanogaster* de *Drosophila* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*), as sequências das espécies de *Zaprionus* e das espécies do complexo *erecta*. Portanto, a mesma incongruência observada na filogenia do elemento *Helena* também ocorre na do *BS*: as sequências *BS* das espécies do complexo *melanogaster* compartilham uma sequência ancestral comum mais recente com as sequências das espécies do subgênero *Zaprionus* (suporte: 100 %) do que com as sequências de *D. erecta*, que também fazem parte do subgrupo *melanogaster*, e com as sequências das espécies asiáticas do grupo *melanogaster* (*D. bipectinata* e *D. ficusphila*). O clado *Zaprionus-complexo melanogaster* é constituído por dois cladogramas derivados reciprocamente monofiléticos, um incluindo as sequências das espécies do complexo *melanogaster*, congruente com a filogenia das espécies (suporte: 100%) e o outro todas as sequências de *Zaprionus* (suporte: 99%).

Figura 9. Árvore filogenética reconstruídas com as sequências do elemento *BS* em *Zaprionus* (vermelho) e subgrupo *melanogaster* de *Drosophila* (azul) e *Drosophila asiáticas* (preto). A história evolutiva foi inferida usando o método de Análise Bayesiana, usando o modelo de substituição Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980). As análises evolutivas foram realizadas no programa BEAST v16. Os valores de suporte dos clados estão em preto, na parte superior dos ramos, e o tempo de divergência, em milhões de anos, em vermelho, na parte inferior.



Os tempos de divergência das sequências dos elementos *Helena* (Figura 8) e *BS* (Figura 9), a partir da sequência ancestral comum mais recente compartilhada pelas espécies constantes nas filogenias reconstruídas pela análise Bayesiana, foram inferiores aos tempos estimados para as espécies analisadas (RUSSO et al., 1995; LACHAISEI et al., 2004; OBBARD et al., 2012).

Os tempos de divergência das sequências do elemento *Helena* nas espécies de *Zaprionus*, a partir da sequência ancestral compartilhada com as espécies do complexo *melanogaster*, é surpreendentemente baixo - 2,7 milhões de anos; esse tempo corresponde ao início da divergência do complexo *melanogaster* (2 a 3 milhões de anos, Lachaise et al., 2004) contudo, o gênero *Zaprionus* e *Drosophila* passaram evoluir independentemente há mais de 40 milhões de anos (Figura 8).

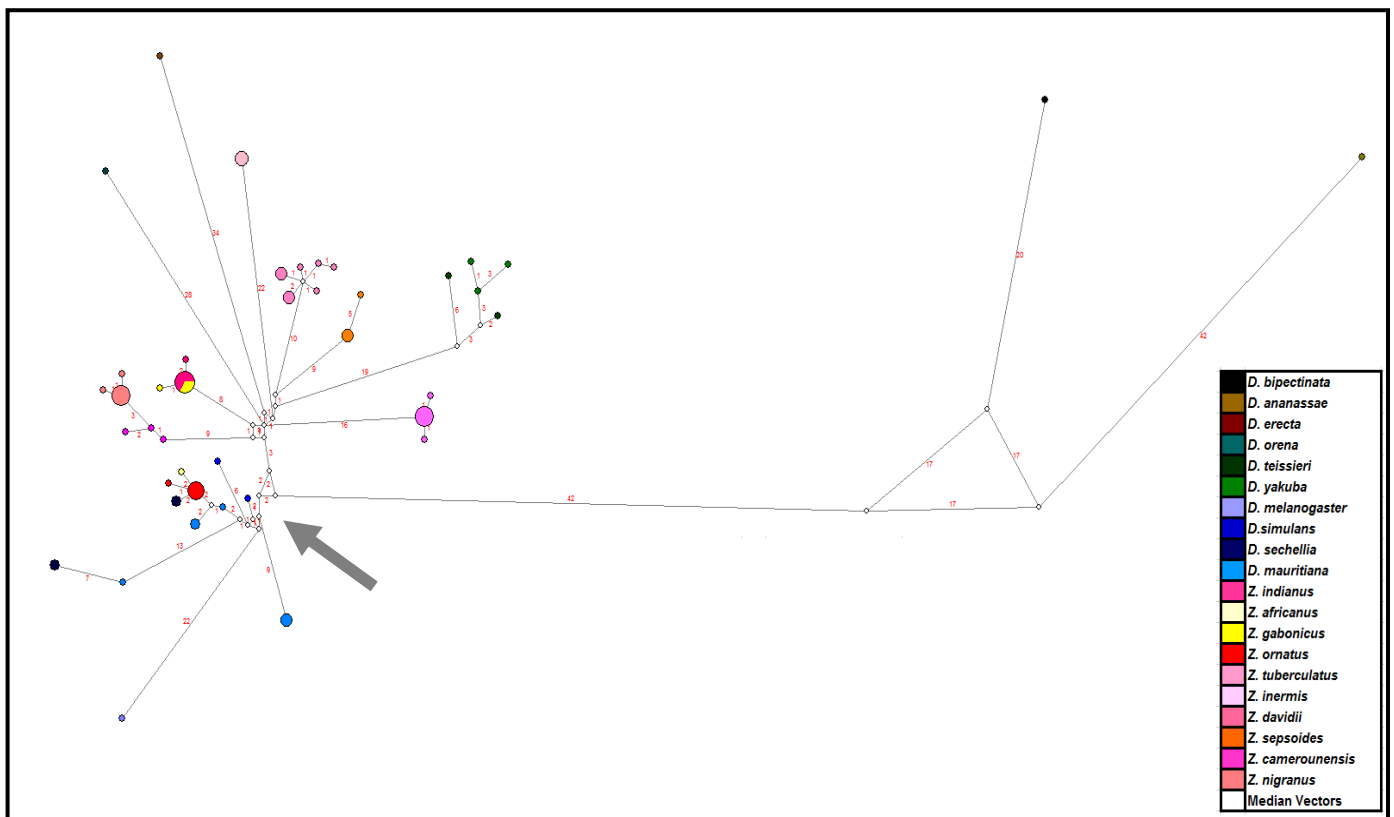
Também para o elemento *BS*, os tempos de divergência a partir da sequência ancestral compartilhada entre as sequências das espécies dos dois gêneros foram inferiores aos esperados. O tempo de divergência das sequências do complexo *erecta* e as sequências do clado *Zaprionus*/complexo *melanogaster* é de 7,2 milhões de anos, uma estimativa de tempo aproximado ao tempo de divergência estimado entre o complexo *erecta* e o complexo *melanogaster* por alguns autores (RUSSO et al., 1995). Contudo, a clusterização das sequências de *Zaprionus* e o tempo encontrado não são concordantes com história evolutiva dos gêneros dessas espécies. As sequências de *Zaprionus* compartilham sequências *BS* com as do complexo *melanogaster* cujas sequências ancestrais comuns foram datadas em torno de 2,5 milhões de anos, altamente discordante da história dos grupos (Figura 9).

4.6. Análises de *Network*

A rede gerada pela análise de *network* mostra um cenário que reforça as análises anteriores realizadas para os elementos *Helena* (Figura 10) e *BS* (Figura 11). Evidencia-se que as sequências *Helena* das espécies pertencentes ao grupo *melanogaster* de *Drosophila* que se diversificaram na África (complexo *erecta*, *yakuba* e *melanogaster*) são mais proximamente relacionadas com as das espécies do subgênero *Zaprionus* do que com as das espécies do grupo *melanogaster* de *Drosophila* que diversificaram na Ásia (*D. ananassae* e *D. bipectinata*) (Figura 10). De modo geral, não há uma relação direta entre as sequências das espécies do subgênero *Zaprionus* com alguma espécie do subgrupo *melanogaster* devido à presença de muitos vetores intermediários entre as sequências. Nota-se que entre as sequências do subgênero *Zaprionus* e as sequências do complexo *melanogaster* encontram-se menos que 10

substituições de nucleotídeos, enquanto que entre as sequências de *Zaprionus* e as sequências de *Drosophila* que evoluíram na Ásia (*D. bipectinata* e *D. ananassae*) existem mais de 80 substituições nucleotídicas. Outro destaque dessa análise é a relação direta entre as sequências de *D. sechellia* com as sequências de *Z. ornatus* e *Z. africanus*. Essa relação de ancestralidade direta é concordante com a filogenia reconstruída (Figura 10).

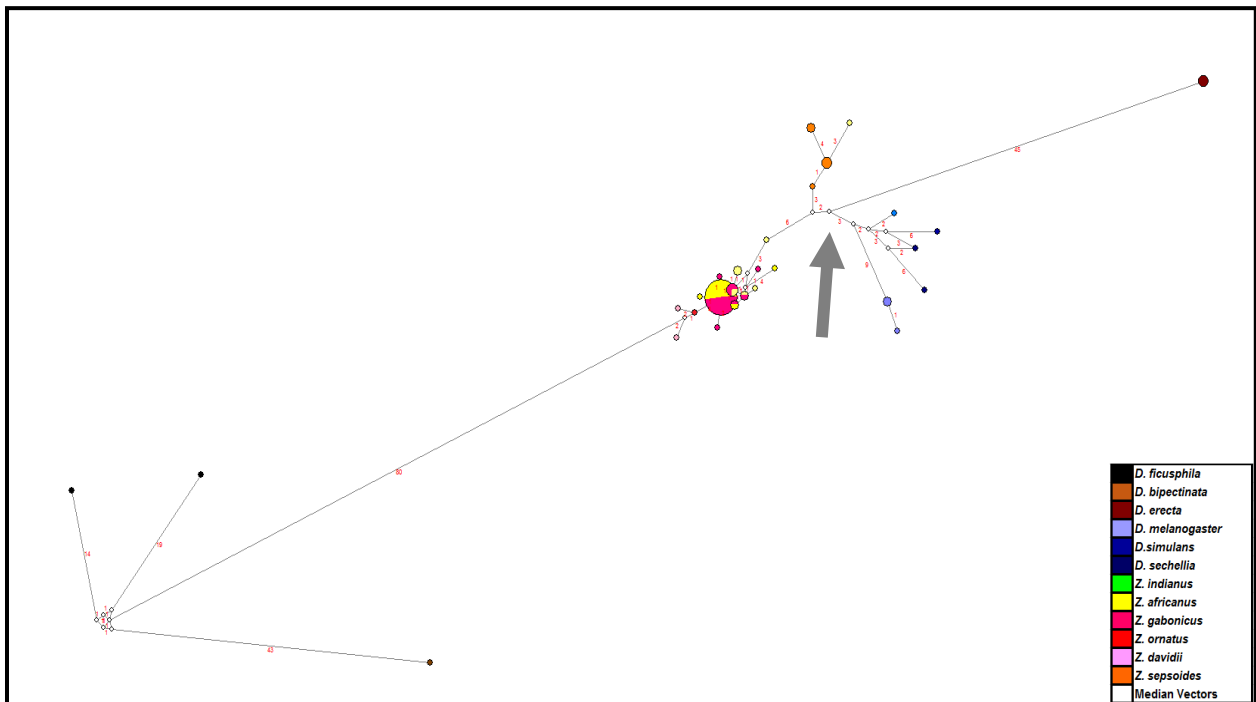
Figura 10. Relações evolutivas entre as sequências do elemento NLTR *Helena* das espécies do gênero *Drosophila* com genoma sequenciado e as espécies do gênero *Zaprionus* obtidas experimentalmente, reconstruídas pelo método Median Joining Network. Na figura, as cores quentes são espécies do subgênero *Zaprionus* e, as cores frias, as espécies representantes do grupo *melanogaster* de *Drosophila*. A seta cinza evidencia a maior similaridade entre as sequências das espécies africanas.



A rede gerada para o elemento *BS* também mostra que as sequências das espécies pertencentes ao complexo *melanogaster* de *Drosophila* são mais relacionadas com as sequências das espécies do subgênero *Zaprionus* do que com as das espécies grupo *melanogaster* que divergiram na Ásia (*D. bipectinata* e *D. ficusphila*), do que com espécies do gênero *Zaprionus*. Como para as sequências *Helena*, não há ligação direta das sequências das

espécies de *Zaprionus* com as espécies do subgrupo *melanogaster*, juntamente com a presença de vetores intermediários e maior número de substituições de nucleotídeos entre as espécies asiáticas de *Drosophila* com as africanas (149) do que entre as espécies de *Drosophila* que evoluíram na África (complexo *melanogaster*) e as espécies de *Zaprionus* (9 – 20). Não há uma relação direta entre as sequências das espécies do subgênero *Zaprionus* e as espécies do subgrupo *melanogaster* devido à presença de muitos vetores intermediários entre as sequências (Figura 11).

Figura 11. Relações evolutivas entre as sequências do elemento NLTR *BS* das espécies do gênero *Drosophila* com genoma sequenciado e as espécies do gênero *Zaprionus* obtidas experimentalmente, reconstruídas pelo método Median Joining Network. Na figura, as cores quentes são espécies do subgênero *Zaprionus* e, as cores frias, as espécies representantes do grupo *melanogaster* de *Drosophila*. A seta cinza evidencia a maior similaridade entre as sequências das espécies africanas.



5. DISCUSSÃO

Estudos envolvendo HT de TEs, iniciados na década de 80, com a descrição da invasão recente do elemento *P* em *D. melanogaster* (BRÉGLIANO; KIDWELL, 1983), continuam despertando o interesse da comunidade científica (SORMACHEVA et al., 2012; IVANCEVIC et al., 2013; EL BAIDOURI et al., 2014; SHARMA; PRESTING; 2014; CHALOPIN et al., 2015; SUH et al., 2016). Para se realizar inferências confiáveis sobre a ocorrência de HT existem três indícios que devem ser observados, e dentre eles os principais são: (i) alta similaridade entre a sequência do TE entre espécies distantemente relacionadas; (ii) incongruências entre a filogenia das espécies envolvidas e das sequências dos TEs nas espécies consideradas; e (iii) distribuição irregular do elemento (ausência e presença) em um grupo de espécies (revisado em LORETO et al., 2008; CARARETO, 2011; WALLAU et al., 2012). Os três critérios foram observados neste estudo.

Eventos de HT podem ser facilitados pela característica de mobilidade dos TEs, contudo as diferenças nas frequências desses eventos envolvendo elementos de diferentes ordens relaciona-se ao modo de transposição dos TEs. Dentre os relatos de possíveis eventos HT em *Drosophila*, 96% de envolvem retrotransposons com LTR e transposons de DNA e somente 4% referem-se a retrotransposon sem LTRs (LORETO et al., 2008).

Os primeiros estudos de HT em eucariotos consideraram que devido ao modo de transposição dos retrotransposons sem LTRs, estes apresentariam uma restrição muito forte para protagonizarem eventos de HT (ANDERSSON, 2005). Alguns estudos contemporâneos reforçam a ocorrência de eventos de HT com tais sequências (revisado em SORMACHEVA et al., 2012), como por exemplo a HT do elemento Bov-B entre cobras e ruminantes (IVANCEVIC et al., 2013), ou ainda do elemento CR1B entre borboletas e mariposas que ocorreu nos últimos 5 milhões de anos (SORMACHEVA et al., 2012).

A história evolutiva dos elementos *Helena* e *BS* foi estudada por Granzotto (2009) utilizando os 12 genomas de *Drosophila* e os autores não encontraram evidências de HT nas espécies investigadas. No presente estudo ampliamos o número de espécies do gênero *Drosophila* (24), bem como incluímos 12 espécies do gênero *Zaprionus* para testar a hipótese de ocorrência de HT desses dois elementos NLTRs entre as espécies dos dois gêneros.

5.1. O elemento *Helena*

O elemento *Helena* não foi encontrado em *Z. bogoriensis*, única espécie do subgênero *Anaprius* que teve origem e diversificação na Ásia disponível para análise neste estudo, contudo, foi identificado em todas as espécies do subgênero *Zaprionus* testadas. Essa distribuição descontínua do elemento *Helena* no gênero *Zaprionus* pode ter diversas explicações. Uma das hipóteses baseia-se na possibilidade de perda do TE na espécie, devido à ocorrência de mutações na sua porção codificante, assim o elemento perde sua autonomia de transposição no genoma hospedeiro, e conseqüentemente a capacidade de aumentar suas cópias no genoma, sendo extinto. Outra possibilidade poderia ser decorrente de algum evento de gargalo genético que poderia afetar de forma intensa a população desse TE no genoma e ter sido perdido de forma estocástica (revisado em ORTIZ; WALLAU, 2015). A terceira explicação para um cenário de distribuição descontínua, concordante com nossa hipótese de ocorrência de HT, seria a sequência nunca ter estado presente no ancestral do gênero, que se originou na Ásia, bem como em espécies do subgênero *Anaprius*, também asiático, como o caso de *Z. bogoriensis*. Dessa forma, a introdução da sequência nos genomas observados teria ocorrido mais recentemente, após a divergência das espécies do subgênero *Zaprionus* na África. Contudo, ressalva-se que um maior número de espécies do subgênero *Anaprius* devem ser investigadas. A opção por uma dessas hipóteses requer aumentar o número de espécies investigadas no subgênero *Anaprius* e de linhagens de *Z. bogoriensis*, o que não foi possível no presente estudo.

O fato do elemento *Helena* estar presente em todas as espécies do subgênero *Zaprionus* testadas, sugere três possibilidades: (i) o elemento sempre esteve presente antes da divergência do subgênero *Zaprionus*, (ii) O elemento pode ter sido introduzido no ancestral do subgênero *Zaprionus*, (iii) o elemento pode ter sido introduzido independentemente em complexos diferentes desse subgênero. Se o elemento sempre esteve presente nas espécies do subgênero *Zaprionus*, o tempo de divergência a partir do ancestral comum das sequências do elemento seria concordante com o tempo de divergência das espécies.

Um estudo com marcadores mitocondriais e nucleares sugere que o subgênero *Zaprionus* teria se originado por volta de 7 milhões de anos, no Quaternário, e posteriormente os complexos de espécies se diversificaram na África central há cerca de 4 milhões de anos (YASSIN et al., 2008). Entretanto, os tempos de divergência para as sequências do elemento *Helena* encontradas nas espécies de *Zaprionus* variaram de 2,4 a 3,2 milhões de anos, valores

esses inferiores ao da origem do subgênero, mas semelhantes aos da diversificação do complexo *melanogaster* na África central, estimado entre 2 e 3 milhões de anos (LACHAISE et al., 2004). Assim, o tempo de divergência entre as sequências do elemento *Helena* compartilhadas entre as espécies de *Zaprionus* com espécies do subgrupo *melanogaster*, a partir de uma sequência ancestral comum, não correspondeu aos valores esperados da divergência entre dois gêneros, estimado em pelo menos 40 milhões de anos (RUSSO et al., 1995) ou até 60 milhões de anos atrás (YASSIN et al., 2008b). Esses tempos são muito inferiores, mesmo considerando-se a estimativa de Obbard (2012) para a divergência de *Sophophora* e *Drosophila* entre 24 a 40 milhões de anos, assumindo-se o consenso atual de que o gênero *Zaprionus* deveria ser rebaixado a um grupo monofilético de espécies do subgênero *Drosophila* (RUSSO et al., 1995; TATARENKOV et al., 1999; ROBE et al., 2005; DA LAGE et al., 2007; YASSIN et al., 2008a; CARARETO, 2011; RUSSO et al., 2013). Entretanto, os tempos de divergência estimados a partir da sequência *Helena* ancestral são congruentes com estimativas aceitas para os tempos de divergência do complexo *melanogaster*, apesar de não haver consenso para as estimativas de tempos de divergência entre *D. melanogaster* e *D. simulans*, que variam de 0,8 a 5,4 milhões de anos (CACCONI et al., 1988; RUSSO et al., 1995; SHARP; LI et al., 1999; TAMURA et al., 2004; CUTTER, 2008). De modo geral, as datações para a origem de *Helena* nos clados das espécies de *Zaprionus* estão entre 2,4 e 3,2 milhões de anos. Vale destacar, que 3 milhões de anos foi o tempo datado para ocorrência de eventos de HT entre espécies de *Zaprionus* e *Drosophila* envolvendo o retrotransposon com LTR *Gypsy* (SETTA et al., 2009). Cabe ressaltar ainda, o compartilhamento de uma sequência ancestral comum de *Helena* entre as espécies *D. mauritiana* e *D. sechellia*, *Z. ornatus* e *Z. africanus* datada entre 0,4 a 0,6 milhões de anos e que, *D. mauritiana* e *D. sechellia*, espécies do subcomplexo *simulans* restritas a ilhas do Oceano Índico, divergiram a apenas ~ 0,4 milhões de anos (TAMURA et al., 2004). Esses valores e a rede de *network* sugerem a ocorrência de HT a partir do ancestral dessas duas espécies irmãs para *Z. ornatus* e desta para *D. sechellia* e *Z. africanus*.

As análises de divergência genética entre as sequências *Helena* são correspondentes aos tempos de divergência acima destacados, valores menores entre as espécies dos dois subgêneros (*Drosophila* e *Zaprionus*) do que entre as próprias espécies do subgrupo *melanogaster* de *Drosophila*, discordantes da história evolutiva dos grupos.

Quando se assume evolução de sequências por transmissão vertical, o esperado é que a filogenia de TEs seja congruente com a das espécies hospedeiras, uma vez que nesse cenário as

sequências estariam presentes no ancestral e foram herdadas verticalmente, como as demais sequências genômicas. Contudo, podem ocorrer incongruências filogenéticas, isto é a filogenia das espécies e das sequências dos TEs não serem correspondentes. Essas incongruências podem ser decorrentes de taxas evolutivas diferentes, polimorfismo ancestral e perda estocástica do elemento (LORETO et al., 2008). Uma quarta explicação para uma incongruência filogenética é um possível evento de HT. Com esse evento, a sequência do elemento teria sido introduzida recentemente em uma espécie e, assim, teria acumulado menos divergência do que o esperado pela filogenia das espécies doadora e receptora. As reconstruções filogenéticas das sequências *Helena* apresentam diversas incongruências, sugerindo que o evento de HT teria ocorrido entre o ancestral do complexo *melanogaster* e ancestrais do subgênero *Zaprionus*, uma vez que as sequências de *Zaprionus* se clusterizam dentro do clado do subgrupo *melanogaster* e diretamente com as espécies representantes do complexo *melanogaster* (as espécies dos complexos *yakuba* e *erecta* não apresentam um agrupamento direto com as espécies de *Zaprionus*).

Em síntese, podemos propor fases de eventos de HT do elemento *Helena* envolvendo as espécies de *Drosophila* e *Zaprionus*, (i) uma mais antiga, na qual um ancestral do complexo *melanogaster* teria transferido *Helena* para o ancestral do subgênero *Zaprionus*, e (ii) outra mais recente, envolvendo a transferência de *Helena* de um ancestral do subcomplexo *simulans* para *Z. ornatus* e desta espécie para *D. sechellia* e *Z. africanus*.

A ocorrência de HT é uma observação recorrente na literatura em estudos envolvendo TEs. Suh e colaboradores (2015) mostraram um importante evento de HT do NLTR AviRTE entre parasitas nematoides e espécies de aves, caracterizado pela ocorrência de duas ondas de transferência entre essas espécies, uma há 25 milhões de anos e outra há cerca de 17,7 milhões de anos. Essa datação é congruente com a expansão desses elementos nos genomas dos nematoides.

A incongruência entre os tempos de divergência das sequências e das espécies observa-se não apenas entre as espécies de *Zaprionus* e de *Drosophila*, mas também entre as espécies mais basais do subgrupo *melanogaster*. Granzotto et al. (2009) investigaram a ocorrência e a história evolutiva do elemento *Helena* em diversas espécies de *Drosophila*, incluindo entre elas espécies do complexo *erecta* (*D. erecta*) e *yakuba* (*D. yakuba*). Nesse estudo, a análise filogenética realizada não evidenciou incongruências robustas entre a filogenia das espécies e do elemento, em razão disso foi proposto que *Helena* evoluiu no grupo *melanogaster* por

transferência vertical. Posteriormente, em uma recente revisão sobre casos de HT, Wallau et al. (2016), utilizando uma nova metodologia para inferência de HT, que denominaram de *Vertical and Horizontal Inheritance Consistence Analyssis* (VHICA), encontraram um fraco sinal de HT para o elemento envolvendo as espécies *D. simulans* e *D. erecta*, e concluíram, que a baixa intensidade do sinal encontrado pode ser um indicativo de um evento mais ancestral, já que quanto mais antigo for um evento de HT, maior o grau de dificuldade em identificá-lo (SCHAACK; GILBERT; FESCHOTTE, 2010).

Os resultados da rede gerada corroboraram as hipóteses levantadas pela filogenia. A existência dos diversos vetores intermediários entre as sequências do elemento *Helena* de *Zaprionus* e do subgrupo *melanogaster* corrobora a hipótese acima formulada de ocorrência de HT mais antiga entre os ancestrais do subgênero *Zaprionus* e do complexo *melanogaster*, uma vez que não há uma relação direta entre as sequências das espécies do subgênero *Zaprionus* e as espécies do subgrupo *melanogaster* e, mais recente, envolvendo o ancestral das espécies *D. mauritiana* e *D. sechellia* e *Z. ornatus*.

Na filogenia, as sequências do elemento *Helena* das espécies asiáticas do grupo *melanogaster* (*D. bipectinata* e *D. ananassae*) se clusterizam com suporte (100%) em um clado separado das espécies africanas. Essa topografia da árvore, mais o grau de divergência entre essas sequências mostra que as sequências do *Helena* encontradas nas espécies africanas são diferenciadas das encontradas nas espécies asiáticas. Assim o elemento das espécies asiáticas não pertence à mesma família de *Helena* das espécies africanas, utilizando o critério de Wicker et al. (2007) ou, pelo menos não à mesma subfamília (grupos filogenéticos diferenciados), se não formos tão restritivos e admitirmos que pertencem à mesma família elementos com similaridade em torno de 70%. Esses dois grupos de sequências poderiam decorrer de polimorfismo ancestral na população de elementos original do gênero *Drosophila* e que um deles não foi herdado pela linhagem *proto-melanogaster* que originou as espécies africanas.

5.2 O elemento *BS*

O elemento *BS* apresenta distribuição mais descontínua no gênero *Zaprionus* que o elemento *Helena*, uma vez que só foi encontrado em seis das 12 espécies testadas. Distribuição irregular ou descontínua é o primeiro critério para se inferir transferência horizontal.

Assim como o discutido para o elemento *Helena*, a divergência das sequências do elemento *BS* das espécies de *Zaprionus* com espécies do subgrupo *melanogaster*, não corresponderam aos valores esperados entre dois gêneros; as sequências do elemento *BS*, de ambos os gêneros apresentaram valores muito similares. Também para *BS* observam-se menores valores de distância entre as espécies de *Drosophila* do complexo *melanogaster* e do subgênero *Zaprionus* do que entre as próprias espécies de *Drosophila* pertencentes ao mesmo subgrupo.

Da mesma forma que para *Helena*, a incongruência na reconstrução filogenética do elemento *BS* sugere que um evento de HT teria ocorrido a partir do ancestral do complexo *melanogaster*, uma vez que as sequências das espécies de *Zaprionus* se agrupam dentro do clado do subgrupo *melanogaster*, formando dois clados reciprocamente monofiléticos com o complexo *melanogaster*, enquanto que as sequências do complexo *erecta* não se agrupam com as das espécies de *Zaprionus*. Para o elemento *BS*, portanto é possível destacar um possível evento de HT entre as espécies de *Drosophila* e *Zaprionus*, envolvendo o ancestral do complexo *melanogaster* e o ancestral das espécies de *Zaprionus*. As sequências *BS* das espécies de *Zaprionus* apresentam-se, na árvore filogenética como uma grande politomia, não sendo possível estabelecer relações congruentes com a divergência dos complexos de espécies (*indianus*, *ornatus* e *sepsoides*). Essa politomia pode refletir a divergência recente entre muitas dessas espécies (YASSIN et al., 2008a), como, por exemplo, entre as espécies do complexo *indianus*, que teria ocorrido há aproximadamente 4 milhões de anos (YASSIN et al 2008b, CARARETO, 2011). Adicionalmente podem representar coalescência não concluída.

A estimativa de tempo de divergência entre as sequências *BS* compartilhadas entre as espécies do subgênero *Zaprionus* e as espécies do subgrupo *melanogaster* foi concordante com o resultado obtido para as sequências do elemento *Helena*, ambas inferiores a 3 milhões de anos. A análise de *network*, além de corroborar a incongruência filogenética, sugere uma segunda possibilidade, evidenciada pelo fato de não existir uma relação direta entre as sequências de *Zaprionus* com as do complexo *melanogaster*. O grande número de vetores intermediários relacionando essas sequências podem indicar que o evento tenha ocorrido a partir do ancestral do subgrupo *melanogaster* e não no ancestral do complexo *melanogaster*; contudo, as datações dos ramos na filogenia inferiores a 3 milhões de anos reforçam a hipótese da transferência horizontal do elemento *BS* de um ancestral do complexo *melanogaster* para o

subgênero *Zaprionus*, tal qual para o elemento *Helena*, e também para retrotransposons com LTRs (SETTA et al., 2009).

As sequências das espécies asiáticas do grupo *melanogaster* (*D. bipectinata* e *D. ficusphila*) se clusterizam com suporte 100% em um clado separado das espécies africanas. Essa topografia da árvore somada às distâncias para essas sequências mostram que as sequências do elemento *BS* encontradas nas espécies africanas não pertencem à mesma família ou subfamília que o *BS* das espécies asiáticas, uma vez que não apresentaram similaridade superior a 70%.

5.3 Condições para ocorrência de HT

Existem alguns pré-requisitos para que ocorram eventos de HT. Uma condição para se poder discutir tais processos é a existência de sobreposição espaço temporal entre as espécies envolvidas no evento de HT. Algumas relações ecológicas podem facilitar eventos de HT, como relações parasito-hospedeiro, presa-predador ou relações mutualísticas (WANG; LIU, 2016).

Atualmente vem sendo reportados diversos casos de HT em eucariotos (SETTA et al., 2009; SORMACHEVA et al., 2012; IVANEVIC et al., 2013; EL BAIDOURI et al., 2014; SHARMA; PRESTING; 2014; COYNE; CHALOPIN et al., 2015; GALLUS et al., 2015; DIAS et al., 2015; SUH et al., 2016). Contudo, os mecanismos pelos quais esses eventos ocorrem ainda não foram completamente elucidados e esclarecidos. Possíveis formas de transferência de um TE para outra espécie seria um contato direto entre espécies por meio de vetores, como parasitas e patógenos. Além de vetores, alguns grupos específicos de TEs podem formar seu próprio capsídeo viral (MALIK et al., 2000), como o retroelemento *Gypsy* em *D. melanogaster*, que sintetiza a proteína do capsídeo e forma partículas citoplasmáticas, capazes de infectar linhagens desprovidas do elemento (revisado em LORETO et al., 2008).

Existem mecanismos possíveis para ocorrência de um evento de HT envolvendo NLTRs como (i) utilização de vírus como vetor, (ii) inserção em uma sequência de transposon de DNA e formação de um elemento quimérico, o qual é transferido (SCHAACK et al., 2010; SORMACHEVA et al., 2012), ou mesmo (iii) transferência de moléculas de DNA e RNA “nuas” envolvidas por fluidos animais, mediada por algum vetor (SCHAACK et al., 2010). Dentre os possíveis exemplos de transporte de TEs por vetores, destaca-se a ação por vírus da

família Poxviridae. Piskurek e Okada, (2007) discutem que vírus dessa família foram os vetores responsáveis pelo evento de HT do NLTR *Bov-B* de reptéis para mamíferos. Contudo, Ivancevic e colaboradores (2013) propõem que esse evento foi mediado por *B. hydrosauri*, uma espécie de carrapato que parasita os animais envolvidos nos eventos de HT.

Assim, neste estudo são apresentadas evidências da ocorrência de HT envolvendo os retrotransposons sem LTR *Helena* e *BS*. Nossa hipótese de que as oportunidades para HTs que se estabeleceram na África Tropical nos últimos 10 milhões de anos entre as espécies do complexo *melanogaster* e subgênero *Zaprionus* foram tão permissivas que até elementos que apresentam baixa possibilidade de HT puderam ser transferidos horizontalmente foi corroborada. A importância deste trabalho não se limita em afirmar se ocorreu HT de TEs entre gêneros de drosofilídeos; ele acrescenta um cenário histórico sobre a evolução de TEs entre grupos de espécies. Este estudo amplia as evidências atuais sobre HT de elementos NLTRs entre espécies e indica que estudos genômicos de larga escala poderão mostrar que HT de elementos NLTRs não são tão raros como se pensava até recentemente, mesmo sendo sua ocorrência menos frequente que a dos retrotransposons com LTRs e Transposons, em decorrência do seu modo de transposição.

6. CONCLUSÕES

1. Os elementos *Helena* e *BS* apresentam distribuição irregular no gênero *Zaprionus* e no grupo *melanogaster* de *Drosophila*, um dos indícios para se inferir ocorrência de transferência horizontal. O elemento *Helena* foi encontrado em todas as espécies analisadas do subgênero *Zaprionus*, mas não na espécie do subgênero *Anapriionus*, enquanto que *BS* apresenta distribuição irregular no gênero e no subgênero *Zaprionus*, estando também ausente na espécie analisada do subgênero *Anapriionus*;
2. Os elementos *Helena* e *BS* encontrados nas espécies asiáticas do grupo *melanogaster* de *Drosophila* pertencem a uma família, ou subfamília, diferente daqueles do subgrupo *melanogaster*;
3. A transferência horizontal do elemento *Helena* ocorreu em duas fases, uma mais antiga (~2,7 milhões de anos), a partir de ancestrais do complexo *melanogaster* para ancestrais do subgênero *Zaprionus*, e outra mais recente, a partir de um ancestral do subcomplexo *simulans* para *Z. ornatus* e, desta, para *D. sechellia* e *Z. africanus*;
4. A transferência horizontal do elemento *BS* ocorreu a partir do subgrupo *melanogaster* para o subgênero *Zaprionus*, possivelmente de ancestrais do complexo *melanogaster* para ancestrais do subgênero *Zaprionus*, em apenas uma fase (~2,5 milhões de anos atrás), correspondente àquela em que se deu a transferência horizontal do elemento *Helena*;
5. A similaridade de sequências, incongruências filogenéticas e baixos tempos de divergência dos elementos *Helena* e *BS*, compartilhados entre espécies do complexo *melanogaster* e do subgênero *Zaprionus*, corroboram a hipótese de que o estado de permissividade para trocas genéticas estabelecido na África Tropical, favoreceu a transferência horizontal de elementos NLTRs entre as espécies dos dois grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. M; CARARETO, C.M.A. Multiple events of horizontal transfer of the Minos transposable element between *Drosophila* species. **Mol Phyl Evol**, v. 35, p. 583-594, 2005.
- ANDERSSON, J.O. Lateral gene transfer in eukaryotes. **Cell and Molecular Life Sciences**, v. 62(11), p. 1182-1197, 2005.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W. MILLER.; W. MYERS.; E.W, LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215(3), p. 403-410, 1990.
- BANDELT, H-J, FOSTER, P, ROHL, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies, **Mol Biology Evolution**, v. 16(1), p. 37-48, 1999.
- BRÉGLIANO JC, KIDWELL. Hybrid dysgenesis determinants. In: Shapiro J (ed). **Mobile Genetic Elements**. Academic Press, New York, pp 363–410, 1983
- BIÉMONT, C. Dynamic equilibrium between insertion and excision of *P* elements in highly inbred lines from an *M'* strain of *Drosophila melanogaster*, **J Mol Evol**. v. 39(5), p. 466-72, 1994.
- CACCONE, A. L.; DESALLE, R.; POWELL, J. R. Calibration of the change in thermal stability of DNA duplexes and degree of base pair mismatch. **J Mol Evol**, v. 27(3), p. 212-6, 1988.
- CAPY, P; BAZIN, C; HIGUET, D; LANGUIN, T. Dynamics and evolution of transposable elements. **Landes Biosciences**, p. 197, 1998.
- CAPY, P; ANXOLABÉHÈRE, D; LANGIN, T. The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? **Trends Genet**, v. 10(1), p. 7-12, 1994.
- CAPY, P. Evolutionary biology. A plastic genome. **Nature**, v. 6711, p. 522-3, 1998.
- CARARETO, C. M. A. Tropical Africa as a cradle for horizontal transfers of transposable elements between species of the genera *Drosophila* and *Zaprionus*. **Mob. Genet. Elements**, v. 1(3), p.179-186, 2011.
- CARARETO, C. M. A. et al. Elementos de Transposição – Diversidade, evolução, aplicações e impactos nos genomas dos seres vivos. **Sociedade Brasileira de Genética**, 2015.
- CHALOPIN, T et al. Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. **Chromosome Res**, v. 23(3), p. 545-60, 2015.
- CORDAUX, R., HEDGES, D. J.; BALZER, M. A. Retrotransposition of *Alu* elements: how many sources? **Trends Genet**, v. 20(10), p. 464-467, 2004.
- CUMMINGS, M. P.; Transmission patterns of eukaryotic transposable elements: arguments for and against horizontal transfer. **Trens Ecology Evolution**, v. 9, p. 141-145, 1994.
- CUTTER, A. D.; Divergence Times in *Caenorhabditis* and *Drosophila* Inferred from Direct Estimates of the Neutral Mutation Rate. **Mol Biol Evol**, v. 25(4), p. 778-786, 2008.

- DA LARGE, J et al, A phylogeny of Drosophilidae using the *Amyrel* gene: questioning the *Drosophila melanogaster* species group boundaries, *J Zoological System*, v. 45, p. 47-67, 2007.
- DANIELS, S. et al. Evidence for horizontal transmission of the p-transposable element between *Drosophila* species. **Genetics**, v. 124, p. 339-355, 1990.
- DIAS, E. S. et al. Large distribution and high sequence identity of a Copia-type retrotransposon in angiosperm families. **Plant Mol Biol**, v 89 (1-2), p. 83-97, 2016.
- DOOLITTLE, W.F. Phylogenetic classification and the universal tree, **Science**, v. 284(5423), p.2128-2129, 1999.
- DRUMMOND, A.J; SUCHARD, M.A; XIE, D; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7, **Mol Bio Evol**, v. 29(8), p. 1969-73, 2012.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 19, p. 113, 2004.
- EL BAIDOURI, M, et al. Widespread and frequent horizontal transfers of transposable elements in plants. **Genome Res**, v. 24(5), p. 831-8, 2014.
- FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nat Rev Genet**, v. 9(5), p. 397-405, 2008.
- FINNEGAN, D. J. Transposable elements in eukaryotes. **International Review of Cytology**, v. 93, p. 281-326, 1985.
- FINNEGAN, D. J. Transposable elements: how non-LTR retrotransposons do it. **Current Biology**, v. 7(4), p. 245-248, 1997.
- GALLUS, S; KUMAR, V; BERTELSEN, M.F; JANKE, A; NILSSON, M.A. A genome survey sequencing of the Java mouse deer (*Tragulus javanicus*) adds new aspects to the evolution of lineage specific retrotransposons in *Ruminantia* (*Cetartiodactyla*), **Gene**, v. 571(2), p. 271-8, 2015.
- GOUBERT, C et al. De novo assembly and annotation of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) repeatome with dnaPipeTE from raw genomic reads and comparative analysis with the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*), **Genome Biol Evol**, v. 7(4), v. 1192-205, 2015.
- GRANZOTTO, A; LOPES F.R.; VIEIRA, C.; CARARETO C. M. A. The evolutionary dynamics of the *Helena* retrotransposon revealed by sequenced *Drosophila* genomes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 174, 2009.
- GRANZOTTO, A.; LOPES, F.R.; VIEIRA, C.; CARARETO C.M.A. Vertical inheritance and bursts of transposition have shaped the evolution of the *BS* non-LTR retrotransposon in *Drosophila*. **Mol Genet Genomics**. v. 286, p. 57-66, 2011.
- GRIFFITHS, A.J.F; WESSLER, S.R; LEWONTIN, R.C; CARROLL, S.B. Mudanças na estrutura do cromossomo. **Introdução à genética**, 9th, p. 490-503, 2008.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. p. 95-98, 1999.

- IVANCEVIC, A.M; WALSH A.M; KORTSCHAK, R.D; ADELSON, D.L. Jumping the fine LINE between species: horizontal transfer of transposable elements in animals catalyses genome evolution. **Bioessays**, v 35(12), p. 1070-82, 2013.
- JORDAN, I. K.; MCDONALD, J. F. Evolution of the copia retrotransposon in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 1160-1171, 1998.
- JORDAN, I. K.; ROGOZIN, I. B.; GLAZKO, G. V.; KOONIN, E. V. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 2, 2003.
- JOWETT, T. Preparation of nucleic acids. In: ROBERTS, D. B. *Drosophila: A Practical Approach*. Oxford, IRL Press, v.335, p. 275-277, 1986.
- KAPITONOV, V.V; JURKA, J. A universal classification of eukaryotic evolution, **Nature Reviews. Genetics**, v. 9(5), p. 411-412, 2008.
- KATOH, K1; MISAWA K; KUMA, K; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Res**, v.15, p. 3059-66, 2002
- KOFLER, R; HILL, T; NOLTE V; BETANCOURT, A.J; SCHLÖTTERER, C, The recent invasion of natural *Drosophila simulans* populations by the P-element, **PNAS**, v. 112(21), p. 6659-63, 2015.
- KIDWELL, M.G; KID, J.F; SVED, J.A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination, **Genetics**, v. 86(4), p. 813-833, 1977.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** v. 16, p.111-120, 1980.
- TAMURA, K; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol Bio Evol.** v, 10(3), p. 512-26, 1993.
- KWIATOWSKI, J.; AYALA, F. J. Phylogeny of *Drosophila* and related genera: conflict between molecular and anatomical analyses. **Mol Phylogenet Evol**, v. 13(2), p. 319–328, 1999.
- LACHAISE D.; SILVAIN, J.F. How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster-D.simulans* palaeogeographic riddle. **Genetics**, v. 120, p. 17-39, 2004.
- LORETO, E.L.; CARARETO, C.M.A.; CAPY, P. Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. **Heredity**, v. 100, p. 545-54, 2008.
- LUAN, D. D.; KORMAN, M. H.; JAKUBCZAK, J. L.; EICKBUSH, T. H. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. **Cell**, v. 72(4), p. 595-605, 1993.
- MALIK, H.S; HENIKOFF, S; EICKBUSH, T.H. Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. **Genome Res**, v. 10(9), p. 1307-18, 2000.

MCCLINTOCK, B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. **Genetics**, 26(2): 234-82, 1941.

MCCLINTOCK, B. Mutable *loci* in maize: Nature of the *Ac* action. The mutable *c loci*. The mutable *wx loci*. Conclusions. **Carnegie Institution of Washington Year Book**, 47: 155-169, 1948.

MCCLINTOCK, B. Mutable *loci* in maize: The mechanism of transposition of the *Ds Locus*. The origin of *Ac*-controlled mutable *loci*. Transposition of the *Ac* locus. The action of *Ac* on the mutable *loci* it controls. Mutable *loci c m-2* and *wx m-1*. Conclusions. **Carnegie Institution of Washington Year Book**, 48: 142-154, 1949.

MCCLINTOCK, B. 1950. The origin and behavior of mutable *loci* in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 36(6): 344-55.

OBARD, D.J. et al. Estimating divergence dates and substitution rates in the *Drosophila* phylogeny. **Mol Bio Evol**, v. 29(11), p. 3459-73, 2012.

O'BROCHTA, D.A et al. Transpositionally active in primate lineage, **BMC Molecular Biology**, v. 10(1), p. 108, 2009.

OKADA, T.; CARSON, H. L, The genera *Phorticella* DUDA and *Zaprionus*. **Entomol** v. 51(4), p. 539–553, 1983.

OSTERTAG, E.M; KAZAZIAN, H.H. Genetics: LINEs in mind. **Nature**, v. 435(7044), p. 809-1, 2005.

ORTIZ, M.F; WALLAU, G.L, Transferência Horizontal de elementos de transposição. **Elementos de transposição – Diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos**, v. 1, cap. 6, p.115 – 140, 2015.

PARDUE, M; DEBARYSHE, P, G. Retrotransposon provide an evolutionary robust Non-Telomerase mechanism to maintain telomeres. **Annu Rev Genetics**, v. 37, p. 485-511, 2003.

PETROV, D.A; SCHATZMAN, J.L; HARTL, D.L; LOZOVSKAYA, E.R. Diverse transposable elements are mobilized in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 92, p. 8050-8054, 1995.

PETROV, D. A; HARTL, D. L. Pseudogene Evolution in *Drosophila* Suggests a High Rate of DNA Loss. **Mol Biol Evol**, v. 15, p. 1562-1567, 1998.

PISKUREK, O; OKADA, N. Poxviruses as possible vectors for horizontal transfer of retroposons from reptiles to mammals. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104(29), p. 12046-51, 2007.

REBOLLO, R.; LERAT, E.; KLEINE, L. L.; BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Losing *Helena*: the extinction of a *Drosophila* line-like element. **BMC Genomics**, v. 31, p. 149, 2008.

REBOLLO, R; HORARD, B; HUBERT, B; VIEIRA, C. Jumping genes and epigenetics: Towards new species. **Gene**, v. 454(1-2), p. 1-7, 2010.

ROBE, L.J, Relações filogenéticas no gênero *Drosophila* (Díptera, Drosophilidae): uma abordagem molecular. Tese (Genética e Biologia Molecular). 303 p. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2008.

RUSSO, C. A. M; TAKEZAKI, N, NEI, M. Phylogeny and divergence times of drosophilid species. **Mol Biol Evol**, v. 12, p. 391-404, 1995.

RUSSO, C. A. M; MELLO, B; FRAZÃO, A; VOLOCH, C. M. Phylogenetic analysis and a time tree for a large drosophilid data set (Diptera: Drosophilidae). **Linnean Society**, v. 169, p. 765-775, 2013.

SCHAACK, S.; GILBERT, C., FESCHOTTE, C. Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n.9, p. 537-546, 2010.

SETTA, N. et al., Transposon display supports transpositional activity of P elements in species of the saltans group of *Drosophila*. **Journal of genetics**, v. 86, p. 37-43, 2007.

SETTA, N.; VAN, S.M.A.; CAPY, P.; CARARETO C.M.A .Multiple invasions of Gypsy and Microopia retroelements in genus *Zaprionus* and melanogaster subgroup of the genus *Drosophila*. **BMC Evol Biol**, v. 9, p. 279, 2009.

SETTA, N.; VAN, S. M. A.; CAPY, P.; CARARETO C.M.A. *Copia* Retrotransposon in The *Zaprionus* Genus: Another Case of Transposable Element Sharing with the *Drosophila melanogaster* Subgroup. **J Mol Evol**, v. 72(3), p. 326-338, 2011.

SHARMA, A; PRESTING,G.G. Evolution of centromeric retrotransposons in grasses. **Genome Biol Evol**, v 96(6), p. 1335-52

SHARP, P. M.; LI, W. H. On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. **J Mol Evol**, v. 28, p. 398-402, 1989.

SIMÃO, M.C.; GRANZOTTO, A.; CARARETO, C.M.A, The evolutionary history of *Helena* retrotransposon in species of *Zaprionus* genus. **VIII Simpósio de Ecologia Genética e Evolução de Drosophila**, 2013

SIMÃO, M.C.; GRANZOTTO, A.; BISELLI, J.M.; CARARETO, C.M.A. A dinâmica evolutiva do elemento *BS* em *Zaprionus*. **XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2014.

SORMACHEVA, I, et al. Vertical evolution and horizontal transfer of CR1 non-LTR retrotransposons and Tc1/mariner DNA transposons in Lepidoptera species. **Mol Biol Evol**, v. 26(12), p. 3685-702, 2012. **Nat Commun**, v. 27(7), p. 1126, 2016.

SUH, A et al. Ancient horizontal transfers of retrotransposons between birds and ancestors of human pathogenic nematodes, **Nat Commun**, v. 21, p. 11396, 2016.

TATARENKOV, A; KWIATOWSKI, J; SKARECKY, D; BARRIO, E; AYALA, F,J, On the evolution of *Dopa* decarboxylase (*Ddc*) and *Drosophila* systematics. **J Mol Evol**, v. 48(4), p. 445-62, 1999.

- TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proc Natl Acad Sci**, v. 101(30), p. 11030–11035, 2004a.
- TAMURA, K., SUBRAMANIN, S., KUMAR. Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. **Mol Biol Evol**, v. 21(1), p. 36-44, 2004b.
- TOURASSE, N.J.; LI, W.H. Selective constraints, amino acid composition, and the rate of protein evolution. **Mol Biol Evol**, v. 17(4), p. 656-64, 2000.
- UDOMKIT, A; FORBES, S; DALGLEISH, G; FINNEGAN, D.J. *BS* a novel LINE-like element in *Drosophila melanogaster*. **Nucleic Acids Res**, v. 23(8), p. 1348-8, 1995.
- YASSIN, A, et al. Grafting the molecular phylogenetic tree with morphological branches to reconstruct the evolutionary history of the genus *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae). **Mol Phylogenet Evol**, v. 47(3), p. 903–15, 2008a
- YASSIN, A. et al. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. **Molecular Ecology Notes**, Inglaterra, v. 8, p. 491-501, 2008b.
- YASSIN, A.; DAVID, J. R.; Revision of the afrotropical species of *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae), with descriptions of two new species and notes on internal reproductive structures and immature stages. **Zookeys**, v. 23 (51), p. 33-72, 2010.
- WALLAU, G.L., ORTIZ, M. F.; LORETO, E.L. Horizontal transposon transfer in eukarya: detection, bias, and perspectives. **Genome Biology Evolution**, v. 4(8), p. 801-811, 2012.
- WALLAU, G.L; CAPY, P; LORETO, E; LE ROUZIC, A; HUA-VAN, A. *VHICA*, a New Method to Discriminate between Vertical and Horizontal Transposon Transfer: Application to the *Mariner* Family within *Drosophila*, v. 33(4), p. 1094-109, 2016.
- WANG X; LIU X. Close ecological relationship among species facilitated horizontal transfer of retrotransposons, **BMC Evol Biol**, v. 16, p. 201, 2016.
- WICKER, et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements, **Nature Reviews Genetics**, Inglaterra, v. 8, p. 973-982, 2007.

8. APÊNDICES

Apêndice 1. Sequências do elemento *Helena* em FASTA, obtida dos amplificadores da região do gene da transcriptase reversa.

>Zafric

```
AAGGCAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGTATTTTCGAAAGGGACACGCTTTTGA
CGACTGCGAGGCCGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACGTATGGCATGTT
GGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCGCCCTACATTTTAAAGTATCT
AGAAGAAAGAAAAATCACGGTGAGAAATAGCACTCCTCTATATACCCAATGAGA
GCTGGAGTCCCTGGCGGTGTTCTCGGACCGCTACTGTATTCCTTGTACACTGCTGA
TATCCCTTGCCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA
```

>Z._camerounenis_2

```
ACAAGGCAACATCTTGCCGGATCATCAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCACT
ATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACAGGCTTTTGACGACTGCG
AGTACTCCAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCA
TGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTT
TAAAATCATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTC
TTCTATATATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTA
CTATACTCCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTTTCGAACACATGGCAGC
ACCAAACA
```

>Z._camerounensis_1

```
ACAAGGCAACATCTTGCCGGATCATCAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCACT
ATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACAGGCTTTTGACGACTGCG
AGTACTCCAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCA
TGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTT
TAAAATCATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTC
TTCTATATATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTA
CTATACTCCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTTTCGAACACATGGCAGC
ACCA
```

>Z._camerounensis_3

ACAAGGCAACATCTTGCCGGATCATCAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCACT
 ATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACAGGCTTTTGACGACTGCG
 AGTACTCCAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCA
 TGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTT
 TAAAGTCATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTC
 TTCTATATATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTA
 CTATACTCCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTTTCGAACACATGGCAGC
 ACCAAACA

>Z._sepsoides_2

GAGTCGTATCCGCCATAAGCATGTTACTCACACTTTCCGCCCATGGGAGAGATC
 TATCCCAATAGGGTTATTGCCATTATAAGACAAGGCAACATCTTGCCGGATCAT
 CAATTTGTATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATTGAACAGGTCCACAGACTGGTGA
 AACACATATTACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCTGTCTTTATAGA
 TATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAG
 ACCCTTCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATCATATCTAGAAGAAAGACA
 ATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTCTTCTATATACCCAATGAGAGCTGGA
 GTCCCTCAGGGCGGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATAT
 CCCTTGCCCAAATTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Z._sepsoides_3

GAGTCGTATAGGCCTATAAGCCTCTTACCCTCCCTTTTTAAATTATGGGAGAGACT
 TATTGCCAATCGGATCAACGACAATATCAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCAT
 CAATTTGGATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTG
 AAACATGTACTACAGGCATTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCTGTCTTTATAG
 ATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAATATAAA
 GACCCTTCTACCTGCGCCCTACTCCTGTATTTTAAAGTCATATCTGGAAGGACGAG
 AATTTAAAATCACAGCGAGAAATACCTACTCTTCTGTAAATCCAATGAGAGCTGG
 AGTCCCACAGGGCTGTGTTCTCGGACCGCTACAATATTCCTTGTACACTGCTGATA
 TCCCTTGCCCGAGTTCCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Z._sepsoides_5

GAGTCGTATAGGCCTATAAGCCTCTTACCCTCCCTTTTTAAATTATGGGAGAGACT
TATTGCCAATCGGATCAACGACAATATCGGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCAT
CAATTTGGATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTG
AAACATGTACTACAGGCATTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCTGTCTTTATAG
ATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAATATAAA
GACCCTTCTACCTGCGCCCTACTCCTGTATTTTAAAGTCATATCTGGAAGGACGAG
AATTTAAAATCACAGCGAGAAATACCTACTCTTCTGTAAATCCAATGAGAGCTGG
AGTCCCACAGGGCTGTGTTCTCGGACCGCTACAATATTCCTTGTACACTGCTGATA
TCCCTTGCCCGAGTTCCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Z.sepsoides_4

GAGTCGTATAGGCCTATAAGCCTCTTACCCTCCCTTTTTAAATTATGGGAGAGACT
TATTGCCAATCGGATCAACGACAATATCGGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCAT
CAATTTGGATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTG
AAACATGTACTACAGGCATTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCTGTCTTTATAG
ATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAATATAAA
GACCCTTCTACCTGCGCCCTACTCCTGTATTTTAAAGTCATATCTGGAAGGACGAG
AATTTAAAATCACAGCGAGAAATACCTACTCTTCTGTAAATCCAATGAGAGCTGG
AGTCCCACAGGGCTGTGTTCTCGGACCGCTACAATATTCCTTGTACACTGCTGATA
TCCCTTGCCCGAGTTCCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Z._sepsoides_5

GAGTCGTATAGGCCTATAAGCCTCTTACCCTCCCTTTTTAAATTATGGGAGAGACT
TATTGCCAATCGGATCAACGACAATATCAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCAT
CAATTTGGATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTG
AAACATGTACTACAGGCATTTGACGACTGCTAGTACTCCAACGCTGTCTTTATAG
ATATGCAACAAGCCTTCGGAAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAATATAAA
GACCCTTCTACCTGCGCCCTACTCATGTATTTTAAAGTCATATCTGGAAGGACGA
GAATTTAAAATCACAGCGAGAAATACCTACTCTTCTGTAAATCCAATGAGAGCTG
GAGTCCCACAGGGCTGTGTTCTCGGACCGCTACAATATTCCTTGTACACTGCTGAT
ATCCCATGCCCGAGTTCCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Z._inermis

GAGTTGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAGAGACT
TATTGCTAATCGGATCAACGACATTATAAGACAATCTAATATCTTGCCGGATCAT
CAATTTGGATTTGGAAAGGGACACGACACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGGG
AAACACATATTACGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCTGTCTTTATTGATA
TGCAATAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTGTTATGCAAGATAAAGAC
TACTACCTGCGCTCTACTTCTGCATTTTAAAGTCATATCTGGAAGGACGAGAATTT
AAAATCACGGTGAGAAATAACTAATCCTCTATATATCCAATGAGAACTGGAATCC
CACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTTTTATACTCCTTATACTGCTGATATCCCT
TGGCCGAGTTTCGAACACATGGAAGCACCGAACA

>Z._inermis_2

GAGTTGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAGAGACT
TATTGCTAATCGGATCAACGACATTATAAGACAATCTAATATCTTGCCGGATCAT
CAATTTGGATTTGGAAAGGGACACGACACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGGG
AAACACATATTACGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCTGTCTTTATTGATA
TGCAATAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTGTTATGCAAGATAAAGAC
TACTACCTGCGCTCTACTTCTGCATTTTAAAGTCATATCTGGAAGGACGAGAATTT
AAAATCACGGTGAGAAATAACTAATCCTCTATATATCCAATGAGAACTGGAATCC
CACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTTTTATACTCCTTATACTGCTGATATCCCT
TGGCCGAGTTTCGAACACATGGAAGCACCGAACA

>Z._inermis_3

GAGTTGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAGAGACT
TATTGCTAATCGGATCAACGACATTATAAGACAATCTAATATCTTGCCGGATCAT
CAATTTGGATTTGGAAAGGGACACGACACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGGG
AAACACATATTACGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCTGTCTTTATTGATA
TGCAATAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTGTTATGCAAGATAAAGAC
TACTACCTGCGCTCTACTTCTGCATTTTAAAGTCATATCTGGAAGGACGAGAATTT
AAAATCACGGTGAGAAATAACTAATCCTCTATATATCCAATGAGAACTGGAATCC
CACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTTTTATACTCCTTATACTGCTGATATCCCT
TGGCCGAGTTTCGAACACATGGAAGCACCGAACA

>Z._inermis_4

GAGTTGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAGAGACT
 TATTGCTAATCGGATCAACGACATTATAAGACAATCTAATATCTTGCCGGATCAT
 CAATTTGGATTTGGAAAGGGACACGACACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGGG
 AAACACATATTACGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCTGTCTTTATTGATA
 TGCAATAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTGTTATGCAAGATAAAGAC
 TACTACCTGCGCTCTACTTCTGCATTTTAAAGTCATATCTGGAAGGACGAGAATTT
 AAAATCACGGTGAGAAATAACTAATCCTCTATATATCCAATGAGAACTGGAATCC
 CACAGGGCAGTGTCTCGGACCGCTTTTATACTCCTTATACTGCTGATATCCCT
 TGGCCGAGTTTCGAACACATGGAAGCACCGAACA

>Zorn1

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATATAAGCGATAATATATGGTATATA
 GCACTAATCTTTAATGCTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAA
 TGGCTGCTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAGCCGGAAGATGATCCTGAGTC
 GTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCACACTTTCTAAATTATGGGAGAGACTTATTG
 CCAATCGGATAAACGACATTATAAGACAAGGCAATATCTTGCCGGATCATCAATT
 TGTATTTTCGAAAGGGACACGGAACTATTGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACA
 CATACTACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCCGTCTTTATAGATATG
 CAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCC
 TTCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGAAAGACAATTT
 AAAATCACGGTGAGAAATAGCTACTCCTCTATATACCCAATGAGAGCTGGAGTCC
 CTCAGGGCAGTGTCTCGGACCGCTACTGTATTCTTGTACACTGCTGATATCCCT
 TGCCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zorn2

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATATAAGCGATAATATATGGTATATA
 GCACTAATCTTTAATGCTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAA
 TGGCTGCTATTTTGATGATCCACTAGCCTGGAAAGCCGGAAGATGATCCTGAGTC
 GTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCACACTTTCTAAATTATGGGAGAGACTTATTG
 CCAATCGGATAAACGACATTATAAGACAAGGCAATATCTTGCCGGATCATCAATT
 TGTATTTTCGAAAGGGGACACGGAACTATTGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACA
 CATACTACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCCGTCTTTATAGATATG
 CAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCC

TTCTACCTGCGCCCTACTTCTGTACTTTAAAGTCATATCTAGAAGAAAGACAATTT
 AAAATCACGGTGAGAAATAGCTACTCCTCTATATACCCAATGAGAGCTGGAGTCC
 CTCAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTGTATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCT
 TGCCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zorn3

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATATAAGCGATAATATATGGTATATA
 GCACTAATCTTTAATGCTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAA
 TGGCTGCTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAGCCGGAAGATGATCCTGAGTC
 GTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCACACTTTCTAAATTATGGGAGAGACTTATTG
 CCAATCGGATAAACGACATTATAAGACAAGGCAATATCTTGCCGGATCATCAATT
 TGTATTTTCGAAAGGGACACGGAAGTATTGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACA
 CATACTACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCCGTCTTTATAGATATG
 CAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCC
 TTCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAGTCATATCTAGAAGAAAGACAATTT
 AAAATCACGGTGAGAAATAGCTACTCCTCTATATACCCAATGAGAGCTGGAGTCC
 CTCAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTGTATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCT
 TGCCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zorn4

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATATAAGCGATAATATATGGTATATA
 GCACTAATCTTTAATGCTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAA
 TGGCTGCTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAGCCGGAAGATGATCCTGAGTC
 GTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCACACTTTCTAAATTATGGGAGAGACTTATTG
 CCAATCGGATAAACGACATTATAAGACAAGGCAATATCTTGCCGGATCATCAATT
 TGTATTTTCGAAAGGGACACGGAAGTATTGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACA
 CATACTACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCCGTCTTTATAGATATG
 CAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCC
 TTCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAGTCATATCTAGAAGAAAGACAATTT
 AAAATCACGGTGAGAAATAGCTACTCCTCTATATACCCAATGAGAGCTGGAGTCC
 CTCAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTGTATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCT
 TGCCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zorn7

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATATAAGCGATAATATATGGTATATA
 GCACTAATCTTTAATGCTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAA
 TGGCTGCTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAGCCGGAAGATGATCCTGAGTC
 GTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCACACTTTCTAAATTATGGGAGAGACTTATTG
 CCAATCGGATAAACGACATTATAAGACGAGGCAATATCTTGCCGGATCATCAATT
 TGTATTTTCGAAAGGGACACGGAAGTATTGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACA
 CATACTACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCCGTCTTTATAGATATG
 CAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCC
 TTCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGAAAGACAATTT
 AAAATCACGGTGAGAAATAGCTACTCCTCTATATACCCAATGAGAGCTGGAGTCC
 CTCAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTGTATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCT
 TGCCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zorn8

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATATAAGCGATAATATATGGTATATA
 GCACTAATCTTTAATGCTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAA
 TGGCTGCTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAGCCGGAAGATGATCCTGAGTC
 GTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCACACTTTCTAAATTATGGGAGAGACTTATTG
 CCAATCGGATAAACGACATTATAAGACAAGGCAATATCTTGCCGGATCATCAATT
 TGTATTTTCGAAAGGGACACGGAAGTATTGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACA
 CATACTACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCCGTCTTTATAGATATG
 CAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCC
 TTCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGAAAGACAATTT
 AAAATCACGGTGAGAAATAGCTACTCCTCTATATACCCAATGAGAGCTGGAGTCC
 CTCAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTGTATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCT
 TGCCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zorn9

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATATAAGCGATAATATATGGTATATA
 GCACTAATCTTTAATGCTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAA
 TGGCTGCTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAGCCGGAAGATGATCCTGAGTC
 GTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCACACTTTCTAAATTATGGGAGAGACTTATTG
 CCAATCGGATAAACGACATTATAAGACAAGGCAATATCTTGCCGGATCATCAATT

TGTATTTTCGAAAGGGACACGGAACTATTGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACA
 CATACTACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCCGTCTTTATAGATATG
 CAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCC
 TTCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGAAAGACAATTT
 AAAATCACGGTGAGAAATAGCTACTCCTCTATATACCCAATGAGAGCTGGAGTCC
 CTCAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTGTATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCT
 TGCCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zorn10

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATATAAGCGATAATATATGGTATATA
 GCACTAATCTTTAATGCTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCTCAAGACAGTGGAAAA
 TGGCTGCTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAGCCGGAAGATGATCCTGAGTC
 GTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCCACACTTTCTAAATTATGGGAGAGACTTATTG
 CCAATCGGATAAACGACATTATAAGACAAGGCAATATCTTGCCGGATCATCAATT
 TGTATTTTCGAAAGGGACACGGAACTATTGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACA
 CATACTACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACGCCGTCTTTATAGATATG
 CAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCC
 TTCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGAAAGACAATTT
 AAAATCACGGTGAGAAATAGCTACTCCTCTATATACCCAATGAGAGCTGGAGTCC
 CTCAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTGTATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCT
 TGCCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zind22

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
 AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCTCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
 GTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGTGTGATCNTGAGTCGTATA
 GGCCTATAACCCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
 CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
 TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
 TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
 CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
 CCCTACTTCTGTATTTTAAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
 TGAGAAATAATTAATCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG

TGTTCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zind23

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
GTTATTTTGTATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATA
GGCCTATAACCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
CCCTACTTCTGTATTTTAAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
TGAGAAATAATTACTCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG
TGTTCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zind25

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCGAGTGTTCCCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
GTTATTTTGTATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATA
GGCCTATAACCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
CCCTACTTCTGTATTTTAAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
TGAGAAATAATTACTCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG
TGTTCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zind29

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
 AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
 GTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGCTTGATCCTGAGTCGTATA
 GGCCTATAACCCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
 CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
 TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
 TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
 CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
 CCCTACTTCTGTATTTTTAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
 TGAGAAATAAATTACTCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG
 TGTTCCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
 TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zind34

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
 AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
 GTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGCTTGATCCTGAGTCGTATA
 GGCCTATAACCCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
 CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
 TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
 TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
 CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
 CCCTACTTCTGTATTTTTAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
 TGAGAAATAAATTACTCTTTTATATATCCTATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG
 TGTTCCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
 TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zind35

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
 AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
 GTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGCTTGATCCTGAGTCGTATA
 GGCCTATAACCCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
 CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT

TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
CCCTACTTCTGTATTTTTAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
TGAGAAATAATTACTCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG
TGTTCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zind31

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCTCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
GTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGCTTGATCCTGAGTCGTATA
GGCCTATAACCCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
CCCTACTTCTGTATTTTTAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
TGAGAAATAATTACTCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG
TGTTCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zgab40

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCTCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
GTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGCTTGATCCTGAGTCGTATA
GGCCTATAACCCCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
CCCTACTTCTGTATTTTTAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACG
GTGAGAAATAATTACTCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCA

GTGTTCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGA
TTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zgab33

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
GTTATTTTGTATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATA
GGCCTATAACCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
CCCTACTTCTGTATTTTAAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
TGCGAAATAATTACTCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG
TGTTCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zgab9

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
GTTATTTTGTATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATA
GGCCTATAACCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
CCCTACTTCTGTATTTTAAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
TGAGAAATAATTACTCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG
TGTTCTCGGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zgab2

ATTTGTCATGCCACGCTCAAAGTTTTAACTATAAAAAGCGATAATTTATATAGCACT
 AATATTCAATGTTATTTTAAGGATCCAAGTGTTCCCAAGGCAGTGGAAACTGGCT
 GTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGGAAACAAGAAGCTTGATCCTGAGTCGTATA
 GGCCTATAACCCTCTTACCTTCCCTTTCCAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAAT
 CGGATCAACGACAATATAAGACAAGGTAATATCTTGCCGGATCATCAATTTGGAT
 TTAGAAAGGGACACGGCACTATAGAAAAGGTCCACAGACTGGTGAAACATATAT
 TACAGGCTTTTGACGACTGCGAGTACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTT
 CGACAAAGTATGGCATGTTGGATTATTATGCAAGATAAAGACCCTTCTACCTGCG
 CCCTACTTCTGTATTTTTAAGTAATATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGG
 TGAGAAATAATTACTCTTTTATATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCATAGGGCAG
 TGTTCGACCACTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTTCCCGAGAT
 TCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid1

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG
 ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT
 ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA
 TCCAATGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
 TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid2

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG
 ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT

ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA
 TCCAATGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
 TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid3

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG
 ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT
 ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA
 TCCAATGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
 TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid4

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG
 ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT
 ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA
 TCCAATGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
 TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid6

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG

ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAACATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT
 ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA
 TCCAATGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
 TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid7

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG
 ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT
 ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA
 TCCAATGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
 TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid8

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG
 ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT
 ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA
 TCCAACGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
 TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid11

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG
 ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT
 ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA
 TCCAATGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
 TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid12

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG
 ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT
 ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA
 TCCAATGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
 TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Zdavid13

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATAATCTATATATCATA
 GCACTAATCTTCAATGCTATTTTAAGGGTTCAAGTGTTCCCAAGACAGTGGAAAC
 TGGCTGAGTCTTATCGGCCTATAAGTCTCTTACCCTCCCTTTCTAAATTATGGGAG
 AGACTTAGTGCCAATCGGATCAACGACATAATAAGGCAAGGTAATATCTTCCCGG
 ACCATCTATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCTTTTGACGACTACGAGTACTCCA
 ACGCTGTCTTTAGAAATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGATT
 ATTATGCAAGATAAAGACCCTCCCACCAGTACCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCAT
 ATCTGGAAGAACGAGAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAACTACTCTTCTATATA

TCCAATGAGAGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGGCCGCTACTATACTCC
TTGTACACTGCTGATATCCCTTGCCCGAATTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub1

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATACTATATATAGCAC
TAATCTTTAATGCTATTTTAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAAACTGGC
TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTATGGGAAAGACTTATTGCAA
ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTGCCGGATCATCAATTTGG
ATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
CAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCC
CAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTG
CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub2

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATACTATATATAGCAC
TAATCTTTAATGCTATTTTAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAAACTGGC
TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTATGGGAAAGACTTATTGCAA
ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTGCCGGATCATCAATTTGG
ATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
CAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCC
AAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTG
CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub3

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATACTATATATAGCAC
 TAATCTTTAATGCTATTTTAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAACTGGC
 TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
 AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTATGGGAAAGACTTATTGCAA
 ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTTCCGGATCATCAATTTGG
 ATTTGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
 ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
 CAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
 TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
 AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCA
 CAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTG
 CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub4

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATACTATATATAGCAC
 TAATCTTTAATGCTATTTTAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAACTGGC
 TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
 AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTATGGGAAAGACTTATTGCAA
 ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTTCCGGATCATCAATTTGG
 ATTTGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
 ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
 CAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
 TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
 AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCA
 CAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTG
 CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub5

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATACTATATATAGCAC
 TAATCTTTAATGCTATTTTAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAACTGGC
 TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
 AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTATGGGAAAGACTTATTGCAA
 ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTTCCGGATCATCAATTTGG

ATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
 ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
 CAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
 TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
 AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCA
 CAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTG
 CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub6

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAGCGATACTATATATAGCAC
 TAATCTTTAATGCTATTTTAAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAAACTGGC
 TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
 AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTATGGGAAAGACTTATTGCAA
 ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTGCCGGATCATCAATTTGG
 ATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
 ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
 CAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
 TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
 AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCGATGAGAGCTGGAGTCCCA
 CAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTG
 CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub7

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAGCGATACTATATATAGCAC
 TAATCTTTAATGCTATTTTAAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAAACTGGC
 TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
 AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTATGGGAAAGACTTATTGCAA
 ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTGCCGGATCATCAATTTGG
 ATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
 ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
 CAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
 TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
 AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCA

CAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTGGTACACTGCTGATATCCCTTG
CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub8

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAGCGATACTATATATAGCAC
TAATCTTTAATGCTATTTTAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAAACTGGC
TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTATGGGAAAGACTTATTGCAA
ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTGCCGGATCATCAATTTGG
ATTTGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
CAAGCCTTCGACTAAGTATGTCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCA
CAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTG
CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub9

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAGCGATACTATATATAGCAC
TAATCTTTAATGCTATTTTAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAAACTGGC
TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTACGGGAAAGACTTATTGCAA
ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTGCCGGATCATCAATTTGG
ATTTGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
CAAGCCTTCGACTAAGTATGTCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCA
CAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTG
CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Ztub10

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTACCTATAAAAAGCGATACTATATATAGCAC
 TAATCTTTAATGCTATTTTAAGGGTCCCAGAGTACCCAAGACAGTGGAAACTGGC
 TATTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGAAAACCAGAAGTTGATCTTGAGTCGTAT
 AGGCCTATAAGCCTCTTAACCTCCCTTTCTAAATTACGGGAAAGACTTATTGCAA
 ATCAGATCAACGACATTATATGACAAGGTAATACCCTGCCGGATCATCAATTTGG
 ATTTTCGAAAGGGACACGGCACTATAGAACAGGTCCACAGACTGGTGAAACATAT
 ACTACAGGGTTTTGACGACTGCGAGTACTCCAACACTGTATTTACAGATATGCAA
 CAAGCCTTCGACTAAGTATGTCATGTCGTATTATTATGCAAGATAAAGACACTTC
 TACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAGTCATATCTAGAAGGACGAGAATTTAA
 AATCACGGTGAGAAATACCTACTCTTCTGTATATCCAATGAGAGCTGGAGTCCCA
 CAGGGCAGTGTTCGACCGCTACTATATTCCTTGTACACTGCTGATATCCCTTG
 CCCGAGTTTCGAACACATGGCAGCACCAAACA

>Znig1

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTATCTATAAAAAGCACTAATTTGCAATGCTAT
 TTTAAGGGTCCAAGTGTGGAAACTGGCTGTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGG
 AAGCCAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCATCCCTTTC
 TAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAATCGGATCAACGACATTGTAAGACAAGGT
 AACATCTTGCCGGATCATGAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCGCTATAGAAC
 AGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACGGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTC
 CAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGA
 TTATTATGCAAGGTAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATC
 ATATCTGGAAGAACGATAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTCTTCTATA
 TATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCGACCGCTACTATACT
 CCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTTGAACACATGGCAGCACCAA
 CA

>Znig2

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTATCTATAAAAAGCACTAATTTGCAATGCTAT
 TTTAAGGGTCCAAGTGTGGAAACTGGCTGTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGG
 AAGCCAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCATCCCTTTC
 TAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAATCGGATCAACGACATTATAAGACAAGGT

AACATCTTGCCGGATCATGAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCGCTATAGAAC
AGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACGGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTC
CAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGA
TTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATC
ATATCTGGAAGAACGATAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTCTTCTATA
TATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATACT
CCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTTGAAACACATGGCAGCACCAAA
CA

>Znig3

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTATCTATAAAAGCACTAATTTGCAATGCTAT
TTTAAGGGTCCAAGTGTGGAAACTGGCTGTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGG
AAGCCAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCATCCCTTTC
TAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAATCGGATCAACGACATTATAAGACAAGGT
AACATCTTGCCGGATCATGAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCGCTATAGAAC
AGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACGGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTC
CAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGA
TTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATC
ATATCTGGAAGAACGATAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTCTTCTATA
TATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATACT
CCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTTGAAACACATGGCAGCACCAAA
CA

>Znig4

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTATCTATAAAAGCACTAATTTGCAATGCTAT
TTTAAGGGTCCAAGTGTGGAAACTGGCTGTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGG
AAGCCAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCATCCCTTTC
TAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAATCGGATCAACGACATTATAAGACAAGGT
AACATCTTGCCGGATCATGAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCGCTATAGAAC
AGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACGGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTC
CAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGA
TTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATC
ATATCTGGAAGAACGATAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTCTTCTATA

TATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATACT
 CCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTCGAACACATGGCAGCACCAAA
 CA

>Znig5

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTATCTATAAAAGCACTAATTTGCAATGCTAT
 TTTAAGGGTCCAAGTGTGGAAACTGGCTGTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGG
 AAGCCAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCATCCCTTTC
 TAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAATCGGATCAACGACATTATAAGACAAGGT
 AACATCTTGCCGGATCATGAATTTGGATTTGAAAAGGACACGGGCGCTATAGAAC
 AGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACGGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTC
 CAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGA
 TTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATC
 ATATCTGGAAGAACGATAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTCTTCTATA
 TATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATACT
 CCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTCGAACACATGGCAGCACCAAA
 CA

>Znig6

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTATCTATAAAAGCACTAATTTGCAATGCTAT
 TTTAAGGGTCCAAGTGTGGAAACTGGCTGTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGG
 AAGCCAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCATCCCTTTC
 TAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAATCGGATCAACGACATTATAAGACAAGGT
 AACATCTTGCCGGATCATGAATTTGGATTTGAAAAGGACACGGGCGCTATAGAAC
 AGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACGGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTC
 CAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGA
 TTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATC
 ATATCTGGAAGAACGATAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTCTTCTATA
 TATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATACT
 CCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTCGAACACATGGCAGCACCAAA
 CA

>Znig7

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTATCTATAAAAGCACTAATTTGCAATGCTAT
 TTTAAGGGTCCAAGTGTGGAAACTGGCTGTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGG
 AAGCCAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCATCCCTTTC
 TAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAATCGGATCAACGACATTATAAGACAAGGT
 AACATCTTGCCGGATCATGAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCGCTATAGAAC
 AGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACGGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTC
 CAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGA
 TTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATC
 ATATCTGGAAGAACGATAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTIONTCTATA
 TATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATACT
 CCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTTGAAACACATGGCAGCACCAAA
 CA

>Znig8

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTATCTATAAAAGCACTAATTTGCAATGCTAT
 TTTAAGGGTCCAAGTGTGGAAACTGGCTGTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGG
 AAGCCAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCATCCCTTTC
 TAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAATCGGATCAACGACATTATAAGACAAGGT
 AACATCTTGCCGGATCATGAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCGCTATAGAAC
 AGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACGGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTC
 CAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGA
 TTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATC
 ATATCTGGAAGAACGATAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTIONTCTATA
 TATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATACT
 CCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTTGAAACACATGGCAGCACCAAA
 CA

>Znig9

ATTTGTCATGCCACGCTAAAGGTTTTATCTATAAAAGCACTAATTTGCAATGCTAT
 TTTAAGGGTCCAAGAGTGGAAACTGGCTGTTATTTTGATGATCCACAAGCCTGGG
 AAGCCAGAAGTTGATCCTGAGTCGTATCGGCCTATAAGCCTCTTACCATCCCTTTC
 TAAATTATGGGAGAGACTTATTGCCAATCGGATCAACGACATTATAAGACAAGGT
 AACATCTTGCCGGATCATGAATTTGGATTTTCGAAAAGGACACGGCGCTATAGAAC

AGGTCCACAGACTGGTGAAACATATATTACGGGCTTTTGACGACTGCGAGTACTC
CAACGCTGTCTTTATAGATATGCAACAAGCCTTCGACAAAGTATGGCATGTTGGA
TTATTATGCAAGATAAAGACCCTCCTACCTGCGCCCTACTTCTGTATTTTAAAATC
ATATCTGGAAGAACGATAATTTAAAATCACGGTGAGAAATAATTACTCTTCTATA
TATCCAATGACGGCTGGAGTCCCACAGGGCAGTGTTCTCGGACCGCTACTATACT
CCTTGTACACCGCTGATATCCCTTGCCCAAATTCGAACACATGGCAGCACCAAA
CA

Apêndice 2. Sequências do elemento *BS* em FASTA, obtidas dos amplificadores da região do gene da transcriptase reversa.

>Zgab3

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGAAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTTTTGCAAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCATTCTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCCGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAG
CAGATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTC
CCTGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGAAGGG

>Zgab4

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATGCCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGAAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACCTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGA AAA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGATTGCAAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCATACTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGC

AGATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCGTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAAGGTAGGG

>Zgab5

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTTCAAACGCCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTGGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGTCAGCACGAGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAGAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTAGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTTGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGAAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACCTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTATTGCAAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCCATACTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGC
AGATATAGTGATAGACTTAGACGACACCACAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAAGGAAGGG

>Zgab1

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCGCTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGGAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCGTAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTTTTGCAAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGATTGCCATTCTATGTGCGTGGCACTACCCTTG
CACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGCA

GATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTCCC
TGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGAAGGG

>Zgab6

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGAAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTTTTGCAAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCATTCTATGTGCGTGGCACTACCCTTG
CACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGCA
GATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTCCC
TGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGAAGGG

>Zsep2

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTGCCCTGCCCAAACGCCTGTCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGATATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTTGCAACGAGGCGGCACGGGGTCTCCAACAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAAAATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTACCTTGAAGACCTTAATTCCTACTACCGCACCCATAGTATTG
GAAGGTGTAATACTAGATCAACCTTTACAGGCTAAGTACCTCGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGATCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGATGGCTGATAAACAGAAAAAGCACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCGTGGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAGCCGCATAACAGGATTGTAAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACGGACTGCCATTTTATGTACGTGGCACTACCCTT
CACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAACAGATCTCCAGGCACACCAGCA

GATATAGTGATAGACTCAGACGACACCGCAGTATACTTGCTAGACGCTTACTCCC
 TGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGAAGGG

>Zsep3

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGAAGATCTGTCCTGCCCAAACGCCTGTCATAT
 GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGTTGATGATATCGCACTGTTG
 TACAGCTCTAATTGTTGCAACGAGGCGGCACGGGGTCTCCAACAGTACCTCACCA
 CACTGGCTGCATGGTGCAAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
 CCAATCCCTGCTTCACCTTGAAGACCTTAATTCCCCTACCGCATCCATAGTATTG
 GAAGGTGTAATACTAGATCAACCTTTACAGGCTAAGTACCTCGGGATTACCCTTG
 ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
 AAGGATGCAACAACCTGCGATGGCTGATAAACAGAAAAAGCACCATGTCCTGAG
 ATCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCGAGGCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
 CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAGCCGCATACAGGTATTGCAAA
 ATCGTGCCATGCGTGCAATTACGGACTGCCCATTTTTATGTACGTGGCACTACCCTT
 CACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAACAGATCTCCAGGCACACCAGCA
 GATATAGTGATAGACTCAGACGACACCGCAGCATTCTTGCTAGACGCTTACTCCC
 TGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGTAGGG

>Zsep4

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTGCCCTGCCCAAACGCCTGTCATAT
 GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGATATCGCACTGTTG
 TACAGCTCTAATTGTTGCAACGAGGCGGCACGGGGTCTCCAACAGTACCTCACCA
 CACTGGCTGCATGGTGCAAAAAATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
 CCAATCCCTGCTTCACCTTGAAGACCTTAATTCCCCTACCGCACCCATAGTATTG
 GAAGGTGTAATACTAGATCAACCTTTACAGGCTAAGTACCTCGGGATTACCCTTG
 ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGATCGGAGATGCTATCA
 AAGGATGCAACAACCTGCGATGGCTGATAAACAGAAAAAGCACCATGTCCTGAG
 AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCGTGGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
 CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAGCCGCATACAGGTATTGTA
 ATCGTGCCATGCGTGCAATTACGGACTGCCCATTTTTATGTACGTGGCACTACCCTT
 CACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAACAGATCTCCAGGCACACCAGCA

GATATAGTGATAGACTCAGACGACACCGCAGTATACTTGCTAGACGCTTACTCCC
TGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGTAGGG

>Zsep5

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTGCCCTGCCCAAACGCCTGTCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGATATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTTGCAACGAGGCGGCACGGGGTCTCCAACAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAAATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACCTTGAAGACCTTAATTCCCACTACCGCACCCATAGTATTG
GAAGGTGTAATACTAGATCAACCTTTACAGGCTAAGTACCTCGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGATCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACA ACTGCGATGGCTGATAAACAGAAAAAGCACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCGTGGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAGCCGCATACAGGTATTGTAAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACGGACTGCCCATTTTATGTACGTGGCACTACCCTT
CACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAACAGATCTCCAGGCACACCAGCA
GATATAGTGATAGACTCAGACGACACCGCAGTATACTTGCTAGACGCTTACTCCC
TGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGAAGGG

>Zsep6

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGAAGATCTGTCCTGCCCAAACGCCTGTCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGTTGATGATATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTTGCAACGAGGCGGCACGGGGTCTCCAACAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACCTTGAAGACCTTAATTCCCACTACCGCATCCATAGTATT
GGAAGGTGTAATACTAGATCAACCTTTACAGGCTAAGTACCTCGGGATTACCCTT
GATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATC
AAAGGATGCAACA ACTGCGATGGCTGATAAACAGAAAAAGCACCATGTCACTGA
GATCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCGAGGCCCGATCTGGCTGTACGGAAT
ACAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAGCCGCATACAGGTATTGCAA
AATCGTGCCATGCGTGCAATTACGGACTGCCCATTTTATGTACGTGGCACTACCCT
TCACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAACAGATCTCCAGGCACACCAGC

AGATATAGTGATAGACTCAGACGACACCGCAGCATTCTTGCTAGACGCTTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGTAGGG

>Zsep6

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTGCCCTGCCCAAACGCCTGTCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGATATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTTGCAACGAGGCGGCACGGGGTCTCCAACAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACCTTGAAGACCTTAATTCCCACCACCGCACCCATAGTATTG
GAAGGTGTAATACTAGATCAACCTTTACAGGCTAAGTACCTCGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGATCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGATGGCTGATAAACAGAAAAAGCACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCGTGGCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAGCCGCATACAGGTATTGTAAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACGGACTGCCCATTTTATGTACGTGGCACTACCCTT
CACCGTGATCTGAATCTCATAACAGTGGAAGAACAGATCTCCAGGCACACCAGCA
GATATAGTGATAGACTCAGACGACACCGCAGTATACTTGCTAGACGCTTACTCCC
TGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGAAGGG

>Zind2

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACCTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGAAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTTTTGCAAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCCATTTCTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCTGTATCTCATAACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGC

AGATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAACGAGATTA AAAAGGTAGGG

>Zind3

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCCACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGAAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTTTTGCAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCATTCTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCTGTATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGC
AGATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAACGAGATTA AAAAGGAAGGG

>Zind4

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAACGCCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CTAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGAAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTTTTGCAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCATTCTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGC

AGATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATACTTGCTAGACGCTTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAAGGAAGGG

>Zind5

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTCCAACAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGAAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTTTTGCAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCATTCTATGTGCGTGGCACTACCCTG
CACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGCA
GATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTCCC
TGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAAGGAAGGG

>Zind6

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAGTTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CTAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGAAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTTTTGCAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCATTCTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGC

AGATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATACTTGCTAGACGCTTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAAGGAAGGG

>Zafr2

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATGCCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTTAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGGAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAATCCAATTACAAGCGCATAACAGGTTTTGCAA
ATTGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCCGTACTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGC
AGATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAAGGAAGGG

>Zafr4

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATGCCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAACCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTGCAGGCAATGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGGAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATTTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAATCCAATTACAAGTGCATAACAGGTTTTGCAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCCATACTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGC

AGATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAAGGAAGGG

>Zafr1

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATGCCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAACCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCAATGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCA
AAGGATGCAACAACCTGCGTTGGCTGATAAACAGGAAAAGTACCATGTCACTGAG
AGCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCATAGCCCCGATTTGGCTGTACGGAATA
CAGGTCTGGGGTATTTCTGCAAATCCAATTACAAGTGCATACAGGTTTTGCAA
ATCGTGCCATGCGTGCAATTACAGACTGCCCATACTATGTGCGTGGCACTACCCT
GCACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAGCAGATCTCCAGGCACACCAGC
AGATATAGAGATAGACTTAGACGACACCAAAGTATGCTTGCTAGACGCTTACTCC
CTGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAAGGAAGGG

>Zafr9

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTGCCCTGCCCAAACGCCTGTCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGATATCGCACTGCTG
TACAGCTCCAATTGTTGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTCCAACAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAACCAC
CAATCCCTGCTTACCTTGAAGACCTTAATTCCCACTACCGCACCCATAGTATTGG
AAGGTGTAATACTAGATCAACCTTTACAAGCTAAGTACCTCGGGATTACCCTTGA
TAAACGACTGACTTTCGGCCCGCACCTGAAAGCTACGGCTCGGAGATGCTATCAA
AGGATGCAACAACCTGCGATGGCTGATAAATAGAAAAAGCACCATGTCACTGAGA
GCCAAAAGAGCAGTCTACGTCCACTGCGTAGCCCCGATCTGGCTGTACGGAATAC
AGGTCTGGGGTATTTCTGCAAATCCAACTACAACCGCATAACAGGTATTGCAA
TCGTGCCATGCGTGCAATTACGGACTGCCATTTTATGTACGTGGCACTACCCTTC
ACCGTGATCTGAATCTCCATACAGTGGAAGAACAGATCTCCAGGCACACCAGCA

GATATAGTGATAGACTCAGACGACACCGCAGTATACTTGCTAGACGCTTACTCCC
TGCTAGGCCTCTAAGGAGATTA AAAAGGTAGGG

>Afr10

CCGTTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATGCCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTAGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTTAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAATTG
GAAGGTGTAATTCTAGATCAGCCTTTACAGGCTAAGTACCTTGGGATTACCCTTG
ATAAACGTCTGACTTCC

>Zdav1

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAGCTG
GAAGGAA

>Zdav6

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAGCTG
GAAGGAA

>Zorn1

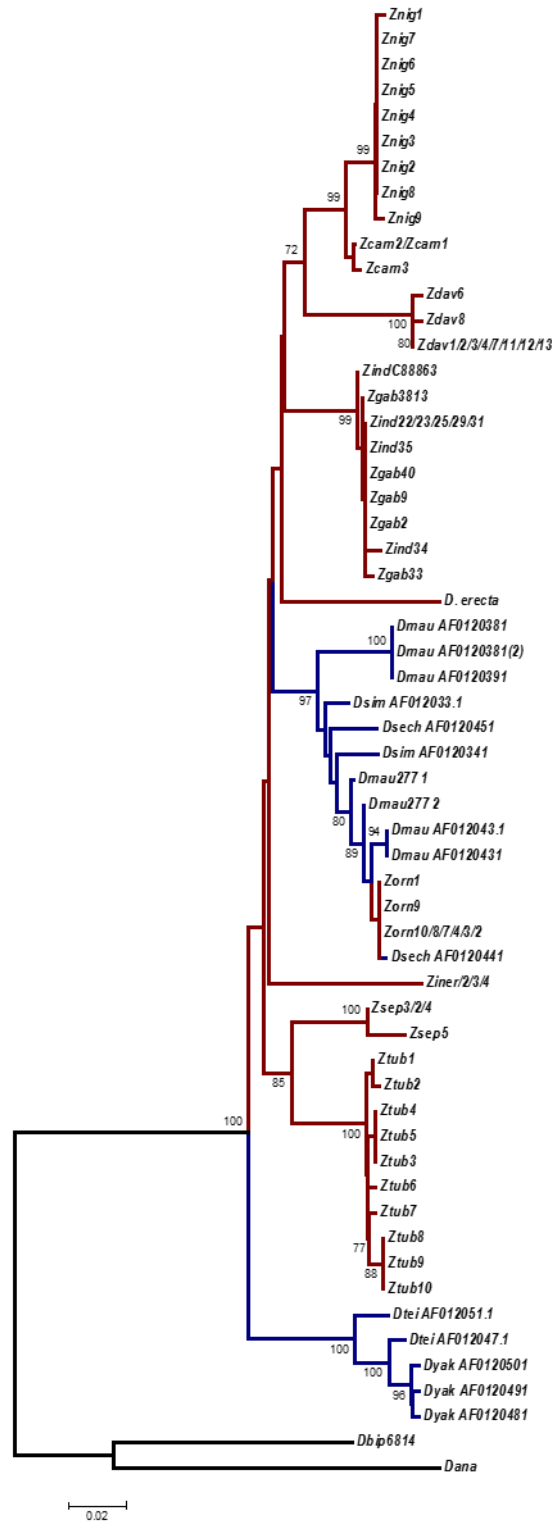
CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAATACCTGTCATAT
GGTAAATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTACGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA

CACTGGCTGCATGGCGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAGCTG
GAAGGAA

>Zorn2

CCGCTGCTCTACTCAGTATTTACTGCAGATCTTCCCTGTCCAAACGCCTATCATAT
GGTAGATCCCAGGAAGGCCCTACTTGCTCCGTACGCTGATGACATCGCACTGTTG
TACAGCTCTAATTGTCGCAACGAGGCAGCACGGGGTCTACAAGAGTACCTCACCA
CACTGGCTGCATGGTGCAAAGATGGAATTTAAAGGTCAATCCACAAAAGACCA
CCAATCCCTGCTTCACTTTGAAGACCTTAATTCCAATTACTGCACCCATAGAGCTG
GAAGGAA

Figura 1 do material suplementar. Árvore filogenética das sequências do elemento *Helena* em *Zaprionus* (vermelho) e no subgrupo *melanogaster* de *Drosophila* (azul), e *Drosophila* asiáticas (preto). A história evolutiva foi inferida pelo método ML, usando como modelo de substituição a Kimura 2-parâmetros. As análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA7.



TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 09/03/2017

Assinatura do autor