

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

“Maturação cuticular em *Apis mellifera*: perfis de hidrocarbonetos cuticulares, expressão e evolução de desaturases e elongases”

TIAGO FALCÓN LOPES

Ribeirão Preto, SP

2013

TIAGO FALCÓN LOPES

Maturação cuticular em *Apis mellifera*: perfis de hidrocarbonetos cuticulares, expressão e evolução de desaturases e elongases

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: GENÉTICA
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi

Ribeirão Preto, SP

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lopes, Tiago Falcón

Maturação cuticular em *Apis mellifera*: perfis de hidrocarbonetos cuticulares, expressão e evolução de desaturases e elongases. Ribeirão Preto, 2013.

119 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Bitondi, Márcia Maria Gentile.

1. *Apis mellifera*. 2. hidrocarbonetos cuticulares. 3. desaturases. 4. elongases. 5. maturação da cutícula.

Nome: Lopes, Tiago Falcón

Título: Maturação cuticular em *Apis mellifera*: perfis de hidrocarbonetos cuticulares, expressão e evolução de desaturases e elongases

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____
Instituição: _____
Parecer: _____
Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2013.

Agradecimentos

Primeiramente à Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi pela orientação, por ter possibilitado todas as condições necessárias para a realização do trabalho, pela condução séria das atividades e sempre estar aberta a novas ideias. Certamente ilustra e influencia diretamente o meu modelo de profissional a ser seguido.

À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, pelos bons conselhos e ensinamentos.

À Dra. Aline Aleixo, que me supervisionou durante esta atividade de estágio e juntamente com a Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões possibilitaram meu primeiro contato experimental com as abelhas.

Ao Prof. Dr. Fábio Santos Nascimento, que disponibilizou a estrutura de seu laboratório para a realização das análises de hidrocarbonetos cuticulares e colaborou diretamente com ideias e ensinamentos durante o andar do trabalho.

À Profa. Dra. Ivelize Tannure-Nascimento, Dr. Sidnei Mateus, Lucas Oliveira, Daniela, Danielle, Glauycia, Yara, Maria Cláudia, Maria Lúcia, Aline Andrade, Aline Borba, Lohan, Christoph, Francisca, Du Carmo, Carla, Túlio, Lucas (Salsas), João Paulo, Denise, Ayrton, Claudia Inês, Kátia, Elisa, Letícia, Léo, Maurício, Morgana, Patrícia, que sempre se demonstraram à disposição para ajudar.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e à técnica Izabel Cristina Casanova Turatti, que possibilitaram a realização da análise inicial de hidrocarbonetos cuticulares e auxílio com a técnica de derivatização de alcenos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Almeida, Eglelson Alencar e Daniel do Carmo por todo o auxílio nas análises filogenéticas.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (LBDA) Dra. Vera Figueiredo que nunca deixou faltar nada para as pesquisas; Marcela Laure, que me ensinou a dissecar o tegumento das abelhas; Luís Aguiar, Rogério Pereira e Jairo de Souza que me ensinaram um pouco do manejo das colônias e me auxiliaram durante a coleta; Roberto Mazzuco, pela manutenção da flora local, fundamental para as abelhas; e Pedro Prado pelo auxílio na informática.

À Dona Shirlei, pela organização do local de trabalho e carinho por todos os membros do LBDA.

À Dra. Maria Juliana Ferreira-Caliman, Dr. Moysés Elias-Neto, Dra. Michele Prioli Soares, Prof. Dr. Francis Moraes Franco Nunes, Msc. Claudinéia Pereira Costa,

Dra. Érica Tanaka, Dr. Rodrigo Pires Dallacqua, Dra. Juliana Ramos Martins e Daniel Guariz Pinheiro por colaborarem diretamente com o trabalho.

À Ana Durvalina, Lívia, Camila, Liliane, Flávia, Karina, Natália, Felipe, Omar, Igor, Ana Rita, Mauro, Paulinho, dispostos a ajudar e pelo bom convívio.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética, Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, sempre atuante.

Aos secretários do Departamento de Genética, Susie, Silvia, Ana Claudia e Gustavo pelos serviços indispensáveis para o bom andamento do curso.

À Juliana Galaschi, minha namorada, que contribuiu diretamente nas primeiras análises filogenéticas realizadas e acompanhou a realização deste trabalho.

À minha família (Nordeste e Sul), que me apoiou a todo instante.

Às instituições financiadoras de projetos de pesquisa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudo e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2010/16380-9 e Processo Temático 11/03171-5) pelos recursos ao LBDA.

RESUMO

Resumo

Lopes, T. F. **Maturação cuticular em *Apis mellifera*: perfis de hidrocarbonetos cuticulares, expressão e evolução de desaturases e elongases.** (2013). 119p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Os hidrocarbonetos cuticulares têm importante papel no processo de reconhecimento dos membros da colônia de insetos sociais. Muitos estudos têm mostrado variações qualitativas e quantitativas nestes compostos entre os insetos adultos. Contudo, abordagens referentes à modulação do perfil destes compostos durante a formação da cutícula são escassas, e se restringem aos estágios larval de holometábolos e de ninhas de hemimetábolos. O principal objetivo dessa pesquisa foi caracterizar o perfil de hidrocarbonetos cuticulares e a expressão de genes potencialmente relacionados à sua biossíntese durante o processo de formação e maturação da cutícula adulta. Os perfis de hidrocarbonetos foram caracterizados por meio de GC/MS e mostraram diferenças quantitativas marcantes que significativamente discriminaram as cutículas pupal, adulta-farata e adulta. Em paralelo, sequências de enzimas que catalisam a desaturação (desaturases) ou elongação (elongases) de lipídeos, disponíveis no banco de dados do NCBI, foram utilizadas para o desenho de *primers* e estudo da expressão gênica por meio de RT-qPCR. Cinco genes de desaturases, e oito genes de elongases mostraram variação de expressão estatisticamente significante no tegumento de abelhas adultas em comparação com pupas e adultas-faratas. Testes de correlação entre os perfis de expressão gênica e de hidrocarbonetos cuticulares evidenciaram os genes potencialmente envolvidos com a biossíntese destes compostos para a formação e maturação da cutícula. Estes resultados corroboram a hipótese de que nos insetos sociais, a cutícula só amadurece completamente por ocasião do início da atividade de forrageamento. Associando estes dados a análises de evolução molecular das desaturases e elongases, pudemos sugerir as etapas da via de síntese de hidrocarbonetos catalisadas por estas enzimas, e assim eleger genes candidatos a futuro silenciamento mediado por RNA de interferência para pesquisa de função.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, hidrocarbonetos cuticulares, desaturases, elongases, maturação da cutícula

ABSTRACT

Abstract

Lopes, T. F. **Cuticle maturation in *Apis mellifera*: cuticular hydrocarbons profiles, expression and evolution of desaturases and elongases.** (2013). 119p. Dissertation – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Cuticular hydrocarbons are important for recognition of nestmates in social insect colonies. Many studies have shown qualitative and quantitative variations in the cuticular hydrocarbons between adult insects. However, approaches on developmental profiles of these compounds during cuticle formation and differentiation are scarce, and restricted to larval stages of holometabolous and nymphs of hemimetabolous. The main objective of this work was to characterize the cuticular hydrocarbons profiles and the expression of genes potentially involved in the biosynthesis of these compounds during the synthesis and differentiation of the adult cuticle in the honeybee. The hydrocarbons profiles were characterized using GC/MS and showed remarkable quantitative differences, thus discriminating the pupal, pharate-adult and adult cuticles from each other. In parallel, we used annotated sequences of enzymes catalyzing lipid desaturation (desaturases) or elongation (elongases), available in NCBI data bank, for primers design and gene expression analysis using RT-qPCR. Five desaturase genes and eight elongase genes showed statistically significant expression changes in the integument of adult bees in comparison to pupae and pharate-adults. Correlation tests supported roles of some of the desaturase and elongase genes in hydrocarbons biosynthesis for incorporation into adult cuticle. In addition, these results go along with the hypothesis that in social insects the cuticle is just completed when the insect starts forager activity. Taken together, these data and an analysis on the molecular evolution of desaturases and elongases allowed suggesting the steps in the pathway of cuticular hydrocarbons biosynthesis that are catalyzed by these enzymes, and also allowed to elect candidate genes for further functional studies using gene silencing mediated by RNAi.

Keywords: *Apis mellifera*, cuticular hydrocarbons, desaturases, elongases, cuticle maturation

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação do transporte de hidrocarbonetos e seus metabólitos desde sua produção nos enóцитos até a superfície cuticular, corpo gorduroso, ovócitos e trato digestivo.....	6
Figura 2 – Esquema geral das camadas da cutícula dos insetos: mais externamente tem-se o envelope, seguindo-se a procutícula e a epiderme.	9
Figura 3 – Eventos da muda em <i>Apis mellifera</i>, com ênfase na muda metamórfica, relacionando a substituição da cutícula com a variação do título de hormônios ecdisteróides que coordena este processo e as fases do desenvolvimento.....	11
Figura 4 – Representação dos três boxes de histidina conservados de cada subfamília de desaturase (Sperling <i>et al</i>, 2003; Hashimoto <i>et al.</i>, 2008).....	15
Figura 5 – Representação dos domínios conservados das subfamílias de elongases (Hashimoto <i>et al.</i>, 2008).....	16
Figura 6 – Esquema geral da formação de hidrocarbonetos cuticulares baseado em Blum (1987); Blomquist <i>et al.</i> (2012); Howard e Blomquist (2005); Hashimoto (2008); Kolattukudy (1966, 1968a, 1968b).....	17
Figura 7 – Coleta do material biológico.....	23
Figura 8 – Cromatograma representativo das frações de extrato cuticular de abelhas forrageiras.....	48
Figura 9 – Análise canônica baseada nos compostos revelados por Análise de Componentes Principais em cada fase do desenvolvimento estudada.....	49
Figura 10 – Proporção dos grupos de hidrocarbonetos nas diferentes fases do desenvolvimento.....	50
Figura 11 – Teste dos <i>primers</i> desenhados para desaturases e elongases.....	51
Figura 12 - Posicionamento dos <i>primers</i> desenhados nos genes codificadores de desaturases (A.) e elongases (B.).....	53
Figura 13 – Análise da expressão gênica por RT-qPCR dos genes de desaturases.....	55
Figura 14 – Análise da expressão gênica por RT-qPCR dos genes de elongases..	56
Figura 15 - Árvore filogenética das desaturases de insetos.	61
Figura 16 - Árvore filogenética das elongases de insetos.	62
Figura 17 - Possível via de biossíntese dos hidrocarbonetos cuticulares em <i>A. mellifera</i>.	74

Lista de Tabelas

Tabela I– Genes codificadores de desaturases e elongases em <i>Apis mellifera</i>, primers utilizados, tamanho do <i>amplicon</i> e informação sobre a eficiência do primer.....	28
Tabela II– Elongases e desaturases utilizadas nas análises filogenéticas.....	32
Tabela III– Média e desvio padrão das proporções relativas de hidrocarbonetos cuticulares nas fases pupais (Pw e Pp), adultas-faratas (Pb, Pbm e Pbd) e adultas (Re e Fg) de operárias de <i>Apis mellifera</i>.	43
Tabela IV – Sequências validadas por sequenciamento e PCR <i>in silico</i> (-).....	51
Tabela V– Resultado do teste de correlação de Spearman R entre expressão de genes de desaturases e grupos de hidrocarbonetos.....	59
Tabela VI– Resultado do teste de correlação de Spearman R entre expressão de genes de elongases e grupos de hidrocarbonetos.....	59

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Aame - <i>Amblyomma americanum</i>	Dple - <i>Danaus plexippus</i>
Amac - <i>Amblyomma maculatum</i>	Dpul - <i>Daphnia pulex</i>
Amel - <i>Apis mellifera</i>	DTT - ditiotreitol
Bimp - <i>Bombus impatiens</i>	EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
Bmor - <i>Bombyx mori</i>	F - primer de sentido direto
Bter - <i>Bombus terrestris</i>	Fg - abelha adulta forrageira
°C - graus célsius	G - taxa de heterogeneidade gama entre os sítios
C - carbono	g - força centrífuga relativa
cAMP - monofosfato cíclico de adenosina	GC/MS - cromatografia a gás associada à espectrometria de massas
cAMP - monofosfato cíclico de adenosina	H - hidrogênio
cDNA - DNA complementar	HDLp - lipoforina de alta densidade
Cn - tamanho de cadeia de carbono com n átomos	Hsal - <i>Harpegnathos saltator</i>
Cn - tamanho de cadeia de carbono com n átomos	I - proporção de sítios invariáveis
CO ₂ - gás carbônico	-LnL - valor de log likelihood
CoA - coenzima A	Lp - lipoforina
Δ - posição de formação de uma insaturação por uma desaturase	μg - micrograma
DDC - dopa-descarboxilase	μl - microlitro
DEPC - dietilpirocarbonato	μm - micrometro
Dmel - <i>Drosophila melanogaster</i>	M - molar
DNA - ácido desoxirribonucleico	Mg ⁺² – íon de magnésio
dNTP - desoxirribonucleotídeo fosfatado	min – minuto (s)
dopa - 3,4-diidroxifenilalanina	ml - mililitro
DP - desvio padrão	mM - milimolar
	Mrot - <i>Megachile rotundata</i>
	Msex - <i>Manduca sexta</i>

n.i. - composto não identificado	PP2 - pré-pupa 2
N2 - nitrogênio molecular	PTTH - hormônio protoracicotrópico
NADA - N-acetildopamina	PUFA - elongase que tem como substrato ácidos graxos poliinsaturados
NADH - dinucleotídeo de adenina nicotinamida	R - primer de sentido reverso
NADPH - dinucleotídeo de adenina nicotinamida fosfato	Re - abelha adulta recém-emergida
NBAD - N-β-alanildopamina	RNA - ácido ribonucleico
nm - nanômetro	RT - transcrição reversa
nt - nucleotídeo	s - segundo
Nvit - <i>Nasonia vitripennis</i>	S/MUFA - elongase que tem como substrato ácidos graxos saturados ou monoinsaturados
O2 - oxigênio molecular	Tcas - <i>Tribolium castaneum</i>
oe- - sem enóцитos	TH - tirosina hidroxilase
pb - pares de bases	TR – tempo de retenção
Pb - adulta-farata de olho marrom	U - unidade
PBAN - neuropeptídio ativador da biossíntese de feromônios	UTR - região não traduzida
Pbl - adulta-farata de olho marrom claro	V - volts
Pbm - adulta-farata com pigmentação e esclerotização intermediárias	v/v - volume por volume
PCA - análise dos componentes principais	ω - tipo de ácido graxo com base na posição de uma insaturação
PCR - reação em cadeia pela polimerase	xMeCn - cadeia de carbono com n átomos e grupo metil ligado ao átomo de carbono terciário na posição x da cadeia
pH - potencial de hidrogênio	z - número de insaturações na cadeia de carbono
pmoles - pico mol	Z - posição da insaturação na cadeia de carbono
Pp - pupa em apólise	

Sumário

1. Introdução.....	2
1.1. A organização social da abelha <i>Apis mellifera</i>	2
1.2. Os hidrocarbonetos cuticulares dos insetos	2
1.3. Os hidrocarbonetos têm origem genética ou ambiental?	4
1.4. Síntese, transporte, armazenamento e local de ação dos hidrocarbonetos	5
1.4.1. Local de síntese.....	6
1.4.2. Transporte e Armazenamento	8
1.5. A maturação da cutícula adulta.....	9
1.6. Enzimas envolvidas na formação dos hidrocarbonetos.....	13
1.6.1. Desaturases e elongases: características e importância	13
1.6.2. A biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares	16
2. Objetivos	21
2.1. Objetivos Específicos	21
3. Material e métodos.....	23
3.1. Abelhas	23
3.2. Extração dos hidrocarbonetos	23
3.3. Identificação da posição das insaturações.....	24
3.4. Análise estatística do perfil de hidrocarbonetos.....	24
3.5. Extração do RNA total.....	26
3.6. Síntese da primeira fita de cDNA	27
3.7. Amplificação por RT-PCR semiquantitativa	27
3.8. Análise por eletroforese em agarose.....	29
3.9. Análise da expressão gênica por RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR)	30
3.10. Validação da amplificação específica dos produtos de PCR	30
3.11. Comparação dos perfis de quantificação dos hidrocarbonetos e de transcritos de desaturases e elongases	31
3.12. Análises de evolução molecular de desaturases e elongases	31
3.12.1. Obtenção das sequências e alinhamento	31
3.12.2. Teste de modelo de substituição de aminoácidos	39
3.12.3. Análise evolutiva das enzimas	39
4. Resultados.....	42
4.1. Perfis de Hidrocarbonetos	42
4.2. Teste dos primers e confirmação das sequências	51
4.3. Análise da expressão gênica por RT-qPCR e correlação com o perfil de	

hidrocarbonetos cuticulares	53
4.4. Análise evolutiva das desaturases e elongases de insetos.....	60
5. Discussão	64
5.1 O perfil de hidrocarbonetos cuticulares.....	64
5.2. Expressão gênica de desaturases e elongases e correlação com os perfis de hidrocarbonetos no contexto de formação e maturação da cutícula adulta	66
5.3. Evolução de desaturases e elongases em Hymenoptera.....	69
6. Conclusões.....	76
Referências Bibliográficas.....	78
Apêndice A.....	92
Apêndice B	107

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. A organização social da abelha *Apis mellifera*

A evolução da organização social dos Hymenoptera está associada à divisão da atividade reprodutiva entre rainhas altamente férteis e operárias estéreis ou funcionalmente estéreis (*quasi* estéreis) (Michener, 1974; Wilson, 1975). As castas de rainha e operárias de abelhas da espécie *Apis mellifera* são sistemas modelo para a compreensão da plasticidade no desenvolvimento (Wheeler, 1986), representando fenótipos alternativos que derivam da alimentação diferencial oferecida às larvas (Weaver, 1955).

Em uma colmeia de *A. mellifera* há normalmente uma rainha, algumas centenas de zangões e entre 10.000 e 30.000 operárias, quando em estação favorável. Os comportamentos das rainhas e zangões são limitados e exclusivamente relacionados à reprodução. Esses membros reprodutivos convivem com as operárias que desenvolvem diversas funções, entre elas, limpeza dos favos, processamento de pólen e néctar, alimentação das larvas, da rainha e dos zangões, aquecimento e resfriamento do ambiente interno da colônia, guarda da entrada da colônia e forrageamento para coleta de água, pólen e néctar. As operárias geralmente exercem estas diferentes atividades de modo sequencial, o que se convencionou chamar de polietismo temporal, ou seja, uma mudança de função por conta da idade cronológica (Seeley, 1982). As operárias jovens (nutrizes) alimentam constantemente as larvas e a rainha por meio da secreção de suas glândulas hipofaríngeas e mandibulares. As operárias mais velhas atuam na defesa da colônia e trabalham como forrageiras, além de participar do processo de fabricação de mel. Esta sequência de funções é flexível, variando de acordo com as condições da colônia, como demografia, tamanho, reserva de alimento e estação do ano (Winston, 2003).

1.2. Os hidrocarbonetos cuticulares dos insetos

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados somente por átomos de hidrogênio (H) e carbono (C). Podem ser separados em alifáticos (sem anel de benzeno) ou aromáticos (com anel de benzeno) (Solomons e Fryle, 2005). Os hidrocarbonetos cuticulares encontrados em insetos são classificados em três classes principais (Blomquist, 2010), todos alifáticos: n-alcanos, que são os compostos de cadeia simples; metil-alcanos, que são alcanos que apresentam um grupo metil como ramificação ligado a um carbono terciário (carbono que apresenta 3 das 4 ligações

possíveis com outros 3 átomos de carbono da cadeia e uma ligação com o hidrogênio); e os hidrocarbonetos insaturados, que apresentam ao menos uma dupla ligação entre átomos de carbono (Solomons e Fryle, 2005), dentre eles destacam-se os alcenos, com uma insaturação, e alcadienos, com duas insaturações. Aqui utilizamos os símbolos C_n (onde n é o número de carbonos da cadeia) para indicar o tamanho dos compostos, xMeC_n (onde x é o número do carbono terciário) para hidrocarbonetos ramificados e C_n:z (onde z é o número de duplas ligações presentes) para indicar compostos insaturados. A letra grega Δ serve para indicar a posição da insaturação na cadeia de hidrocarboneto, enquanto a letra ω indica a posição da insaturação em ácidos graxos. Grupos alquil, ou alquila, são radicais alcanos ligados a um outro composto. Os ésteres são compostos resultantes de uma reação envolvendo dois ácidos carboxílicos formando um composto R-CO-O-CO-R. No caso do hidroxialquil, há uma hidroxila ligada ao radical alquil (Solomons e Fryle, 2005)

Os hidrocarbonetos cuticulares de insetos têm como funções básicas a impermeabilização da cutícula contra a perda de água além de constituírem uma barreira contra a invasão do organismo contra patógenos (Gibbs, 2002).

Diferentes proporções de alcanos, com diferentes tamanhos de cadeia, e alcenos podem alterar a permeabilidade cuticular. Alcanos simples de cadeia maior que 30 carbonos (>C30) tornam a cutícula mais impermeável, enquanto alcenos em geral a tornam mais permeável, formando fases (sólida e liquefeita) sobre a cutícula (Ramsay, 1935; Gibbs, 2002). O acréscimo de um único radical metil, ou de uma insaturação, à cadeia de carbono colabora consideravelmente para a redução da temperatura de fusão do hidrocarboneto, formando uma camada menos densa (Gibbs e Pomonis, 1995), uma vez que esses compostos têm maior dificuldade de formar uma estrutura cristalina devido à geometria da molécula (Gibbs, 1998).

A resposta de proteção contra patógenos pode incluir alteração da biossíntese, ou das vias de transporte dos hidrocarbonetos cuticulares, especialmente de alcenos. Foi verificado que a estimulação do sistema imune de *A. mellifera* por lipossacarídeos de paredes celulares de bactérias gera diferenças na proporção geral dos hidrocarbonetos cuticulares, porém sem alterar sua composição. A resposta imunológica estimulada não produz um sinal específico para doença, mas serve para alertar, através da alteração do conjunto de hidrocarbonetos cuticulares, os membros saudáveis da colônia (Richard *et al.*, 2008).

A composição de hidrocarbonetos cuticulares varia entre as espécies, entre os

sexos e estágios de desenvolvimento dos insetos. Em geral, se apresentam em misturas complexas, de forma que a análise quantitativa e qualitativa depende da correta separação e identificação de todos os componentes (Lockey, 1991). Os perfis de hidrocarbonetos podem distinguir as operárias de *A. mellifera* que exercem diferentes atividades na colmeia (Kather *et al.*, 2011), podendo, então, refletir o polietismo etário (Lobo, 2009). A importância dos hidrocarbonetos para os insetos sociais já foi considerada em diversos trabalhos que abordaram o ataque por parasitas (Nation *et al.*, 1992), reconhecimento de membros da colônia (Singer, 1998; Tannure-Nascimento *et al.*, 2007, Nunes *et al.*, 2008; Martin e Drijhout, 2009), maturação sexual e controle do comportamento dos membros da colônia (Cuvilier-Hot *et al.*, 2002; D'Ettorre *et al.*, 2004; Martin e Drijhout, 2009) e polietismo etário (Ferreira-Caliman *et al.*, 2010; Kather *et al.*, 2011). Sendo assim, estes compostos são a base do reconhecimento químico entre insetos sociais (van Zweden e d'Ettorre, 2010).

As abelhas são capazes de diferenciar os hidrocarbonetos cuticulares de acordo com a natureza dos compostos, reconhecendo alkanos e alcenos, sendo estes últimos geralmente de mais fácil percepção. Os compostos mal percebidos parecem exercer pouca, ou nenhuma função na comunicação química, sendo geralmente representados pelos alkanos. Estes se diferenciam pelo tamanho da cadeia, enquanto os alcenos podem ser caracterizados pela angulação da dupla ligação, pelo comprimento da cadeia curta entre um término e a dupla ligação, comprimento da cadeia longa entre o outro término e a dupla ligação e pela posição desta insaturação (Châline *et al.*, 2005). Os alcenos com cadeias menores que 29 carbonos, são compostos candidatos a estarem relacionados ao reconhecimento, entretanto compostos estruturalmente similares não são sempre bem discriminados (Châline *et al.*, 2005).

1.3. Os hidrocarbonetos têm origem genética ou ambiental?

Os hidrocarbonetos apresentam grande diversidade, afetam vários aspectos da colônia e a fisiologia das abelhas servindo inclusive como indicadores do *status* fisiológico. Mas qual é a origem desses compostos?

Analisando-se abelhas que não tiveram contato com a colmeia, foi verificado que a composição de hidrocarbonetos é de origem genética e que são sintetizados pelas próprias abelhas. Na ausência de indicadores ambientais, a abelha distingue os membros do grupo dos que não são do grupo. A base genética para essas pistas cria a possibilidade de, dentro da colônia, as abelhas fazerem distinção entre subgrupos da

população (Breed, 1983).

Breed *et al.* (1985) reuniram favos contendo pupas de operárias de *A. mellifera* de colônias diferentes, obtendo operárias “irmãs” na eclosão. Quando uma operária de uma das colônias originais foi introduzida na colônia mista observou-se que as suas irmãs genéticas interagiam positivamente de forma mais constante que as sem parentesco genético. Mas dentro da colônia mista, as operárias imãs na eclosão também interagiam como se fossem da mesma colônia. Assim, o odor de causa genética é mantido mesmo em um ambiente diferente, porém o odor de origem ambiental também é importante para as interações na colônia.

Recentemente, Martin *et al.* (2012) verificaram que, na formiga *Formica exsecta*, o perfil de hidrocarbonetos resulta de componentes genéticos e ambientais (variação na temperatura e no alimento disponível, principalmente) atuando de forma independente nos processos bioquímicos de síntese destes compostos. Os componentes ambientais alteram a composição de hidrocarbonetos cuticulares a curto prazo, mas não contribuem para a manutenção da diversidade entre colônias, sendo este fenômeno uma resultante dos componentes genéticos que mantêm a diversidade de perfis de hidrocarbonetos entre as colônias a longo prazo. Em outro trabalho com formigas, Holman *et al.* (2013) observaram que o componente genético é importante para a honestidade dos sinais químicos. Este fato também é corroborado por dados obtidos de colônias com múltiplas mães ou pais, que apresentaram maior diversidade de compostos (Chernenko *et al.*, 2012).

1.4. Síntese, transporte, armazenamento e local de ação dos hidrocarbonetos

Três importantes processos estão relacionados aos perfis de hidrocarbonetos: sua síntese, seu transporte do local onde foram produzidos aos locais de armazenamento e ação e sua deposição tecido-específica. A biossíntese de hidrocarbonetos ocorre nos enócitos (Piek, 1964; Diehl, 1973; Fan *et al.*, 2003; Schal *et al.*, 1998) de insetos. Além dos enócitos, os hidrocarbonetos também foram detectados na epiderme, hemolinfa, no corpo gorduroso e nas gônadas. Os insetos que apresentam enócitos na hemocele claramente transportam os hidrocarbonetos através da hemolinfa para a cutícula, enquanto nos insetos em que os enócitos estão associados ao tegumento (epiderme e cutícula), a hemolinfa pode não ser necessária para o transporte, que passaria a ser realizado através das células epidérmicas e, em

seguida, dos canais-poros até atingir a camada mais externa da cutícula, o envelope. Entretanto, grandes quantidades de hidrocarbonetos são encontradas na hemolinfa de todos os insetos, sugerindo que um transporte interno e indireto deve ser comum (Schal *et al.*, 1998). Um esquema geral ilustrando o direcionamento dos hidrocarbonetos pode ser observado na Figura 1.

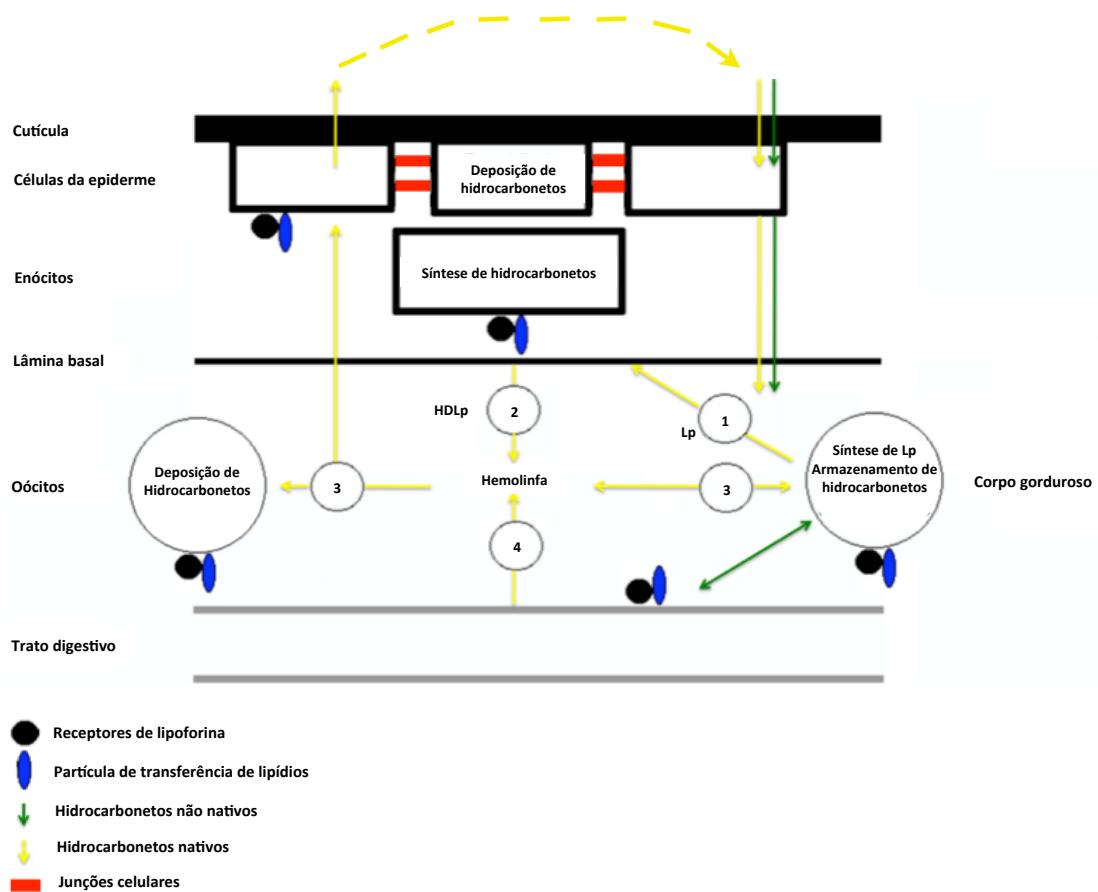


Figura 1 – Representação do transporte de hidrocarbonetos e seus metabólitos desde sua produção nos enóцитos até a superfície cuticular, corpo gorduroso, ovócitos e trato digestivo. As setas amarelas indicam as direções dos deslocamentos da lipoproteína lipoforina (Lp) e dos hidrocarbonetos. A lipoforina de alta densidade (HDLp) é sintetizada no corpo gorduroso (1) e carrega os hidrocarbonetos sintetizados nos enóцитos através da hemolinfa (2), que libera os hidrocarbonetos para atravessar a epiderme, encaminha hidrocarbonetos para os ovócitos e para o corpo gorduroso (3). Hidrocarbonetos do meio externo também podem ser adquiridos através do trato digestivo (4). Os hidrocarbonetos não nativos podem entrar através da cutícula, ou trato digestivo, e podem ser removidos pelo metabolismo do corpo gorduroso assim como do trato digestivo. Não se sabe se HDLp penetra nos tecidos alvos e como os hidrocarbonetos atravessam a cutícula (adaptado de Schal *et al.*, 2003).

1.4.1. Local de síntese

O estudo de Young e Schal (1997), usando como modelo a barata *Blattella germanica*, sugere que os hidrocarbonetos sintetizados em qualquer estágio de desenvolvimento são usados primariamente no estágio seguinte e estão associados ao

desenvolvimento da cutícula imaginal. Segundo esses autores, no período entre as mudas os hidrocarbonetos cuticulares não sofrem grandes alterações quantitativas, porém sua produção é mantida e são armazenados internamente para utilização durante a fase adulta.

Um bom exemplo para mostrar a importância dos enócitos na síntese de hidrocarbonetos reside no experimento de Billeter *et al.* (2009), onde a ablação destas células em *Drosophila melanogaster*, resultou em moscas oe-, as quais tiveram a identidade sexual e a barreira interespecífica de hidrocarbonetos afetadas. Os autores observaram machos normais cortejando machos oe- e fêmeas oe- sendo cortejadas por machos de outras espécies como *D. simulans*, *D. yakuba* e *D. erecta*.

Os enócitos de *A. mellifera* são esféricos (25 µm de diâmetro) ou ovóides com um grande núcleo (12 µm de diâmetro) de membrana sinuosa, numerosos nucléolos (2 µm de diâmetro) e um nucleoplasma claro. O citoplasma é principalmente ocupado por mitocôndrias em forma de pequenas barras e retículo endoplasmático liso muito desenvolvido. Também apresentam ribossomos, pequenas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e corpos densos. A membrana plasmática está associada com uma lâmina basal relativamente densa (0,22 - 0,25 µm) (Cassier e Lensky, 1995). Nos enócitos das operárias de *A. mellifera* recém-emergidas o retículo endoplasmático liso é quase imperceptível quando comparado ao dos enócitos das operárias nutridoras e forrageiras. No quarto dia após a emergência da abelha, o volume desta organela é grande, reduzindo um pouco ao final do período secretor no 18º dia, mas ainda apresentando-se mais volumosa que nas recém-emergidas (Hepburn *et al.*, 1991). O volume destas células também diminui ao final do período secretor, simultaneamente ao aparecimento de lisossomos e vacúolos autolíticos (Hepburn *et al.*, 1991; Ruvolo e Cruz-Landim, 1993).

Nas operárias e rainhas adultas, os enócitos se localizam entre as células parietais (associadas ao tegumento) do corpo gorduroso, exceto nas rainhas recém-emergidas, onde se localizam entre as células periviscerais do corpo gorduroso. Com a maturação da rainha, estas células são frequentemente encontradas nos esternitos da área medial do gáster. Em rainhas recém-emergidas são encontradas duas populações de enócitos diferenciadas por sua localização e tamanho das células. Os menores enócitos são parietais e encontrados em pequenos grupos imersos no corpo gorduroso. Os maiores se apresentam como células isoladas dispostas randomicamente no corpo gorduroso perivisceral. Em rainhas mais velhas apenas uma população de enócitos foi

observada no corpo gorduroso parietal localizado mais ventralmente, o que pode ser explicado por uma necessidade de envio de hidrocarbonetos através da hemolinfa para os ovários e glândulas (Ruvolo e Cruz-Landim, 1993).

Em operárias, estas células também estão presentes nos esternitos onde as glândulas de cera se desenvolvem. Na cabeça das operárias, os enócitos foram localizados em pequenos grupos logo abaixo da epiderme da mandíbula, e aparecem, em número bem menor (variando de nenhum a 12) se comparado com o abdômen. Esses enócitos são maiores que os do abdômen, com uma relação entre o volume celular e o volume nuclear maior que os do abdômen (Ruvolo e Cruz-Landim, 1993).

Contrariamente ao que ocorre nas células da epiderme, os hidrocarbonetos presentes nos enócitos estão mais relacionados com a produção de cera. As mudanças sub-celulares dos enócitos coincidem com o ciclo etário de produção de cera pelas abelhas operárias (Hepburn *et al.*, 1991).

1.4.2. Transporte e Armazenamento

Em insetos, o problema de transportar lipídios é resolvido pela produção de um tipo de lipoproteínas, as lipoforinas, menos diversas, porém mais versáteis e eficientes que as análogas de outros animais. Cada lipoforina é composta por uma matriz básica, que contém duas apolipoproteínas (proteínas que se ligam a lipídios), as apolipoforinas I e II (originadas pro clivagem pós-traducional) (Weers *et al.*, 1993) e um complemento formado principalmente por lipídios polares (revisado em Shapiro, 1988), aos quais uma apolipoproteína de baixa densidade (apolipoforina III) associada a lipídios podem ser adicionados (Ryan e Van der Horst, 2000). A lipoforina transporta a gordura digerida para os tecidos (para a construção de membrana celular), para o músculo (para ser usada como fonte de energia), e para os locais de armazenamento, ou a partir destes para outras partes do corpo (revisado em Shapiro, 1988). Esta proteína transporta vários tipos de lipídios, incluindo diacilglicerol e colesterol, hidrocarbonetos (n-alcanos e alcanos ramificados, variando de C25 a C38) e provavelmente carotenoides (Chino e Kitazawa, 1981; Chino *et al.*, 1981), além de compostos xenobióticos hidrofóbicos (Shapiro, 1988) e hormônio juvenil (Sevala *et al.*, 1997) dos locais de armazenamento, absorção, ou síntese, para os locais onde são utilizados como combustível metabólico, precursores de triacilglicerol, para a síntese de fosfolipídios, ou como componentes estruturais da membrana celular e cutícula (Chino e Kitazawa, 1981; Chino *et al.*, 1981). Em *A. mellifera* existem evidências de

que as células de cera e células da glândula de Dufour, ambas modificadas a partir de células da epiderme, podem obter hidrocarbonetos a partir da hemolinfa (Katzav-Gozansky *et al.*, 2000).

A maior parte dos hidrocarbonetos internos de fêmeas adultas de *B. germanica* se encontra nos ovócitos, sugerindo uma importante função da lipoforina no abastecimento de hidrocarbonetos destes órgãos, que não são capazes de sintetizá-los. Quando os hidrocarbonetos não são diretamente transportados para os ovários, são depositados na superfície da cutícula, mas sua quantidade é reduzida neste local quando ocorre o direcionamento para os ovários. Aumentando-se a quantidade de hidrocarbonetos no meio também aumenta a proporção de moléculas de lipoforina na hemolinfa, que são posteriormente sequestradas pelos ovócitos juntamente com os hidrocarbonetos (Fan *et al.*, 2002).

1.5. A maturação da cutícula adulta

O tegumento dos insetos é formado pela cutícula e epiderme (Figuras 2; Figura 3A-E), fisiologicamente integradas, servindo de meio de interação com o ambiente, local para inserção de músculos assim viabilizando o movimento e locomoção, e barreira para proteção contra a agressão de predadores, parasitas e patógenos (Hepburn, 1985).

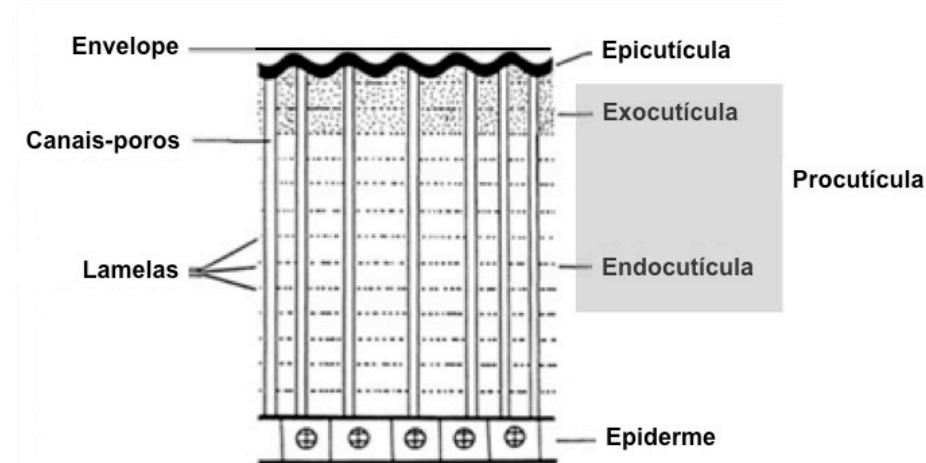


Figura 2 – Esquema geral das camadas da cutícula dos insetos: mais externamente tem-se o envelope, seguindo-se a procutícula e a epiderme. A procutícula é dividida em exocutícula e endocutícula, sendo esta organizada em estrutura lamelar. Canais-poros conectam as células epidérmicas à epicutícula. Esquema adaptado de Locke (1961) e baseado em Wigglesworth (1970) e Locke (2001). Associados à epiderme do tegumento, encontram-se os enócitos responsáveis pela síntese dos hidrocarbonetos cuticulares (não mostrados).

A cutícula é uma matriz extracelular produzida pela epiderme e também pelo epitélio do sistema de traqueias e das porções proximal e distal do intestino. A cutícula que reveste a larva de primeiro instar é produzida ainda durante a embriogênese e é renovada em cada episódio de muda. Estruturalmente é composta por três camadas: o envelope, mais externo, tem de 10 a 30 nm de espessura e é recoberto por depósitos de lipídios (Locke, 2001). Esta camada era denominada cuticulina (Locke, 1961); logo abaixo do envelope está a epicutícula (Locke, 2001), composta de proteínas e quinonas (compostos orgânicos resultantes da reação de grupos aromáticos substituindo a dupla ligação entre átomos de carbono por uma dupla ligação com átomos de oxigênio) e que permite a passagem de lipídios para o envelope (Locke e Krishnan, 1971) através de canais-poros (Locke, 1961); a camada mais interna é chamada de procutícula, mais espessa e composta por uma mistura complexa de moléculas, as principais são a quitina (polissacárido constituído de um homopolímero de N-acetilglicosamina interagindo em ligações β 1→4) e proteínas diversas (Locke, 2001).

Quando a epiderme do abdômen do inseto adulto está completamente desenvolvida e a epicutícula está sendo depositada, os enócitos estão com seu tamanho máximo e apresentam numerosas gotículas de secreção, liberando lipídios e proteínas. O produto lipídico que recobre a epicutícula sofre reação na presença de tetróxido de ósmio, indicando a liberação de lipídios insaturados (Wigglesworth, 1970).

O crescimento dos insetos é restrinido pela cutícula rígida, mas este problema foi resolvido pela ocorrência de mudas periódicas (Smith e Rybczynski, 2012). No caso das mudas larvais dos holometábolos, e ninfais dos hemimetábolos, um pico de ecdisteróides induz cada episódio de muda (Figura 3F). A ação sinérgica do hormônio juvenil nestes momentos garante a sucessão dos instares larvais ou dos estágios de ninfa (revisado em Smith e Rybczynski, 2012).

A muda metamórfica que transforma a larva do holometábolo em pupa, e a ninfa do hemimetábolo em adulto (Figura 3 F-H), implica em grandes alterações estruturais no organismo (Smith e Rybczynski, 2012). Para que estas mudas ocorram, é necessário que o nível de hormônio juvenil circulante baixe, fazendo com que seja liberado no cérebro o hormônio protoracicotrópico (*Prothoracicotropic Hormone*,

PTTH). A presença de PTTH nas glândulas protorácticas ocasiona liberação de ecdisteróides (Riddiford, 1976).

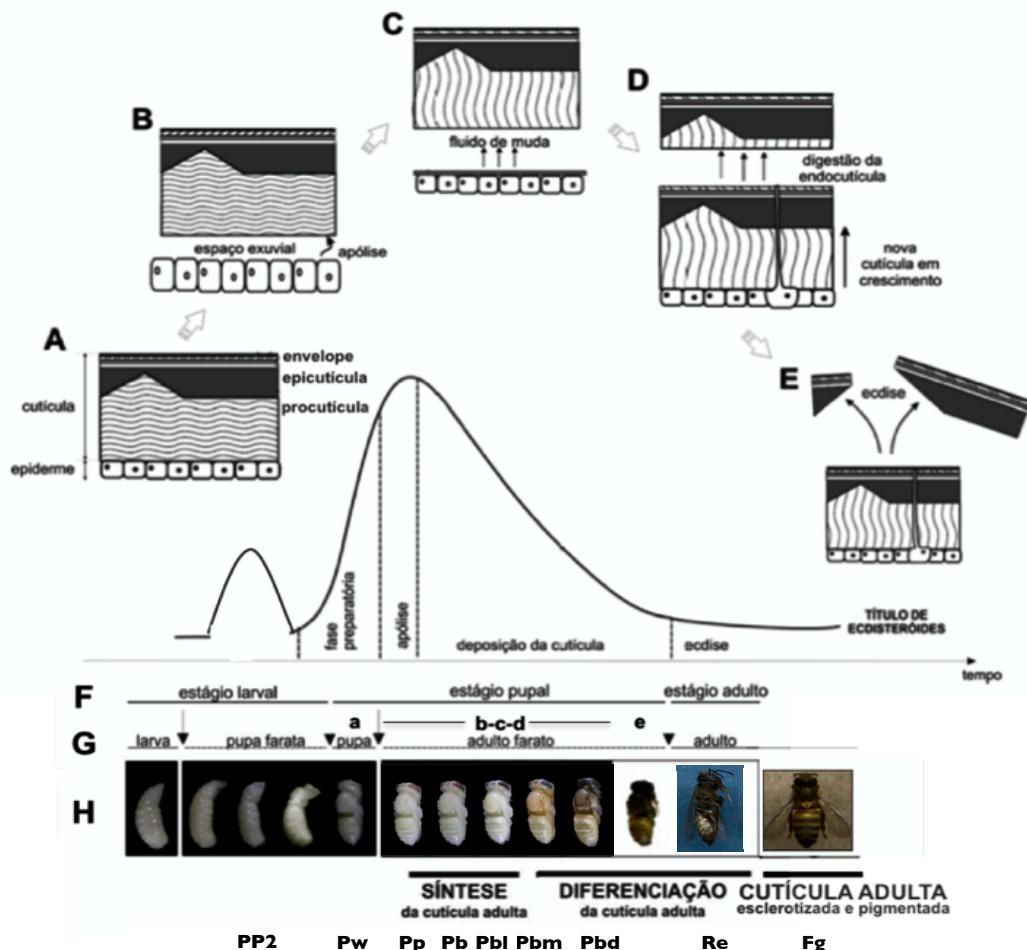


Figura 3 – Eventos da muda em *A. mellifera*, com ênfase na muda metamórfica, relacionando a substituição da cutícula com a variação do título de hormônios ecdisteróides que coordena este processo e as fases do desenvolvimento. A: Estrutura do tegumento antes do início da muda, indicando ainda as camadas da cutícula. B: Ocorrência da apólise, onde pode ser observado o espaço exuvial. A apólise é induzida pelo aumento do título de ecdisteróides. C: O espaço exuvial é preenchido pelo fluido de muda secretado pela epiderme. D: A cutícula velha é parcialmente reabsorvida e enfraquecida, enquanto a nova cutícula é formada. Nesse momento o título de ecdisteróides está diminuindo na hemolinfa. E: Momento da ecdisse, quando a cutícula precedente é eliminada e o título de ecdisteróides circulantes é praticamente basal. F: Título de ecdisteróides e delimitação dos estágios do desenvolvimento de *A. mellifera* (larval, pupal e adulto). G: Fases do desenvolvimento separadas por setas e pontas de setas iniciando episódios de apólise e ecdisse, respectivamente. As letras a-b-c-d-e representam as fases onde estão ocorrendo as etapas da muda A-B-C-D-E, esquematizadas na parte superior da figura. H: Imagens das fases do desenvolvimento de *A. mellifera*. PP2 (pré-pupa 2), Pw (pupa de olho branco, pós ecdisse), Pp (pupa de olho rosa, em apólise), Pb (adulta-farata de olho marrom e cutícula ainda não pigmentada), Pbl (adulta-farata de olho marrom-claro e cutícula em início de pigmentação), Pbm (adulta-farata de olho marrom, com pigmentação cuticular e grau de esclerotização intermediaria), Pbd (adulta-farata de olho marrom, com pigmentação e esclerotização cuticulares avançadas), Re (abelha adulta recém emergida) e Fg (abelha forrageira). As fases de desenvolvimento Pw, Pp, Pb, Pdm, Pbd, Re e Fg foram utilizadas neste trabalho (a figura foi adaptada de Riddiford, 1985; Klowden, 2007; Elias-Neto *et al.*, 2009; Soares, 2012).

O título elevado deste hormônio induz a apólise, ou seja, a cutícula precedente

se desprende da epiderme (Locke e Huie, 1979) formando entre elas o espaço exuvial que é preenchido pelo fluido de muda. Enzimas presentes neste fluido digerem parcialmente a cutícula precedente, enfraquecendo o restante da estrutura cuticular, tornando-a mais susceptível à fragmentação mecânica no momento da ecdise (Kramer *et al.*, 1985). No fluido de muda, a enzima quitinase hidrolisa as ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ entre as moléculas de *N*-acetilglicosamina do homopolissacarídeo quitina, enquanto uma nova cutícula é sintetizada e depositada sobre a epiderme. Esta nova cutícula tem baixa concentração de quitina (revisado em Kramer e Muthukrishnan, 2005), mas não é degradada pelo fluido de muda devido à proteção exercida pelo envelope (Locke, 2001) e/ou pela ação da proteína Knickkopf sintetizada por tecidos de origem epidérmica (Chaudhari *et al.*, 2011).

A progressiva maturação da cutícula, após sua síntese, está associada a processos de esclerotização e melanização (Figura 3H) (Locke, 2001). Durante a esclerotização, período em que a cutícula é estabilizada pela deposição de compostos fenólicos, o aminoácido tirosina é inicialmente hidroxilado formando 3,4-diidroxifenilalanina (dopa) (Andersen, 2010). Esta reação é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), codificada pelo gene *pale*, assim denominado em *D. melanogaster*. Sequencialmente, a enzima dopa-descarboxilase (DDC) converte dopa (True *et al.*, 1999) em dopamina, que serve de molécula precursora de melanina na via de pigmentação, ou pode ser *N*-acetilada pela enzima dopamina *N*-acetiltransferase formando *N*-acetildopamina (NADA) e *N*- β -alanildopamina (NBAD). NADA e NBAD são catecósis da via de esclerotização e são então transportados das células epidérmicas para a matriz cuticular sendo oxidados nas correspondentes orto-quinonas, que podem reagir com grupos nucleofílicos de proteínas. As orto-quinonas podem ser convertidas em para-quinona-metides que também reagem com grupos nucleofílicos de proteínas. Especificamente, a molécula NADA-para-quinona-metide pode ser enzimaticamente modificada para reagir com dois grupos nucleofílicos, assim originando um *crosslink*. Estes processos levam ao enrijecimento da cutícula (Andersen, 2010). O passo da oxidação em orto-quinonas é realizado pela ação da enzima lacase 2 (Arakane *et al.*, 2009; Andersen, 2010).

O decaimento do título de ecdisteróides, em seguida ao pico que induz a apólise da cutícula pupal, desencadeia uma cascata de regulação hormonal que leva à liberação de bursicon pelo sistema nervoso central (Davis *et al.*, 2007; revisado em Song, 2012). O bursicon é um neuro-hormônio que tem a capacidade de induzir a

maturação cuticular (Luo *et al.*, 2005; Bai e Pali, 2010) e a expansão das asas dos insetos (Bai e Pali, 2010). A liberação do bursicon na hemolinfa é controlada pelo neuro-hormônio CCAP (*crustacean cardioactive peptide*). O bursicon age via receptor acoplado a proteína G, com consequente aumento de cAMP (monofosfato cíclico de adenosina) e ativação da enzima TH via fosforilação. Ocorre então o aumento dos níveis de dopa que é convertida em dopamina (Davis *et al.*, 2007), a molécula precursora da síntese de melanina e de agentes esclerotizantes. Assim, a cutícula torna-se escura e enrijecida.

Trabalhos recentes mostraram que a enzima lacase 2 também é importante para a diferenciação cuticular em *A. mellifera* (Elias-Neto *et al.*, 2010). A expressão do gene codificador desta enzima, *Amlac2*, assim como dos genes codificadores de proteínas cuticulares estruturais da família Tweedle (*AmelTwdl1* e *AmelTwdl2*) e do gene *Ampxd*, que codifica uma peroxidase cuticular, é regulada pelo título de ecdisteróides (Soares *et al.*, 2011). Os recentes projetos de sequenciamento de genomas de diversas espécies de insetos contribuíram significativamente para a identificação e caracterização de genes codificadores de proteínas estruturais da cutícula (Willis *et al.*, 2005; Willis, 2010). Entretanto pouco se sabe sobre os hidrocarbonetos e as enzimas envolvidas em sua biossíntese durante o processo de maturação cuticular, embora estes compostos sejam de fundamental importância para a formação da superfície da cutícula durante os sucessivos eventos de muda (Schal *et al.*, 1998).

1.6. Enzimas envolvidas na formação dos hidrocarbonetos

1.6.1. Desaturases e elongases: características e importância

Os hidrocarbonetos cuticulares em geral são sintetizados por elongação e descarboxilação de ácidos graxos. Os alcenos particularmente são formados a partir de compostos que sofreram insaturação nas posições Z-8, Z-9 e Z-10 (Blomquist *et al.*, 1980a). Ao fim do processo é necessário que haja descarboxilação da molécula de ácido graxo, para que deixe de ser um ácido orgânico e se transforme em um hidrocarboneto (Kolattukudy, 1968a). Para o processo, também são necessários NADH e/ou NADPH, sendo esta última molécula mais eficiente na produção dos hidrocarbonetos (Wang *et al.*, 1982; Vaz *et al.*, 1988), assim como malonil-CoA (Vaz *et al.*, 1988). Pouco se sabe sobre as descarboxilases, mas as elongases e desaturases têm sido estudadas em relação ao processo de biossíntese de hidrocarbonetos

(Gleason *et al.*, 2009).

As estruturas dos ácidos graxos são, em geral, determinadas pela atividade destes dois tipos de enzimas: as desaturases e as elongases (Hashimoto *et al.*, 2008), ambas catalisam reações em ácidos orgânicos associados à coenzima A (acil-CoA) (Howard e Blomquist, 2005).

Hashimoto *et al.* (2008) analisaram o genoma de 56 organismos eucariontes e obtiveram 275 homólogos de desaturases e 265 homólogos de elongases. Após análise filogenética, as desaturases e elongases foram organizadas em quatro e duas subfamílias, respectivamente.

As desaturases de ácidos graxos integrantes de membrana são as principais enzimas catalisadoras de insaturação e são encontradas em todos os eucariontes e bactérias. Suas sequências são caracterizadas por três domínios conservados com oito resíduos de histidina (Shanklin *et al.*, 1994) (Figura 4). Esses resíduos se localizam na porção citoplasmática da enzima associada ao retículo endoplasmático (Sperling *et al.*, 2003). As desaturases de ácidos graxos catalisam a introdução de uma dupla ligação em uma cadeia acil em região de estereoquímica específica (Sperling *et al.*, 2003), promovendo uma desidrogenação em posição *cis* (Shanklin *et al.*, 2009).

A árvore filogenética das desaturases compreende quatro grandes ramos, cada um formado por enzimas que compartilham a mesma função e que apresentam diferenças na composição de aminoácidos em três regiões conservadas (Figura 4). As subfamílias são: Primeira Desaturase, que introduz a primeira insaturação na cadeia acil saturada; Omega Desaturase, que introduz uma insaturação entre uma insaturação existente e a terminação acil da cadeia; Desaturase de Começo e Fim, que introduz a insaturação entre uma insaturação existente e o terminal carboxila; Esfingolipídio Desaturase: esfingolipídio $\Delta 4$ desaturases. Todas as subfamílias estão representadas em animais, fungos, plantas e protistas, indicando que divergiram antes da separação dos grupos no curso da evolução (Hashimoto *et al.*, 2008).

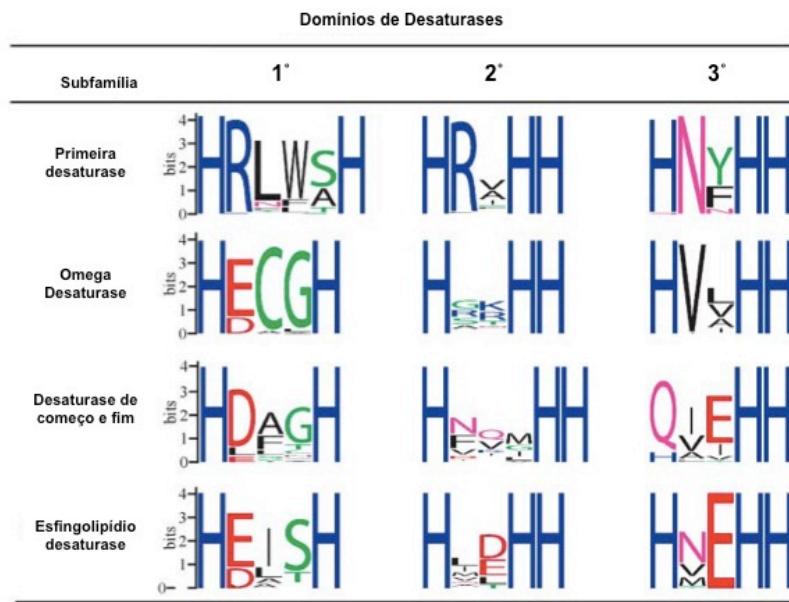


Figura 4 – Representação dos três boxes de histidina conservados de cada subfamília de desaturase (Sperling et al., 2003; Hashimoto et al., 2008).

Os principais membros da subfamília Primeira Desaturase são desaturases estearil-coA (SCDs), que geralmente introduzem a dupla ligação na posição Δ9 do ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0). A subfamília Omega Desaturase compreende 13 desaturases conhecidas e cujas funções consistem em formar insaturações nas posições 12 ou 15 (Δ12 ou Δ15 desaturases), entre uma dupla ligação já existente e o grupo acil do ácido graxo. A subfamília Desaturase de Começo e Fim tem como função formar uma segunda dupla ligação, assim como as Omega Desaturases, porém as insaturações ocorrem nas posições Δ4, Δ5 e Δ6. Apresentam ainda a função dupla de Δ6, Δ8 esfingolipídio desaturases. A partir de análise filogenética observou-se que as funções das subfamílias Omega Desaturase e Desaturase de Começo e Fim divergiram independentemente entre os organismos. A subfamília Esfingolipídio Desaturase tem a função catalisar a insaturação no carbono 4 de esfingolipídios (Δ4 esfingolipídio desaturase) (Hashimoto et al., 2008).

Em insetos, são encontradas desaturases que atuam nas posições Δ5, Δ6, Δ9, Δ12, Δ15 da cadeia de ácido graxo nascente (Cook e McMaster, 2002). Serra et al. (2007), trabalhando com a mariposa *Thaumetopoea pityocampa*, utilizaram primers degenerados comuns a todos os genes codificadores de desaturases de insetos até então conhecidos; isolaram uma única sequência de cDNA, comum a todas as desaturases deste inseto, mostrando que esses genes podem apresentar regiões muito conservadas.

As elongases se dividem em dois ramos: Elongase S/MUFA e Elongase PUFA. As elongases S/MUFA alongam ácidos graxos saturados ou com apenas uma insaturação, enquanto as elongases PUFA alongam ácidos graxos poliinsaturados e são específicas de animais (Hashimoto *et al.*, 2008).

A análise filogenética e dos motivos (Figuras 4 e 5) indicam que as desaturases e elongases consistem em subfamílias distintas nas quais as sequências e funções são diferentes, sendo assim possível determinar o conjunto de subfamílias em um organismo a partir das sequências genômicas. Variações nas vias bioquímicas devido à diversidade de desaturases e elongases levam a considerável variedade de ácidos graxos nos organismos (Hashimoto *et al.*, 2008).

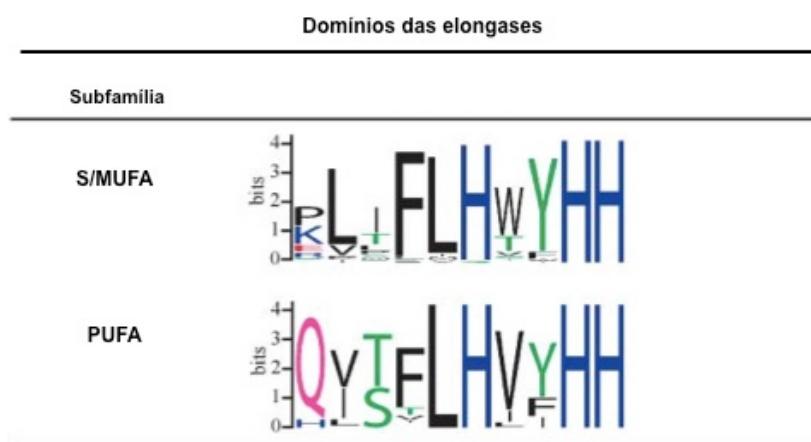


Figura 5 – Representação dos domínios conservados das subfamílias de elongases (Hashimoto *et al.*, 2008).

1.6.2. A biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares

A elongação e a descarboxilação possibilitam a formação de hidrocarbonetos insaturados e saturados (Kolattukudy, 1968a). Durante a elongação, grupos acetato são adicionados à molécula nascente (Kolattukudy, 1968a, 1968b; Blum, 1987; Katzav-Gozansky *et al.*, 1997). A descarboxilação ocorre depois da molécula ser elongada, primeiro originando um aldeído através da ação de uma acil-CoA redutase e depois os diferentes hidrocarbonetos a partir de um processo de descarbonilação (Cheesbrough e Kolattukudy, 1984) realizado por enzima da família citocromo P450 em presença de O₂ e NADPH e liberando CO₂ (Reed *et al.*, 1994, 1995). Em *Musca domestica*, a síntese de hidrocarbonetos ocorre a partir dos aminoácidos valina, isoleucina e/ou metionina que são então convertidos em propionil-CoA, que será usado para formar acetil-CoA, fundamental para a elongação da cadeia, e

metilmalonil-CoA, que serve para formar compostos ramificados. Em *Blatella germanica* são usados os aminoácidos valina, isoleucina, metionina e o ácido succínico (revisado em Blomquist *et al.*, 2012). O processo de desaturação ocorre após a elongação inicial (Legendre *et al.*, 2008). Já os metil-alcanos se originam a partir de propionato (Dillwith *et al.*, 1981). Um modelo esquemático da formação de hidrocarbonetos pode ser observado na Figura 6. Ácidos de tamanho de cadeia de C10, C12, C14 e C16 também podem ser utilizados para a formação dos hidrocarbonetos. Os ácidos graxos de cadeia longa são mais eficientes neste processo (Kolattukudy, 1966).

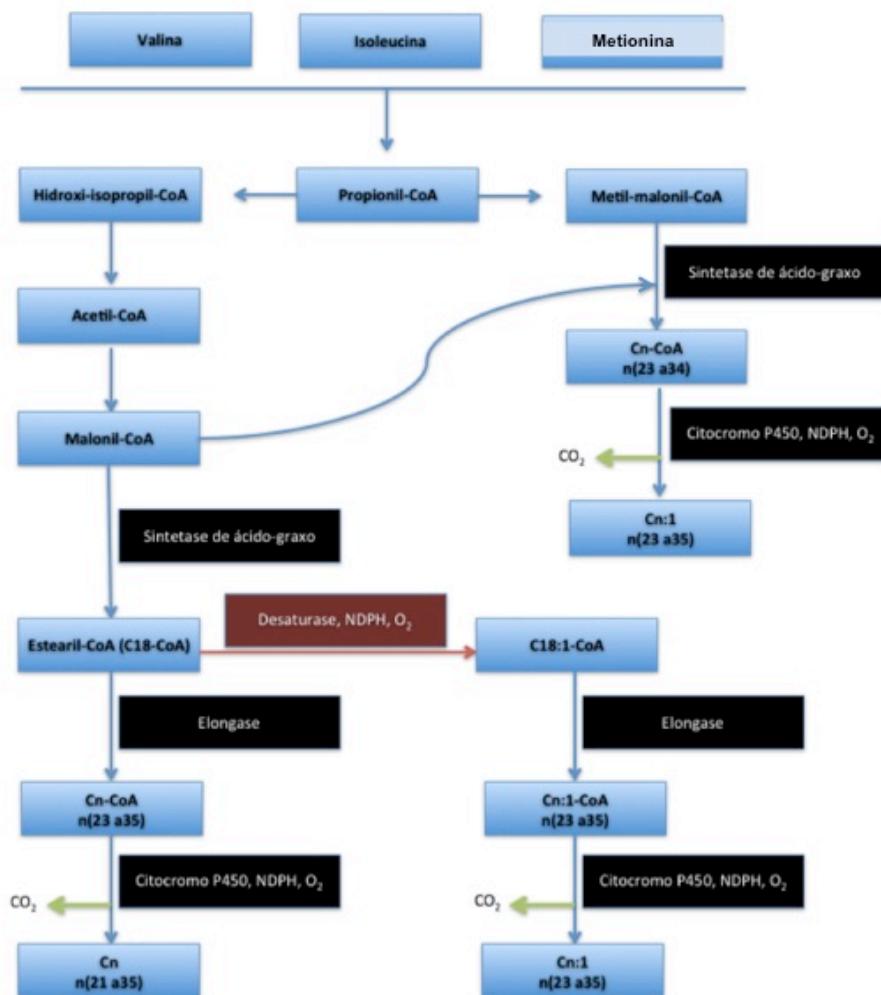


Figura 6 – Esquema geral da formação de hidrocarbonetos cuticulares baseado em Blum (1987); Blomquist *et al.* (2012); Howard e Blomquist (2005); Hashimoto (2008); Kolattukudy (1966, 1968a, 1968b). Na base do processo são encontrados os aminoácidos valina, isoleucina e metionina. Grupos acetil formam ácidos com cerca de 18C de tamanho de cadeia, que será elongada e posteriormente desaturada e descarboxilada (ação da citocromo P450 na descarboxilação). Caso o propionil-CoA seja convertido em metil-malonil-CoA, há formação de hidrocarboneto ramificado.

Sendo assim, os hidrocarbonetos são fundamentais não só a título de impermeabilização cuticular, mas como componentes essenciais para a comunicação

química, onde essas substâncias relativamente não-voláteis podem agir como feromônios sexuais, aleloquímicos, pistas de reconhecimento gênero-específico, reconhecimento de prole, pistas de dominância e fertilidade, mimetismo químico e indicadores de tarefas específicas (Blomquist e Bagnères, 2010), além de permitir avaliar a proximidade genética em processo de seleção sexual (Thomas e Simmons, 2011). A grande maioria desses compostos é sintetizada pelos insetos, porém pouco se sabe sobre as enzimas envolvidas em sua biossíntese nestes animais (Blomquist e Bagnères, 2010), especialmente no que se refere ao processo de formação e maturação da cutícula adulta. Somente recentemente foi descoberta uma descarbonilase específica de inseto importante para a biossíntese desses compostos (Qiu *et al.*, 2012).

Levando-se em consideração o levantamento bibliográfico realizado que revelou a escassez de informações sobre os hidrocarbonetos cuticulares e enzimas que produzem estes compostos em insetos, especificamente em *A. mellifera*, espécie representante de um táxon, Hymenoptera, de grande importância econômica, buscou-se responder às seguintes questões:

- Qual a contribuição dos hidrocarbonetos para a composição da cutícula definitiva que recobrirá o inseto adulto?
- Quantos são e quais são os genes codificadores de elongases e desaturases potencialmente envolvidos nas vias de síntese de hidrocarbonetos e que poderiam contribuir para a formação da cutícula pupal e adulta de *A. mellifera*?
- Há variação na expressão destes genes durante o processo de maturação da cutícula?
- Como estes genes evoluíram nos insetos?

Assim, o presente trabalho propôs três abordagens metodológicas complementares. A primeira consistiu em caracterizar as alterações do perfil de hidrocarbonetos durante a formação e maturação da cutícula adulta. Para essas análises, utilizamos cromatografia a gás associada à espectrometria de massas (GC/MS) que permite a rápida e eficiente determinação da composição e quantificação de hidrocarbonetos (Blomquist e Bagnères, 2010). A segunda abordagem consistiu em utilizar técnicas de biologia molecular para caracterização da expressão de genes potencialmente envolvidos na biossíntese de hidrocarbonetos, um tema ainda incipiente na literatura científica. A terceira abordagem foi a utilização de

ferramentas de análise filogenética para compreender a evolução molecular de desaturases e elongases relacionando com a possível função destas enzimas em insetos.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Como uma contribuição ao conhecimento dos processos de formação e diferenciação do exoesqueleto de insetos, o principal objetivo desse trabalho consistiu em identificar os hidrocarbonetos que compõem a cutícula e analisar a expressão de genes relacionados à formação destes compostos durante o desenvolvimento, isto é, antes, durante e após a síntese da cutícula definitiva.

2.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar os perfis de hidrocarbonetos constituintes da cutícula de diferentes fases do desenvolvimento;
- Identificar genes codificadores de desaturases e elongases com potencial função na biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares;
- Caracterizar a expressão de genes codificadores destas enzimas nas fases do desenvolvimento relacionando-a com o processo de formação da cutícula adulta;
- Associar os perfis de hidrocarbonetos e de expressão gênica diferencial no tegumento em formação e maturação;
- Investigar o relacionamento evolutivo das desaturases e elongases de *A. mellifera* e de outros insetos sociais e solitários.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e métodos

3.1. Abelhas

Foram utilizadas abelhas operárias de *A. mellifera* Africanizada, em diferentes fases do desenvolvimento: pupas (fase Pw: olho branco, cutícula não pigmentada), pupas em apólise (fase Pp: olho rosa, cutícula não pigmentada), adultas-faratas (fases Pb Pbm e Pbd: olho marron, cutícula não pigmentada, em processo de pigmentação e pigmentada, respectivamente), segundo a classificação proposta por Michelette e Soares (1993), além de abelhas recém emergidas (Re) e forrageiras (Fg) (Figura 3H). Estas abelhas foram obtidas a partir de uma postura controlada de 24h de duração (Figura 7), realizada em uma colônia do Apiário do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.



Figura 7 - Coleta do material biológico. Foto da esquerda: Apiário Experimental. Foto da direita Postura controlada: a rainha é mantida presa pela grade ajustada sobre o favo durante 24h, utilizando apenas a área de reclusão para postura, possibilitando assim obter abelhas com o desenvolvimento sincronizado. (Foto da direita cedida por F. M. F. Nunes).

3.2. Extração dos hidrocarbonetos

Para a extração de hidrocarbonetos cuticulares foram utilizadas trinta e seis abelhas de cada fase de desenvolvimento (Pw, Pp, Pb, Pbm, Pbd, Re e Fg) (Figura 3 H) que foram coletadas em frascos tipo *vial* de vidro (*Sun-SRI*) de 4ml (1 frasco para cada abelha). A cada frasco foi então adicionado 1,5ml de n-hexano 95% (*Mallinckrodt Chemicals*) servindo para dar um banho de hexano por 1min a fim de extrair os hidrocarbonetos cuticulares. Depois desse tempo a solução foi transferida para frascos de 2ml com o auxílio de pipetas Pasteur (1 para cada amostra, para evitar contaminação). As amostras foram então secadas e ressuspensas em 160µl de n-hexano 95%, e em seguida transferidas para frascos com *insert* e analisadas em

sistema de Cromatografia a Gás acoplado à Espectrometria de Massas *SHIMADZU*, modelo GCMS QP2010, equipado com coluna Rtx-5MS 30m e hélio como gás carreador à 1ml/min, utilizando o método de ionização eletrônica (EI). O volume injetado foi de 1 μ l em temperatura inicial de 150°C elevando-se a uma taxa de 3°C/min até 280°C (mantendo-se nesta temperatura por 15min). As análises foram feitas em modo *splitless*, recomendado para amostras pouco concentradas (revisado em Hübschmann, 2009), como acontece com misturas de compostos quantitativamente variáveis como os hidrocarbonetos cuticulares.

3.3. Identificação da posição das insaturações

A posição das insaturações nos compostos insaturados foi identificada utilizando-se a técnica de derivatização por dimetil dissulfeto (DMDS) (Carlson, 1989). As amostras (as mesmas utilizadas na extração de hidrocarbonetos) foram secas em frascos de 2ml, seguindo-se a adição de 200 μ l de n-hexano 95%, 200 μ l de DMDS (*Sigma-Aldrich*[®]) e 100 μ l de solução de iodo 6% em éter etílico. O sistema foi purgado (retirado o ar do frasco) com fluxo de N₂ e depois mantido em agitador magnético *overnight*. O sistema foi transferido para um frasco de 4ml e diluído em 500 μ l de tiosulfato de sódio 5% em água ultra-pura, seguido de agitação em agitador de tubos. A fase superior (orgânica) foi transferida para outro frasco de 4ml e a água restante foi eliminada com adição de quantidade suficiente de sulfato de sódio (Na₂SO₄), pois este sal absorve a água formando sólidos (blocos) no fundo do frasco, seguido de agitação em agitador de tubos. A fase líquida foi transferida para outro frasco de 4ml, onde o sistema foi seco, seguido de ressuspenção com 10 μ l de n-hexano 95%, dos quais 2 μ l foram utilizados para injeção manual no sistema de Cromatografia a Gás acoplado à Espectrometria de Massas *SHIMADZU*, modelo GCMS QP2010 citado anteriormente. A temperatura inicial foi de 80°C, por 2min, seguindo-se até 180°C a uma taxa de 30°C/min, seguindo-se a 300°C a uma taxa de 3°C/min, mantendo-se nesta temperatura por 80min. As análise foram feitas em modo *splitless*.

3.4. Análise estatística do perfil de hidrocarbonetos

Os dados foram analisados com o auxílio do programa GCMS *Solutions for Windows* (*Shimadzu Corporation*). Os cromatogramas geralmente apresentam vários picos em posições diferentes por conta dos diferentes tempos de retenção (TR) de

cada soluto na coluna cromatográfica. Cada pico por sua vez contém todas as informações obtidas pelo espectrômetro de massa. A quantificação foi realizada com base nas áreas de pico obtidas pelos cromatogramas (Singer e Espelie, 1992). Os compostos foram identificados com base nos íons diagnósticos e na solução padrão contendo diferentes hidrocarbonetos sintéticos (*Fluka*).

Foi utilizado o software Statistica (v. 8.0 para *Windows*) na análise multivariada para comparar os grupos experimentais. A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada para definir os principais picos de compostos a serem comparados. Também foi realizada a análise de discriminante modo *stepwise* para se contrastar o perfil químico dos grupos experimentais. Substâncias ausentes na maior parte das abelhas de mesma fase de desenvolvimento foram excluídas das análises estatísticas. Os compostos apontados pela análise de componentes principais como responsáveis por menos de 5% de contribuição relativa foram excluídos da análise discriminante, sendo as porcentagens dos compostos utilizados reajustadas para 100%, uma vez que os picos são medidos em porcentagem de área, obtendo-se assim os compostos que melhor explicam a variação entre as fases do desenvolvimento analisadas. Em seguida foi realizada uma análise canônica obtendo-se o gráfico da Função Discriminante. Para se evitar erros na composição dos dados amostrais, a área de cada pico apontado pelo programa foi transformada de acordo com a seguinte fórmula: $Z = \ln[A_p/g(A_p)]$, onde A_p é a área do pico, $g(A_p)$ é a média geométrica do pico das amostras de cada fase de desenvolvimento e Z é a área transformada do pico (Aitchison, 1986).

Os compostos que apresentaram mais de 0,001% de proporção de área de pico em todas as fases em estudo e foram identificados e utilizados para uma comparação individual variação da proporção relativa destes compostos entre as fases. Para isto foi utilizado o teste ANOVA para múltiplos grupos associado ao teste *post-hoc* de Bonferroni utilizando um valor de $p < 0,05$. O objetivo deste teste foi verificar se houve aumento ou redução da área do pico especialmente na forrageira, já que os trabalhos com abelhas se restringem, em sua maioria, à fase adulta (ver item **5.1.** da **Discussão**). O mesmo teste também foi utilizado para a comparação entre as proporções do conjunto de n-alcanos, metil-alcanos, dimetil-alcanos, hidrocarbonetos ramificados (metil-alcanos + dimetil-alcanos), hidrocarbonetos saturados (n-alcanos + metil-alcanos + dimetil-alcanos), alcenos, alcadienos, hidrocarbonetos insaturados (alcenos + alcadienos) e compostos não identificados entre todas as fases do desenvolvimento estudadas para verificar variações quantitativas durante o processo

de maturação da cutícula.

3.5. Extração do RNA total

Para a análise molecular foram utilizadas três amostras de cada uma das seguintes fases de desenvolvimento: Pw, Pp, Pbm, Re e Fg, abrangendo pontos importantes do período de formação e maturação cuticular. As amostras foram dissecadas em solução de cloreto de sódio 0,9%, mantendo-se somente as regiões do tegumento do tórax e abdômen, ricas em enóцитos que são as células responsáveis pela síntese de hidrocarbonetos (Piek, 1964; Diehl, 1973; Schal *et al.*, 1998; Billeter *et al.*, 2009). Após adição de 1ml de *TRIzol®* (Invitrogen) as amostras foram congeladas a -80°C até o momento de uso, quando então foram descongeladas e mantidas por 5min em temperatura ambiente para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. A cada amostra foram adicionados 200µl de clorofórmio (Merck) e, em seguida, os tubos foram agitados manualmente, vigorosamente, por 15 s e mantidos em temperatura ambiente por 2min, seguindo-se centrifugação a 12.000xg a 4°C por 15min. Ao final da centrifugação, as amostras apresentaram duas fases: uma fase transparente aquosa superior (onde se encontram os RNAs) e outra vermelha inferior (contendo fragmentos celulares, *TRIzol* e pequenos fragmentos de cutícula). A fase transparente aquosa (aproximadamente 60% do volume de *TRIzol®*) foi transferida para outro tubo de 1,5ml onde foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico (Merck), iniciando a etapa de precipitação do RNA. As amostras foram então mantidas em temperatura ambiente por 10min e depois centrifugadas a 12.000xg por 10min a 4°C. O RNA precipitado formou *pellet* nas laterais do fundo do tubo. O sobrenadante obtido na precipitação foi descartado e o RNA foi lavado em 1ml de etanol 75%. Os tubos foram então rapidamente agitados no agitador de tubos até o desprendimento do *pellet* e o material foi centrifugado a 7.500xg por 5min a 4°C. Ao fim do procedimento o RNA foi redissolvido. Para isso o sobrenadante foi descartado com cuidado e os tubos abertos foram colocados em termobloco *Digital Dry Bath Incubator (Boekel)* a 55°C por 10 min para evaporação do álcool remanescente, entretanto não foi seco por completo, pois o RNA totalmente seco é de difícil solubilização. O RNA foi então ressuspêndido em 25µl de água ultra-pura (purificada por osmose reversa, em seguida pelo sistema *Milli-Q Plus*) tratada com dietilpirocárbonato (DEPC 0,1% (v/v), *Sigma*) e autoclavada. Para completa dissolução do RNA precipitado as amostras foram deixadas em termobloco a 55 °C

por 5min e sua pureza e concentração foram estimadas em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (*NanoDrop Technologies*). A razão entre as leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280nm foi utilizada como um indicador da pureza do RNA, sendo ideal entre os valores de 1,9 e 2,0 (Ausubel *et al.*, 1995), considerando-se que uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40 μ g/ml de RNA (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras foram então diluídas para perfazer a concentração de 0,6 μ g/ μ l. Em seguida, para eliminar possível contaminação com DNA genômico, as amostras foram incubadas na presença de 0,1 unidade de DNase (*RQ RNase-free DNase, Promega*) por 30min a 37°C e, em seguida, a 70°C por 15min para inativação da DNase.

3.6. Síntese da primeira fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA total, utilizando-se o sistema de síntese da *SuperScript™* (Invitrogen™, Life Technologies). Por este método, apenas a primeira fita do cDNA é sintetizada através de transcrição reversa (RT). Nesta reação, as moléculas de cDNA foram sintetizadas utilizando-se: 0,6 μ g de RNA total, 1 μ l de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/ μ l) e 1 μ l de dNTP (10mM) totalizando um volume de 12 μ l, em seguida, a reação foi aquecida por 5 min a 65°C. Posteriormente, foram adicionados 4 μ l de *First-Strand Buffer* (Invitrogen), 2 μ l de DTT (0,1M) e 1 μ l de RNase Out (40 unidades/ μ l). A reação foi novamente incubada por 2min a 42°C e resfriada no gelo. Finalmente, foi adicionado 1 μ l de *SuperScript™ II RT 200U* (Invitrogen), num volume total de 20 μ l. A reação foi incubada por 50 min a 42°C e, depois, aquecida por 15min a 72°C para inativação da enzima. Como controle negativo para as futuras reações de RT-PCR semiquantitativa e quantitativa, misturas de reação para síntese de cDNA foram preparadas sem adição da enzima SuperScript.

3.7. Amplificação por RT-PCR semiquantitativa

Para as amplificações por PCR (realizadas no equipamento *Veriti®*, *Applied Biosystems*), cada amostra de cDNA sintetizado a partir do RNA total foi usada como molde para a reação. Para isso, foram utilizados 10 μ l de *Eppendorf Master Mix 2,5x [Taq - DNA - Polymerase (0,06 unidade/ μ l); Taq reaction buffer 2,5x (125mM KCl, 75mM Tris-HCl, pH 8,4, 4mM Mg²⁺, 0,25% Nonidet® – P40); 500 μ l de cada dNTP e estabilizadores]; 10 pmoles de cada primer; 1 μ l de cDNA, totalizando um volume final de 20 μ l com água bidestilada e autoclavada. Primers específicos foram*

desenhados para os genes codificadores de enzimas envolvidas na biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares (para identificação dos genes ver item **3.12.1**). Pares de *primers* foram desenhados com o software Primer3 (v. 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), a partir de genes anotados na plataforma Artemis (v. 13.2.0). Cada *primer* de um dado par localiza-se em éxons distintos, assim qualquer contaminação por DNA genômico pode ser facilmente checada examinando-se o tamanho dos amplicons após eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR, ou a curva de dissociação resultante da análise por PCR quantitativa. Os genes que putativamente codificam as enzimas elongases e desaturases de *A. mellifera*, disponíveis no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), encontram-se listadas na Tabela I, juntamente com as sequências dos *primers*, tamanho dos *amplicons* e informação sobre a eficácia do *primers* para a amplificação do cDNA. As condições de PCR foram 5min a 94°C, 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C, 30s a 72°C e uma extensão final de 72°C por 7min. A normalização da expressão dos genes de interesse foi realizada utilizando-se *primers* específicos para o gene de referência *rp49*, constitutivamente expresso em *A. mellifera* (Lourenço *et al.*, 2008) (sentido direto: 5'-TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG-3' e reverso: 5'-AGA ATT GAC CCA CCA ATC CA-3'), utilizando as mesmas condições de amplificação.

Tabela I– Genes codificadores de desaturases e elongases em *A. mellifera*, primers utilizados, tamanho dos amplicons e informação sobre a eficiência do primer.

Gene (GB v. 4.5 do genoma)	Primer	Tamanho dos amplicons (nt)	Primer eficaz
Desaturases			
GB11596 (GB51238)	F 5' TTAATGGTCCGAAAGCATCC 3'	145	sim
	R 5' CCCATGTAGGAATTACAAAGCA 3'		
GB11969 (GB48195)	F 5' CGCTGCTCATATCTTGGAA 3'	148	sim
	R 5' ATTCCCAATTCTGCCGTTT 3'		
GB18472 (GB42218)	F 5' ACGGGTGAACTTGGTGGTA 3'	154	sim
	R 5' TTTTGTTGCAGCTCGATTCA 3'		
XM_001123042 (GB42217)	F 5' GGGCCCATAAACATACGAA 3'	147	sim
	R 5' TGTATGGATCTTATCAGTCCCATAAT 3'		
GB17206 (GB48193)	F 5' ACTACCGGATTGGCATAACT 3'	146	sim
	R 5' CTGTGATCCAATGCCATCT 3'		
GB12710 (GB48194)	F 5' TCACTTCTGCCAAATGGATG 3'	148	não
	R 5' TGAGCGAGCATGAGAAAAAG 3'		
GB17408	F 5' CGCAGCGATTCACAGTTA 3'	148	não

Gene (GB v. 4.5 do genoma)	Primer	Tamanho dos amplicons (nt)	Primer eficaz
(GB45034)	R 5' CCTTTTATTCCCTTCTCTTCC 3'		
GB15513 (GB51236)	F 5' TACGTTTCGTGCTGATGCTT 3'	153	sim
	R 5' ACCAACCCATATGCGAGAAG 3'		
XM_001119994	- -	-	-
Elongases			
GB13264 (GB54401)	F 5' TGGGACCGGAATATCAAAAA 3'	147	sim
	R 5' GCAGTAAAAGTGCCGCTACC 3'		
GB14916 (GB51249)	F 5' ATGTCGATTAAATGCAATACGTG 3'	145	sim
	R 5' AAACTTTACACCATATACGTAGCTA 3'		
GB12340 (GB53872)	F 5' ATTAACGTATCACGGTTTATCAT 3'	152	sim
	R 5' TTAATTCCCTGCTTCGTAACACT 3'		
GB12176 (GB54396)	F 5' TCGGTAATCATGGAGTTATATAAGGA 3'	145	sim
	R 5' ATCTTGGTCCAGCTGATAAGG 3'		
GB16107 (GB54399)	F 5' GTCAGCTGCCTGGTGGTATT 3'	145	sim
	R 5' TACAACCATGAGCATATTGAGG 3'		
GB11136 (GB46038)	F 5' TTGATTCTTGGCATCAATGG 3'	155	sim
	R 5' CTCTCCGCATATGCTTGCTT 3'		
GB12096 (GB53873)	F 5' GAGTCATTACTTCATTGTTTCCA 3'	153	sim
	R 5' AACATCCATGACCAAAAACCA 3'		
GB19038 (GB54302)	F 5' GTTATGCCGATGATTTCGTG 3'	149	não
	R 5' GATTCCAGGTACGGGTGATG 3'		
GB14684 (GB40681)	F 5' ATGGCCTCGTTGGTATTTC 3'	146	sim
	R 5' ACGAATTGGACCATTGCAC 3'		
GB19070 (GB45596)	F 5' TGGAACACATTGCTTGCATC 3'	147	sim
	R 5' TGTCCAAAAACCAGACACGA 3'		
GB19345 (GB51247)	F 5' CAGATCTGGTCACGGTA 3'	154	sim
	R 5' TTCTCCATTATCCTCGGTCT 3'		
GB19144 (GB55040)	-	-	-
	-		
GB19268 (GB54404)	-	-	-
	-		

(nt) Nucleotídeos; (F) primer de sentido direto; (R) primer de sentido reverso; (-) Não foi possível desenhar primer específico.

3.8. Análise por eletroforese em agarose

O cDNA amplificado por PCR (20 µl) foi misturado a tampão de corrida para DNA (bromofenol blue 0,25%, xileno cianol FF 0,25% e glicerol 30%) e analisado em gel de agarose 1% contendo GelRed™ (Biotium) na proporção de 1:10 (0,1µl/ml

de gel de agarose) em tampão 1x TBE (0,45M Tris base; 0,45M ácido bórico; 0,5M EDTA, pH 8,0). A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 100V. Após a eletroforese, o gel foi analisado em digitalizador de imagem KODAK EDAS 290. O λDNA/Hind III Fragments de 100pb (InvitrogenTM, Life Technologies) foi usado como marcador de massa molecular.

3.9. Análise da expressão gênica por RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

A análise por RT-qPCR foi realizada utilizando-se triplicatas técnicas para cada amostra biológica (3 amostras independentes de tegumento para cada fase de desenvolvimento) e os *primers* que apresentaram um resultado positivo na amplificação (ver Tabela I). A análise foi realizada em equipamento *Applied Biosystems* (7500 Real Time PCR System). Em placas para RT-qPCR contendo 96 poços foram adicionados 10µl de *Sybr Green PCR Master Mix 2x* (*Applied Biosystems*), 0,8µl de *primers* específicos para cada gene estudado (vide Tabela I), 2µl de cDNA em volume final de 20µl, completados com água DEPC. O programa de amplificação constituiu de 50°C por 2min e 95°C por 10min, seguidos de 40 ciclos a 94°C por 1min, 60°C por 30s e 72°C por 30s. A quantidade relativa de transcritos foi obtida com a fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (Schmittgen e Livak, 2008), onde a expressão do gene *rp49* foi utilizada como referência para a normalização dos dados de expressão dos genes de interesse (Lourenço *et al.*, 2008). A significância estatística ($p<0,05$) dos dados de quantificação de transcritos entre as fases do desenvolvimento se deu pelo teste de One-Way ANOVA associado ao teste *post-hoc* Tukey utilizando o software *Statistica* (v. 8.0 para Windows).

3.10. Validação da amplificação específica dos produtos de PCR

Foi realizado o sequenciamento direto, a partir do produto amplificado por PCR utilizando os *primers* para os genes codificadores de desaturases e elongases, para validar as sequências obtidas. Após a reação de amplificação com 40 ciclos, o conteúdo de DNA dos produtos de PCR foi quantificado em Nanodrop (ND 1000) e, caso necessário, diluído para posterior realização de reação de sequenciamento, segundo o seguinte protocolo: 1µl de DNA, 1µl de *primer* direto (F), ou reverso (R), 2µl de solução *Big Dye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer), 2µl de solução tampão (5X *Sequencing Buffer*) e 4µl de água bidestilada e autoclavada

totalizando um volume de 10 μ l. Foram utilizados 25 ciclos de 96°C por 10s, 50°C por 5s e 60°C por 4min.

Posteriormente as amostras foram precipitadas com adição de 40 μ l de isopropanol 75%, incubadas em temperatura ambiente por 15min, centrifugadas por 20min e os respectivos sobrenadantes foram descartados. Esses procedimentos se repetiram com a adição de 250 μ l de isopropanol 75% e centrifugação por 5 min. Após o descarte do sobrenadante as amostras secaram em banho seco a 55-57°C e foram ressuspendidas em 12 μ l de *Hi-Diphormamid (HD)*. As amostras foram transferidas para tubos para sequenciamento e passaram por um choque térmico de 95°C por 2min e 5s seguindo para o gelo por 5min para, enfim, serem analisadas pelo método de Sanger no sequenciador automático *ABI Prism 310* (Applied Biosystems) para identificação da ordem das bases nas amostras de cDNA.

3.11. Comparação dos perfis de quantificação dos hidrocarbonetos e de transcritos de desaturases e elongases

Para a comparação entre os perfis de hidrocarbonetos e de expressão gênica, foi utilizada a mediana dos valores de porcentagem de área de compostos e de quantidade relativa de transcritos. Os valores das medianas foram então normalizados aplicando-se o logaritmo de base 10. Em seguida, para se correlacionar estes dados químicos e moleculares foi realizado o teste de Spearman utilizando o software Statistica.

3.12. Análises de evolução molecular de desaturases e elongases

3.12.1. Obtenção das sequências e alinhamento

As análises de evolução molecular foram realizadas utilizando sequências completas de desaturases e elongases preditas, disponíveis no *site* do NCBI. Para as desaturases a pesquisa foi realizada com o termo indicativo do domínio da superfamília de proteínas *Membrane – FADS – like superfamily* em conjunto com a ferramenta BLASTP (Altschul *et al.*, 1990), para evitar repetições de sequências. Para as elongases a pesquisa foi realizada utilizando-se os domínios que caracteriza esta família de proteínas: *GNS1/SUR4 family* em conjunto com a ferramenta BLASTP (Altschul *et al.*, 1990). Somente sequências completas e com número reduzido de *gaps* foram utilizadas, para tornar a análise mais robusta. Os alinhamentos foram realizados com o auxílio do programa MAFFT v. 7 (Katoh *et al.*, 2002) *online* (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) deixando os parâmetros como *default*. Este

programa apresenta melhor desempenho que outros programas quando se analisa um grande número de terminais (>50) (Katoh *et al.*, 2005). Os números de acesso e organismos utilizados encontram-se na Tabela II, juntamente com os números de acesso (GBs) dos genes codificadores de desaturases e elongases de *A. mellifera* para as versões do Genoma 2.0 (usada no decorrer do trabalho) e 4.5 (atual versão, publicada após o início do trabalho).

Tabela II– Elongases e desaturases utilizadas nas análises de evolução molecular.

Organismo (sigla utilizada análise)	Número de acesso no GenBank	Número de acesso no Genoma de <i>Apis mellifera</i> versão 2.0	Número de acesso no Genoma de <i>Apis mellifera</i> versão 4.5
Desaturases			
<i>Apis mellifera</i> (Amel)	XP_623925	GB11596	GB51238
	XP_624794	GB15513	GB51236
	XP_003251704	GB18472	GB42218
	XP_395629	GB11969	GB48195
	XP_624557	GB17206	GB48193
	XP_001123042	-	GB42217
	XP_001122877	GB12710	GB48194
<i>Bombus impatiens</i> (Bimp)	XP_003492441		
	XP_003492439		
	XP_003492440		
	XP_003492461		
<i>Bombus terrestres</i> (Bter)	XP_003395147		
	XP_003395144		
	XP_003395145		
	XP_003395146		
<i>Nasonia vitripennis</i> (Nvit)	XP_001599665		
	XP_003425691		
	XP_001602540		
	XP_001607533		

	XP_001600683
	XP_003425101
	XP_001599836
	XP_001599877
	XP_001599899
	XP_001602289
	XP_001607893
	XP_001599579
	XP_003703957
<i>Megachile rotundata</i> (Mrot)	XP_003703958
	XP_003703960
	XP_003703961
	XP_003703934
	XP_003704955
<i>Harpegnathos saltator</i> (Hsal)	EFN78056
	EFN76593
	EFN88658
	EFN76589
	EFN76591
	EFN85122
	EFN78052
<i>Drosophila melanogaster</i> (Dmel)	NP_731710
	NP_650201
	NP_651966
	AAF54920
	NP_651779
<i>Tribolium castaneum</i> (Tcas)	XP_968828
	EFA05209
	XP_968897
	XP_968970
	XP_967341

	EFA05022
	EFA12799
	XP_968024
	XP_970520
	EFA05245
	XP_970732
	NP_001180578
	NP_001182164
	NP_001137206
	XP_967943
	XP_974033
<i>Bombyx mori</i> (Bmor)	NP_001036971
	NP_001037018
	NP_001036914
	NP_001037017
	NP_001040141
<i>Manduca sexta</i> (Msex)	CAJ27975
	CAJ27976
	CAJ43430
<i>Danaus plexippus</i> (Dple)	EHJ71380
	EHJ76461
	EHJ63142
	EHJ77791
	EHJ68613
	EHJ70677
	EHJ66504
	EHJ73552
	EHJ69993
<i>Daphnia pulex</i> (Dpul)	EFX85062
	EFX60807
	EFX70200
	EFX82757
<i>Amblyomma americanum</i> (Aame)	AAB86499

Elongases			
<i>Apis mellifera</i> (Amel)	XP_001121645	GB12340	GB53872
	XP_003251850	GB19070	GB45596
	XP_001122200	GB12096	GB53873
	XP_397228	GB19345	GB51247
	XP_393136	GB14916	GB51249
	XP_001120442	GB12176	GB54396
	XP_624324	GB19038	GB54302
	XP_001120770	GB13264	GB54401
	XP_395160	GB11136	GB546038
	XP_624585	GB16107	GB54399
<i>Bombus impatiens</i> (Bimp)	XP_003250061	GB14684	GB40681
	XP_003490277		
	XP_003488925		
	XP_003488983		
	XP_003488976		
	XP_003492944		
	XP_003486801		
	XP_003492943		
	XP_003484516		
	XP_003491006		
	XP_003490999		
	XP_003491013		
	XP_003491027		
	XP_003490977		
<i>Bombus terrestris</i>	XP_003490969		
	XP_003484909		
<i>Bombus terrestris</i>	XP_003489235		
	XP_003401825		

(Bter)	XP_003398598	
	XP_003398349	
	XP_003402700	
	XP_003401771	
	XP_003401772	
	XP_003401883	
	XP_003401773	
	XP_003399522	
	XP_003399502	
	XP_003399534	
	XP_003399529	
	XP_003399465	
	XP_003399613	
	XP_003396173	
	XP_003399626	
	XP_003395770	
<i>Nasonia vitripennis</i> (Nvit)	XP_001600017	
	XP_001600048	
	XP_001599996	
	XP_001599838	
	XP_001599914	
	XP_001599942	
	XP_001599867	
	XP_001607111	
	XP_001603768	
	XP_001602545	

<i>Megachile rotundata</i> (Mrot)	XP_003707508
	XP_003700456
	XP_003700522
	XP_003700524
	XP_003700518
	XP_003700520
	XP_003700519
	XP_003703286
	XP_003704078
	XP_003700216
<i>Harpegnathos saltator</i> (Hsal)	EFN75445
	EFN75681
	EFN86956
	EFN85774
	EFN80181
	EFN76075
	EFN76074
	EFN76719
<i>Drosophila melanogaster</i> (Dmel)	NP_730187
	NP_730846
	NP_730841
	NP_730843
	AAM51033
	NP_649754
	NP_651060
	NP_651063
	NP_788716
	NP_001097580
	NP_729666
	ACT88147
	NP_651062
	NP_651104
	AAL90154
	NP_725820

	NP_649955
	NP_649956
	NP_731419
	NP_649958
	NP_649957
	NP_732912
	NP_611365
<i>Tribolium castaneum</i> (Tcas)	XP_971544
	XP_971599
	XP_968784
	XP_968706
	XP_968563
	XP_968636
	XP_966527
	XP_967030
	EFA05977
	XP_974047
	XP_973993
	EFA05473
	XP_975397
	EFA00083
	XP_970514
<i>Daphnia pulex</i> (Dpul)	EFX85691
	EFX88828
	EFX76285
	EFX74343
	EFX74342
	EFX74344
	EFX74345
	EFX74502
	EFX74346
	EFX74501
	EFX74503
	EFX76305
<i>Amblyomma maculatum</i> (Amac)	AEO35934
	AEO35590
	AEO36539
	AEO32695

3.12.2. Teste de modelo de substituição de aminoácidos

Foram realizados testes de modelo de substituição de aminoácidos para os alinhamentos de desaturases e elongases utilizando o programa ProtTest v.3.2 (Darriba *et al.*, 2011) como *default*. O programa indicou o uso do modelo de LG (Le e Gascuel, 2008), que apresenta uma matriz com um padrão geral de substituição de aminoácidos, juntamente com a estimativa da proporção de sítios invariáveis (+I) com taxa de heterogeneidade gama entre os sítios (+G), para ambos os grupos de enzimas. Os valores de $-\text{LnL}$ (*log likelihood*) foram -39.255,449 para desaturases e -43.718,338 para elongases.

3.12.3. Análise evolutiva das enzimas

Para as desaturases, a análise evolutiva foi realizada no programa PhyML (Chevenet *et al.*, 2006; Dereeper *et al.*, 2008; Guindon *et al.*, 2010) (<http://phylogeny.lirmm.fr>), utilizando os parâmetros indicados pelo teste de modelo. Foi realizada uma análise de máxima verossimilhança (Felsenstein, 1981) com 500 replicações de *Bootstrap*. Foram utilizadas como grupos externos as sequências de aminoácidos do crustáceo *Daphnia pulex* e do carapato *Amblyomma americanum* (Liu *et al.*, 1999; Roelofs e Rooney, 2003), sendo a ultima usada para o enraizamento da árvore. Também foi realizado BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) para cada uma das sequências comparando-as com sequências de função conhecida. As sequências de aminoácidos utilizadas como referência para o BLASTP foram: *D. melanogaster* – NP_731710 (desat1), uma $\Delta 9$ desaturase que tem preferência de substrato por ácido palmítico (C16) ao ácido esteárico (C18) (16>18) numa proporção de 2-3:1, NP_650201 (desat 2), uma $\Delta 9$ desaturase que tem preferência por ácido mirístico (C14), e forma $\Delta 5$ hidrocarbonetos (Dallerac *et al.*, 2000) e NP_651996 (desatF), uma desaturase que age sobre o produto ácido graxo ω -7 resultante da insaturação catalisada por desat1 (Chertemps *et al.*, 2006); *Ostrinia furnacalis* - AAL35746, uma $\Delta 14$ desaturase; *Helicoperva zea* - AAF81790, uma $\Delta 9$ desaturase com preferência pelo ácido esteárico (18>16) (revisado em Roelofs e Rooney, 2003); *Trichoplusia ni* – AAB92583, uma $\Delta 9$ desaturase com preferência por ácido esteárico (18>16), AAD03775, uma $\Delta 11$ desaturase (Liu *et al.*, 1999); *Choristoneura rosaceana* - AAN39697, uma $\Delta 9$ desaturase com preferência por ácido palmítico (16>18) (Hao *et*

al., 2002); *Danaus plexippus* – EHJ69993, uma Δ14 desaturase; *Bombyx mori* – NP_001040141, uma Δ11 desaturase; *Lampronia capitella* – ABX71629, uma Δ14-26 desaturase; *Choristoneura paralela* – AAQ12887, uma Δ14-26 desaturase; *Helicoperva assulta* – AF482905, uma Δ14-26 desaturase (Liénard *et al.*, 2008).

As elongases foram agrupadas em *cluster* utilizando o método de aLRT na versão online do PhyML (Chevenet *et al.*, 2006; Anisimova e Gascuel, 2006; Dereeper *et al.*, 2008; Guindon *et al.*, 2010) (<http://phylogeny.lirmm.fr>), utilizando o modelo de substituição indicado pelo teste de modelo. As árvores geradas foram visualizadas e editadas no programa FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2009).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Perfil de Hidrocarbonetos

As proporções relativas de hidrocarbonetos cuticulares para cada fase do desenvolvimento estudada (Pw, Pp, Pb, Pbm, Pbd, Re e Fg) estão representadas na Tabela III, onde também estão indicados os Componentes Principais. A Figura 8 mostra um exemplo de cromatograma de identificação dos hidrocarbonetos cuticulares com indicação dos componentes principais. Não foi observada variação qualitativa dos hidrocarbonetos durante o desenvolvimento da abelha operária. A análise estatística multivariada dos componentes principais revelou que todas as fases diferem quantitativamente entre si ($p<0,000001$). A distância entre Pw e Fg com relação às demais fases do desenvolvimento é tão grande que ao retirar essas duas fases da análise os demais grupos se separam graficamente (Figura 9). Claramente, a proporção de n-alcanos, alcenos, alcadienos e compostos insaturados (alcenos + alcadienos) é maior na forrageira que nas demais fases do desenvolvimento. Situação oposta ocorre para os compostos metilados, observando-se redução com o avanço do processo de maturação cuticular. A Figura 10 apresenta a proporção dos grupos de compostos com significância de $p<0,05$ no teste de ANOVA associado ao teste *post-hoc* Bonferroni.

Tabela III– Média e desvio padrão das proporções relativas de hidrocarbonetos cuticulares nas fases pupais (Pw e Pp), adultas-faratas (Pb, Pbm e Pbd) e adultas (Re e Fg) de operárias de *A. mellifera*. N=36 amostras independentes para cada fase do desenvolvimento, exceto Pw (N=35). Compostos numerados de 1 a 25 (na segunda coluna) são resultantes da Análise de Componentes Principais.

Área Relativa dos Picos																				
		n-Alcanos																		
TR	Composto	Pw			Pp			Pb			Pbm			Pbd			Re		Fg	
Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	
11.735	C19	*		*		*		*		0,316	± 0,072	0,112	± 0,052	*		*				
17.026	C21	0,128	± 0,055	0,206	± 0,109	0,33	± 0,126	0,925	± 0,221	4,485	± 0,922	2,438	± 0,993	0,144	± 0,062					
22.348	C23 ³	1,185	± 0,25	1,374	± 0,18	1,086	± 0,197	2,259	± 0,405	12,086	± 2,026	11,404	± 2,835	6,836	± 2,984					
24.960	C24	0,079	± 0,041	0,048	± 0,025	0,06	± 0,047	0,056	± 0,008	0,078	± 0,015	0,094	± 0,024	0,355	± 0,106					
27.485	C25	4,258	± 0,645	4,952	± 0,921	3,572	± 0,974	3,924	± 0,572	4,678	± 0,643	4,925	± 0,521	16,108	± 4,378					
29.943	C26	0,555	± 0,081	0,562	± 0,098	0,44	± 0,099	0,459	± 0,07	0,406	± 0,071	0,396	± 0,073	1,041	± 0,193					
32.353	C27	25,223	± 3,013	27,725	± 3,208	21,659	± 4,168	21,475	± 1,905	21,104	± 2,173	18,863	± 2,527	31,637	± 4,781					
34.649	C28 ¹⁰	1,812	± 0,178	1,766	± 0,195	1,559	± 0,253	1,479	± 0,173	1,286	± 0,152	1,02	± 0,156	0,705	± 0,163					
36.900	C29 ¹⁴	11,476	± 1,845	11,541	± 1,891	11,741	± 2,725	10,85	± 1,836	10,492	± 1,843	8,434	± 1,879	9,9	± 1,971					
38.193	C30 ¹⁶	1,225	± 0,22	1,087	± 0,335	1,887	± 2,935	1,346	± 0,225	0,887	± 0,182	1,4	± 0,379	*						
41.163	C31	1,502	± 0,384	1,328	± 0,542	1,85	± 0,437	1,797	± 0,445	1,579	± 0,339	2,446	± 1,657	5,213	± 2,029					
Metil-Alcanos																				
TR	Composto	Pw			Pp			Pb			Pbm			Pbd			Re		Fg	
Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	
23.285	9,11,13MeC23 ⁴	0,542	± 0,208	0,628	± 0,148	0,543	± 0,152	0,574	± 0,15	0,406	± 0,107	0,121	± 0,062	*						
28.330	9,11,13MeC25	2,235	± 0,889	3,105	± 0,45	2,455	± 0,634	2,702	± 0,481	2,372	± 0,426	1,384	± 0,346	0,331	± 0,101					
28.512	7MeC25	0,006	± 0,021	0,1	± 0,025	0,135	± 0,35	0,089	± 0,018	0,057	± 0,028	0,033	± 0,024	*						
28.742	5MeC25 ⁶	0,027	± 0,122	0,23	± 0,032	0,266	± 0,277	0,204	± 0,055	*		0,003	± 0,015	0,018	± 0,053					

Área Relativa dos Picos

Metil-Alcanos												
		Pw	Pp	Pb	Pbm	Pbd	Re	Fg				
TR	Composto	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP					
30.743	11,12MeC26	0,345 ± 0,068	0,326 ± 0,069	0,295 ± 0,092	0,338 ± 0,076	0,208 ± 0,044	0,172 ± 0,046	0,039 ± 0,041				
33.093	9,11,13MeC27	14,813 ± 1,487	15,315 ± 1,603	12,993 ± 2,591	13,436 ± 1,229	11,267 ± 1,012	10,97 ± 1,751	0,341 ± 0,143				
33.292	7MeC27	0,298 ± 0,1	0,261 ± 0,028	0,804 ± 3,224	0,255 ± 0,026	0,195 ± 0,023	0,231 ± 0,078	0,005 ± 0,008				
33.502	5MeC27	0,185 ± 0,026	0,164 ± 0,019	0,499 ± 2,045	0,156 ± 0,031	0,107 ± 0,024	0,133 ± 0,023	0,026 ± 0,027				
35.350	12,13, 14MeC28 ¹²	1,573 ± 0,269	1,38 ± 0,297	1,359 ± 0,261	1,374 ± 0,183	0,977 ± 0,172	1,282 ± 0,475	*				
37.570	9,11,13,15MeC29 ¹⁵	15,2 ± 1,483	15,102 ± 1,859	16,028 ± 3,038	15,972 ± 1,304	12,043 ± 1,191	14,232 ± 2,285	0,345 ± 0,122				
41.767	13,15,17MeC31 ²⁰	5,702 ± 0,768	5,074 ± 0,733	7,412 ± 1,131	7,254 ± 0,576	5,353 ± 0,545	6,479 ± 0,97	0,155 ± 0,055				
42.199	3,5,7,10,12, 13,15MeC31	0,195 ± 0,085	0,15 ± 0,059	0,351 ± 0,401	0,314 ± 0,06	0,185 ± 0,052	0,289 ± 0,074	*				
42.305	9, 12, 14MeC31	0,378 ± 0,188	0,225 ± 0,126	0,724 ± 1,307	0,509 ± 0,098	0,251 ± 0,105	0,54 ± 0,157	0,024 ± 0,027				
42.774	3,5,7,11,13,15,16 MeC32	0,203 ± 0,105	0,097 ± 0,041	0,206 ± 0,054	0,206 ± 0,032	0,121 ± 0,03	0,256 ± 0,191	0,13 ± 0,104				
45.352	7,9 MeC33	0,085 ± 0,08	0,055 ± 0,082	0,147 ± 0,065	0,159 ± 0,068	0,094 ± 0,051	0,359 ± 0,433	1,15 ± 0,559				
46.030	5,11, 13,14,15,16 MeC33	1,233 ± 0,243	0,879 ± 0,216	2,011 ± 0,31	1,914 ± 0,149	1,292 ± 0,13	1,508 ± 0,204	0,021 ± 0,024				
51.990	13,15,16,17MeC35	0,198 ± 0,108	0,087 ± 0,037	0,48 ± 0,078	0,454 ± 0,083	0,203 ± 0,061	0,205 ± 0,05	*				
diMetil-Alcanos												
		Pw	Pp	Pb	Pbm	Pbd	Re	Fg				
TR	Composto	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP					
33.663	11,15diMeC27	0,514 ± 0,156	0,505 ± 0,168	0,5 ± 0,139	0,537 ± 0,123	0,363 ± 0,099	0,457 ± 0,142	*				
33.731	7, 11- 7,15 diMeC27	0,301 ± 0,162	0,232 ± 0,155	0,257 ± 0,103	0,222 ± 0,092	0,13 ± 0,072	0,201 ± 0,126	*				
33.825	6,10 e 11,15 diMeC27	0,322 ± 0,096	0,307 ± 0,105	0,319 ± 0,079	0,327 ± 0,069	0,214 ± 0,08	0,296 ± 0,097	*				

Área Relativa dos Picos												
		diMetil-Alcanos										
TR	Composto	Pw	Pp	Pb	Pbm	Pbd	Re	Fg	Média	±	DP	
33.977	4,8 e 13,15 diMeC27	0,371 ± 0,116	0,328 ± 0,097	0,338 ± 0,073	0,33 ± 0,076	0,179 ± 0,069	0,273 ± 0,084	0,075 ± 0,027				
38.049	10,15diMeC29	0,708 ± 0,131	0,631 ± 0,145	1,217 ± 2,556	0,814 ± 0,12	0,519 ± 0,099	0,739 ± 0,2	0,031 ± 0,066				
39.691	9,13 diMeC29 ¹⁷	0,9 ± 0,24	0,532 ± 0,104	0,774 ± 0,095	0,759 ± 0,083	0,456 ± 0,065	0,625 ± 0,108	*				
43.776	3, 7 diMeC31 ²¹	0,667 ± 0,437	0,113 ± 0,032	0,25 ± 0,031	0,246 ± 0,029	0,131 ± 0,025	0,209 ± 0,073	*				
Alcenos												
TR	Composto	Pw	Pp	Pb	Pbm	Pbd	Re	Fg	Média	±	DP	
21.585	7C23:1, 9C23:1 ²	*	*	0,014 ± 0,015	0,273 ± 0,066	1,796 ± 0,299	0,732 ± 0,275	0,433 ± 0,152				
26.813	5C25:1, 7C25:1, 9C25:1	0,181 ± 0,081	0,194 ± 0,066	0,139 ± 0,054	0,288 ± 0,059	0,928 ± 0,276	0,656 ± 0,232	1,131 ± 0,309				
27.020	zC25 ⁵	0 ± 0	*	*	0,011 ± 0,011	0,002 ± 0,007	0,002 ± 0,008	0,331 ± 0,186				
31.734	6C27:1, 7C27:1, 9C27:1 ⁹	0,326 ± 0,088	0,276 ± 0,077	0,219 ± 0,064	0,289 ± 0,063	0,243 ± 0,062	0,234 ± 0,077	1,917 ± 0,621				
31.901	zC27	0,118 ± 0,151	0,114 ± 0,02	0,1 ± 0,03	0,117 ± 0,018	0,066 ± 0,02	0,047 ± 0,029	0,976 ± 0,447				
34.222	8C28:1, 9C28:1	0,287 ± 0,069	0,246 ± 0,077	0,266 ± 0,058	0,262 ± 0,057	0,143 ± 0,049	0,192 ± 0,063	0,013 ± 0,021				
36.362	7C29:1, 9C29:1 ¹³	1,034 ± 0,214	0,795 ± 0,181	0,812 ± 0,227	0,948 ± 0,181	0,606 ± 0,113	0,523 ± 0,155	3,391 ± 0,773				
36.503	zC29	*	*	*	*	*	*	*				
40.702	7C31:1, 8C31:1, 9C31:1, 10C31:1, 11C31:1, 15C31:1	1,257 ± 0,355	0,723 ± 0,204	0,997 ± 0,278	1,162 ± 0,271	0,479 ± 0,387	0,808 ± 0,221	2,999 ± 1,57				
44.645	8C33:1, 9C33:1, 10C33:1, 12C33:1	*	*	*	*	*	*	*				
44.812	9C33:1, 10C33:1, 13C33:1	0,512 ± 0,371	0,392 ± 0,486	0,653 ± 0,303	0,915 ± 0,423	0,651 ± 0,294	2,25 ± 2,448	6,848 ± 3,301				

Área Relativa dos Picos															
		Alcenos													
TR	Composto	Pw		Pp		Pb		Pbm		Pbd		Re		Fg	
		Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
44.961	zC33	0,057	± 0,138	0,026	± 0,086	0,084	± 0,061	0,139	± 0,088	0,055	± 0,061	0,38	± 0,532	1,244	± 0,679
50.024	10C35:1, 12C35:1, 14C35:1, 15C35:1	*		*		*		*		0,006	± 0,027	0,198	± 0,414	1	± 0,581
50.210	zC35 ²⁵	*		*		*		*		0,013	± 0,043	0,37	± 0,626	1,432	± 0,724
Alcadienos															
TR	Composto	Pw		Pp		Pb		Pbm		Pbd		Re		Fg	
		Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
31.004	zzC27 ⁸	*		*		*		*		0,16	± 0,059	0,169	± 0,055	0,012	± 0,023
40.268	zzC31 ¹⁹	*		*		*		*		*		*		0,54	± 0,274
44.302	zzC33 ²²	*		*		*		*		0,031	± 0,045	0,266	± 0,352	1,151	± 0,776
44.473	zzC33 ²³	*		*		*		*		*		0,012	± 0,048	0,121	± 0,092
49.393	zzC35a ²⁴	*		*		*		*		*		0,102	± 0,239	0,503	± 0,337
49.596	zzC35b	*		*		*		*		*		0,052	± 0,16	0,278	± 0,177
Não Identificados (n.i.)															
TR	Composto	Pw		Pp		Pb		Pbm		Pbd		Re		Fg	
		Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
11.620	n.i. ¹	*		*		*		*		*		*		*	
19.644	n.i.	*		*		*		*		0,248	± 0,047	0,191	± 0,06	0,098	± 0,035
19.958	n.i.	*		*		0,004	± 0,011	0,045	± 0,011	*		*		*	
20.338	n.i.	*		*		0,023	± 0,014			*		*		0,061	± 0,056
23.982	n.i.	0,004	± 0,024	*		0,161	± 0,155	0,037	± 0,062	0,006	± 0,024	0,038	± 0,112	0,048	± 0,067

Área Relativa dos Picos

		Não Identificados (n.i.)													
TR	Composto	Pw		Pp		Pb		Pbm		Pbd		Re		Fg	
		Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
25.833	n.i.	0,002	± 0,01	*		*		0,02	± 0,016	*		*		*	
29.242	n.i.	*		0,036	± 0,044	0,058	± 0,032	0,076	± 0,025	0,003	± 0,012	0,022	± 0,029	0,027	± 0,02
29.558	n.i. ⁷	0,099	± 0,064	0,106	± 0,058	0,117	± 0,044	0,118	± 0,051	0,025	± 0,026	0,057	± 0,047	0,002	± 0,007
34.765	n.i. ¹¹	0,006	± 0,024	0,011	± 0,028	0,013	± 0,027	*		0,001	± 0,003	0,012	± 0,026	*	
38.400	n.i.	0,191	± 0,127	0,072	± 0,063	0,177	± 0,139	0,155	± 0,039	0,021	± 0,041	0,159	± 0,06	*	
40.116	n.i. ¹⁸	*		*		*		*		*		*		0,243	± 0,057

(TR) - Tempo de retenção (min); (DP) – desvio padrão; (-) - composto não encontrado; (Z) - indica uma insaturação de posição não identificada; (Me) - grupo metil; (*) - composto que apresentou porcentagem de área do pico <0,001%; compostos com tempo de retenção em azul apresentaram aumento estatisticamente significativo (ANOVA associado ao teste *post-hoc* Bonferroni, $p<0,05$) na proporção da área do pico em forrageiras ao menos com relação à recém-emergida, já os tempos de retenção em vermelho representam redução da concentração estatisticamente significante (ANOVA associado ao teste *post-hoc* Bonferroni, $p<0,05$) nas forrageiras; (n.i.) - hidrocarboneto não identificado; os números sobreescritos em vermelho na segunda coluna indicam os componentes principais na ordem em que aparecem de acordo com o tempo de retenção.

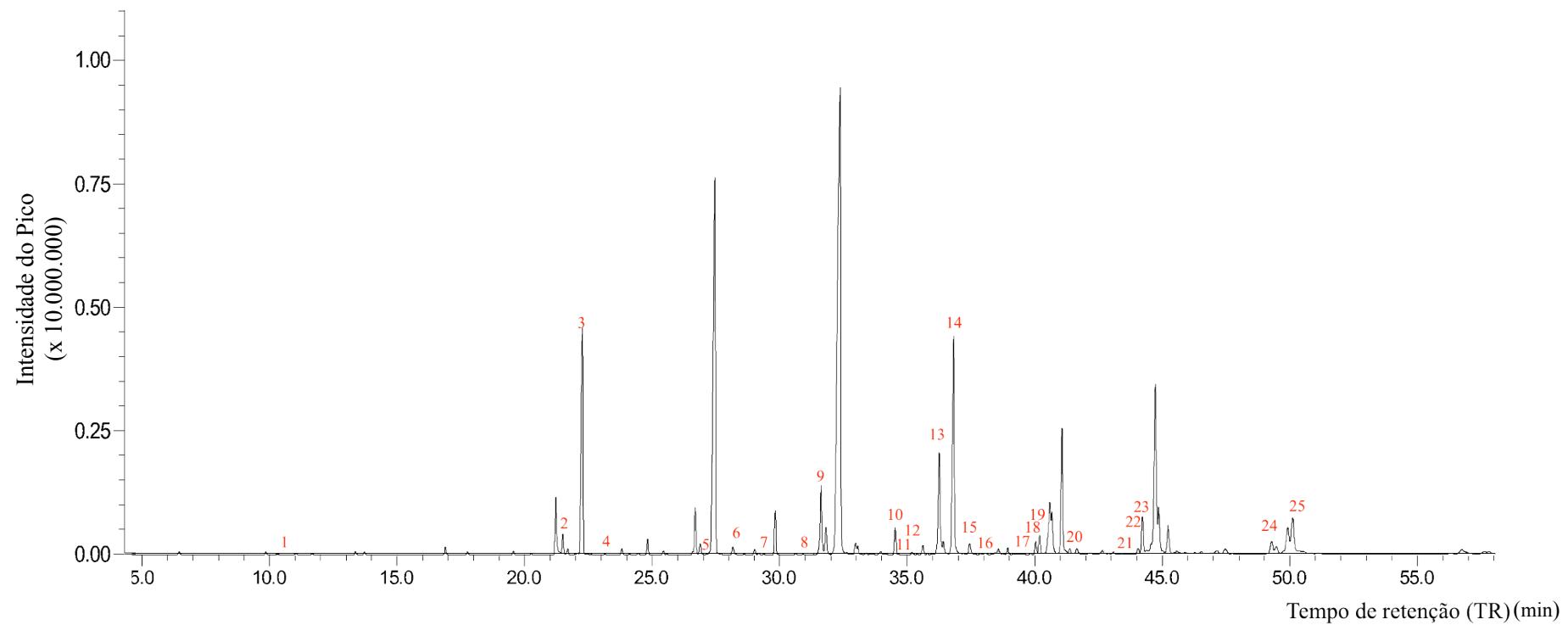


Figura 8 – Cromatograma representativo das frações de extrato cuticular de abelhas forrageiras. Os compostos que melhor explicam a variação entre as fases do desenvolvimento estão marcados em vermelho (ver Tabela III). O eixo X representa o tempo de retenção em que os compostos aparecem. O eixo Y indica a intensidade do pico. Compostos menos representativos nesta fase do desenvolvimento podem aparecer basais. Picos de compostos que não estão indicados como componentes principais, incluindo alguns mais intensos, não ajudam a explicar a variação entre os grupos.

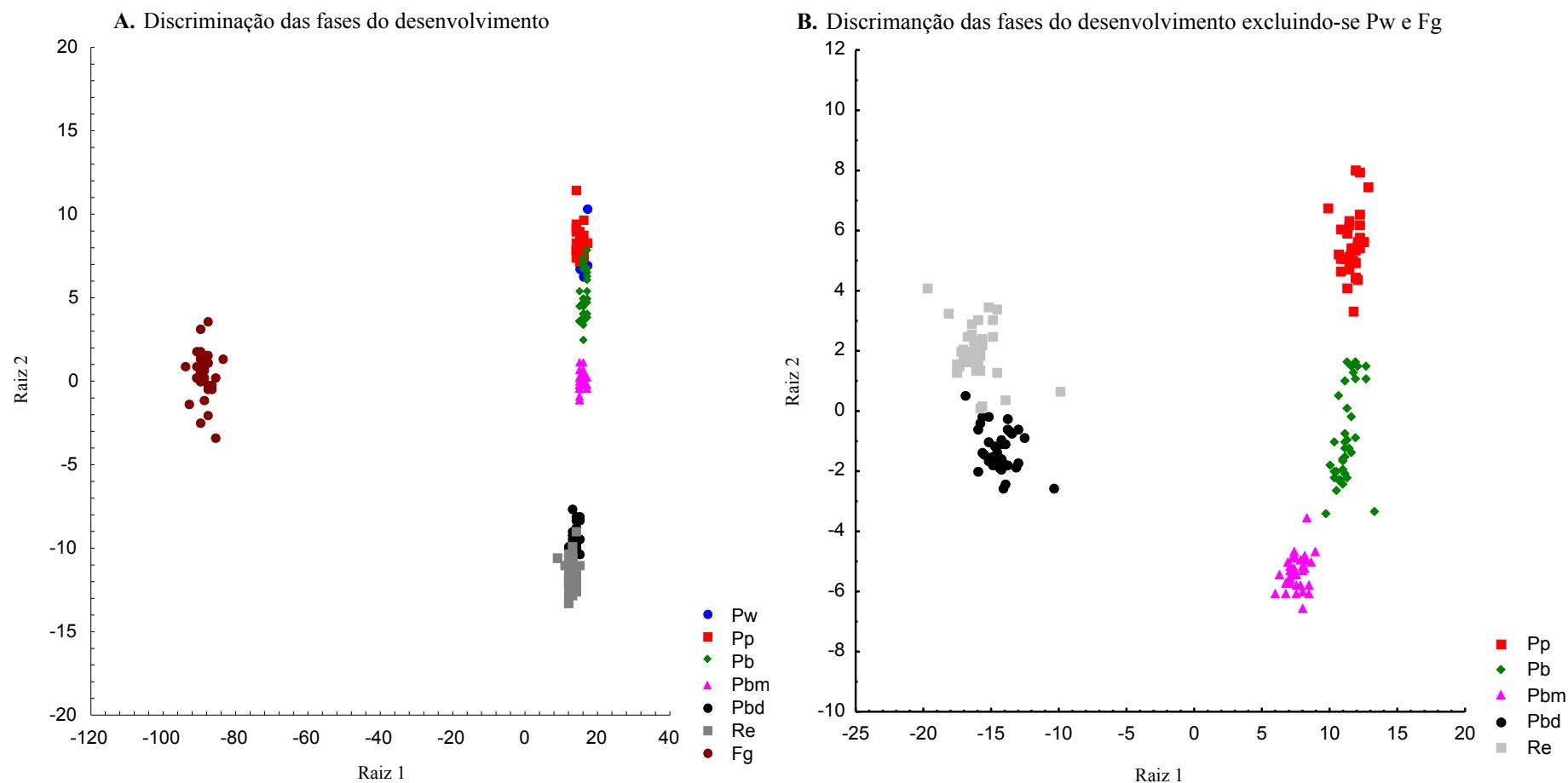


Figura 9 – Análise canônica baseada nos compostos revelados por Análise de Componentes Principais em cada fase do desenvolvimento estudada. A análise discrimina quantitativamente os hidrocarbonetos cuticulares de todas as fases do desenvolvimento em estudo (Pw, Pp, Pb, Pbm, Pbd, Re e Fg). (A) Análise comparativa incluindo todas as fases em estudo. (B) Análise comparativa retirando-se as fases Pw e Fg. Wilks'Lambda: $p < 0,000001$.

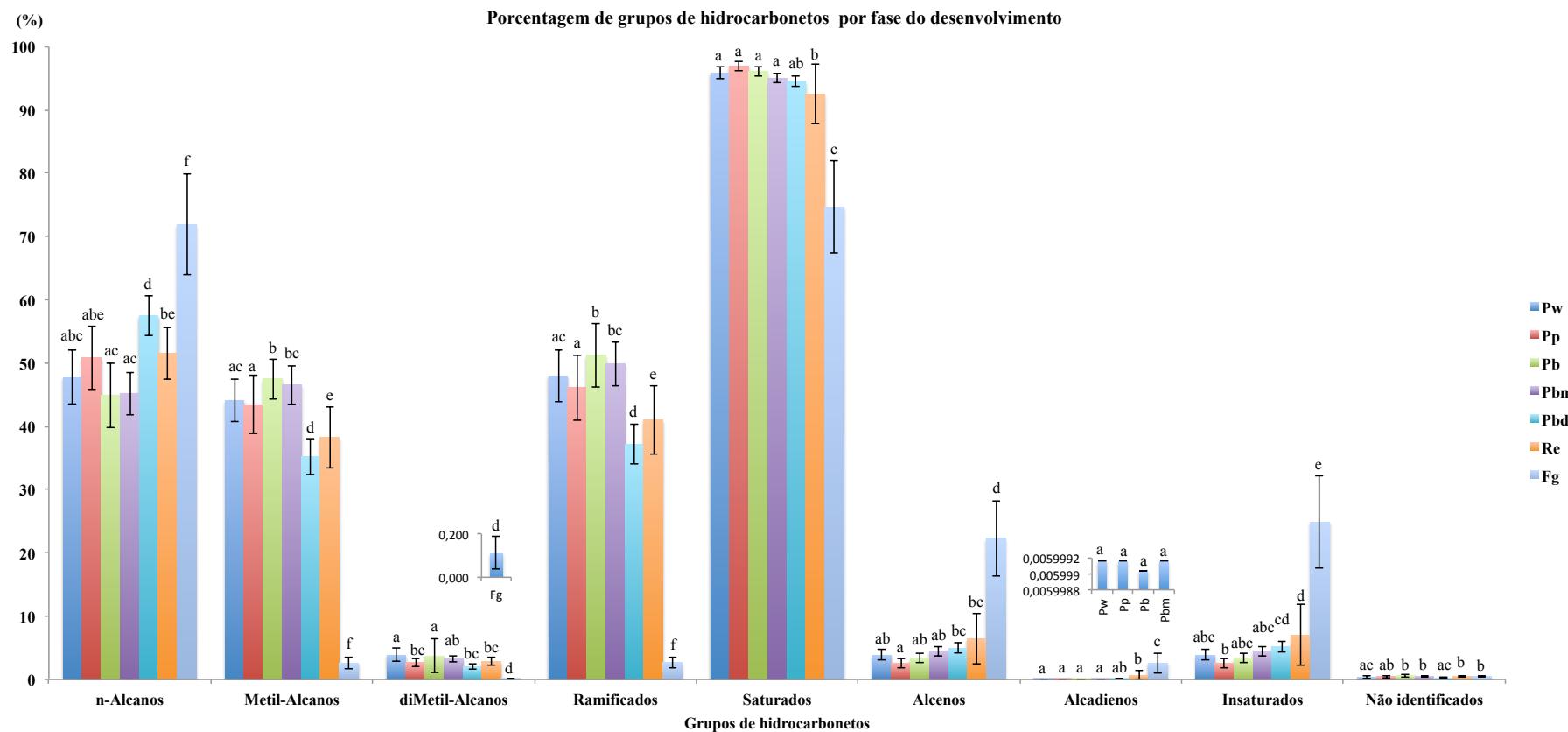


Figura 10 – Proporção dos grupos de hidrocarbonetos nas diferentes fases do desenvolvimento. As colunas representam as médias de compostos e as barras representam o desvio padrão. Letras diferentes dentro de um grupo significam diferença estatística significante para $p<0,05$ no teste ANOVA associado ao teste post-hoc Bonferroni. Os gráficos menores inseridos em diMetil-Alcanos e Alcadienos são uma representação em maior escala das barras de fases com baixa proporção de compostos, para que possam ser mais adequadamente visualizadas.

4.2. Teste dos *primers* e confirmação das sequências

O resultado do teste dos *primers* para amplificação dos cDNAs de desaturases e elongases encontra-se na Figura 11. As sequências foram validadas por sequenciamento direto da região inter-*primers* e PCR *in silico* (Tabela IV). As posições de amplificação dos *primers* abrangendo a região de dois exons consecutivos nos genes de desaturases e elongases podem ser observadas na Figura 12.

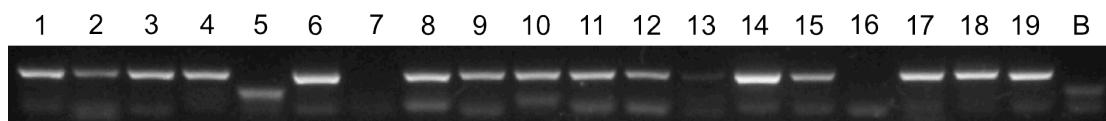


Figura 11 – Teste dos *primers* desenhados para desaturases e elongases. Desaturases: 1-GB51236, 3-GB51238, 4-GB48195, 5-GB48194, 6-GB48193, 7-GB45034, 8-GB42217 e 9-GB42218. Elongases: 2-GB46038, 10-GB53873, 11-GB54396, 12-GB53872, 13-GB54401, 14-GB51249, 15-GB54399, 16-GB54302, 17-GB45596, 18-GB51247 e 19-GB40681. B- controle negativo (sem cDNA).

Tabela IV – Sequências validadas por sequenciamento direto da região inter-*primers* e PCR *in silico* (-). (F) amplificação para sequenciamento com *primer* de sentido direto; (R) amplificação para sequenciamento com *primer* de sentido reverso.

Enzima	Gene	Primer	Sequência (5'->3')
DESATURASES	GB48195	F	-
		R	GCCAACCTTCGCCAAGTGCTCCTATGGCCACCG CTTTATTCTCCGAAGGATTGATAAACTTGTAT ATGGTTGTTCCAAGGATATGAGCAGCGAG
	GB51236	F	AATGGGTGAGAGACCACAGAGTTCATCATAAA TTCACAGATACTGATGCGGATCCACATAATGCA CAACGAGGATTCTTCTCTGCATATGGGTTGG GTAAAAAC
		R	TCCAGTACTGTGAATTATGATGAACCTGTG GTCTCTCACCCATTCTATAATGATTGGAA AGCGGTTGTTGAAGAAGCATCAAGCACGAAA CGTAA
	GB51238	F	AGTGATTGGAAAAAGATCCCATTGTCGTTGG CAAAGAAGATTGTATATCGTGTGATGCCCTTT TTGTGCTTGTATTCTACATGGGAATCTT
		R	-
	GB42218	F	TATGATTAAAAACTGTTCCCGAAGAAATGATT GCAAAACGAATAGCCAGAACTGGAAATGAATC GAGCTGCAACAAAAA
		R	TATGCTTCCCATAAAGCACAGAAATCAAT GAACGCAGTGGTAAGATTGGTTTATAACCCCC AAGTCACCCGTAAG
	GB42217	F	CTCATACTCTGCAGGAAGTAGGTTCGATATAT GACTGGATTTATATCACAGGATTCTCATCATAAA TATTATGGGACTGTTAAAGATCCATACAAG
		R	ATCCAGTCATATATCGAACCTACTCCTGCAAGA GTATGAGCAAGCATAAGGAATAATTAAATAAA TCCTACGGCTTC
	GB48193	F	AAAATGGCCACTTCGATTACTCTAATATTCT CTTACCATACCGGACAAAAAGATGTATACA GATGGCATTGGATCACAGAA

Enzima	Gene	Primer	Sequência (5'->3')
ELONGASES		R	CGAATATTAGAAGTAATCGGAAGTGGCCATTT GCTTGTATGCCCTATGAGACCACAATCGATGT ACTCCTGCAGTTATGCCGAATCCGGTAGTAAA
		F	CGTACACAGGCCAAGCTTGATATTGATTG CGGCTATCCAAAAGCTGGTAGCGGCACCTTTACT GCAAACCTCTAT
	GB54401	R	ACAGAATTGTACCAATTGTACAGTAGTGAGAT GTTTTTCCACCATAAGTATTGTATATTCCGG TCCCCAAAT
		F	TCGCAGATCAGAGAACAGAATTGGTTATG ATGAGCTACCATTCTACTCTGTTATCTGCT TGAGCTACGTATAGGGGTGAAAGTTAAAT C
	GB51249	R	-
		F	AGTGTACGAAAGCAGGAATT
	GB53872	R	-
		F	-
	GB54396	R	-
		F	TCGTATTCTCACACTCGAAAAAACAAATCA AGTGGACATTTCTACATGTTACCACCATACGA TAACCTCAATATGGCTCATGGGTGTAAACACG T
	GB54399	R	GTGAAGAATACCGTGTCAAGAAGATCCATTAT TTTGCATGAAATACCAACCAGCAGCTGACA AT
		F	TATGGGTTTACCATAGTGTGTATACCTAGC TTTATTGAACAAGATGTCGTCTGGTTTTGG ACAAAACAT
	GB45596	R	-
		F	GTCCTCTCCTACCATGGTATATGCCGTGTT ATCGTATTTCAGCAAAGTTTAGGACCGAGG GATAATGGAGAAATCTCTATCC
	GB51247	R	GCTCATCATCATCCAATGGTCACTCTGGG
		F	AAAAAAATTGTCTCCGTATAAACCAATAATA ACCTCGGTGCAAATGGTCCAATCGTAACCCT
	GB46081	R	-
		F	CCTTATCGTTCTATTGGAAACTTTATGCCAA AGCTTATATTGCTAAGGGCAAGCAAGCATATG CGGAGAGGAA
	GB46038	R	TCCATGACAAGTGCATATTGCATCCAAAGTGG AAAATCGCATCCTGATCGAATACCATTGATGCC AAGAATCAA
		F	TTTATCATAGTGTGTATACCTAGCTTATTG AACAGGACGTAGTATGTGGTTTGGGTGATG GATGTTAAA
	GB53873	R	TTAATATATGAATCATTCTGGTAATGTTCTAA ATACTCCAATAATGGAAAACAATGAAAGTAAT GAACTCAA

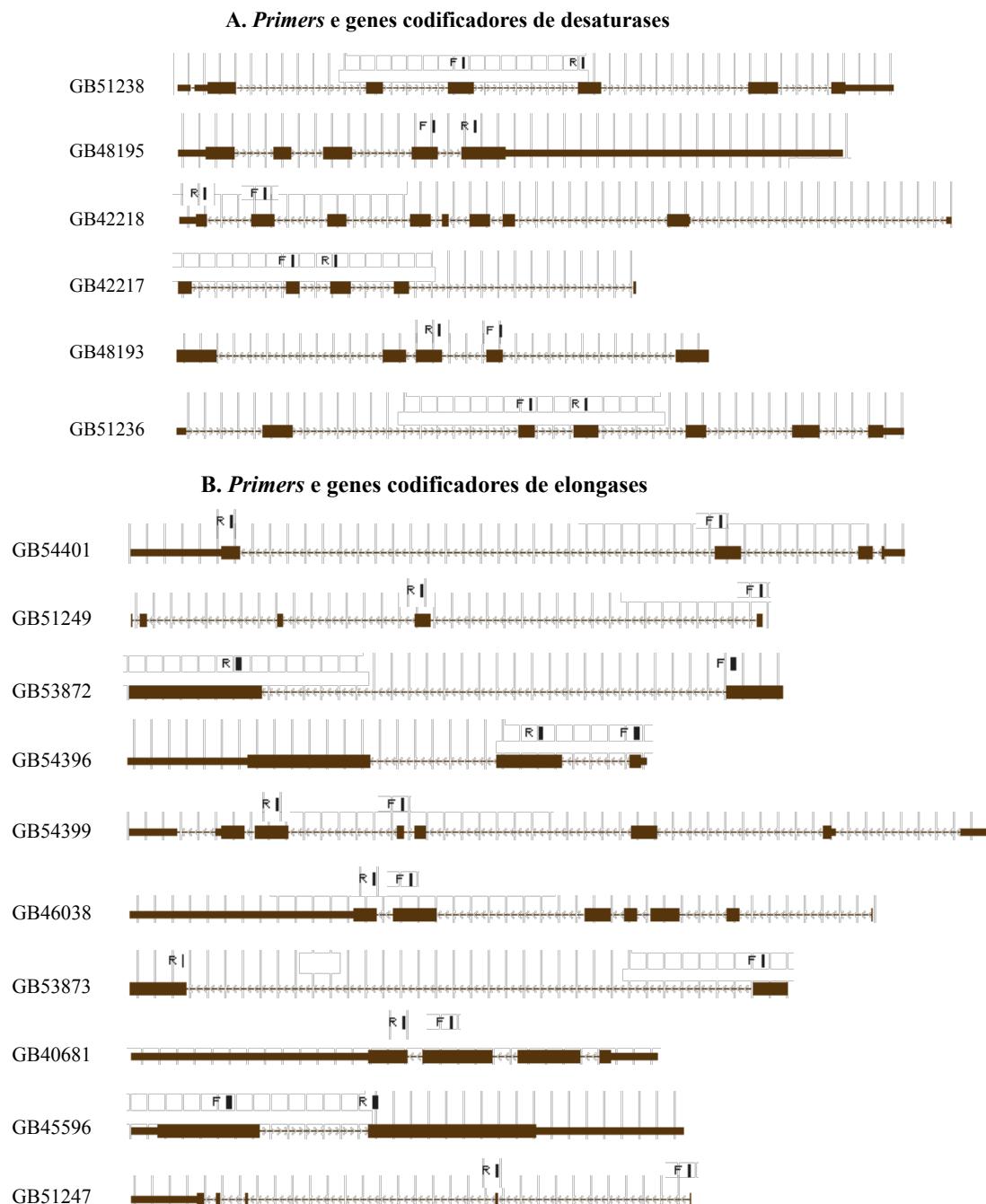


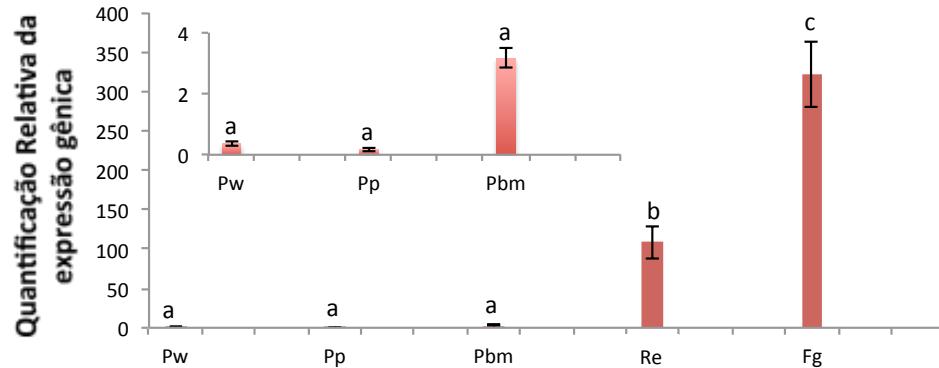
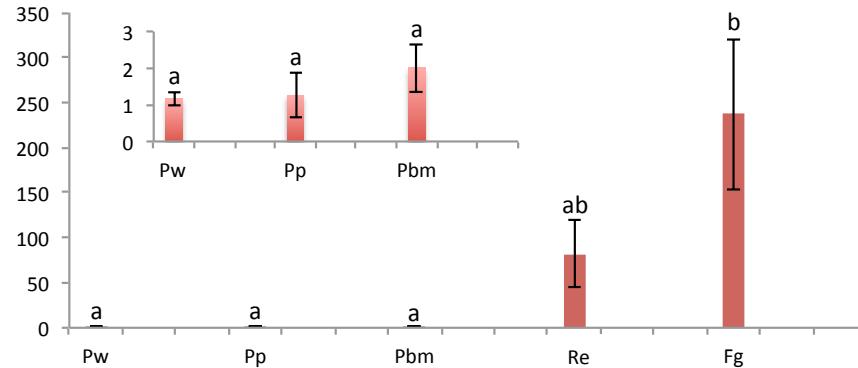
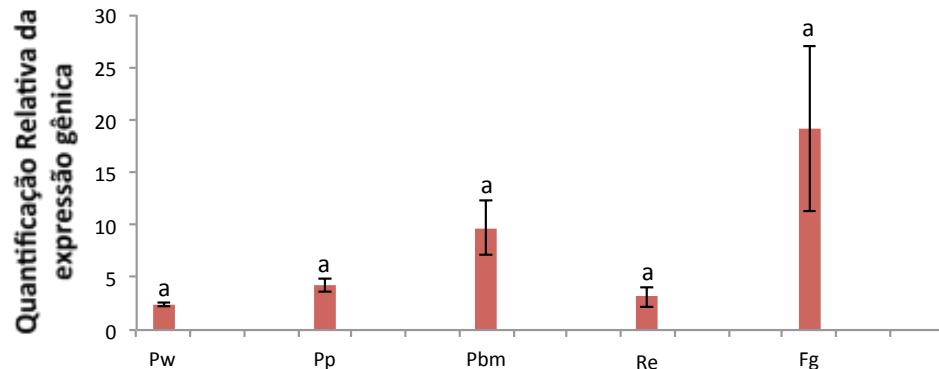
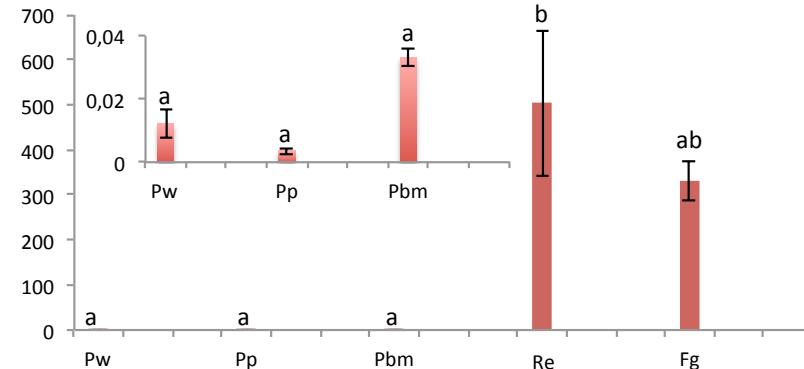
Figura 12 - Posicionamento dos primers nas sequências dos genes codificadores de desaturases (A) e elongases (B). Em marrom está representada a região transcrita do gene; nas áreas marrons mais estreitas estão as regiões não traduzidas (UTRs). As linhas tracejadas representam os íntrons. As barras verticais acompanhadas das letras F e R indicam os primers sentido direto (F), e sentido reverso (R).

4.3. Análise da expressão gênica por RT-qPCR e correlação com o perfil de hidrocarbonetos cuticulares

Tanto para os genes de desaturases como para os genes codificadores de elongases que apresentaram diferença de expressão estatisticamente significativa durante o período de desenvolvimento analisado (fases Pw, Pp, Pbm, Re e Fg),

verificou-se um padrão de aumento de expressão no estágio adulto (fases Re e Fg). Os genes de desaturases que apresentaram expressão significativamente mais alta nos adultos foram: GB51238, GB48195, GB42218, GB42217, e GB48193 (Figura 13). Os genes de elongases com expressão significativamente mais abundante nas fases adultas (Re e/ou Fg) foram: GB51249, GB53872, GB54396, GB45596 e GB51247. Os genes GB54401 e GB46038 apresentaram maior quantificação de transcritos em Fg se comparados a Pp e Pbm, respectivamente. O gene de elongase GB40681 apresentou maior nível de expressão na fase adulta-farata Pbm (Figura 14).

A partir dos dados de expressão gênica e do perfil de hidrocarbonetos, foi feito um teste de correlação com a finalidade de inferir sobre o envolvimento destes genes na biossíntese de grupos de hidrocarbonetos cuticulares específicos. Dos genes codificadores de desaturases, apenas o GB51236 não apresentou qualquer tipo de correlação estatisticamente significativa ($p>0,05$), enquanto os demais foram negativamente correlacionados com o grupo de compostos saturados e positivamente correlacionados com o grupo de compostos insaturados ($p<0,05$) (Tabela IV). Dos genes codificadores de elongases, seis (GB54401, GB51249, GB54396, GB45596, GB51247 e GB53873) apresentaram dados de correlação estatisticamente significantes ($p<0,05$) (Tabela V).

GB51238**GB48195****GB51236****GB42218**

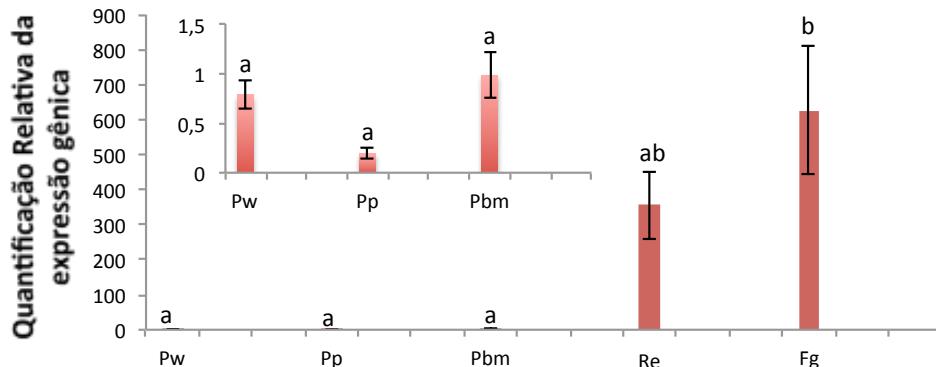
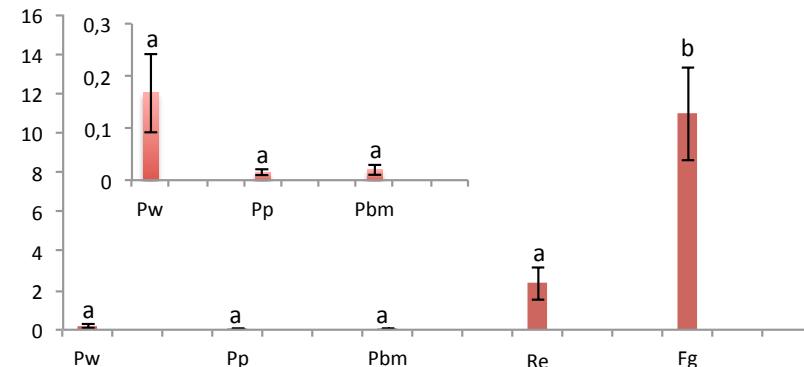
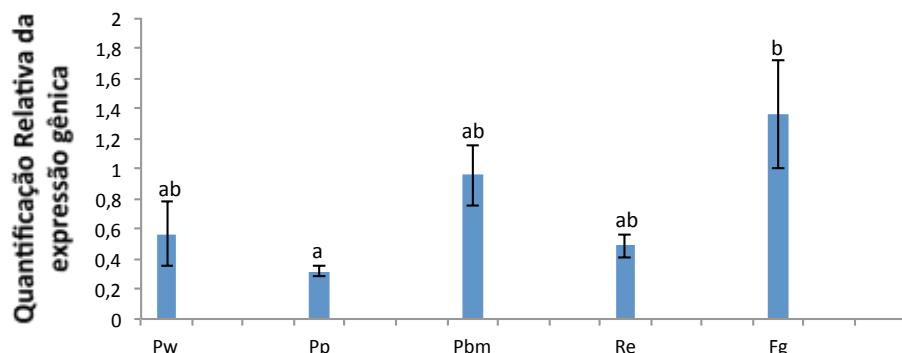
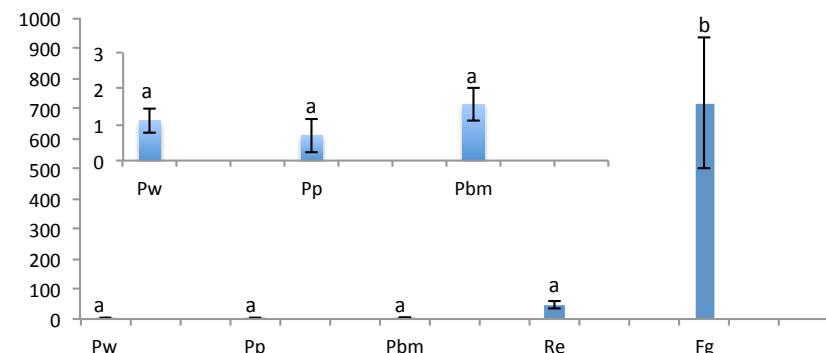
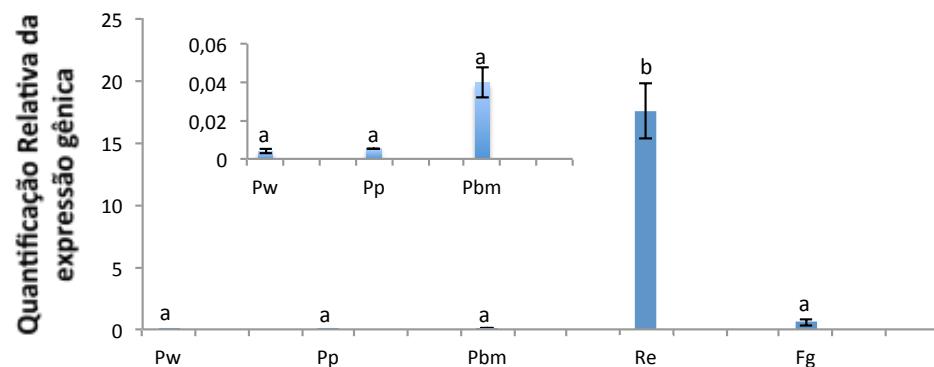
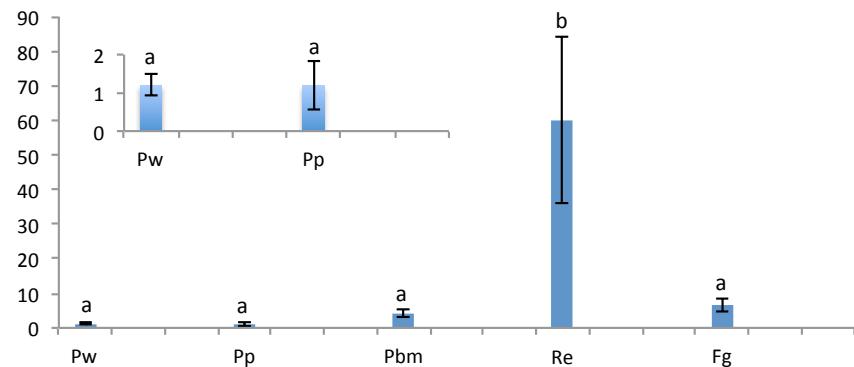
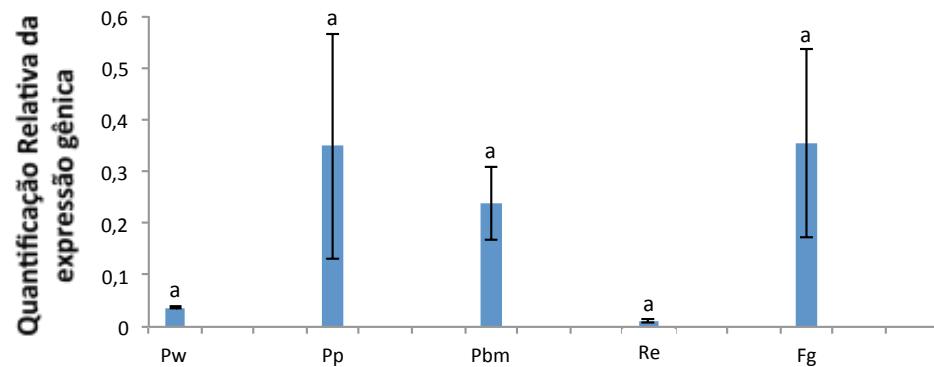
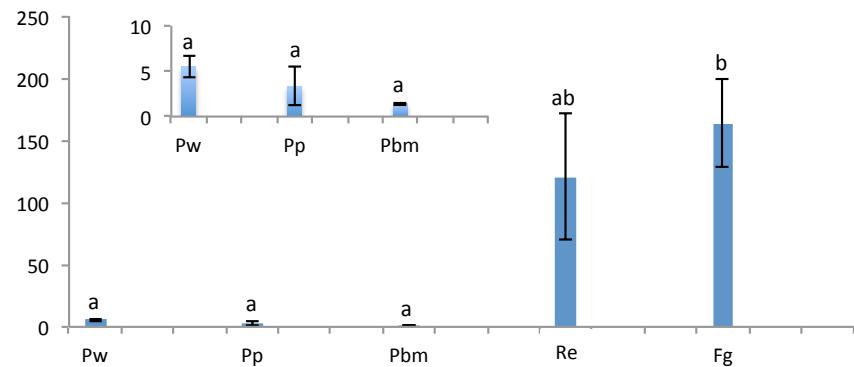
GB42217**GB48193**

Figura 13 - Análise da expressão gênica de desaturases por RT-qPCR. Os códigos de acesso estão indicados em cada gráfico. Foram avaliadas as quantidades relativas de transcritos de seis desaturases. Diferentes letras sobre as barras de erro indicam diferença estatística significativa entre as fases do desenvolvimento ($p<0,05$). Os gráficos menores inseridos são uma representação em maior escala das barras relativas às fases de desenvolvimento com baixo nível de expressão, para que possam ser mais adequadamente visualizadas. Pw: pupa; Pp: pupa em apóiese; Pbm: adulta-farata; Re: recém emergida; Fg: forrageira.

GB54401**GB51249**

GB53872**GB54396****GB54399****GB45596**

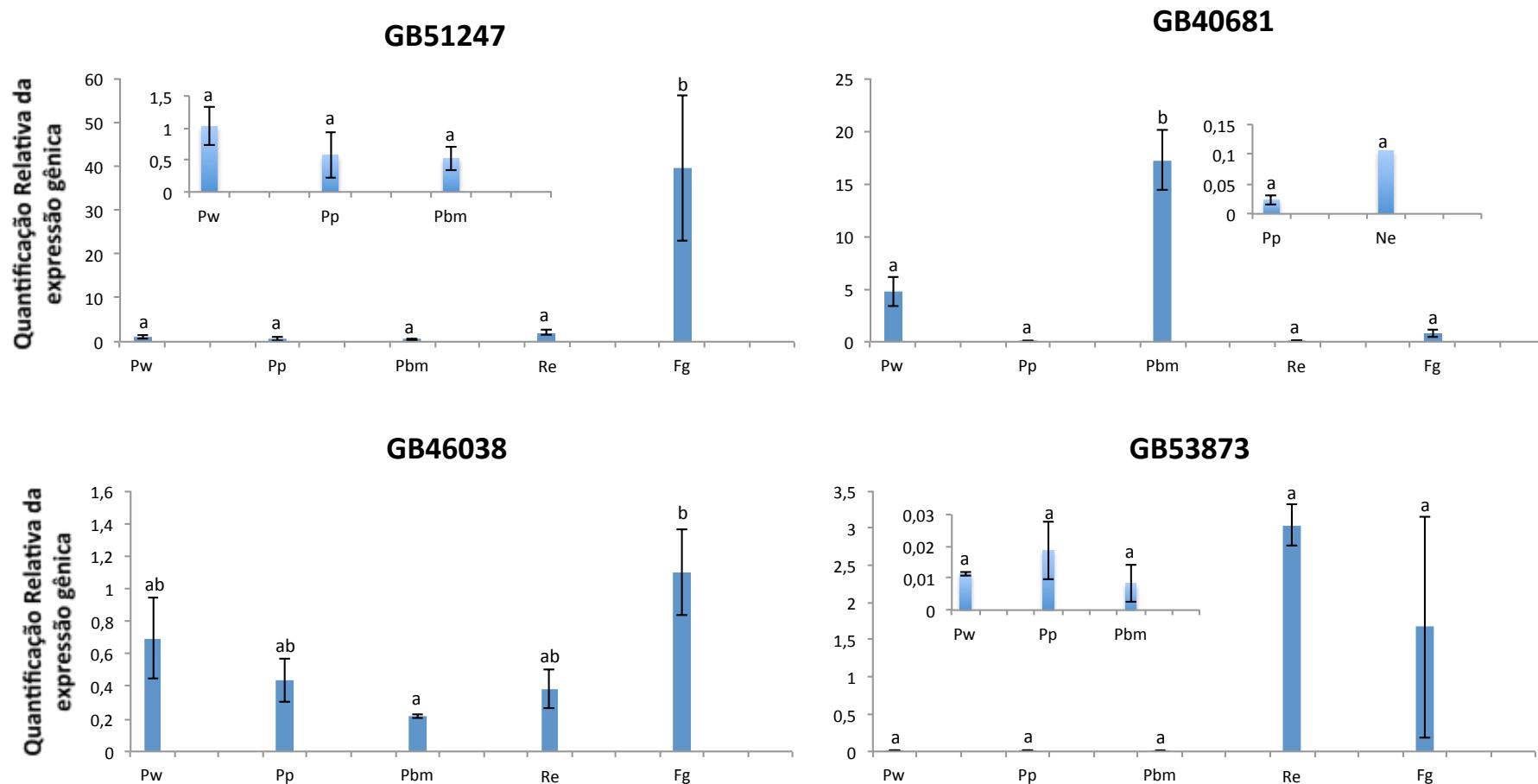


Figura 14 - Análise da expressão gênica de elongases por RT-qPCR. Os códigos de acesso estão indicados em cada gráfico. Foram avaliadas as quantidades relativas de transcritos de dez elongases. Diferentes letras sobre as barras de erro indicam diferença estatística significativa entre as fases do desenvolvimento ($p<0,05$). Os gráficos menores inseridos são uma representação em maior escala das barras relativas às fases de desenvolvimento com baixo nível de expressão, para que possam ser mais adequadamente visualizadas. Pw: pupa; Pp: pupa em apólide; Pbm: adulta-farata; Re: recém emergida; Fg: forrageira.

Tabela V– Resultado do teste de correlação de Spearman R entre os perfis de expressão de genes de desaturases e de grupos de hidrocarbonetos. Valores marcados em vermelho indicam significância estatística ($p<0,05$). (-) indica correlação negativa.

Genes de desaturases	n-Alcanos	Grupos de hidrocarbonetos						
		Metil-Alcanos	diMetil-Alcanos	Ramificados	Saturados	Alcenos	Alcadienos	Insaturados
GB51238	0,600	-0,700	-0,400	-0,600	-1,000	1,000	0,975	1,000
GB48195	0,600	-0,700	-0,400	-0,600	-1,000	1,000	0,975	1,000
GB51236	0,100	0,000	-0,500	-0,100	-0,300	0,300	0,205	0,300
GB42218	0,500	-0,600	-0,200	-0,500	-0,900	0,900	0,872	0,900
GB42217	0,600	-0,700	-0,400	-0,600	-1,000	1,000	0,975	1,000
GB48193	0,700	-0,900	-0,300	-0,700	-0,900	0,900	0,975	0,900

Tabela VI– Resultado do teste de correlação de Spearman R entre os perfis de expressão de genes de elongases e de grupos de hidrocarbonetos. Valores marcados em vermelho indicam significância estatística ($p<0,05$). (-) indica correlação negativa.

Genes de elongases	n-Alcanos	Grupos de hidrocarbonetos						
		Metil-Alcanos	diMetil-Alcanos	Ramificados	Saturados	Alcenos	Alcadienos	Insaturados
GB54401	0,300	-0,400	-0,300	-0,300	-0,900	0,900	0,821	0,900
GB51249	0,600	-0,700	-0,400	-0,600	-1,000	1,000	0,975	1,000
GB53872	0,600	-0,500	-0,500	-0,600	-0,800	0,800	0,718	0,800
GB54396	0,500	-0,600	-0,200	-0,500	-0,900	0,900	0,872	0,900
GB54399	-0,500	0,700	-0,100	0,500	0,300	-0,300	-0,462	-0,300
GB45596	0,700	-0,900	-0,300	-0,700	-0,900	0,900	0,975	0,900
GB51247	0,700	-0,900	-0,300	-0,700	-0,900	0,900	0,975	0,900
GB40681	-0,600	0,300	0,600	0,600	-0,200	0,200	0,154	0,200
GB46038	0,600	-0,700	-0,400	-0,600	-0,200	0,200	0,359	0,200
GB53873	0,800	-0,900	-0,300	-0,800	-0,600	0,600	0,718	0,600

4.4. Análise evolutiva das desaturases e elongases de insetos

Todas as desaturases incluídas na análise filogenética pertencem à subfamília da Primeira Desaturase (Figura 4, Apêndice A). As desaturases se agruparam em *clusters* de acordo com a similaridade de função (posição onde é formada a insaturação no ácido graxo), sendo claro o processo de duplicação gênica para expansão desta família de enzimas nos insetos. Alguns eventos de duplicação gênica também podem ser descritos dentro de ordens específicas, como é o caso das $\Delta 11$ desaturases de Lepidoptera (Figura 15). Todas as desaturases de *A. mellifera* apresentaram maior similaridade com as $\Delta 9$ ($16>18$) desaturases.

Para as elongases foram observados dois grandes grupos (Figura 16), distintos pelo seu domínio funcional (Figura 5, Apêndice B). Três elongases de *A. mellifera* estão localizadas no *cluster* das S/MUFAs (GB53873, GB53872 e GB45596), enquanto oito estão no *cluster* das PUFAs (GB51249, GB51247, GB54401, GB54302, GB54396, GB54399, GB40681 e GB46038). Está claro, através da topologia da árvore, que estes genes, assim como os codificadores de desaturases, vêm sofrendo processos de duplicação entre os insetos desde a origem da classe e dentro de cada ordem.

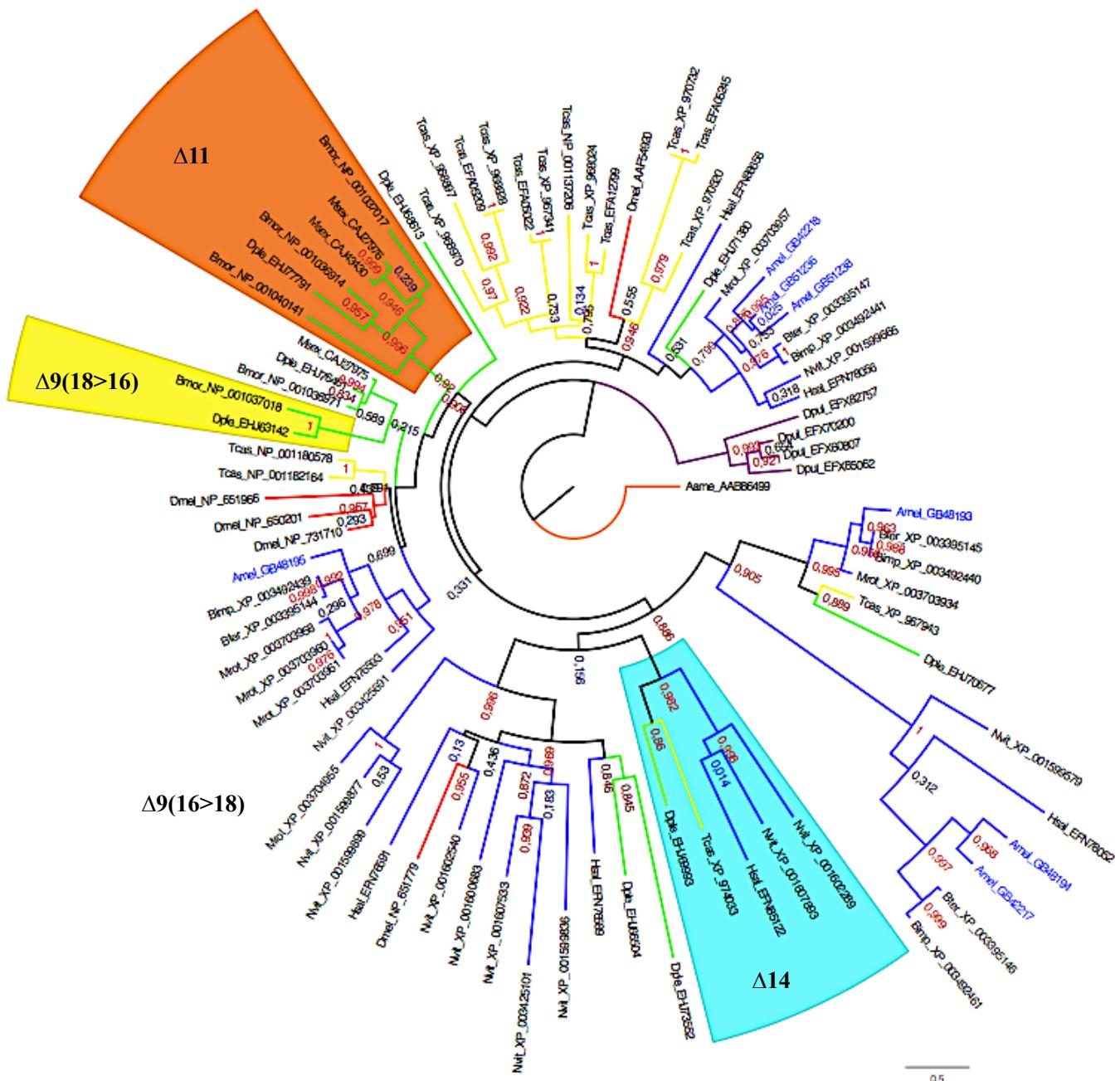


Figura 15 - Árvore filogenética das desaturases de insetos. Estas enzimas foram classificadas com base no grau de similaridade de enzimas com função conhecida. Cluster em azul apresenta maior similaridade com $\Delta 14$ desaturases; cluster em amarelo apresenta maior similaridade com $\Delta 9(18>16)$ desaturases; cluster em laranja apresenta maior similaridade com $\Delta 11$ desaturases. As demais apresentam maior similaridade com $\Delta 9(16>18)$ desaturases. Cores dos ramos: azul, Hymenoptera; vermelho, Diptera; verde, Lepidoptera; amarelo, Coleóptera; lilás, Crustacea; laranja, Chelicerata. As enzimas de *A. mellifera* estão grafadas em azul. A barra indica substituições para aquele tamanho de ramo. Os valores nos nós indicam o suporte de ramo para 500 replicações de bootstrap. Foi utilizado um padrão de nomenclatura com a primeira letra indicando o gênero e as três letras seguintes indicando a espécie, seguido do número de acesso da enzima (ver Tabela II).

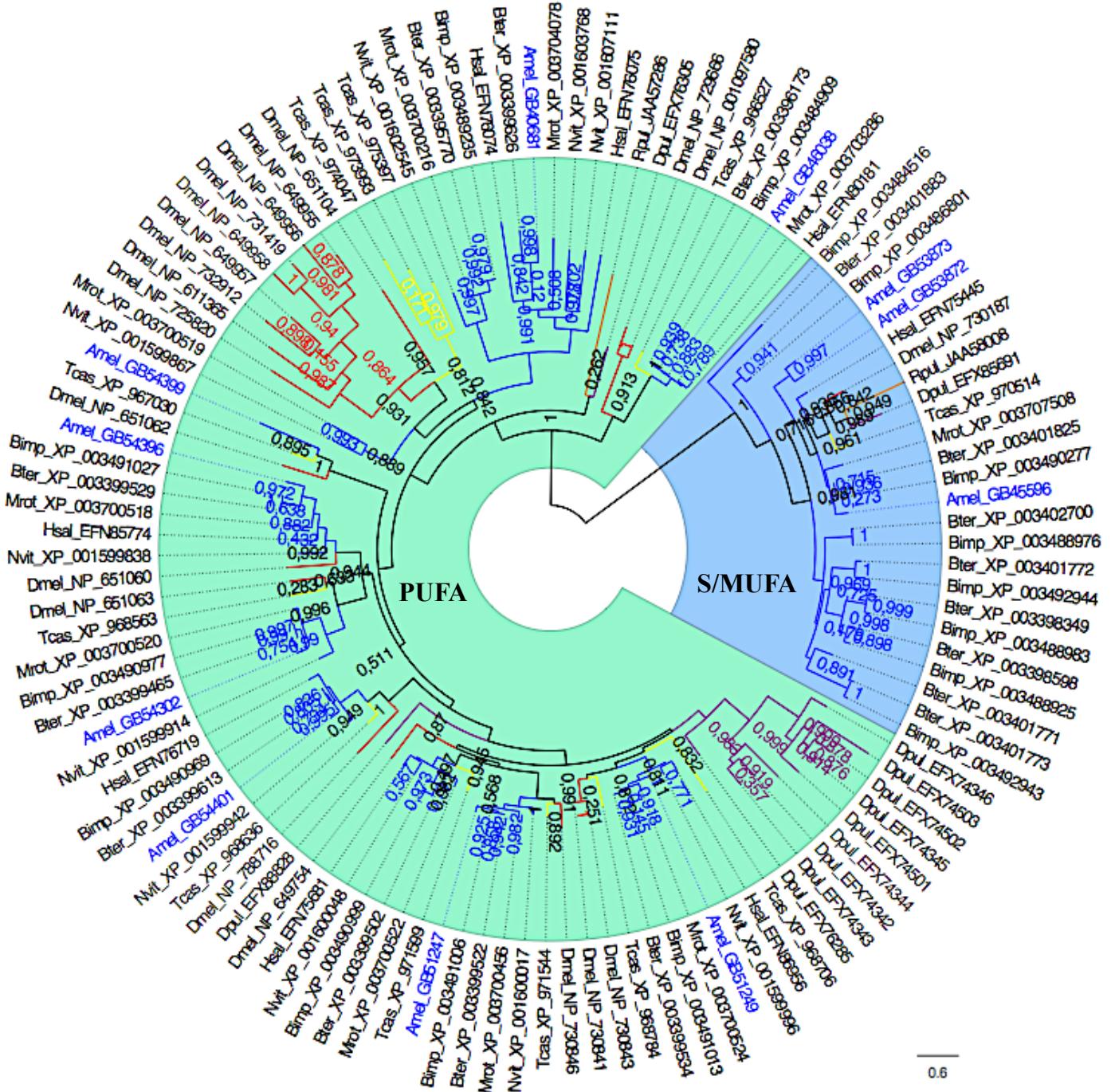


Figura 16 - Arvore filogenética das elongases de insetos. Estas enzimas foram classificadas com base em seus domínios funcionais, obtendo-se dois *clusters*: S/MUFA (área azul) e PUFA (área cinza). Cores dos ramos: azul, Hymenoptera; vermelho, Diptera; amarelo, Coleoptera; lilás, Crustaceia; laranja, Chelicerata. As enzimas de *A. mellifera* estão grafadas em azul. Valores de suporte de ramos em ALRT. A barra indica substituições para aquele tamanho de ramo. Foi utilizado um padrão de nomenclatura com a primeira letra indicando o gênero e as três letras seguintes indicando a espécie, seguido do número de acesso da enzima (ver Tabela II).

DISCUSSÃO

5. Discussão

5.1 O perfil de hidrocarbonetos cuticulares

Os hidrocarbonetos cuticulares são produzidos em um estágio para serem usados principalmente no estágio subsequente do desenvolvimento (Guo e Blomquist, 1991; Young e Schal, 1997). Os níveis destes compostos são praticamente constantes na cutícula nos estágios larval e pupal da mariposa *Spodoptera eridania*. Estes compostos são acumulados internamente no inseto (nos enócitos) antes de cada evento de muda (primeira metade de cada fase larval) para posteriormente compor a nova cutícula da fase seguinte (Guo e Blomquist, 1991), uma vez que não são reabsorvidos na muda e são utilizados na formação do envelope que recobre a cutícula (Young e Schal, 1997; Schal *et al.*, 1998). Aqui demonstramos que o perfil de hidrocarbonetos cuticulares da abelha *A. mellifera* apresenta variação quantitativa durante o processo de formação e maturação da cutícula. Este *pool* de hidrocarbonetos será utilizado para a reconhecimento na colmeia e impermeabilização da cutícula.

Os perfis de hidrocarbonetos se modificam com o avanço da diferenciação e maturação cuticular durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato até a fase adulta da abelha operária *A. mellifera*. A análise multivariada dos principais componentes revelou diferenças quantitativas significantes ($p<0,000001$) entre a cutícula pupal (fases Pw e Pp), a cutícula adulta em formação (fases Pbm, Pbd e Re) e a cutícula completamente formada (Fg).

Após sete dias de emergência da abelha, Blomquist *et al.* (1980a) verificaram um aumento na proporção de compostos saturados, contudo só foram verificados os n-alcanos, condizendo com os resultados aqui encontrados. Estes autores observaram aumento nas frações C25 e C27, e um decréscimo nas frações de C31, C31:1, C33, C33:1 e C35:1 cuticulares. Aqui não foi identificado o composto C33 e os níveis dos alcanos C25 e C27, e dos compostos insaturados na fração de C31:1 a C35:1 (ver Tabela III) tiveram aumento nas suas proporções se compararmos as forrageiras com as demais fases do desenvolvimento. Nunes *et al.* (2009) demonstraram um aumento nas frações de C27, C27:1 e C31:1 em operárias mais velhas da abelha sem ferrão *Schwarziana quadripunctata*, similar ao que estamos demonstrando em *A. mellifera* (ver Tabela III).

Kather *et al.* (2011) mostraram que o perfil de hidrocarbonetos das forrageiras consiste principalmente de n-alcanos. Estes compostos, juntamente com os alcenos (ver Figura 10), apresentaram maior proporção em forrageiras que em recém

emergidas, como aqui observado. Ainda segundo Kather *et al.* (2011), os alcenos apresentam este aumento no estágio adulto por, possivelmente, atuarem no reconhecimento intra e inter-colonial, fato já observado por Châline *et al.* (2005) e Dani *et al.* (2005), uma vez que n-alcanos são menos informativos (Blomquist *et al.*, 1980b; Krasnec e Breed, 2013). Contudo, o foco dos trabalhos quase sempre foi a função dos hidrocarbonetos como composto semioquímico, não a sua participação na formação e maturação cuticular.

Nossos resultados diferem dos de Blomquist *et al.* (1980b), onde se tratando da proporção de hidrocarbonetos cuticulares de operárias adultas, os alcanos representam cerca de 48% do total e os componentes insaturados 52%, já que aqui foram encontrados aproximadamente 70% e 30%, respectivamente, em forrageiras. Isto pode se dar pelos diferentes métodos utilizados para a verificação da posição das insaturações - aqui usamos o método de derivatização de Carlson (1989), baseado em reações com enxofre, enquanto Blomquist *et al.* (1980b) utilizaram uma técnica baseada em mercuração de compostos seguida de oxidação por grupo metóxi (metil ligado a oxigênio).

Similarmente a Blomquist *et al.* (1980b) encontramos alcenos com tamanho de cadeia de 23 a 35 átomos de carbono em abelhas adultas, porém, enquanto Blomquist *et al.* (1980b) só encontraram alcadienos de cadeias com 28, 30 e 32 átomos de carbono, aqui foram encontrados alcadienos para todos os tamanhos de cadeia entre 28 e 35 átomos de carbono.

Comparando-se com outro modelo de abelha social, *Melipona marginata*, abelhas imediatamente antes da emergência (ou ecdise) e recém-emergidas (pós-ecdise) apresentaram maiores concentrações de compostos saturados que as forrageiras, porém a concentração de compostos insaturados se mostrou maior que a dos saturados na fase de forrageira (Abdalla *et al.*, 2003).

Os resultados da literatura sobre (1) as alterações no perfil de hidrocarbonetos cuticulares em consequência de resposta imune (Richard *et al.*, 2008; Richard *et al.*, 2012), (2) a relação entre a alimentação e a incorporação de acetato marcado com ¹⁴C para integrar hidrocarbonetos seguida do acúmulo destes compostos no corpo gorduroso de larvas de Lepidoptera (Guo e Blomquist, 1991) e ninhas de *B. germanica* (Young e Schal, 1997), (3) a identificação destes hidrocarbonetos na cutícula recém sintetizada e a manutenção de seus níveis em cada fase de desenvolvimento (Guo e Blomquist, 1991; Young e Schal, 1997), somados aos

resultados aqui obtidos durante a maturação da cutícula adulta de *A. mellifera*, servem para reafirmar a ideia de que estes compostos são fundamentais para a estrutura da cutícula, seja como barreira contra perda de água e contra patógenos, seja para a comunicação química, e ainda sugerem uma cutícula informativa desde a pupa à forrageira. Outro ponto a ser ressaltado é que, de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo da evolução do perfil de hidrocarbonetos cuticulares durante o período de formação e maturação da cutícula adulta em um inseto social.

5.2. Expressão gênica de desaturases e elongases e correlação com os perfis de hidrocarbonetos no contexto de formação e maturação da cutícula adulta

Em ninfas de *B. germâника* foi estabelecida estreita associação entre a alimentação durante os ciclos de muda e a incorporação de acetato marcado com ¹⁴C em hidrocarbonetos cuticulares (Young e Schal, 1997). Durante as fases em que a larva do Lepidoptera *Trichoplusia ni* se alimenta, há intensa biossíntese de hidrocarbonetos, reduzindo somente no momento próximo à ecdise. Estes compostos não são reaproveitados e, próximo aos episódios de muda, são sintetizados *de novo* e estocados internamente para mais tarde integrar o envelope da nova cutícula (Dwyer *et al.*, 1986). Extrapolando estes resultados deduz-se que a síntese de hidrocarbonetos em ninfas de hemimetábolos e em larvas de holometábolos está diretamente relacionada à alimentação e ao processo de muda e progresso do desenvolvimento. Nossos dados mostram aumento significativo na proporção de alcanos, alcenos e alcadienos (ver Figura 10) ao final da muda imaginal. Este aumento ocorre em ausência de consumo de alimento e, provavelmente, às custas de materiais e energia estocados nos adultos-faratos.

Biologicamente, um fator que explica a correlação entre a expressão gênica e o perfil de hidrocarbonetos é o fato da biossíntese de hidrocarbonetos e seu transporte à cutícula serem regulados conjuntamente, sendo maior a quantidade de hidrocarbonetos produzidos e transportados à cutícula em estágios em que o inseto se alimenta (Dwyer *et al.*, 1986), no caso do trabalho aqui apresentado a fase adulta da abelha em relação aos estágios pupais e adultos-faratos. Entretanto, a desaturase GB51236 (ver Figura 13) e as elongases GB54401, GB54399, GB40681, GB40638 e GB53873 (ver Figura 14) não apresentaram aumento significativo na quantificação relativa de transcritos nas fases em que a abelha deve se alimentar, o que no caso de

abelhas Re pode ser explicado pelo momento da coleta, no ato da emergência da célula de cria quando a abelha ainda não se alimentou. Wang *et al.* (1982) mostrou através da incorporação de acetato marcado com ^{14}C , injetado no abdômen, que em *Musca domestica* L. a atividade das enzimas desaturases aumenta após a emergência apresentando alto índice de correlação com a síntese de alcenos.

Os genes codificadores das desaturases GB51238, GB48195, GB42218, GB42217 apresentaram elevado nível de transcritos nas operárias adultas se comparado aos demais genes de desaturases, além de alto índice de correlação positiva com os compostos insaturados, alcenos e alcadienos, tornando-os potenciais candidatos a participarem da biossíntese destes grupos de hidrocarbonetos cuticulares.

Curiosamente, nenhuma elongase apresentou correlação positiva estatisticamente significativa com os grupos de compostos saturados, incluindo os alcanos e hidrocarbonetos ramificados. As elongases que apresentaram correlação positiva significante o fizeram com grupos de compostos insaturados, incluindo os alcenos e alcadienos (ver Tabela V). Como a proporção de insaturados aumenta por meio da redução da proporção de compostos saturados, ocorre uma correlação negativa destes compostos com as elongases que aumentam seu nível de expressão na fase adulta, sugerindo que as elongases aqui estudadas podem participar da biossíntese de compostos saturados e insaturados. Os genes de elongases GB51249 e GB45596 foram os que apresentaram maior nível de transcritos e também obtiveram alto valor de correlação, sendo os melhores candidatos para testes posteriores de silenciamento para verificação de função relacionada à produção de hidrocarbonetos cuticulares.

Os aumentos nos níveis de expressão gênica das desaturases e elongases de *A. mellifera* condizem com o aumento de volume dos enóцитos e retículo endoplasmático liso em abelhas operárias recém-emergidas e forrageiras relatado por Hepburn *et al.* (1991), fortalecendo a ideia de que as enzimas aqui analisadas estão diretamente envolvidas na biossíntese destes compostos.

Variação na expressão de desaturases também foi observada em outra espécie de Hymenoptera, além da aqui caracterizada para *A. mellifera*. Larvas de rainhas e operárias da abelha *Bombus terrestris* apresentam expressão diferencial do gene codificador da enzima acil-CoA desaturase (similar à $\Delta 9$ desaturase AF417841 de *Musca domestica*). Este gene é expresso mais intensamente e mais cedo em rainhas, durante o primeiro estágio larval. Já no 4º estágio larval, a quantificação dos

transcritos é um pouco maior em operárias (Pereboom *et al.*, 2005). As desaturases, assim, afetam a produção de feromônios de acordo com a necessidade do animal (Vogel *et al.*, 2010).

A síntese e deposição dos hidrocarbonetos cuticulares têm relação com os episódios de muda regulados por ecdisteróides. Tegumentos da mosca *Sarcophaga bullata* tratados com 20-hidroxiecdisona (20E) apresentam maior capacidade de incorporação de acetato (8-9 vezes mais) em hidrocarbonetos, especialmente em torno de 22 a 26 horas após a aplicação de 20E (Armold e Regnier, 1975). A elevação nos níveis de ecdisteróides possivelmente favorece as reações de elongação da molécula de ácido graxo precursora de hidrocarbonetos. As desaturases GB51238, GB48195, GB42218, GB42217, e GB48193 (Figura 13) apresentam tendência de aumento de expressão gênica no estágio adulto, após o pico de ecdisteróides. Padrão semelhante é observado para genes envolvidos na maturação e pigmentação cuticulares (Pinto *et al.*, 2002). O aumento significante da expressão dos genes codificadores de elongases de *A. mellifera* (GB54401, Fg>Pp; GB51249 e GB51247, Fg>Pw, Pp, Pbm e Re; GB53872 e GB54396, Re>Pw, Pp, Pbm e Fg; GB45596, Fg>Pw, Pp e Pbm; GB40681, Pbm>Pw, Pp, Re e Fg; GB46038, Fg>Pbm) (Figura 14), em seguida ao pulso de ecdisteróides na fase Pp (ver Figura 3F-H) corrobora os resultados de Arnold e Regnier (1975) obtidos em *S. bullata* através de aplicação de 20E e quantificação da incorporação de acetato marcado com ^3H em hidrocarbonetos. É possível que nos casos em que a quantificação da expressão gênica apresentou-se maior em Fg e Re seja necessário um nível basal de 20E, enquanto para o gene GB40681, que tem maior expressão na fase Pbm, o início da redução dos níveis de 20E circulantes seja o suficiente.

Outros reguladores, além de 20E, têm sido relacionados à biossíntese de hidrocarbonetos. Em mariposas, feromônios dependentes da biossíntese de ácidos graxos, que se utiliza da ação de desaturases, tem seus níveis elevados após a injeção de neuropeptídio ativador da biossíntese de feromônios (*Pheromone Biosynthesis-Activating Neuropeptide*, PBAN) (Foster e Roelofs, 1996; Foster, 1998). Este neuropeptídio também tem sido relacionado ao início do processo de pigmentação da cutícula (revisado em Zitnam e Adams, 2012).

Além das desaturases e elongases aqui abordadas, outras enzimas (ou genes que as codificam) têm sido estudadas no contexto da formação e maturação da cutícula de *A. mellifera* e outros insetos.

A enzima *laccase 2*, fundamental para a pigmentação e maturação cuticular, mostrou aumento de expressão no período de maturação da cutícula em *T. castaneum* (Arakane *et al.*, 2005). Em *A. mellifera*, o nível de expressão do gene da lacase 2 aumenta conforme ocorre a formação da cutícula adulta (Elias-Neto *et al.*, 2009; 2010). A expressão do gene *th* e da respectiva proteína, com papel fundamental na maturação da cutícula, aumenta no último dia do desenvolvimento adulto-farato, sendo mantida nos adultos jovens de *Tribolium castaneum* (Gorman e Arakane, 2010).

DDC e TH, enzimas importantes para a maturação cuticular, também são importantes para a produção de hidrocarbonetos (Marican *et al.*, 2004; Wicker-Thomas e Hamann, 2008). O tratamento de fêmeas de *D. melanogaster* com um supressor de TH causa elevação nos níveis de alcenos e redução nos níveis de alcadienos e n-alcanos, sendo os dois primeiros usados como feromônio sexual por esta espécie. Moscas mutantes para *Ddc* têm seus hidrocarbonetos restaurados pela adição de dopamina e foi sugerido que os genes codificadores de DDC e TH podem estar regulando o gene codificador da enzima desatF, uma desaturase importante para a produção dos hidrocarbonetos usados como feromônios em *Drosophila*.

Os genes *ebony* e *tan*, também codificadores de enzimas importantes para a esclerotização e pigmentação da cutícula, atuantes no metabolismo de dopamina, não apresentam relação com a biossíntese de hidrocarbonetos. Sendo assim, modificações do perfil de hidrocarbonetos não são consequência de defeitos no processo de esclerotização e pigmentação (Wicker-Thomas e Hamann, 2008).

Sendo assim é coerente supor que as enzimas das vias de síntese de hidrocarbonetos cuticulares sejam reguladas por um processo paralelo, sujeito ao efeito hormonal de 20E e importante para a formação da cutícula, mais especificamente a formação do envelope.

5.3. Evolução de desaturases e elongases em Hymenoptera

As desaturases vem evoluindo por centenas de milhões de anos entre os insetos (Roelofs *et al.*, 2002), sendo responsáveis pela produção de feromônios distintos, específicos de cada espécie, servindo de atrativo sexual e impedindo a hibridização interespecífica (Liu *et al.*, 2004).

As Δ9 desaturases são comuns a todos os insetos (Roelofs e Rooney, 2003). Em lepidópteros, foi encontrado um padrão de duplicações independentes de genes

codificadores de Δ -9 e Δ -11 desaturases importantes para a produção de feromônios (Knipple *et al.*, 2002; Roelofs e Rooney, 2003; Liénard *et al.*, 2008) e que apresentam o mesmo domínio das subfamília de enzimas Primeira desaturase (Apêndice A). Apesar de serem encontradas em espécies filogeneticamente distantes, as enzimas acil-CoA Δ -11 desaturases de lepidópteros são homólogas às acil-CoA Δ -9 desaturases de outras ordens de insetos (Knipple *et al.*, 1998) indicando divergência de função posterior à separação das ordens de holometábolos, causada por eventos de duplicação gênica (Figura 15) (Liénard *et al.*, 2008).

As desaturases Δ 9(14-26) não apresentam alto grau de similaridade com as desaturases bioquimicamente já caracterizadas, normalmente relacionadas à produção de feromônios, e não formam um clado específico na árvore filogenética, além disso, as representantes de lepidópteros estão mais relacionadas às Δ 9(14-26) de dípteros que de sua própria ordem (Liu *et al.*, 2004).

Segundo Roelofs e Rooney (2003), as Δ 14 desaturases possivelmente se diversificaram antes da separação das ordens Diptera e Lepidoptera, o que é corroborado pela filogenia aqui apresentada, mostrando sequências de desaturases de himenópteros apresentando maior similaridade com Δ 14 desturases (valor de suporte de ramo = 0,982), formando um *cluster* com as desaturases representantes de lepidópteros (ver Figura 15, área azul).

Ao menos três genes (*desat1*, *desat2* e *desatF*) estão relacionados com a biossíntese de hidrocarbonetos que funcionam como feromônios usados para o reconhecimento do parceiro em *D. melanogaster* (Dallerac *et al.*, 2000). Wicker-Thomas *et al.* (2009) também relataram a ação dos genes *desat1* e *desat F* nos enócitos, indicando que a síntese de feromônios insaturados de *Drosophila* ocorre nessas células.

Enquanto *desat1* e *desat2* são originados de duplicação (Fang *et al.*, 2009), o gene *desatF* originou-se de uma única retrotransposição , sendo este o único gene desta família que não possui íntrons (Bai *et al.*, 2007). É possível que a evolução dessa família de genes tenha sido influenciada por processos de seleção sexual e adaptação ecológica (Keays *et al.*, 2011). Os dois genes Δ 9-desaturase duplicados em *tandem*, *desat1* e *desat2*, codificam produtos responsáveis pela adição da primeira dupla ligação nos precursores de ácidos graxos insaturados, construindo monoenos em moscas *D. melanogaster* de ambos os sexos. Desat1, Desat 2 e Desat F atuam sobre diferentes substratos. A ancestral Desat 1 é uma Δ 9-desaturase que introduz a

primeira dupla ligação na posição Δ9 do ácido palmítico (C16:0) para produzir Δ7-hidrocarbonetos, ou menos comumente ácido esteárico (C18:0), para gerar Δ9-hidrocarbonetos em machos e fêmeas. O gene *desat 2* também codifica uma Δ9-desaturase, que tem como substrato o ácido mirístico (C14:0) para produzir ω5-ácidos graxos e, assim como *desatF*, é expresso em fêmeas (Dallerac *et al.*, 2000).

Um problema para se construir árvores gênicas de desaturases é que suas respectivas sequências apresentam um baixo nível de homogeneidade, exceto em casos de duplicação gênica recente. Também são observados casos de possível perda de função do gene ou formação de pseudogenes (Roelofs e Rooney, 2003), entretanto, a formação de pseudogenes não pode ser destacada em árvores obtidas a partir de sequências de aminoácidos. Outro problema encontrado para a análise evolutiva destas enzimas é que as sequências preditas não necessariamente corroboram suas funções (posição específica onde a insaturação será formada) (Tripodi *et al.*, 2006), o que dificulta a análise com base na similaridade das sequências (Hashimoto *et al.*, 2008).

O extenso tempo de evolução das desaturases faz com que as taxas de substituição sejam elevadas, com muitos sítios já sobrecarregados. Genes que codificam proteínas/enzimas que interagem com ácidos graxos, através de duplicações, acumulam mutações podendo adquirir novas funções (revisado em Karanth *et al.*, 2009). O nível de conservação dessas enzimas é elevado na região que compreende os boxes de histidina, mas relativamente baixo fora dessa região, especialmente no domínio amino terminal (Knipple *et al.*, 1998). Este fato pode ser observado no Apêndice A, onde se tem o alinhamento das sequências utilizadas para a construção da árvore filogenética das desaturases de insetos. No alinhamento, a região N-terminal apresenta-se com muitos *gaps*, que são menos frequentes na região entre os *boxes* de histidina conservados.

Dados computacionais e filogenéticos podem ser usados para predizer as funções das desaturases (Roelofs e Rooney, 2003; Liu *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2004) sugerem que membros de *clusters* de desaturases que apresentam um valor de *bootstrap* no suporte do ramo $\geq 90\%$ provavelmente tem a mesma função, justificando a comparação das sequências de desaturases de Hymenoptera com outras de função já conhecida, porém a caracterização bioquímica ainda é muito importante, especialmente para o grupo das Δ10,11 desaturases, já que neste grupo pequenas diferenças nas sequências que caracterizam as funções são sutis.

Quatro genes relacionados com a função desaturase, pertencentes à subfamília Primeira Desaturase que age na formação de alcenos, tendo como alvo predito o ácido esteárico (C18:0) para formar ácido oléico (C18:1) foram previamente identificados em *A. mellifera* (Hashimoto *et al.*, 2008). Entretanto, com as atualizações nas versões da sequência genômica desta abelha (a versão 4.5 é a mais recente) e com a avaliação da expressão gênica, foi possível detectar ao menos seis membros da subfamília Primeira Desaturase (Apêndice A) e suas sequências apresentaram maior similaridade (testada por BLASTP) com $\Delta 9(16>18)$ desaturases. Apenas sequências de aminoácidos de desaturases de lepidópteros apresentaram maior similaridade com $\Delta 11$ desaturases. Esses dados não excluem a possibilidade de enzimas de himenópteros também realizarem essa função, porém, caso o fizerem, seria provavelmente através de um processo evolutivo convergente e paralelo.

As elongases também podem afetar o comportamento sexual de uma espécie, como demonstrado por Chertemps *et al.* (2007) ao estudar o gene *elo F* de *D. melanogaster*. Fêmeas submetidas ao silenciamento deste gene mediado por RNAi se tornavam menos atraentes para os machos. Efeito contrário foi observado em machos que sofreram indução da expressão de *elo F* tornando-os atraentes para outros machos. A ação desta enzima é importante para a elongação de dienos resultantes da reação catalisada por Desat F.

Foram previamente identificados em *A. mellifera* dois genes codificadores de elongases da subfamília S/MUFA, com função na síntese de alkanos e alcenos, e quatro da subfamília PUFA, com função de elongação da cadeia dos compostos poliinsaturados (Hashimoto *et al.*, 2008). Porém, utilizando-se a versão mais atual do genoma (versão 4.5) e a análise do perfil de expressão gênica, foi possível detectar três membros da subfamília S/MUFA e oito da subfamília PUFA (Figura 14, Figura 16, Apêndice B).

Os eventos de duplicação podem gerar dois ou mais genes, similares ou não, com as mesmas funções, funções similares ou funções divergentes (revisado em Sankoff, 2001). Variedade de duplicações foi encontrada para as desaturases dos insetos, como previamente abordado por Roelofs e Rooney (2003) e Fang *et al.* (2009). Na análise filogenética de famílias de enzimas codificadas por múltiplos genes de espécies proximamente relacionadas, as sequências se agruparão em *clusters* ordenados por tipo de enzima ou proteína, ou gene, ou ainda pela ordem das duplicações, mas não por espécies (Roelofs e Rooney, 2003).

As desaturases GB51238, GB48195 e GB42217, com elevado nível de expressão nas operárias de *A. mellifera* adultas e correlação positiva significativa com alcenos e alcadienos, além de correlação negativa com os compostos saturados, apresentaram, assim como as demais desaturases de *A. mellifera* analisadas, maior similaridade com as $\Delta 9(16>18)$ desaturases. Porém é possível que ao menos uma delas tenha função de formar a segunda insaturação como ocorre no caso da enzima desat F em *D. melanogaster* (Dallerac *et al.*, 2000) favorecendo, no caso de *A. mellifera*, a formação de diferentes hidrocarbonetos para a comunicação química.

As duas elongases mais expressas no estágio adulto (GB51249 e GB45596) são duas das três elongases que apresentaram alto índice de correlação positiva com os alcadienos, porém a primeira foi agrupada no grande *cluster* de PUFAs e a segunda no *cluster* das S/MUFAs, indicando uma relação de ação sequencial no substrato, com GB45596 aumentando a cadeia de carbono de hidrocarbonetos saturados e monoinsaturados, estes servindo de substrato para a ação da enzima codificada por GB51249 para produção de alcadienos. A expressão do GB51247, que codifica outra elongase, apresentou alto índice de correlação com alcadienos e esta enzima se agrupou com as PUFAs, porém, apesar da diferença estatística significante entre Fg e os estágios pupais e adulto farato, o nível de expressão do gene GB51247 foi baixo, exigindo cautela ao realizarmos inferências sobre sua função no processo de biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares.

A expressão dos genes de elongases GB54401 e GB54396 mostrou correlação negativa com o grupo de compostos saturados e positiva com os alcenos. Enquanto GB54401 apresentou maior expressão ($p > 0,05$) em Fg comparando-se a Pp, GB54396 apresentou maior quantificação de transcritos em Re comparando-se às demais fases do desenvolvimento analisadas (Pw, Pp, Pbm e Fg). A expressão do gene GB53873 mostrou correlação negativa significativa com metil-alcanos. Não houve diferença significativa de expressão deste gene durante as fases do desenvolvimento abordadas, não nos permitindo fazer qualquer tipo de inferência de acordo com seu posicionamento no *cluster* S/MUFA de elongases.

Dentro do contexto de formação e maturação da cutícula adulta, propomos um modelo de biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares (Figura 17). Sendo assim, as enzimas utilizadas no modelo proposto se apresentam como melhores candidatas para estudos posteriores de silenciamento gênico para verificação de sua função na biossíntese dos hidrocarbonetos.

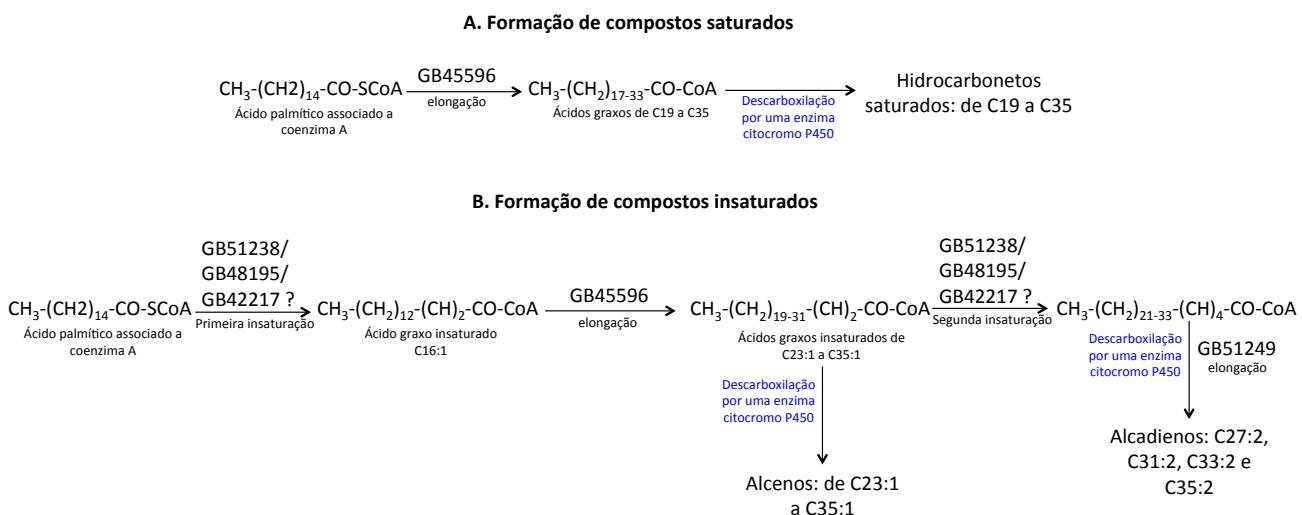


Figura 17 - Possível via de biossíntese dos hidrocarbonetos cuticulares em *A. mellifera* levando-se em consideração o nível de expressão gênica, a correlação da expressão dos genes com o perfil de hidrocarbonetos e a posição nas árvores geradas pelas análises evolutivas. Os hidrocarbonetos das vias foram sugeridos com base na Tabela III.

A. Formação de hidrocarbonetos saturados. Partindo-se de um ácido palmítico associado à coenzima A e previamente formado por elongação, a cadeia continua a ser elongada, formando os hidrocarbonetos saturados que apresentam de 19 a 35 átomos de carbono.

B. Formação de hidrocarbonetos insaturados. Partindo-se da maior semelhança das desaturases aqui estudadas com as $\Delta 9(16>18)$ desaturases, três das enzimas desta classe apresentam-se como opção para formar a Primeira e Segunda insaturação, enquanto os compostos monoinsaturados seriam elongados pela enzima codificada pelo gene GB45596 e os diinsaturados pela enzima codificada pelo gene GB51249. Ao fim de todo o processo é necessário que haja descarboxilação da cadeia de ácido graxo para formar um hidrocarboneto.

Elias-Neto (2012) propôs a hipótese de abelhas sociais e solitárias apresentarem diferenças de *timing* na maturação da cutícula adulta, uma vez que as abelhas sociais passam mais tempo na colônia e demoram mais a iniciar a atividade de forrageamento, além de emergirem com a cutícula menos pigmentada e esclerotizada se comparada à da forrageira, enquanto as abelhas solitárias emergem prontas para o contato com o ambiente externo. Os perfis de hidrocarbonetos e de expressão gênica aqui apresentados fortalecem esta hipótese mostrando o aumento na proporção de n-alcanos e hidrocarbonetos insaturados e da expressão de genes potencialmente envolvidos na biossíntese destes compostos, nas forrageiras em comparação com as recém-emergidas. É nosso objetivo investir em análises comparativas de transcriptomas e perfis de hidrocarbonetos cuticulares de abelhas sociais e solitárias, os quais poderão aprofundar nossa compreensão evolutiva e funcional sobre a formação e maturação da cutícula adulta.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

1. A análise quantitativa dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares de operárias *A. mellifera* separou com elevado nível de significância estatística ($p<0,000001$) todas as fases do desenvolvimento estudadas, representando cutículas específicas dos estágios pupal e adulto, ou cutículas em processo de síntese e deposição do período adulto-farato. A proporção de n-alcanos e compostos insaturados se elevam com a maturação da cutícula sugerindo que contribuem para sua estrutura;
2. A análise qualitativa dos perfis de hidrocarbonetos não revelou variação significante durante o período de formação e maturação da cutícula adulta;
3. Os genes codificadores de desaturases e elongases diferencialmente expressos apresentaram aumento significativo de transcritos após a ocorrência do pico de ecdisteróides que desencadeia o processo de formação e maturação da cutícula adulta, sugerindo regulação da expressão destes genes pelos hormônios da muda;
4. A filogenia molecular mostrou que as desaturases e elongases vêm sofrendo processos de duplicação gênica durante o curso evolutivo e formam *clusters* comuns aos himenópteros e a outras ordens de insetos holometábolos;
5. Os dados permitem inferir que as desaturases codificadas pelos genes GB51238, GB48195 e GB42217 têm função análoga à da enzima Desat F de *Drosophila*, catalisando uma segunda insaturação no ácido graxo nascente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- Abdalla, F. C.; Jones, G. R.; Morgan, E. D.; Cruz-Landim, C. (2003). Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Genetics and Molecular Research* 2, 191-199.
- Aitchison, J. (1986). The statistical analysis of compositional data. London: Chapman & Hall.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Andersen, S.O. (2010). Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 166-178.
- Anisimova, M.; Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Systematic Biology* 55, 539-552.
- Arakane, Y.; Muthukrishnan, S.; Beeman, R. W.; Knost, M. R.; Kramer, K. J. (2005). *Laccase 2* is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 11337-11342.
- Arakane, Y.; Lomakin, J.; Beeman, R. W.; Muthukrishnan, S.; Gehrke, S. H.; Kanost, M. R.; Kramer, K. J. (2009). Molecular and functional analyses of amino acids decarboxylases involved in cuticle tanning in *Tribolium castaneum*. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 16584-16594.
- Armold, M. T.; Regnier, F. E. (1975). Stimulation of hydrocarbon biosynthesis by ecdysterone in the flesh fly *Sarcophaga bullata*. *Journal of Insect Physiology* 21, 1581-1586.
- Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1995). Short protocols in Molecular Biology. 3.ed. Wiley, U.S.A.
- Bai, Y.; Casola, C.; Feschotte, C.; Betrán, E. (2007). Comparative genomics reveals a constant rate of origination and convergent acquisition of functional retrogenes in *Drosophila*. *Genome Biology* 8, R11.
- Bai, H.; Palli, S.R. (2010). Functional characterization of bursicon receptor and genome-wide analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi. *Developmental Biology* 344, 248-258.
- Billeter, J.-C.; Atallah, J.; Krupp, J. J.; Millar, J. G.; Levine, J. D., (2009). Specialized cells tag sexual and species identity in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 461, 987-992.
- Blomquist, G. J. (2010). Structure and analysis of insect hydrocarbons. In G. J. Blomquist e A. G. Bagnères (Ed.), *Insect Hydrocarbons*. p. 19-34. Cambridge University Press, New York.

Blomquist, G. J.; Bagnères, A. G. (2010). Introduction: history and overview of insect hydrocarbons. In G. J. Blomquist e A. G. Bagnères (Ed.), *Insect Hydrocarbons*. p. 3-18. Cambridge University Press, New York.

Blomquist, G. J.; Chu, A. J.; Remaley, S. (1980a). Biosynthesis of wax in the honeybee *Apis mellifera* L. *Insect Biochemistry* 10, 313-321.

Blomquist, G. J.; Howard, R. W.; McDaniel, C. A.; Remaley, S.; Dwyer, L. A.; Nelson, D. R., (1980b). Application of methoxymercurcation-demercuration followed by mass spectrometry as a convenient microanalytical technique for double-bond location in insect-derived alkenes. *Journal of Chemical Ecology* 6, 257-269.

Blomquist, G. J.; Jurenka, R.; Schal, C.; Tittiger, C. (2012). Pheromone production: biochemistry and molecular biology. In L. I. Gilbert (Ed.), *Insect Endocrinology*. p. 523-567. Elsevier Academic Press.

Blum, M. S. (1987). Biosynthesis of arthropod exocrine compounds. *Annual Review of Entomology* 32, 381-413.

Breed, M. D. (1983). Nestmate recognition in honey bees. *Animal Behavior* 31, 86-91.

Breed, M. D.; Butler, L.; Stiller, T. M. (1985). Kin discrimination by worker honey bees in genetically mixed groups. *Proceedings of the National Academy of Science* 82, 3058-3061.

Carlson, D. A. (1989). Dimethyl disulfide derivates of long chain alkenes, alkadienes, and alkatrienes for gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 61, 1564–1571.

Cassier, P.; Lensky, Y. (1995). Ultrastructure of the wax gland complex and secretion of beeswax in the worker honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie* 26, 17-26.

Châline, N.; Sandoz, J. C.; Martin, S. J.; Ratnieks, F. L. W.; Jones, G. R., (2005). Learning and discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honeybees (*Apis mellifera*). *Chemical Senses* 30, 327-335.

Chaudhari, S.S.; Arakane, Y.; Specht, C.A.; Moussian, B.; Boyle, D.L.; Park, Y.; Kramer, K.J.; Beerman, R.W.; Muthukrishnan, S. (2011). Knickkopf protein protects and organizes chitin in the newly synthesized insect exoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 17028-17033

Cheesbrough, T. M.; Kolattukudy, P. E. (1984). Alkane biosynthesis by decarbonylation of aldehydes catalyzed by a particulate preparation from *Pisum sativum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 6613-6617.

Chernenko, A.; Holman, L.; Helanterä, H.; Sundström, L. (2012). Cuticular chemistry of males and females in the ant *Formica fusca*. *Journal of Chemical Ecology* 38, 1474-1482.

- Chertemps, T.; Duportets, L.; Labeur, C.; Ueda, R.; Takahashi, K.; Saigo, K.; Wicker-Thomas, C. (2007). A female-biased expressed elongase involved in long-chain hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 4273-4278.
- Chertemps, T.; Duportets, L.; Labeur, C.; Ueyama, M.; Wicker-Thomas, C. (2006). A female-specific desaturase gene responsible for diene hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology* 15, 465-473.
- Chevenet, F.; Brun, C.; Bañuls, A> L.; Jacq, B.; Christen, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7:439.
- Chino, H.; Katase, H.; Downer, R. G. H.; Takahashi, K. (1981). Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the American cockroach: purification, characterization, and function. *Journal of Lipid Research* 22, 7-15.
- Chino, H.; Kitazawa, K. (1981). Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the locust and some insects. *Journal of Lipid Research* 22, 1042-1052.
- Cook, H.W.; McMaster, C.R. (2002). Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In Vance D.E.; Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. p. 181-204. Elsevier.
- Cuvilier-Hot, V.; Gadagkar, R.; Peeters, C.; Cobb, M. (2002). Regulation of reproduction in a queenless ant: aggression, pheromones and reproduction in conflict. *Proceedings of The Royal Society B* 269, 1295-1300.
- D'Ettorre, P.; Heinze, J.; Schulz, C.; Francke, W.; Ayasse, M. (2004). Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbon signal in the ant *Pachycondyla inversa*. *The Journal of Experimental Biology* 207, 1085-1091.
- Dallerac, R.; Labeur, C.; Jallon, J. M.; Knipple, D. C.; Roleofs, W. L. (2000). A $\Delta 9$ desaturase gene with a different substrate specificity is responsible for the cuticular diene hydrocarbon polymorphism in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 9949-9954.
- Dani, F. R.; Jones, G. R.; Corsi, S.; Beard, R.; Pradella, D.; Turillazzi, S. (2005). Nestmate recognition cues in the honey bee: Differential importance of cuticular alkanes and alkenes. *Chemical Senses* 30, 477-489.
- Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27, 1164-1165.
- Davis, M.M.; O'Keefe, S.L.; Primrose, D.A.; Hodgetts, R.B. (2007). A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. *Development* 134, 4395-4404.

- Dereeper, A.; Guignon, V.; Blanc, G.; Audic, S.; Buffet, S.; Chevenet, F.; Dufayard, J. F.; Guindon, S.; Lefort, V.; Lescot, M.; Claverie, J. M.; Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acid Research* 36, 465-469.
- Diehl, P. A., (1973). Praffin synthesis in the oenocytes of the Desert Locust. *Nature* 243, 468-470.
- Dillwith, J. W.; Blomquist, G. J.; Nelson, D. R. (1981). Biosynthesis of the hydrocarbon componentes of the sex pheromone of the housefly, *Musca domestica* L. *Insect Biochemistry* 11, 247-253.
- Dwyer, L. A.; Zamboni, A. C.; Blomquist, G. J. (1986). Hydrocarbon accumulation and lipid biosynthesis during larval development in the cabbage lopper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry* 16, 463-469.
- Elias-Neto, M.; Soares, M. P. M.; Bitondi, M. M. G. (2009). Changes in integument structure during the imaginal molt of the honey bee. *Apidologie* 40, 29-39.
- Elias-Neto, M; Soares, M. P. M.; Simões, Z. L. P.; Hartfelder, K.; Bitondi, M. M. G. (2010). Developmental characterization, function and regulation of a Laccase2 encoding gene in the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 241-251.
- Elias-Neto, M. (2012). Diferenciação do exoesqueleto em abelhas eussociais: heterocronia da maturação cuticular. 82 p. Tese-Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Fan, Y.; Chase, J.; Sevala, V. L.; Schal, C. (2002). Lipophorin-facilitated hydrocarbon uptake by oocytes in the German cockroach *Blattella germanica* (L.). *The Journal of Experimental Biology* 205, 781-790.
- Fan, Y.; Zurek, L.; Dykstra, M. J.; Schal, C. (2003). Hydrocarbons synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German Cockroach, *Blattella germanica*. *Naturwissenschaften* 90, 121-126.
- Fang, S.; Ting, C. T.; Lee, C. R.; Chu, K. H.; Wang, C. C.; Tsaur, S. C. (2009). Molecular evolution and functional diversification of fatty acid desaturases after recurrent gene duplication in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 26, 1447-1456.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17, 368-376.
- Ferreira-Caliman, M. J.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C.; Mateus, S.; Lopes, N. P.; Zucchi, R. (2010). The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *Journal of Insect Physiology* 56, 800-804.
- Ferveur, J. F. (2005). Cuticular hydrocarbons: Their evolution and roles in *Drosophila*

pheromonal communication. *Behavior Genetics* 35, 279-295.

Foley, B.; Chenoweth, S. F.; Nuzhdin, S. V.; Blows, M. W. (2007). Natural genetic variation in cuticular hydrocarbon expression in male and female *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 175, 1465-1477.

Foster, , S. P. (1998). Sex pheromone biosynthesis in the tortricid moth *Planotortrix excessana* (Walker) involves chain-shortening of palmitoleate an oleate. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 37, 158-167.

Foster, S. P.; Roelofs, W. L. (1996). Sex pheromone biosynthesis in tortricid moth, *Ctenopseustis herana* (Felder & Rogenhofer). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32, 135-147.

Gibbs, A. G. (1998). Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist* 38, 471-482.

Gibbs, A. G. (2002). Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal of Insect Physiology* 48, 391-400.

Gibbs, A.; Pomonis, J. G. (1995). Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112B, 243-249.

Gleason, J. M.; James, R. A.; Wicker-Thomas, C.; Ritchie, . G. (2009). Identification of quantitative trait loci function through analysis of multiple cuticular hydrocarbons differing between *Drosophila simulans* e *Drosophila schellia* females. *Heredity* 103, 416-424.

Gorman, M. J.; Arakane, Y. (2010). Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 267-273.

Guindon, S.; Dufayard, J. F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59, 307-321.

Guo, L. e Blomquist, G. J. (1991). Identification, accumulation, and biosynthesis of the cuticular hydrocarbons of the southern armyworm, *Sophocerota eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 16, 19-30.

Hao, G.; O'Connor, M.; Liu, W.; Roelofs, W. L. (2002). Characterization of Z/E11- and Z9-desaturases from the obliquebanded leafroller moth, *Choristoneura rosaceana*. *Journal of Insect Science* 2:26.

Hashimoto, K.; Yoshizawa, A. C.; Okuda, S.; Kuma, K.; Goto, S.; Kanehisa, M. (2008). Ther repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *Journal of Lipid Research* 49, 2008.

- Hepburn, H. R. (1985). Structure of the integument. In: G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology*. Vol. 3, p. 1-58. Pergamon Press, Oxford, U.K.
- Hepburn, H. R.; Bernard R. F. T.; Davidson, B. C.; Muller, W. J.; Lloyd, P.; Kurstjens, S. P.; Vincent, S. L. (1991). Synthesis and secretion of beeswax in honeybees. *Apidologie* 22, 21-36.
- Holman, L.; Linksvayer, T. A.; d'Ettorre, P. (2013). Genetic constraints on dishonesty and caste dimorphism in an ant. *The American Naturalist* 181, 161-170.
- Howard, R. W.; Blomquist, G. J., (2005). Ecological, behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* 50, 371-393.
- Hübschmann, H.J. (2009). *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*. 2^a ed. 737 p. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, Weinheim.
- Karanth, S.; Lall, S.; Denovan-Wright, E.M.; Wright, J.M. (2009). Differential transcriptional modulation of duplicated acid-biding protein genes by dietary fatty acids in zebrafish (*Danio rerio*): evidence for subfunctionalization or neofunctionalization of duplicated genes. *BMC Evolutionary Biology* 9:219.
- Kather, R.; Drijfhout, F. P.; Martin, S. J. (2011). Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology* 37, 205-212.
- Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Hefetz, A. (1997). The biosynthesis of Dufour's gland constituents in queens of the honeybee (*Apis mellifera*). *Invertebrate Neuroscience* 3, 239-243.
- Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Hefetz, A. (2000). Plasticity in caste-related secretion biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 46, 993-998.
- Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K.; Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30, 3059-3066.
- Katoh, K.; Kuma, K.; Toh, H.; Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33, 511-518.
- Keays, M. C.; Barker, D.; Wicker-Thomas, C.; Ritchie, M. G. (2011). Signatures of selection and sex-specific expression variation of a novel duplicate during evolution of the *Drosophila* desaturase gene family. *Molecular Ecology* 20, 3617-3630.
- Klowden, M. (2007). *Physiological Systems in Insects*. 2^a ed. 415 p. Academic Press, Amsterdam.
- Knipple, D. C.; Rosenfield, C. L.; Miller, S. J.; Liu, W.; Tang, J.; Ma, P. W. K.; Roelofs, W. L. (1998). Cloning and functional expression of a cDNA encoding a pheromone gland-specific acyl-CoA Δ11-desaturase of the cabbage looper moth,

Trichoplusia ni. Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 15287-15292.

Knipple, D. C.; Rosenfield, C. L.; Nielsen, R.; You, K. M.; Jeong, S. E. (2002). Evolution of the integral membrane desaturase gene family in moths and flies. *Genetics* 162, 1737-1752.

Kolattukudy, P. E. (1966). Biosynthesis of wax in *Brassica oleracea*. *Biochemistry* 5, 2265-2275.

Kolattukudy, P. E. (1968a). Biosynthesis of surface lipids. *Science* 159, 498-505.

Kolattukudy, P. E. (1968b). Further evidence for an elongation-decarboxylation mechanism in the biosynthesis of paraffins in leaves. *Plant Physiology* 43, 375-383.

Kramer, J.K.; Dziadik-Turner, C.; Koga, D. (1985). Chitin metabolism in insects. In G. A. Kerkut e L. I. Gilbert (Ed.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 3 (pp 75-115). Pergamon Press, Oxford.

Krasnec, M. O.; Breed, M. D. (2013). Colony-specific cuticular hydrocarbon profile in *Formica argentea* ants. *Journal of Chemical Ecology* 39, 59-66.

Le, S.Q.; Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1307-1320.

Legendre, A.; Miao, X X.; Da Lage, J. L.; Wicker-Thomas, C. (2008). Evolution of a desaturase involved in female pheromonal cuticular hydrocarbons biosynthesis and courtship behavior in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 244-255.

Liénard, M. A.; Strandh, M.; Hedenström, E.; Johansson, T.; Löfstedt, C. (2008). Key biosynthetic gene subfamily recruited for pheromone production prior to the extensive radiation of Lepidoptera. *BMC Evolutionary Biology* 8, 270.

Liu, W.; Ma, P. W. K.; Marsella-Herrick, P.; Rosenfield, C. L.; Knipple, D. C.; Roelofs, W. (1999). Cloning and functional expression of a cDNA encoding a metabolic acyl-CoA Δ9-desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 435-443.

Liu, W.; Rooney, A. P.; Xue, B.; Roelofs, W. L. (2004). Desaturases from the spotted fireworm moth (*Choristoneura paralela*) shed light on the evolutionary origins of novel moth sex pheromone desaturases. *Gene* 342, 303-311.

Lobo, C.H. (2009). Determinantes moleculares do polietismo sequencial em *Apis mellifera*. 130 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Locke, M. (1961). Pore canals and related structures in insect cuticle. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 10, 589-618.

Locke, M. (2001). The Wigglesworth lecture: Insects for studying fundamental

- problems in biology. *Journal of Insect Physiology* 47, 495-507.
- Locke, M.; Huie, P. (1979). Apolysis and the turnover of plasma membrane plaques during cuticle formation in an insect. *Tissue & Cell* 11, 277-291.
- Locke, M.; Krishnan, N. (1971). The distribution of phenoloxidases and polyphenols during cuticle formation. *Tissue & Cell* 3, 103-126.
- Lockey, K. H. (1991). Insect hydrocarbon classes: implications for chemotaxonomy. *Insect Biochemistry* 21, 91-97.
- Lourenço, A. P.; Mackert, A.; Cristino, A. S.; Simões, Z. L. P. (2008). Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39, 372-385.
- Luo, C. W.; Dewey, E. M.; Sudo, S.; Ewer, J.; Hsu, S. Y.; Honegger, H. W.; Hsueh, A. J. W. (2005). Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 2820-2825.
- Marican, C.; Duportets, L.; Birman, S.; Jallon, J. M. (2004). Female-specific regulation of cuticular hydrocarbon biosynthesis by dopamine in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 823-830.
- Martin, S.; Drijfhout, F. (2009). A review of ant cuticular hydrocarbons. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 1151-1161.
- Martin, S. J.; Shemilt, S.; Drijfhout, F. P. (2012). Effect of time on colony odour stability in the ant *Formica exsecta*. *Naturwissenschaften* 99, 327-331.
- Michelette, E.R.F.; Soares, A.E.E. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24, 431-440.
- Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees*. 404 p. Harvard University Press, Massachusetts.
- Moussian, B. (2010). Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 363-375.
- Nation, J. L.; Sanford, M. T.; Milne, K. (1992). Cuticular hydrocarbons from *Varroa jacobsoni*. *Experimental & Applied Acarology* 16, 331-344.
- Nunes, T. M.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C.; Lopes, N. P.; Zucchi, R. (2008). Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guardacceptance? *Animal Behaviour* 75, 1165-1171.
- Nunes, T. M.; Turatti, I. C. C.; Mateus, S.; Nascimento, F. S.; Lopes, N. P.; Zucchi, R. (2009). Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age.

Genetics and Molecular Research 8, 589-595.

Pereboom, J. J. M.; Jordan, W. C.; Sumner, S.; Hammond, R. L.; Bourke, A. F. G. (2005). Differential gene expression in queen-worker caste determination in bumblebees. *Proceedings of the Royal Society B* 272, 1145-1152.

Piek, T. (1964). Synthesis of wax in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 10, 563-572.

Pinto, L. Z.; Hartfelder, K.; Bitondi, M. M. G.; Simões, Z. L. P. (2002). Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *Journal of Insect Physiology* 48, 783-790.

Qiu, Y.; Tittiger, C.; Wicker-Thomas, C.; Goff, G.L.; Young, S.; Wajnberg, E.; Fricaux, T.; Taquet, N.; Blomquist, G.J.; Feyereisen, R. (2012). An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science* 109, 14858-14863.

Rambaut, A. (2009). Institute of Evolutionary Biology – University of Edinburgh. Acesso em: 02 mar 2012. Disponível em : <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>.

Ramsay, J. A. (1935). The evaporation of water from the cockroach. *Journal of Experimental Biology* 12, 373-383.

Reed, J. R.; Quilici, D. R.; Blomquist, G. J.; Reitz, R. C. (1995). Proposed mechanism for the cytochrome P450-catalyzed conversion of aldehydes to hydrocarbons in the house fly, *Musca domestica*. *Biochemistry* 34, 16221-16227.

Reed, J. R.; Vanderwel, D.; Choi, S.; Pomonis, J. G.; Reitz, R. C.; Blomquist, G. J. (1994). Unusual mechanism of hydrocarbon formation in the housefly: Cytochrome P450 converts aldehyde to the sex pheromone component (Z)-9-tricosene and CO₂. *Proceedings of the National Academy of Science* 91, 10000-10004.

Richard, F. J.; Aubert, A.; Grozinger, C. M. (2008). Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology* 6, 50.

Richard, F. J.; Holt, H. L.; Grozinger, C. M. (2012). Effects of immunostimulation on social behavior, chemicar communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 13, 558.

Riddiford, L. M. (1976). Hormonal control of insect epidermal cell commitment *in vitro*. *Nature* 259, 115-117.

Riddiford, L.M. (1985). Hormone action at the cellular level. In: G.A. kerkut, Gilbert, L.I., (Eds.). Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Vol 8. p. 2-84. Pergamon, Oxford.

Roelofs, W. L.; Liu, W.; Hao, G.; Jiao, H.; Rooney, A. P.; Jr. Linn, C. E. (2002). Evolution of moth sex pheromones via ancestral genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13621-13626.

- Roelofs, W. L.; Rooney, A. P. (2003). Molecular genetics an evolution of pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Science* 100, 9179-9184.
- Ruvolo, M. C. C.; Cruz-Landim, C. (1993). Morphology and morphometric aspects of oenocytes of *Apis mellifera* queens and workers in different phases of life. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88, 387-395.
- Ryan, R. O.; Van der Horst, D. J. (2000). Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annual Review of Entomology* 45, 233-260.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sankoff, D. (2001). Gene and genome duplication. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 681-684.
- Schal, C.; Fan, Y. Bomquist, G. J. (2003). Chapter 10 - Regulation of pheromone biosynthesis, transport, and emission in cockroaches. In: Blomquist, G. J.; Vogt, R. G. (Org.). Insect pheromone biochemistry and molecular biology: the biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles. p. 304. Elsevier, Amsterdam; Boston; Heidelberg; London; New York; Oxford; Paris; San Diego; Singapore; Sydney; Tokyo.
- Schal, C.; Sevala, V. L.; Young H. P.; Bachmann, J. A. S., (1998). Sites of Synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: cuticle and ovary as target tissues. *American Zoologist* 38, 383-393.
- Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols* 3, 1101-1108.
- Seeley, T. D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 11, 287–293.
- Serra, M.; Pinà, B.; Abad, J. L.; Camps, F.; Fabriàs, G. (2007). A multifunctional desaturase involved in the biosynthesis of the processionary moth sex pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 16444-16449.
- Sevala, V. L.; Bachmann, J. A. S.; Schal, C. (1997). Lipophorin: A hemolymph juvenile hormone binding protein in the german cockroach, *Blattella germanica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 663-670.
- Shanklin, J.; Guy, J. E.; Mishra, G.; Lindqvist, Y. (2009). Desaturases: emerging models for understanding functional diversification of diiron-containing enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 284, 18559-18563.
- Shanklin, J.; Whittle, E.; Fox, B. G. (1994). Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme stearoyl-CoA desaturase and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33,

12787-12794.

Shapiro, J. R. (1988). Lipid transport in insects. *Annual Review of Entomology* 33, 297-318.

Singer, T. L. e Espelie, K. E. (1992). Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. *Animal Behavior* 44, 63-68.

Singer, T. L. (1998). Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *American Zoologists* 38, 394-405.

Smith, W.; Rybczynski, R. (2012). Prothoracicotrophic hormone. In: L.I. Gilbert (Ed.). *Insect Endocrinology*. p. 1-62. Academic Press, Amsterdam; Boston; Heidelberg; London; New York; Oxford; Paris; San Diego; San Francisco; Singapore; Sydney; Tokyo.

Soares, M. P. M.; Silva-Torres, F. A.; Elias-Neto, M.; Nunes, F. M. F.; Simões, Z. L. P.; Bitondi, M. M. G. (2011). Ecdysteroid-dependent expression of the *Tweedle* and *Peroxidase* genes during adult cuticle formation in the honey bee, *Apis mellifera*. *PLOS One* 6, e20513.

Soares, M.P.M. (2012). Genes cuticulares diferencialmente expressos durante eventos da metamorfose de *Apis mellifera*. 158 p. Tese -Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Solomons, T. W. G.; Fryhle, C.B.(2005). *Química Orgânica*. Vol. 1. 8^a ed. 715 p. LTC, Rio de Janeiro.

Song, Q. (2012). Bursicon, a neuropeptide hormone that controls cuticle tanning and wing expansion. In L.I. Gilbert (Ed.). *Insect Endocrinology*. p. 93-105. Academic Press, Amsterdam; Boston; Heidelberg; London; New York; Oxford; Paris; San Diego; San Francisco; Singapore; Sydney; Tokyo.

Sperling, P.; Ternes, P.; Zank, T. K.; Heinz, E. (2003). The evolution of desaturases. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68, 73-95.

Tannure-Nascimento, I. C.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C.; Lopes, N. P.; Trigo, J. R.; Zucchi, R. (2007). Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbon profile in a Neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera, Vespidae). *Genetics and Molecular Research* 6, 390-396.

Thomas, M. L. e Simmons, L. W. (2011). Crickets detect the genetic similarity of mating partners via cuticular hydrocarbons. *Journal of Evolutionary Biology* 24, 1793-1800.

Tripodi, K. E. J.; Buttiglieri, L. V.; Altabe, S. G.; Uttaro, A. D. (2006). Functional characterization of front-end desaturases from trypanosomatids depicts the first polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway from a parasitic protozoan. *The*

Federation of European Biochemical Societies Journal 273, 271-280.

True, J. R.; Edwards, K. A.; Yamamoto, D.; Carroll, S. B. (1999). *Drosophila* wing melanin patterns form by vein-dependent elaboration of enzymatic prepatterns. *Current Biology* 9, 1382-1391.

Van Zweden, J. S., D'Ettorre P. (2010) Nestmate recognition in social insects and the hole of hydrocarbons. In: Blomquist, G. C., Bagnères, A.-G. (Eds.). *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. p. 222-243 Cambridge University Press, Cambridge.

Vaz, A. H.; Blomquist, G. J.; Reitz, R. C. (1988). Characterization of the fatty acyl elongation reactions involved in hydrocarbon biosynthesis in the housefly, *Musca domestica* L. *Insect Biochemistry* 18, 177-184.

Vogel, H.; Heidel, A. J.; Heckel D. G.; Groot, A. T. (2010). Transcriptome analysis of the sex pheromone gland of the noctuid moth *Heliothis virescens*. *BMC Genomics* 11, 29.

Wang, D. L.; Dillwith, J. W.; Ryan, R. O.; Blomquist, G. J.; Reitz, R. C. (1982). Characterization of the Acyl-CoA desaturase in the housefly, *Musca domestica* L. *Insect Biochemistry* 12, 545-551.

Weaver, N. (1955). Rearing of honeybee larvae on royal jelly in the laboratory. *Science* 121, 509-510.

Wheeler, D. E. (1986). Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *The American Naturalist* 128, 13-34.

Weers, P. M.; Van Marrewijk, W. J.; Van der Horst, D. J. (1993). Biosynthesis of locust lipophorin. Apolipophorins I and II originate from a common precursor. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 4300-4303.

Willis, J. H. (2010). Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 189-204.

Willis, J. H., Iconomidou, V., Smith, R. F., Hamodrakas, S. J. (2005). Cuticular proteins. In: L. Gilbert, Iatrou, K., Gill, S., (Ed.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 4. 507 p. Elsevier, Oxford.

Wilson, E. O. (1975). *Sociobiology: The New Synthesis*. 697 p. Harvard University Press, Cambridge.

Winston, M. L. (2003). *A biologia da abelha*. 276 p. Trad. Carlos A. Osowski. Magister, Porto Alegre.

Wicker-Thomas, C. e Hamann, M. (2008). Interaction of dopamine, female pheromones, locomotion and sex behavior in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 54, 1423-1431.

Wicker-Thomas, C.; Guenachi, I.; Keita, Y. F. (2009). Contribution of oenocytes and pheromones to courtship behaviour in *Drosophila*. *BMC Biochemistry* 10.

Wigglesworth, V. B. (1970). Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. *Tissue & Cell* 2, 155-179.

Young, H. P.; Schal, C. (1997). Cuticular hidrocarbon synthesis in relation to feeding and developmental stage in nymphs of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 90, 655-661.

Zitnam, D.; Adams, M.E. (2012). Neuroendocrine regulation of ecdysis. In L.I. Gilbert (Ed.). *Insect Endocrinology*. p. 253-309. Academic Press, Amsterdam; Boston; Heidelberg; London; New York; Oxford; Paris; San Diego; San Francisco; Singapore; Sydney; Tokyo.

APÊNDICE

Apêndice A

Alinhamento de sequências completas de aminoácidos utilizadas para a construção da árvore filogenética das desaturases. À direita tem-se o número de aminoácidos da sequência até o fim do fragmento. Embaixo tem-se o número de aminoácidos do bloco e o gráfico do nível de conservação do aminoácido nas sequências. Acima, setas azuis indicam o início dos boxes de histidina que caracterizam a enzima e as setas vermelhas indicam o fim destes boxes— uma sequência de *A. mellifera* tem um box faltando, porém a expressão do seu gene foi comprovada. Aminoácidos idênticos em todas as sequências são indicados por “*”, substituições conservadas são indicadas por “.” e semi conservadas por “:”. Para a nomenclatura das sequências, foi utilizado a primeira letra do gênero e as três primeiras letras do nome específico, seguido do número de acesso da sequência.

Aame_AAB86499
 Dpul_EFX85062
 Dpul_EFX60807
 Dpul_EFX70200
 Dpul_EFX82757
 Amel_GB51238
 Amel_GB51236
 Bimp_XP_003492441
 Bter_XP_003395147
 Mrot_XP_003703957
 Hsal_EFN78056
 Nvit_XP_001599665
 Amel_GB42218
 Dple_EHJ71380
 Tcas_XP_968828
 Tcas_EFA05209
 Tcas_XP_968897
 Tcas_XP_968970
 Tcas_XP_967341
 Tcas_EFA05022
 Tcas_EFA12799
 Tcas_XP_968024
 Tcas_XP_970520
 Tcas_EFA05245
 Tcas_XP_970732
 Amel_GB48195
 Bimp_XP_003492439
 Bter_XP_003395144
 Mrot_XP_003703958
 Mrot_XP_003703960
 Mrot_XP_003703961
 Hsal_EFN76593
 Bmor_NP_001036971
 Dple_EHJ76461
 Msex_CAJ27975
 Dmel_NP_731710
 Dmel_NP_650201
 Tcas_NP_001180578
 Tcas_NP_001182164
 Nvit_XP_003425691
 Bmor_NP_001037018
 Dple_EHJ63142 MNFKIIEKHIQSGIWF SNNRSE I QWVVKISILSFFLTNITQFVALFMATDDPKLSCFSVFTFCAMGLLKLSSLLIV
 Dmel_NP_651966
 Dmel_AAF54920
 Bmor_NP_001036914
 Dple_EHJ77791
 Msex_CAJ27976
 Msex_CAJ43430
 Bmor_NP_001037017
 Bmor_NP_001040141
 Hsal_EFN88658
 Tcas_NP_001137206
 Dple_EHJ68613
 Amel_GB48193
 Bimp_XP_003492440
 Bter_XP_003395145
 Mrot_XP_003703934
 Tcas_XP_967943
 Dple_EHJ70677
 Dple_EHJ66504
 Dmel_NP_651779
 Nvit_XP_001602540
 Hsal_EFN76589
 Nvit_XP_001607533
 Nvit_XP_001600683
 Nvit_XP_003425101
 Nvit_XP_001599836
 Mrot_XP_003704955
 Nvit_XP_001599877
 Nvit_XP_001599899
 Hsal_EFN76591
 Dple_EHJ73552
 Dple_EHJ69993
 Tcas_XP_974033
 Hsal_EFN85122
 Nvit_XP_001602289
 Nvit_XP_001607893
 Amel_GB42217
 Bimp_XP_003492461
 Bter_XP_003395146
 Amel_GB48194
 Nvit_XP_001599579
 Hsal_EFN78052

80

1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80

Aame_AAB86499
 Dpul_EFX85062
 Dpul_EFX60807
 Dpul_EFX70200
 Dpul_EFX82757
 Amel_GB51238
 Amel_GB51236
 Bimp_XP_003492441
 Bter_XP_003395147
 Mrot_XP_003703957
 Hsal_EFN78056
 Nvit_XP_001599665
 Amel_GB42218
 Dple_EHJ71380
 Tcas_XP_968828
 Tcas_EFA05209
 Tcas_XP_968897
 Tcas_XP_968970
 Tcas_XP_967341
 Tcas_EFA05022
 Tcas_EFA12799
 Tcas_XP_968024
 Tcas_XP_970520
 Tcas_EFA05245
 Tcas_XP_970732
 Amel_GB48195
 Bimp_XP_003492439
 Bter_XP_003395144
 Mrot_XP_003703958
 Mrot_XP_003703960
 Mrot_XP_003703961
 Hsal_EFN76593
 Bmor_NP_001036971
 Dple_EHJ76461
 Msex_CAJ27975
 Dmel_NP_731710
 Dmel_NP_650201
 Tcas_NP_001180578
 Tcas_NP_001182164
 Nvit_XP_003425691
 Bmor_NP_001037018
 Dple_EHJ63142 
 Dmel_NP_651966
 Dmel_AAF54920
 Bmor_NP_001036914
 Dple_EHJ77791
 Msex_CAJ27976
 Msex_CAJ43430
 Bmor_NP_001037017
 Bmor_NP_001040141
 Hsal_EFN88658
 Tcas_NP_001137206
 Dple_EHJ68613
 Amel_GB48193
 Bimp_XP_003492440
 Bter_XP_003395145
 Mrot_XP_003703934
 Tcas_XP_967943
 Dple_EHJ70677
 Dple_EHJ66504
 Dmel_NP_651779
 Nvit_XP_001602540
 Hsal_EFN76589
 Nvit_XP_001607533
 Nvit_XP_001600683
 Nvit_XP_003425101
 Nvit_XP_001599836
 Mrot_XP_003704955
 Nvit_XP_001599877
 Nvit_XP_001599899
 Hsal_EFN76591
 Dple_EHJ73552
 Dple_EHJ69993
 Tcas_XP_974033
 Hsal_EFN85122
 Nvit_XP_001602289
 Nvit_XP_001607893
 Amel_GB42217
 Bimp_XP_003492461
 Bter_XP_003395146
 Amel_GB48194
 Nvit_XP_001599579
 Hsal_EFN78052
90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160

Aame_AAB86499
 Dpul_EFX85062
 Dpul_EFX60807
 Dpul_EFX70200
 Dpul_EFX82757
 Amel_GB51238
 Amel_GB51236
 Bimp_XP_003492441
 Bter_XP_003395147
 Mrot_XP_003703957
 Hsal_EFN78056
 Nvit_XP_001599665
 Amel_GB42218
 Dple_EHJ71380
 Tcas_XP_968828
 Tcas_EFA05209
 Tcas_XP_968897
 Tcas_XP_968970
 Tcas_XP_967341
 Tcas_EFA05022
 Tcas_EFA12799
 Tcas_XP_968024
 Tcas_XP_970520
 Tcas_EFA05245
 Tcas_XP_970732
 Amel_GB48195
 Bimp_XP_003492439
 Bter_XP_003395144
 Mrot_XP_003703958
 Mrot_XP_003703960
 Mrot_XP_003703961
 Hsal_EFN76593
 Bmor_NP_001036971
 Dple_EHJ76461
 Msex_CAJ27975
 Dmel_NP_731710
 Dmel_NP_650201
 Tcas_NP_001180578
 Tcas_NP_001182164
 Nvit_XP_003425691
 Bmor_NP_001037018
 Dple_EHJ63142 GNNNDHKVPRILQGWAPLDFNIFGYFFTIVTEAVAAAVYCVIIHKTFDLTVIGLMIFIRGGFALLHNLSRIGGRGNLLS 240
 Dmel_NP_651966
 Dmel_AAF54920
 Bmor_NP_001036914
 Dple_EHJ77791
 Msex_CAJ27976
 Msex_CAJ43430
 Bmor_NP_001037017
 Bmor_NP_0010404141
 Hsal_EFN88658
 Tcas_NP_001137206
 Dple_EHJ68613
 Amel_GB48193
 Bimp_XP_003492440
 Bter_XP_003395145
 Mrot_XP_003703934
 Tcas_XP_967943
 Dple_EHJ70677
 Dple_EHJ66504
 Dmel_NP_651779
 Nvit_XP_001602540
 Hsal_EFN76589
 Nvit_XP_001607533
 Nvit_XP_001600683
 Nvit_XP_003425101
 Nvit_XP_001599836
 Mrot_XP_003704955
 Nvit_XP_001599877
 Nvit_XP_001599899
 Hsal_EFN76591
 Dple_EHJ73552
 Dple_EHJ69993
 Tcas_XP_974033
 Hsal_EFN85122
 Nvit_XP_001602289
 Nvit_XP_001607893
 Amel_GB42217
 Bimp_XP_003492461
 Bter_XP_003395146
 Amel_GB48194
 Nvit_XP_001599579
 Hsal_EFN78052170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240

Aame_AAB86499		
Dpul_EFX85062		
Dpul_EFX60807		
Dpul_EFX70200		
Dpul_EFX82757		
Amel_GB51238	MILNK	5
Amel_GB51236	MAPNL	5
Bimp_XP_003492441	MAPNL	5
Bter_XP_003395147	MAPNL	5
Mrot_XP_003703957	MAPNL	5
Hsal_EFN78056	MAPNL	5
Nvit_XP_001599665	MLSFPRRAAVSSSSLFRARSMLDRSMAPNL	31
Amel_GB42218	MAPNL	5
Dple_EHJ71380		
Tcas_XP_968828		
Tcas_EFA05209		
Tcas_XP_968897		
Tcas_XP_968970		
Tcas_XP_967341		
Tcas_EFA05022		
Tcas_EFA12799	MAPNL	5
Tcas_XP_968024		
Tcas_XP_970520		
Tcas_EFA05245	MROIQVRFEEQIGLLVLTSA	21
Tcas_XP_970732	MSPSPIV	7
Amel_GB48195	MAPNV	5
Bimp_XP_003492439	MAPNI	5
Bter_XP_003395144	MAPNI	5
Mrot_XP_003703958	MAPNS	5
Mrot_XP_003703960	MAPNI	5
Mrot_XP_003703961	MAPNI	5
Hsal_EFN76593	MAPNI	5
Bmor_NP_001036971	MAPN	4
Dple_EHJ76461	MAPN	4
Msex_CAJ27975	MPPY	4
Dmel_NP_731710	MPPNA	9
Dmel_NP_650201	MPPYS	9
Tcas_NP_001180578	MTPN	4
Tcas_NP_001182164	MPPY	4
Nvit_XP_003425691	MTPNI	5
Bmor_NP_001037018	MPPQR	5
Dple_EHJ63142	KRRDELAHGRIKDRLHGVTAIASCTVRLPEVCIVKAKMPPQG	285
Dmel_NP_651966	MPRN	4
Dmel_AAF54920	MSPNI	5
Bmor_NP_001036914		
Dple_EHJ77791	MAKNGGNRPAECTENIEDRYNRCGFLNTIEHIDIVGRMKK	40
Msex_CAJ27976	MAPNF	5
Msex_CAJ43430	MAPNF	5
Bmor_NP_001037017	MPPNS	5
Bmor_NP_001040411	MAQNO	5
Hsal_EFN88658		
Tcas_NP_001137206		
Dple_EHJ68613	MPPQA	5
Amel_GB48193		
Bimp_XP_003492440		
Bter_XP_003395145		
Mrot_XP_003703934		
Tcas_XP_967943		
Dple_EHJ70677		
Dple_EHJ66504		
Dmel_NP_651779		
Nvit_XP_001602540	MPPNASSANPRIQEECDEAHLECP	24
Hsal_EFN76589	MTPNVWDSNFEIHDEED	17
Nvit_XP_001607533	MAPDIVDG	8
Nvit_XP_001600683	MLPDEVPAEPOSFYHOFIDRSYDPKAELINGL	31
Nvit_XP_003425101	MAPNS	5
Nvit_XP_001599836	MPPNE	5
Mrot_XP_003704955		
Nvit_XP_001599877		
Nvit_XP_001599899		
Hsal_EFN76591		
Dple_EHJ73552		
Dple_EHJ69993		
Tcas_XP_974033		
Hsal_EFN85122		
Nvit_XP_001602289		
Nvit_XP_001607893		
Amel_GB42217		
Bimp_XP_003492461		
Bter_XP_003395146		
Amel_GB48194		
Nvit_XP_001599579		
Hsal_EFN78052250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320	

Aame_AAB86499		
Dpul_EFX85062		
Dpul_EFX60807		
Dpul_EFX70200		
Dpul_EFX82757		
Amel_GB51238		
Amel_GB51236		
Bimp_XP_003492441		
Bter_XP_003395147		
Mrot_XP_003703957		
Hsal_EFN78056		
Nvit_XP_001599665		31
Amel_GB42218		
Dple_EHJ71380		
Tcas_XP_968828		
Tcas_EFA05209		
Tcas_XP_968897		
Tcas_XP_968970		
Tcas_XP_967341		
Tcas_EFA05022		
Tcas_EFA12799	L GNS  T	11
Tcas_XP_968024		
Tcas_XP_970520		
Tcas_EFA05245		
Tcas_XP_970732		7
Amel_GB48195	 T S P 	11
Bimp_XP_003492439	 T S S P 	11
Bter_XP_003395144	 T S S P 	11
Mrot_XP_003703958	 T S S P 	11
Mrot_XP_003703960	 T S S P 	11
Mrot_XP_003703961	 T S S P 	11
Hsal_EFN76593	 TRAP E	11
Bmor_NP_001036971	VKDANG	10
Dple_EHJ76461	 SSDANG	10
Msex_CAJ27975	 TSDANG	10
Dmel_NP_731710	 Q S I D S L I A A A A A A D A G Q S P T K L Q E D S T G	39
Dmel_NP_650201	 QDK-	18
Tcas_NP_001180578	 A S I P T G	10
Tcas_NP_001182164	 V S H V I G	10
Nvit_XP_003425691	 D K P T G	10
Bmor_NP_001037018	K Q E A S W	11
Dple_EHJ63142	 Q Q S E S W	291
Dmel_NP_651966	 I K D P T G	10
Dmel_AAF54920		5
Bmor_NP_001036914		
Dple_EHJ77791	SYTEKRWNLSHPECVSAI  S C C S S K F K E Q N N D I K V A E K L S T F S I T T K C C G L V P G N D I L S K K T K K K Q Q K C I N N V T F A K A I V R	120
Msex_CAJ27976		5
Msex_CAJ43430		5
Bmor_NP_001037017		5
Bmor_NP_001040411		5
Hsal_EFN88658		
Tcas_NP_001137206		
Dple_EHJ68613	 D P T P 	11
Amel_GB48193		
Bimp_XP_003492440		
Bter_XP_003395145		
Mrot_XP_003703934		
Tcas_XP_967943		
Dple_EHJ70677		
Dple_EHJ66504		
Dmel_NP_651779		
Nvit_XP_001602540		24
Hsal_EFN76589		17
Nvit_XP_001607533		8
Nvit_XP_001600683		31
Nvit_XP_003425101		5
Nvit_XP_001599836		5
Mrot_XP_003704955		
Nvit_XP_001599877		
Nvit_XP_001599899		
Hsal_EFN76591		
Dple_EHJ73552		
Dple_EHJ69993		
Tcas_XP_974033		
Hsal_EFN85122		
Nvit_XP_001602289		
Nvit_XP_001607893		
Amel_GB42217		
Bimp_XP_003492461		
Bter_XP_003395146		
Amel_GB48194		
Nvit_XP_001599579		
Hsal_EFN78052330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	

Aame_AAB86499	-----MSTVTETV-----TEERPASKPHKMEIVWRNVILMGSLLHISIVGFYLIF-----F-AAQWKTIVLAAYIFY	60
Dpul_EFX85062	MESNNNDQESALGKIDTIGR-----LAVSEAGKQPVVIVWRNVLVFLHAAALYGLYLCF-----I-DVTWATLAWSYALF	71
Dpul_EFX60807	---MCVIPDFSAVCGPRR-----IPVRICNKEPPLQIVWRNVLIFVVLHAAALYGFYLCF-----A-AAKLTATLSWSFALF	67
Dpul_EFX70200	-----MGIWWRNVLIFVVLHAAALYGFYLCF-----I-VAKPSITLAWSFFLF	41
Dpul_EFX82757	-----MEIIWWRNVLVFIGLHVAALYGGVLCF-----I-AAKVATLWVWAYLF	41
Amel_GB51238	FQONVDQETSKEKENKQKKLI-----QELSNSELKIKWNINVWKNVIVFIVLHLGGIYGFYLWI-----N-GTKAYTILWSIFVE	81
Amel_GB51236	SQODVHQEKSTIEKENNQKL-----IQKSSSKSKYKWNINVWKNVIVFIVLHLGGIYGFYLWG-----NGSTKAYTILWTILVT	89
Bimp_XP_003492441	SQONIHQEKSTTEKTNQELLV-----EKSSNTTESEWEKIVWRNVIATFYLHIGAIYGVYLAF-----I-SAKYOTTIWLFSLI	90
Bter_XP_003395147	SOONIHOKKSTAETKTNQELLV-----EKSSNTTESEWEKIVWRNVIATFYLHIGAIYGVYLTF-----I-STKFOTNIWLVSLI	90
Mrot_XP_003703957	SQOGVHQDKSTTEKTSQSQVQ-----KTPPEKVOQKIKWNKIVWRNVIATFYLHIGSLYGMYLF-----N-GTRFYTLIWHVFV	91
Hsal_EFN78056	TQODVSQNKPSSEKSAAQKLSP-----QKAQPSANPKYANKIVWRNVIATFYLHIGALYGFYL-----I-AAKSYTAVGISIA	91
Nvit_XP_001599665	AQGQIPEKPVNSKPTYL-----EAQKSKSCKYTWKIVWRNVIATFYLHIGALYGFYL-----H-GAKILTTLWTLIA	113
Amel_GB42218	SQKNVHQEKKNEKEKS-----DQNLNSNSKKEWENKIVWRNVLIFVFLHIGALYGFYL-----N-GTKKYTLILWFFVMG	81
Dple_EHJ71380	ASAFLHDPMHQKNIGELSQ-----LDPPQRDRDYEQIVWRNVLAFVVLHMATLYGIYLIL-----I-GKTKEITLIFAVTIS	74
Tcas_XP_968828	-----MNKLPKRNPKFAQH-----LTSSISKQKMEREIAWKVFFFVVLHIGALYGFYL-----I-EASWLTCPFWFYFLV	66
Tcas_EFA05209	-----MEREIAWKVFFFVVLHIGALYGFYL-----I-EASWLTCPFWFYFLV	43
Tcas_XP_968897	-----MSSELAPLNRPLVWLKIVYFAYLHYGTILGYTYLL-----I-AAQWKTILWTYLL	50
Tcas_XP_968970	-----MSTLETOVQIVWRNVLIFVVLHVAALYGFYFTF-----I-AAKWPPTILEFTYFLT	48
Tcas_XP_967341	-----MTWADLEQVIRQIVWRNVLIFVVLHVAALYGFYFLV-----I-TAKWPPTILEYGFIFG	52
Tcas_EFA0522	-----MESRTSEKRGTRIAERV-----WEPRGAEWHNMDMGSDQIVWRNVLFLILHIIISLQGWYFLV-----T-TAKWPPTILEYGFIFG	74
Tcas_EFA12799	IQIISKPGLQDVLPQVKPQ-----ISSRSSVSQYRNQIVWRNVLIFVYLHIAIGIYGLYAI-----A-QAQWKTILWGYLVI	92
Tcas_XP_968024	FSNAGLFYNEKLNNSETKE-----TQNQYNLPHNRNQIVWRNVLIFAYLHYAAFYGLYML-----I-LAQWKSIIWGYAVI	116
Tcas_XP_970520	-----MFQPTIPVWNPNVILFILYHAIALQGWYFYI-----T-FQINLRTIFWAFLIL	45
Tcas_EFA05245	-----FPRTIISRKKMLEIVWKVNFSFILYHYLAFLHGLFYL-----T-GHTHWATFAFNLF	74
Tcas_XP_970732	-----PLMAPEAQKMLEIVWKVNFSFILYHYLAFLHGLFYL-----T-GHTHWATFAFNLF	60
Amel_GB48195	-----RSDQ-----TIIETPKKYYKKHIIWWRNVIIFSYLHAAVYGLYLVF-----T-SAQFKTTLFLALFLY	73
Bimp_XP_003492439	-----ESS-----RVIDAPKTKYKROIVWRNVIIFTYLHISAVYGLYAL-----T-SAKWATLFLF	75
Bter_XP_003395144	-----ESS-----RVIDAPKTKYKROIVWRNVIIFAYLHYGAVYGLYAL-----T-SAKWATLFLF	75
Mrot_XP_003703958	-----NTP-----VVVEPDKQKIVRRIVWRNVIIFVYLHAAVYGLYLVF-----T-SAKFATTIILFTLALY	75
Mrot_XP_003703960	-----VVAEPVKQKYDTP-----VVAEPVKQKYRRIIVWRNVIIFSYLHAAVYGLYLVF-----T-SAKFATTIILFALVLY	88
Mrot_XP_003703961	-----DTP-----VVAEPVKQKYRRIIVWRNVIIFSYLHAAVYGLYLVF-----T-SAKFATTIILFALVLY	78
Hsal_EFN76593	-----VAE-----LOPIEKKPKYVSRIIVWRNVIIFSYLHIAALYGGYFL-----I-SAKWATVIFAFFLY	73
Bmor_NP_001036971	-----DTPDLGLS-----STPVQOADNPVKKLWWRNIIILFTYLHIAALYGGYFL-----F-HAKWQTDLFLAYFLY	77
Dple_EHJ76461	-----ATPDALP-----NTPIQOADSRKIIVWRNVIIFAYLHYAALYGGYFL-----F-SAKWQTDNIFAYFLY	77
Msex_CAJ27975	-----ATPDAL-----STPVQOADNPVKKLWWRNIIILFTYLHIAALYGGYFL-----V-HAKWQTDIFAYFLY	77
Dmel_NP_731710	-----ETTDGGLVKD-----ITVMKKAERKRLKLVWRNIIIAFGYHLLAALYGAYLMV-----I-SAKWQTCILAYFLY	108
Dmel_NP_650201	-----QTVDGDLTTD-----RFQLKRAEKRRRLPVWRNIIILFALVHVAALYGLHSIF-----T-RAKLATLFLAAGLY	87
Tcas_NP_001180578	-----EVSNATL-----PPEVMKPDDRKLQLVWRNIIILFAYLHYAALYGIWIMF-----I-SAKVATSLFGILLY	76
Tcas_NP_001182164	-----EVSTKNI-----LPEVKTPENRKLQLVWRNIIILFAYLHYAALYGGYFL-----T-SAKLATSIIFAYFLY	76
Nvit_XP_003425691	-----LEDQVETSIINNI-----KEQIKTDYNYKVEIVWRNVIIFVYLHISALYGLYLCF-----I-SAKLATVLF	81
Bmor_NP_001037018	-----NNLPEDAP-----PHVPSSAEKRPWIKIVWRNVIIFVFLHVGGVYGGYFL-----F-KAMWRTSIFAIFLY	78
Dple_EHJ63142	-----NKDAUT-----IIPVPSAEKRKLQIVWRNVIIFVFLHVGGVYGGYFL-----I-QAMWSITRLF	356
Dmel_NP_651966	-----ETVDGGLSTE-----LSNRKTTDGSKLEIVLWVNIVLFLVHIISSLYGVWLFL-----I-SATWTTVVLFWPTV	79
Dmel_AAF54920	AASAAPSAATPSQVAKKA-----EAKTPENKPYELEIVWRNVLGLFVILHSMALYGLYLVF-----A-ESAIWELLPVYATM	100
Bmor_NP_001036914	MEAKQNNLAPTEEEEQFE-----KLIAPOASDRKHEIIYANLITFAYGHISALYGLYLCF-----S-SAKWATIIIMAYVIL	71
Dple_EHJ77791	SQTMSCDETEESKSSDDVFE-----KLVPAQOAPRKYIIVHNSLLTFSVGHLYLCV-----I-VASWKVLLFHIIIF	271
Msex_CAJ27976	-----GTEMSAHIDAEESYE-----KLIPPOAAPRKYIIVHLYANMIYFVWHIAALYGGYFL-----T-SAKWATIILAYLLF	72
Msex_CAJ43430	-----GNEVSSPVAEEESYE-----KLIPPOAAPRKYIIVHLYANMIYFVWHIAALYGGYFL-----T-TAKWATIILAYLLF	72
Bmor_NP_001037017	-----VDKTNETEYKLKDHNVDYE-----KLIAPOASPIKKIIVVMNVIIFSYLHIAALYGGYFL-----I-SAKLATSVFAIVLF	75
Bmor_NP_001040414	-----TYNGLIVTEIEDSLEHD-----SVKPSVVGPREVEIVYKNIIFIHLYHVTFMVGFLYLC-----T-TAKWPSVGFAYLCY	75
Hsal_EFN88658	-----MGLDKSASNGL-----EKELEPRNDYKWKIIVWNENPSIVIHLAGLYGMLM-----FLHVVKYLTILWYAVCT	66
Tcas_NP_001137206	-----MSAQTTTTET-----TQNAQKPOQYHWRMVWRNIIILYIIMHLTGFYGLYLM-----F-YAQWKTIVFYSWFLL	63
Dple_EHJ68613	-----D-----VSLIKKARPKIYEVWNIMWFPLFLHVVASAIVYLVF-----I-SAKWQTNVFAFLVH	80
Amel_GB48193	KNNLNKRNRLAKTDDFLTAD-----GSYRSKSTEVYPRISWSNLIGLFLVHIGGLYGFYLF-----V-EAKLSTILWMFIT	94
Bimp_XP_003492440	ENDSKNKRKLAETDDYLAVID-----ETYRSSKVEYVPRITWPDLIALFVHVHGCIYGLYLF-----I-EAKLSTILWAFVVI	94
Bter_XP_003395145	ENDSKNKRKLAETDDYLAVID-----ETYRSSKVEYVPRITWPDLIALFVHVHGCIYGLYLF-----T-EAKLSTILWAFVVI	94
Mrot_XP_003703934	KLETKNGRIAVTDFLAD-----ESYRSSKSTEVYVPRITWPDLIAQIFIHAGCVYGLYLF-----V-EAKLTTIVWAFVIV	92
Tcas_XP_967943	STAAKETSRRNLALTKEI-----PENKLKEEPRRIPRIPWDLTVQFVHVGCYGLYLC-----V-SARLYTTLF	84
Dple_EHJ70677	-----SIADQLNEDIIDNKSDF-----DLMKYEALEFKPRIKWPDLVQLCLHSTTVGFYLL-----VNRVKLYTILFVFTI	79
Dple_EHJ66504	-----MGFI-----IRWTNAILIS-----SFHIMAVITFLYTFSSGM-----VPTLETVFFGFLCG	48
Dmel_NP_651779	IANHPKDAIDLEEYTRTF-----VGDRVLGWQOQPLKWDVKIYQISLLHIVAGCILLYT-----P-LRELNPTTIVSFV	146
Nvit_XP_001602540	-KELQAKIVAE TRAINKKLNIAEKLPDKGWLDFE-----IWLWPNLIGLFLVHILGFYVFL-----Y-LLHWKTSFLWGYLVS	99
Hsal_EFN76589	HLRLTSATIDKRKCEQEYEH-----KTRKVKWEKWLGFEFKWLIVMLTILHIGLTLISLFTIN-----M-IGNITTFFWTFLG	93
Nvit_XP_001607533	GKQISILEPDKIEIKEPK-----KEQFSMSFHRKDVDKVGWNVVMTILHIVAAVYGFIT-----Y-FEKWNITFLWTWSIG	101
Nvit_XP_001600683	SNGFAKGSEEVKQNSREDNE-----KFIANSLTFGQAIWVWNIAITFPHILALYSTIFT-----Y-VQRWRAAAWATAA	115
Nvit_XP_003425101	-VETETVDRDESPKSSDAV-----DTKQKSGTYFRGKIRWQTTIVLAAVHALAVYGLLFT-----Y-LQSWKVLLWAYFVA	75
Nvit_XP_001599836	GYDEQYKDSFNMSSAEYK-----EKVLSPKFLQRTDIKWGNLLFMVVMHAVA LYGFIT-----Y-LEKKMTFVWWGFLA	100
Mrot_XP_003704955	VTOYEEKKNDNGKVEEDAEP-----LPLPTEKIPAROFIIWENVIGIIVLHFVFLAVYGFMN-----R-DAKFWTIWNI	77
Nvit_XP_001599877	VTOFEEAPKK-----KVEEDE-----PSSLVKEEGQPIWIWRNIIIGIATLHVAVISFATY-----H-EAKLGTWIFSP	74
Nvit_XP_001599899	VTEYENPPDK-----KITDSDE-----PTABIEQAEEOPWIWRNIIIGIATLHVAVISFATY-----H-EAKLGTWIFSP	74
Hsal_EFN76591	SKTITFDNNVSAATKEVY-----RMKRSGFFE-----IWIWSMALLLFLHTVGFYGLTF-----Y-LQNLKTTSWIFCMH	93
Dple_EHJ73552	-----MENINLKLHLPPISET-----FRAFEKSLKDKIWKTSAILLFLYHIAAVYWCYHY-----I-PVKMOTIVFAAIMY	67
Dple_EHJ69993	YNTDVKISKQNSNSFDNNI-----IKNIGTDXSYKHQVWKNIAIGFFILHLLGIWCHLIV-----TGGIYQTFMWTSLLL	84
Tcas_XP_974033	-----MGALKQTEEEKTL-----PQDITGTDYTFKRIKIVWFNAIGFFILHLLALYGGYRLL-----HCHILTPFLALM	65
Hsal_EFN85122	PRDQPPDKTEKEEVGEEVL-----DEKLTDMDNRYRKLWRRVLIVHLLHISWFYIYTAI-----F-HAKVATLNWMLFLG	77
Nvit_XP_001602289	-MDKELKKRCDHYDENGIK-----TYKLTTDFNRYRHLRWFVFLYIILQIMGLYGGYCF-----F-KITWKFIPWAWIT	70
Nvit_XP_001607893	EVKKKDEPGSEMYDGDGV-----LQKLGTDPNVRHOFVPGIVLIVLHIVIAAVYGFYLA-----R-SILTPIWAVLVA	82
Amel_GB42217	-----MVEEEPKKKQYKVWAIAVNWIVIIVHVLGVYIWIWLF-----I-SAKWMTIIFTYTFII	50
Bimp_XP_003492461	-----MLDEKOPARKQEMKWAIAVNWIVIIVHVLGVYIWIWLF-----I-SAKWMTIIFTYTFII	51
Bter_XP_003395146	-----MLDEKOPARKQEMKWAIAVNWIVIIVHVLGVYIWIWLF-----I-SAKWMTIIFTYTFII	51
Amel_GB48194	-----MNERKQKVWKWIAIWALNWIVIIVHVLGVYIWIWLF-----I-SAKWMTIIFTYTFII	46
Nvit_XP_001599579	-----MFAERMDDYKRDIIHWPTVLYYIHLHALGFYGAILL-----I-EAKWLTVFTLFLII	51
Hsal_EFN78052	-----MTEINEQNGS-----VSNSDNEKTNOLSKNWLIIIFYIYLHIFGIGGFYFLF-----I-KAKWMTVLYFASLV	62



		100
Aame_AAB86499	TISIGIGVTAGSHRLWSHRSYAKAKLPVRIMLMIF	93
Dpul_EFX85062	IFGGFGITGGAAHRLWAHRCYAKAKWPLRVIAVG	104
Dpul_EFX60807	IFGGFGITGGAAHRLWAHRCYAKAKWPLRVIAG	100
Dpul_EFX70200	LFGGFGITGGAAHRLWAHRCYAKAKWPLRVIAG	74
Dpul_EFX82757	IVGGFGIAAGAHKLWSHRSFKAILPFRILIAVA	74
Amel_GB51238	FFAICMGITAGAHLRLWSHRSYAKAKWPLRFLMLL	114
Amel_GB51236	FCIAMGITAGAHLRLWSHRSYAKAKWPLRFLMLL	122
Bimp_XP_003492441	ALGGMVGITAGAHLRLWAHRTYKAKWPMRFLLMIL	123
Bter_XP_003395147	LFGGVGVTAGAHLRLWAHRTYKAKWPMRLLMIL	123
Mrot_XP_003703957	LLAGMGITAGAHLRLWAHRSYAKAKWPMRVFLMIC	124
Hsal_EFN78056	VFAAIGVIGGGAAHRLWAHRSYAKAKWPLRVLMLF	124
Nvit_XP_001599665	CSEALGITAGAHLRLWCHRAYKAKWPLRFLMLMIF	146
Amel_GB42218	FAGSMGVITAGAHLRLWSHRSYAKAKWPLRFLMLL	161
Dple_EHJ71380	AMSAMGVITAGAHLRLWAHRSYAKAKWPLRFLMLMIF	107
Tcas_XP_968828	QISTQGTGAGGVHRLWAHRAYKATVPLRLLLTFY	99
Tcas_EFA05209	QISTQGTGAGGVHRLWAHRAYKATVPLRLLLTFY	76
Tcas_XP_968897	LSATHGTAAGAHLRLWAHRAYKAKLPLRLLLAFD	83
Tcas_XP_968970	IISTQGTGAGGVHRLWSHRSYAKAKLPLRLLLAFD	81
Tcas_XP_967341	ALTGQGITVGAHLRLWAHRCYAKAKLPLRIFLCFL	85
Tcas_EFA05022	ALTGQGITVGAHLRLWAHRCYAKAKLPLRIFLCFL	107
Tcas_EFA12799	LASGIGVTAGAHLRLWAHRTYKAKLPLRIVLAFC	125
Tcas_XP_968024	LFASIGVIGGGAAHRLWAHRSYAKAKLPLRIVLAFC	149
Tcas_XP_970520	VLAGQGITSGVHRLWSHRSYAKAKLPLRIFLCFL	78
Tcas_EFA05245	QLSNLGTISGAHLRLWTHRSYQAQLPLKLFMFC	107
Tcas_XP_970732	QLSNLGTISGAHLRLWTHRSYQAQLPLKLFMFC	93
Amel_GB48195	VCTGLGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQELVUVW	106
Bimp_XP_003492439	VYSALGITAGAHLRLWAHRSYAKWPQQLFLMIG	108
Bter_XP_003395144	LFSALGITAGAHLRLWAHRSYAKWPQQLFLMIG	108
Mrot_XP_003703958	VVNAFGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQQLFLMIN	108
Mrot_XP_003703960	FVCGFGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQQLFLMIC	121
Mrot_XP_003703961	FVCGFGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQQLFLMIC	111
Hsal_EFN76593	QMTGLGITAGAHLRLWAHRSYAKWPQPLRLLLVIL	106
Bmor_NP_001036971	VMSGLGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQPLRVLVIF	110
Dple_EHJ76461	VMSGLGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQPLRVLVIF	110
Msex_CAJ27975	VMSGLGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQPLRVLVIF	110
Dmel_NP_731710	VISVSLGITAGAHLRLWAHRSYAKWPQPLRVLVIF	141
Dmel_NP_650201	IIIGMLGVITAGAHLRLWAHRTYKAKWPQPLRLLLIF	120
Tcas_NP_001180578	QLGGFGITAGAHLRLWAHRSYAKWPQPLRLLLIF	109
Tcas_NP_001182164	QLGGFGITAGAHLRLWAHRSFKAKWPQPLRLLLAFD	109
Nvit_XP_003425691	QTSVLGITAGVHRLWAHRSYAKWPQPLRLLLIF	114
Bmor_NP_001037018	LCMSGLGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQPLRLLLIF	111
Dple_EHJ63142	LCMSGLGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQPLRLLLIF	389
Dmel_NP_651966	VVTIILGVSGGAHRLWAHRTFKANIPPLKLIIFLFL	112
Dmel_AAF54920	FLGGLGITAGVHRLWSHKAYKAKLPLRIFLFLMC	133
Bmor_NP_001036914	IAAEVGVTAGAHLRLWTHRAYKAKRPLQIILMVM	104
Dple_EHJ77791	VLAIAIGVITAGAHLRLWTHRAYKAKRPLQIILMVM	304
Msex_CAJ27976	VAGDIGVITAGAHLRLWAHKSYSYAKLPLQIILMLF	105
Msex_CAJ43430	VAGEIGITAGAHLRLWAHKSYSYAKLPLQIILMLF	105
Bmor_NP_001037017	FLGNFGITAGAHLRLWSHNGYKVKLPLEILLMVF	108
Bmor_NP_001040141	VAATIGVITAGAHLRLWSHKSYKARLPLQIILMVF	108
Hsal_EFN88658	LFIMIGITAGAHLRLWSHRSYAKWPQPLRLLLIF	99
Tcas_NP_001137206	VIALQGVITAGSHRLWAHKAQKARLPLRMLLCIF	96
Dple_EHJ68613	LCCAIGIGAGSHRLWTHRSFKAKLPLRILLMIW	113
Amel_GB48193	YTTCGFITAGVHRLWSHRSYAKWPQPLRLLLIF	127
Bimp_XP_003492440	YTSGFGITAGAHLRLWSHRSYAKWPQPLRLLLIF	127
Bter_XP_003395145	YTSGFGITAGAHLRLWSHRSYAKWPQPLRLLLIF	127
Mrot_XP_003703934	YTSGFGITAGAHLRLWSHRSYAKWPQPLRLLLIF	125
Tcas_XP_967943	YLSGFGITAGAHLRLWSHRSYAKWPQPLRLLLIF	117
Dple_EHJ70677	YTSGFGITAGVHRLWSHRSYAKWPQPLRLLLIF	112
Dple_EHJ66504	WIGGFGVITAGAHLRWTHRAYKAKLPLQIILMVF	81
Dmel_NP_651779	GVAGFGVITAGAHLRWTHKSYSYAKWPQPLRLLLIF	179
Nvit_XP_001602540	IMGGFGVIGGGAAHRYWTHKSYSYAKWPQPLRLLLIF	132
Hsal_EFN76589	AVQGIGVITAGVHRLWTHRAYKAKLPLRIVLLIF	126
Nvit_XP_001607533	MMGAFGTTGGIHYRWSHRSYAKWPQPLRLLLIF	134
Nvit_XP_001600683	VLASFCGVAGVHRLWCHKSFKAKLPLRIVLLCF	148
Nvit_XP_003425101	MYTMIGINGGVHRLWCHKSFKAKLPLRIVLLCF	108
Nvit_XP_001599836	IVANFGVASGVHRLWSHRAFKAKLPPFKIISIIC	133
Mrot_XP_003704955	VTSGVGITAGAHLRLWAHKSYSYAKWPQPLRIVLLIF	110
Nvit_XP_001599877	ITAGL GITAGAHLRLWAHRSYSYAKWPQPLRIVLLIF	107
Nvit_XP_001599899	FASGVGVITAGAHLRLWAHRSYSYAKWPQPLRIVLLIF	107
Hsal_EFN76591	VLTVFGVSAGAHLRLWSHKSYSYAKWPQPLRIVLLIF	123
Dple_EHJ73552	VATGFGITGGAAHRLWTHKSYSYAKWPQPLRIVLLMC	100
Dple_EHJ69993	FTSTEGITTAGAHLRLWSHRSYAKWPQPLRIVLLIF	117
Tcas_XP_974033	FVSGEGITLGAHRSYAKWPQPLRIVLLIF	98
Hsal_EFN85122	FWIAEGVSLGAHRSYAKWPQPLRIVLLIF	110
Nvit_XP_001602289	FLSGQGVVLLGSHRGYSHKSFKAKLPLRIVLLIF	103
Nvit_XP_001607893	LASSQIMLGAHRSYAKWPQPLRIVLLIF	115
Amel_GB42217	AIGYLGVTAGAHLRLWAHRTYEAvgfIKLFLMLA	83
Bimp_XP_003492461	TLGCLGVITAGAHLRLWAHRTYEAvgfIKLFLMLA	84
Bter_XP_003395146	ILGCLGVITAGAHLRLWAHRTYEAvgfIKLFLMLA	84
Amel_GB48194	AIGYFGMTAGAHLRLWAHRTYEAvgfIKLFLMLA	79
Nvit_XP_001599579	LIAGLGITLGAHRLWAHGAFeASGFVRGFLMVA	84
Hsal_EFN78052	IFSYIGLTVGAHRLYAHOTFTASISLRFFLVTA	95

.....570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640



Aame_AAB86499	QIMAFQNDIYDWARDHRMHHKFSETTADPHDATRGFF	130
Dpul_EFX85062	QTIALQNDIYVWSRDHRVHHKFSETDADPHNARRGFF	141
Dpul_EFX60807	QTISVONDIYEWSRDHRVHHKFSETDADPHNARRGFF	137
Dpul_EFX70200	QTIAVQNDIYEWSRDHRVHHKFSETDADPHNACRGFF	111
Dpul_EFX82757	QTIALQDDIYQNSRDHRVHHKFSDTDADPYNSRRGFF	111
Amel_GB51238	QTTSYQNHIEWVRDHRVHHKFTDTDADPHNSRRGFF	151
Amel_GB51236	QTMAFQNHIEWVVDHRVHHKFTDTDADPHNAQRGFF	159
Bimp_XP_003492441	QTIAFQNHIEWVVRDHRVHHKFTDTDADPHNAKRGFF	160
Bter_XP_003395147	QTIAFQNHIEWVVRDHRVHHKFTDTDADPHNAKRGFF	160
Mrot_XP_003703957	QSIAFQNHIEWVVRDHRVHHKFTDTDADPHNAQRGFF	161
Hsal_EFN78056	QTMAFQNHIEWVVRDHRVHHKFTDTDADPHNAQRGFF	161
Nvit_XP_001599665	QTIAFQNHIEWVVRDHRVHHKFTDTDADPHNAKRGFF	183
Amel_GB42218	KHSDVIIKKGATVDMMSDLEKDPPIVVFQRTTYKAKWPLRFLMLSLTILAYQNHIEWVVRDHRVHHKFTDTDADPHNARRGFF	241
Dple_EHJ71380	QTMAFQNHIEWVVRDHRVHHKFTETDADPHNAKRGFF	144
Tcas_XP_968828	QTLTFQKDIYDWVRDHRVHHKYSETDADPHNASNGFF	136
Tcas_EFA05209	QTLTFQKDIYDWVRDHRVHHKYSETDADPHNASNGFF	113
Tcas_XP_968897	QTLTFQKDIYDWVRDHRVHHKYSETDADPHNASNGFF	120
Tcas_XP_968970	QTHCLQNHIYEWVVRDHRRAHHKFSDTDADPHNSTRGFF	118
Tcas_XP_967341	QTVTLQNPPLYEWWVRDHRVHHKYDTDNADPHNATRGFF	122
Tcas_EFA05022	QTVTLQNPPLYEWWVRDHRVHHKYDTDNADPHNATRGFF	144
Tcas_EFA12799	QVALQNDIYEWVVRDHRVHHKFTDTDADPHNSNRGFF	162
Tcas_XP_968024	QVALQNHIEWVVRDHRVHHKFTDTDADPHNSNQGFF	186
Tcas_XP_970520	OTISFQNSIYEWARDHRRAHHKFSDTDADPHNIKRGFF	115
Tcas_EFA05245	NNISQNSIYDWVRDHRVHHKFSDTDADPHNIKRGFF	144
Tcas_XP_970732	NNISQNSIYDWVRDHRVHHKFSDTDADPHNIKRGFF	130
Amel_GB48195	NTMAFQDAAIHWARDHRHLHHKYSETDADPHNATRGFF	143
Bimp_XP_003492439	NTVAFQDAAIHWARDHRHLHHKYSETDADPHNAKRGFF	145
Bter_XP_003395144	NTIAFQDAAIHWARDHRHLHHKYSETDADPHNAKRGFF	145
Mrot_XP_003703958	NTMAFQDAAIHWARDHRHLHHKYSETDADPHNAKRGFF	145
Mrot_XP_003703960	NTMAFQDAAIHWARDHRHLHHKYSETDADPHNAKRGFF	158
Mrot_XP_003703961	NTMAFQDAAIHWARDHRHLHHKYSETDADPHNAKRGFF	148
Hsal_EFN76593	NTIAFQDAAIHWARDHRVHHKFSDTDADPHNSNRGFF	143
Bmor_NP_001036971	NSLAFQDSALDWARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFF	147
Dple_EHJ76461	NTLAFQDSAIHWARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFF	147
Msex_CAJ27975	NTMAFQDSAIHWARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFF	147
Dmel_NP_731710	NTIAFQDAAYHWARDHRVHHKYSETDADPHNATRGFF	178
Dmel_NP_650201	NTIAFQDAVYHWARDHRVHHKYSETDADPHNATRGFF	157
Tcas_NP_001180578	NTLAFEDSVIDWSDRHRVHHKFSETDADPYNAKRGFF	146
Tcas_NP_001182164	NTLAFEDSVIDWSDRHRVHHKFSETDADPYNAKRGFF	146
Nvit_XP_003425691	NTIAFQNSVIDWARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFF	151
Bmor_NP_001037018	NTIAFQDAVVWDWARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFF	148
Dple_EHJ63142	NTIAFQDSVIDWARDHRMHHKYSETDADPHNATRGFF	426
Dmel_NP_651966	NTLAFOQDAVYVWDRHRVHHKYTETDADPYNSQRGWF	149
Dmel_AAF54920	OSLAFOQNSIWEWTDRHRVHHKFDTDADPHNSNRGFF	170
Bmor_NP_001036914	NSFAFQNSAIIWDRHRMHHRYSDTDADPHNATRGFF	141
Dple_EHJ77791	NTLAFQNTVIDWVKKHRLHHRYSDTDADPHNATRGFF	341
Msex_CAJ27976	STMAFQNTVITWVKDHRMHHKYSDTDADPHNATRGFF	142
Msex_CAJ43430	NSTAFQNSVTWVKDHRMHHKYSDTDADPHNATRGFF	142
Bmor_NP_001037017	NSIAFQNTIFTWVDRHRLHHKYTDTDADPHNATRGFF	145
Bmor_NP_001040141	LSSLANCRATH-NVRDHRVHHKYSDTDADPHNASRGFF	144
Hsal_EFN88658	QSAAYONTIYRWARDHRVHHKYDTTDADPHNANRGLF	136
Tcas_NP_001137206	QTLSLQNHIIYDWATYHRVHHKFSDTDADPHNSRRGFF	133
Dple_EHJ68613	QTMGFQDCIFEWADHRTHHHKYADTDADPHNAERGLF	150
Amel_GB48193	FTITGQKDVYRWALDHRVHHKYSETDADPHNVKRGFF	164
Bimp_XP_003492440	FTITGQKHVYAWALDHRVHHKYSETDADPHNAKRGFF	164
Bter_XP_003395145	FTITGQKHVYAWALDHRVHHKYSETDADPHNAKRGFF	164
Mrot_XP_003703934	FTITGQRHVYAWALDHRVHHKYSETDADPHNVKRGFL	162
Tcas_XP_967943	FTITGQRHVYVWALDHRVHHKYSETDADPHNAKRGFL	154
Dple_EHJ70677	FTVTGQRDITYTWALDHRVHHKYTETVADPHDVRRGFW	149
Dple_EHJ66504	YSVAGONSIPNWVDRHRVHHKMSSETDADPHDANRGFF	118
Dmel_NP_651779	YCVAGQNTLYDWVRDHRVHHKYSETDADPHNANRGGF	216
Nvit_XP_001602540	YCISGQNTLYDWVDRHRVHHKFSETDADPHNSNRGFF	169
Hsal_EFN76589	YTIAQNKISDWVRDHRVHHKYDTTDADPHNSNRGFF	163
Nvit_XP_001607533	YLSAGQNSMYQNVDRDHRVHHKYSETDADPHNSHRGFF	171
Nvit_XP_001600683	YSISGMNSIYNNVDRDHRVHHKYSETDADPHNSNRGFF	185
Nvit_XP_003425101	YLTAAQVSFKKVNQYHRCHHRYMETDADPHNSQRGFF	145
Nvit_XP_001599836	YLTSGQYSAIWNSRDEHRLHHKYSETDADPVNAARGFW	170
Mrot_XP_003704955	YCMAGOTRFYNWIRDHRTHHYTETTDADPHDARRGFF	147
Nvit_XP_001599877	YCMAGMTHFHKWIRDHRTHHKFTETAADPHDANRGFF	144
Nvit_XP_001599899	FCMIGOTHMHKIRDHRTHHKFTETKADPHDHSKRGFF	144
Hsal_EFN76591	NSVYQNVRNHLHHKYCDTDADPHNTNRGFF	154
Dple_EHJ73552	FASAGQNSLEQWVDRDHRLHHKSDTDADPHNANRGLF	137
Dple_EHJ69993	QTLAGQNSIFTWCRDHRLHHRYSDTDADPHNAKRGFF	154
Tcas_XP_974033	HTIAGQNCIYINVRDHRQHHKYSDTDADPHNSNRGFF	135
Hsal_EFN85122	QTMGQNSIFSNVRDHLHHKYSDTDADPHNATRGFF	147
Nvit_XP_001602289	HTMSGQNHVYWWARDHRLHHKFDTTDADPYNASRGFF	140
Nvit_XP_001607893	QTISGQNHIEWVVRDHRLHHKYCDTDADPYNASRGFF	152
Amel_GB42217	HTLAGVGSIYDWILYHRLHHKYGGTDKDPYNHKKGFL	120
Bimp_XP_003492461	HTLAGVGSIHDWVLYHRLHHKYGGTDKDPYNHKKGFF	121
Bter_XP_003395146	HTIAGVGSIYDWVLYHRLHHKYGGTDKDPYNHKKGFF	121
Amel_GB48194	HTSTGV-----KGFL	89
Nvit_XP_001599579	HTLAGVGNIYDWVLALRTHHKFYGTSRDPYNHKKGFW	121
Hsal_EFN78052	HILAGVGPLYDWVLWHRVHHKYHNTDKDPYDHKGFI	132

.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720







Aame_AAB86499	-----RHISPRONLVIVGAEGFHNHHYHFPYDRTSELGC-----	R-INTTTWFIDFFAWLGQVYDRKEVPTSV-----	295
Dpul_EFX85062	-----KGINPSENRFVAFITSGEGWHNYYHHVFPWDYKASELGN-----	G-TNTTTRAIIDFCAWGLAYDLKSVPEKV-----	307
Dpul_EFX60807	-----KEINPAENRVRVAFLTSGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	N-MNTIKAVIDFFAWIGWAYDLKTVPERI-----	303
Dpul_EFX70200	-----KEINPAENRNMVAFLTSGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	S-MNMTTAAIDFFSWLGLAYDLKSVPQRI-----	277
Dpul_EFX82757	-----KOMKPSDSRLAASFSLGE-WHNYHHVFPGDVRVAELGSW-----	R-MSATVVVIDLFAWMGLIYDLKTVSPKI-----	275
Amel_GB51238	-----MNICPVENKIVSIFAYGEGWHNYYHHVFPWDYKTFSEFGTY-----	N-TNFTTAIFDFCARLGLAYDLKTV-----	316
Amel_GB51236	-----KNIGPTENLTVSILCGCEGWHNYYHHVFPWDYKAGEFGNY-----	N-TNFSTAFIDFCARLGLAYDMKTV-----	324
Bimp_XP_003492441	-----KNIGPTENKSVAIVAFGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGDY-----	K-VNITTAIFDFCARLGLAYDMKIVPVEA-----	325
Bter_XP_003395147	-----KNIGPTENKGVALLAEGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	K-FNFTTAFIDFCAWGLAYDLKTV-----	325
Mrot_XP_003703957	-----KNIGPTENIGVAICAVGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	K-LNLTTAFIDFCARLGLAYDMKAPADI-----	326
Hsal_EFN78056	-----NSISPDSLSVGIGAFGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	R-TNFTTAFIDDMAKIGWAYDLKTV-----	326
Nvit_XP_001599665	-----ETISATDNIRVALGAEGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGDY-----	K-ANFTTAFIDFARIGWAYDLKTV-----	348
Amel_GB42218	-----VNIOPTENLFFVSIFAFGEGWHNYYHHVFPWDYKTCGELGGY-----	K-TNLTTAFIDFCALLQOAYDLKTVPEEM-----	406
Dple_EHJ71380	-----QYIGATDNKAVAICAFGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	S-TNLSTALIDFAAKYGLAYDLKTVSIEM-----	310
Tcas_XP_968828	-----KNILPTQNLVSYITNGEFGHNYYHHAFPWDYKAAELGSY-----	Y-GNWSTAFIDFMARI-----	302
Tcas_EFA05209	-----KNILPTQNLVSYITNGEFGHNYYHHAFPWDYKAAELGSY-----	Y-GNWSTAFIDFMARI-----	279
Tcas_XP_968897	-----KNIKPVETSWVAHISHGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGSY-----	Y-GNWSTAFIDFMARI-----	286
Tcas_XP_968970	-----RNİKATETNVVSYSITNGEFGHNYYHTFPWDYKAAELGSY-----	W-GNWSTAFIDFMKI-----	284
Tcas_XP_967341	-----KNIKPTENIAVAIVAYGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	R-TNLSTAFIDFMKI-----	288
Tcas_EFA05022	-----KNIKPTENIAVAIVAYGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	R-TNLSTAFIDFMKI-----	310
Tcas_EFA12799	-----KNINATEKNSVSIILAFGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	R-MNFTTAFDLMLSKI-----	328
Tcas_XP_968024	-----KNINATDNISVIAIFIAGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	R-MNFTTAFDLMLMRI-----	352
Tcas_XP_970520	-----RFIKPSENQIVAKLTMEGEGWHNYYHHTFPWDYKAAELDSY-----	N-GNLSTAFIDLMMAKI-----	280
Tcas_EFA05245	-----SDIKPTENPIAVITYMGEGWHNYYHHTFPWDYKRASEFDSF-----	N-GNVNFVINFMAVKGLAHGLKTASL-----	309
Tcas_XP_970732	-----SDIKPTENPIAVITYMGEGWHNYYHHTFPWDYKRASEFDSF-----	N-GNVNFVINFMAVKGLAHGLKTASL-----	295
Amel_GB48195	-----KFINPSENKAVAGALGEGWHNYYHHVFPWDYKTAELGN-----	R-FNVTTAFIDMCAKLRLAYDLKSVPSDL-----	309
Bimp_XP_003492439	-----KYINPVENKVMVITALGEGWHNYYHHVFPWDYKTAELGN-----	K-VNITTLFIDACSKLGLAYDMKIVPQDL-----	311
Bter_XP_003395144	-----KYINPVENKVMVITALGEGWHNYYHHVFPWDYKTAELGN-----	K-VNITTLFIDACSKLGLAYDMKIVPQDL-----	311
Mrot_XP_003703958	-----KYINPAENKGVSIVTLLGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELFGNY-----	R-YSPPTTAFIDLCALKLGLAYDLKFVPDDW-----	311
Mrot_XP_003703960	-----KNINPVENRGVSIISLGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	R-YSPPTTAFIDLCALKLGLAYDLKIVPDDW-----	329
Mrot_XP_003703961	-----KNINPVENRGVSIISLGEGWHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	R-YSPPTTAFIDLCALKLGLAYDLKIVPDDW-----	319
Hsal_EFN76593	-----KYINPSQNKSVAIMALGEGWHNYYHHVFPWDYKTSSEYGN-----	T-FNITTAIFDFAKIGWAYDLKSTSEDM-----	309
Bmor_NP_001036971	-----KNIKPSENISVSVFALGEFGHNYYHHTFPWDYKTAELGN-----	R-LNFTTAFINFNAFKIGWAYDLKTVSDEI-----	313
Dple_EHJ76461	-----KNIQPSENMSVSLFALGEFGHNYYHHTFPWDYKTAELGNN-----	R-LNFTTAFINFNAFKIGWAYDLKTVSDEI-----	313
Msex_CAJ27975	-----KSICKPSENISVSMFALGEFGHNYYHHTFPWDYKTAELGNN-----	R-LNFTTAFINFNAFKIGWAYDLKTVSDEI-----	313
Dmel_NP_731710	-----KFINPSENISVAILAFGEGWHNYYHHVFPWDYKTAELGNN-----	S-LNFTTAFIDFFAKIGWAYDLKTVSTD-----	344
Dmel_NP_650201	-----KTMNPQTQNAFVSAFTFEGEGWHNYYHHAFPWDYKTAEWGCV-----	S-LNITTAIFIDLMAKI-----	323
Tcas_NP_001180578	-----RFINPAENFVVSIVLALGEGWHNYYHHTFPWDYKTSSELGK-----	S-VNFSTAFIDFFAKIGWAYDLKTVSEM-----	311
Tcas_NP_001182164	-----KFINPAENFAVSIVLALGEGWHNYYHHTFPWDYKTSSELGK-----	S-VNFSSAFIDFFAKIGWAYDLKTVSEDL-----	311
Nvit_XP_003425691	-----RFINPVENVSVAILALGEGWHNYYHHTFPWDYKTAELGDY-----	W-ONFTTGFIDFFAMIGWAYDLKIVSLD-----	317
Bmor_NP_001037018	-----KNINPVETRPVSLVVLGEFGHNYYHHTFPWDYKTAELGDY-----	S-LNLSKLFIDFMAKIDWAYDLKTVSTD-----	313
Dple_EHJ63142	-----KNINPVETKPVSLVVLGEFGHNYYHHTFPWDYKTAELGHD-----	Q-OFSKSLFIDFMATIGWAYDLKTVSTD-----	591
Dmel_NP_651966	-----KNICPVDQGLFLFRVGEGYHNYYHHVFPWDYKSAELGK-----	S-QDVTTFKIEFMAYLGWAYDLKSVSDL-----	315
Dmel_AAF54920	-----VNVSAMNNKVLVSTATLGEFGHNYYHHVFPWDYKAAELGT-----	S-FNWTTAFIDVMAKIGOAYDLKFVSEOM-----	336
Bmor_NP_001036914	-----KRIFPAQNLIVSLLAVGEFGHNYYHHVFPWDYKTAELGNN-----	Y-LNLTTKFIDFFAWLGWAYDLKSVPSDA-----	306
Dple_EHJ77791	-----EHIKPSQNLFVFSVSGEGFGHNYYHHVFPWDYKTAELGNN-----	Y-LNLTTKFIDFFAWLGWAYDRKTFIPDDL-----	506
Msex_CAJ27976	-----KNIAPTOSYIAFTATLGEFGHNYYHHVFPWDYKRASELDGND-----	Y-LNLTTKFIDFFAWLGWAYDLKAAPEDL-----	307
Msex_CAJ43430	-----KNIAPTONYIAFTATLGEFGHNYYHHAFPWDYKRASELDGND-----	Y-LNLTTKFIDFFAWLGWAYDLKTPEDL-----	307
Bmor_NP_001037017	-----KSLKATOSGMANAFTFGEFGHNYYHHVFPWDYKRADELGDR-----	Y-INLTTRFIDFFAWMGWAYDLKTASTNI-----	310
Bmor_NP_0010404141	-----KTIKSAENNVLVAFATLGEFGHNYYHHVFPWDYKRCTELGR-----	W-LNYTCKLFIIDLCAKVGGLAYDLKVVSDV-----	309
Hsal_EFN88658	-----KSMRPAFDNSLAMTFGEFGHNYYHHVFPWDYRSGGLKD-----	G-INITSMFIHFIAFFGLAYDMKITSPEV-----	302
Tcas_NP_001137206	-----KNIYPTESATIAVLTGEGFGHNYYHHTFPWDYKTFEGFKY-----	R-SNLTTGFIDFLMAAIGWAYDLKTVSEEM-----	300
Dple_EHJ68613	-----KSLNPRENIAVVMCFV-EGFGHNYYHHTFPWDYKTRATEHPIL-----	NMLTPIMFDLMAKLGOAYDLKTVPEI-----	316
Amel_GB48193	-----KYISSVENTMLSIAALGEGWHNHFHHVFPWDYKTCGELGN-----	T-FNLTGFIIDIFARFGWAYDRKIVSPAM-----	330
Bimp_XP_003492440	-----KYISPVENVVVVSIAALEGEFGHNHFHHVFPWDYKTCGELGN-----	T-FNLTGFIIDIFARFGWAYNRKYVSPAM-----	330
Bter_XP_003395145	-----KYISPVENVVVVSIAALEGEFGHNHFHHVFPWDYKTCGELGN-----	T-FNLTGFIIDIFARFGWAYNRKYVSPAM-----	330
Mrot_XP_003703934	-----KYISPVENVAVSIAALEGEFGHNHFHHVFPWDYKTCGELGN-----	S-LNITTAIFDFAWIGWAYDCKYVSPAM-----	328
Tcas_XP_967943	-----RYISPVENVAVSLSAALGEFGHNHFHHVFPWDYKTCGELGN-----	S-YNPSTTFIDFFAKIGWAYDLKFASNSM-----	319
Dple_EHJ70677	-----RFIKPSVENRIVSLSAALGEFGHNHFHHVFPWDYKRTSELGM-----	I-NISTTFIDFAKIGWAYDLKVAITNEM-----	315
Dple_EHJ66504	-----INITPVENWKVSIIVMGEFGHNYYHHTFPWDYKASEL-----Y-----	F-INVTTFLIDIFGKIGWAYDFKVASPAL-----	282
Dmel_NP_651779	-----KRIMPSENIVSLLAMGEFGHNYYHHVFPWDYKAAELGN-----	T-VNFTTVMVLDAFHKLGWAWNMKQPSKEL-----	382
Nvit_XP_001602540	-----KKISPVNENRVLVAFSLMGEFGHNYYHHVFPWDYKAAELGDY-----	N-LNGTTAVIDFPAWLGVWWDRKQPSADL-----	335
Hsal_EFN76589	-----MYINPTNNLVSFLSCGEFGHNYYHHVFPWDYKAAELGDY-----	M-LNITTMFIDFCAKMGWAYDLKQPSREL-----	329
Nvit_XP_001607533	-----KNIGPVENKVFVSIVSFGEGFGHNYYHHTFPSDYKRAAEIGGG-----	R-FNNTTTFLIDWFPAKLGWAYDRKVPSESL-----	336
Nvit_XP_001606083	-----KTIAPTENLISAMTGGEGFGHNYYHHAFPWDYKASEFGH-----	T-IDSTTTFIDIFAKIGWAYDRKQPSSDL-----	351
Nvit_XP_003425101	-----KNIAPVENRWTTSVSYFSGEGFGHNYYHHTFPWDYKTFEPICGGP-----	R-FDVTVAWFIALFGMIGWAYDLKKPSPNL-----	309
Nvit_XP_001599836	-----KNIAPSENFLMLATLGEFGHNYYHHAFPWDYKASELGFN-----Y-----	S-VNLTTTFLIDLAALKI-----	339
Mrot_XP_003704955	-----RQVKPVENPTIVSFFALGEFGHNYYHHCFPWDYKAAELGAY-----	S-LNPTTAFIELMARVGLAYNLKTPSKEL-----	312
Nvit_XP_001599877	-----RNVKPTENAIVSFFTLGEFGHNYYHHSFPWDYKAAELPGY-----	G-LNASTGFIQAMAWLGWAYDLKTPSKEL-----	309
Nvit_XP_001599899	-----KKFRAGNAVGSVFLALGEFGHNYYHHAFPWDYKAAELPSY-----	G-LNLTTAIFDFFASIGWAYNLKTPSKEL-----	309
Hsal_EFN76591	-----RHKPADNKIVNIILNGEFGHNYYHHVFPWDYKRAAEIAR-----	ISVITLYLIDWFPAKLGLAYDLKYPSELEL-----	318
Dple_EHJ73552	-----KNIVPRENRFVACTLGEFGHNYYHHAFPWDYKAAEHFDL-----	FNWGLFLIQAFEKLGLAYGLRMAFPEM-----	302
Dple_EHJ69993	-----KKLOPVEWSFVFSIFSPGEGFGHNYYHHAFPWDYKAAELSMH-----	FNQSAKFIREFEKLGLAYDLKTAPEM-----	319
Tcas_XP_974033	-----KFMNPVENYFISMIALGEFGHNYYHHAFPSDYKRAAEYGV-----	R-YSITTFIDLAFFGLVYDLSKTAPEM-----	300
Hsal_EFN85122	-----KRIKPKOSLFAWIVTAGEGGGHNYHHTFPWDCKRLSEYGRM-----	GGLSSTLLEFLFNYVGLAYDLKTAPEM-----	312
Nvit_XP_001602289	-----KRIKPTOSWVADWATAGDGWHNYYHHIFPWDYKTCGEGFG-----Y-----	S-KGLSSTRLEFLFLAYCGLAYDLKKASFSV-----	305
Nvit_XP_001607893	-----RRISSAROSYFDLVLSLGEFGHNYYHHSFPWDYKTCGEGFG-----Y-----	K-GGVSTNFLYFLRDLGLVYDLKKASRKV-----	317
Amel_GB42217	-----		
Bimp_XP_003492461	-----NPKQTTHGSRLPQDNISVFFLT-KSFWPMPYHYMVPWDWKCCEFGSY-----	-A-DGCAIFFIKIWHELGYVTLLOTTIDSED-----	349
Bter_XP_003395146	-----LPQDNISIYFLT-KSFWPMPYHYMVPWDWKCCEFGSY-----	-A-DGWAFFFIKIWIHELGYVTLLOTTIDSED-----	283
Amel_GB48194	-----KI-PSKTISIFFLK-KSFWPKYHYKIPWDWKCCEFGSY-----	-D-DDWTFIFIKMAHELNLVNSLIIVTDDED-----	252
Nvit_XP_001599579	-----KF-PADDNTIFLLN-KSYWPYNHYLLPWDYKTCGEGFG-----Y-----	-D-RGCSTFFIKMWENLGLVDSLKTASSES-----	284
Hsal_EFN78052	-----RY-PINDNSVFFLML-KSYWLNYHYILPWDYKTCGEGFG-----Y-----	-E-KGFSTPMIKMMYEMGLIKNMKTATTED-----	295
890.....900.....910.....920.....930.....940.....950.....960		



Aame_AAB86499	VEGRMKRTGDGS	RGLTA	GTRSW	317
Dpul_EFX85062	VYNVRVRTGDGS	HP	FALODN-QFRL	331
Dpul_EFX60807	IRSRAARTGDGS	HP	FSLEDS-QYTL	327
Dpul_EFX70200	IRSRVNRTGDGS	HP	FSLEDS-QYTA	301
Dpul_EFX82757	VRSLVLRGDGT	HP	VALMENCPPLTY	300
Amel_GB51238	IKKRAARTGDGS	-RYDRKEAVHYYNLEDMK-	WGWDI-----	351
Amel_GB51236	IKKRAARTGDGS	-RYNKNETIYHHNHEDMK-	WGWD-----	359
Bimp_XP_003492441	IKRAIRTGDT	-KYNEHDDSHHHMHVDMK-	WGWD-----	360
Bter_XP_003395147	IKRAIRTGDT	-KYSKHDSDSHHMHVDMK-	WGWDV-----	360
Mrot_XP_003703957	VKKRANRTGDGS	-RYDQGTSDFHS-HVDMK-	WGWDV-----	360
Hsal_EFN78056	VKKRAARTGDGT	-RYERAEEAHQHS-HANAI	WGWD-----	361
Nvit_XP_001599665	VEKRAARTGDGN	-RIKOSSPEHSHE--DAI-	WGWDK-----	381
Amel_GB42218	IAKKIARTGNES	-SCNKNEIIHHHE--DMK-	WGWDK-----	439
Dple_EHJ71380	IRKRVSRRTGDGS	-HPLSSKKESLNOHDHHPPENPV	WGWD-----	350
Tcas_XP_968828	VEKRVKRTGDGT	-HNV	WGWDK-----	323
Tcas_EFA05209	VEKRVKRTGDGT	-HNV	WGWD-----	300
Tcas_XP_968897	VKKRGERTGDT	-KL	WGWD-----	306
Tcas_XP_968970	VEKKRAKRTGDGT	-HKV	WGWD-----	305
Tcas_XP_967341	LRRKMKRTGDCD	-Y	-----	301
Tcas_EFA05022	LRRKMKRTGDCD	-Y	-----	323
Tcas_EFA12799	INKRRKRTGDGT	-GLVDEELLENEEDKHHHHHDDSI	WGWDK-----	368
Tcas_XP_968024	INKRRKRTGDGT	-DTV	WGWDK-----	373
Tcas_XP_970520	IRKRVLRGTQ	-	-----	290
Tcas_EFA05245	IQRKLLKSTNST	-	TNKK-----	325
Tcas_XP_970732	IQRKLLKSTNST	-	TNKK-----	311
Amel_GB48195	VKKRVERTGDGS	HNL	WGWDK-----	330
Bimp_XP_003492439	VRKKRVERTGDGS	HNV	WGWDK-----	332
Bter_XP_003395144	VRKRVERTGDGS	HNV	WGWDK-----	332
Mrot_XP_003703958	VRKKRVERTGDGS	HEV	WGWDK-----	332
Mrot_XP_003703960	VRKRVERTGDGS	HEV	WGWDK-----	350
Mrot_XP_003703961	VRKKRVERTGDGS	HEV	WGWDK-----	340
Hsal_EFN76593	VKKRVERTGDGS	HDL	WGWDK-----	330
Bmor_NP_001036971	IKRNVRNTGDGS	HYL	WGWDK-----	334
Dple_EHJ76461	VKRVNRTGDGS	HHL	WGWDK-----	334
Msex_CAJ27975	IOORVORTGDGS	HHL	WGWDK-----	334
Dmel_NP_731710	IKKRVKRTGDGT	HAT	WGWDV-----	365
Dmel_NP_650201	IQRVLRGTGDGS	HEL	WGWDK-----	344
Tcas_NP_001180578	IKKRVTRTGDT	HEI	WGWDK-----	332
Tcas_NP_001182164	VKKRVLRTGDGS	HHV	WGWD-----	332
Nvit_XP_003425691	IEKRVNRTGDPT	HDR	-----	332
Bmor_NP_001037018	IQRKTKRTGDGS	HPV	WGVDVG	334
Dple_EHJ63142	IEKRVKRTGDGS	HKE	WGQEIK-----	612
Dmel_NP_651966	VKQRVQRSGDGS	HPV	WGWDK-----	336
Dmel_NP_54920	VYKRVLRTGDGS	HIAALLDANNNSAIPSELVAHLDHEKEEHAI	WGWDK-----	386
Bmor_NP_001036914	VQSRAARTGDGT	NS	WGPEE-----	326
Dple_EHJ77791	IRSRSKRTGDGT	NS	WGFSKT-----	526
Msex_CAJ27976	VOKRIERTGDGT	KL	-----	321
Msex_CAJ43430	LQKERMERTGDGT	NL	WGRGDK-----	327
Bmor_NP_001037017	IEKRALRTGDGT	VKRPNGMN	-----	330
Bmor_NP_001040141	ILRRVKRTGDRS	HFIEN-	-----	326
Hsal_EFN88658	IKQRAVRCGDGF	-	-----	315
Tcas_NP_001137206	IMKRVLRTGDGT	RKFDKIDKILNVDDDHEDML	WGWD-----	340
Dple_EHJ68613	IKQRAQRTGDGT	HHL	WGWD-----	337
Amel_GB48193	VRRRAKRGDGGS	HI	WGYGDA-----	350
Bimp_XP_003492440	VRRRAIRSGDGS	HV	WGYGDA-----	350
Bter_XP_003395145	VRRRAIRSGDGS	HV	WGYGDA-----	350
Mrot_XP_003703934	VRRRAIRSGDGS	HV	WGYGDA-----	348
Tcas_XP_967943	IARRAKSGDGS	HI	WGYGDA-----	339
Dple_EHJ70677	IRNRARRNGDRS	LRH	LEEPDP-----	336
Dple_EHJ66504	VKAIVRKRGPRF	-	-----	294
Dmel_NP_651779	VRRTLEKYGDGT	HASQLGGPEEFKDGVLAGATMVGHVHYAEVPDPELEYDAESSS-TESA	-----	441
Nvit_XP_001602540	VETVIKNRGDGS	HRTQH	OEEIPEIKDD-----	362
Hsal_EFN76589	VMSVVMKRGDGGS	HHWD	PMAVPNSEIE- Q -----	357
Nvit_XP_001607533	VRMTIEKRGDGTS	HDHSM	KTE-----	356
Nvit_XP_001600683	IKLTITNKGDGT	HCEVAAPPEETKAK	-----	377
Nvit_XP_003425101	VQTMNNKGDGT	FMKAAVS	-----	328
Nvit_XP_001599836	LKAVIKNRGDGS	HPI SH	ETVKTE-----	362
Mrot_XP_003704955	VDRTSMKGDGT	DSL	WGHQRH-----	333
Nvit_XP_001599877	IEKVSVNKGDGTS	ASK	WGNDHH-----	330
Nvit_XP_001599899	IERVLSKKGDGTS	ASK	WGVDYH-----	330
Hsal_EFN76591	VKKVAMNRGDGT	YLSFY	EVPAP-----	340
Dple_EHJ73552	ISNISKRLGENA	Q	-----	315
Dple_EHJ69993	VQRIIQTGDGT	HYA	LGNDDD-----	340
Tcas_XP_974033	VKIRAVKKGDGTS	HPV	FGKQKE-MEVN	325
Hsal_EFN85122	IYGHMKRHGDAT	GQKRCIEAERREREDLMEKWTTLDC	-----	351
Nvit_XP_001602289	VIGHARRHGDGS	-----	LVEDDI-----	323
Nvit_XP_001607893	VYGHQRHGDT	-----	LGTEKS-TLSN	339
Amel_GB42217	-----	-----	-----	215
Bimp_XP_003492461	VREMLHEVSKKKM	-----	-----	362
Bter_XP_003395146	VREMLHEVSKKKM	-----	-----	296
Amel_GB48194	IRDMLHEMTIKEI	-----	-----	265
Nvit_XP_001599579	IRDALYRAASQKL	-----	-----	297
Hsal_EFN78052	LRETLEEMATSQI	-----	-----	308
970.....980.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040			



Aame_AAB86499	-----	317
Dpul_EFX85062	DNDMQEEEQFTEITPAAEKQRSAYKETWKM-----	362
Dpul_EFX60807	E-DMKSEEKAFCCEIIPEGKEN-----	347
Dpul_EFX70200	E-DIKEEEQ-FCEIIIPEDKKN-----	320
Dpul_EFX82757	SGDIAKTNMSMAKFLKAGLPNNN-----	324
Amel_GB51238	--DMKPEEIQEINIYNKSD-----	368
Amel_GB51236	--DMKPEEIQEVNLYNKGD-----	376
Bimp_XP_003492441	--DMKPEEIQEVEIINKSN-----	377
Bter_XP_003395147	--DMKPEEIQEVDIINKRN-----	377
Mrot_XP_003703957	--DMKPEEIQEVEIINKCD-----	377
Hsal_EFN78056	--DMAEDIQKVQIFNKGD-----	378
Nvit_XP_001599665	--DMHQEDIEYATIINKAD-----	398
Amel_GB42218	--DMKPHEIEETRIFNKKD-----	456
Dple_EHJ71380	--DMTEEEKKLAEIAHKLN-----	367
Tcas_XP_968828	--DLHPDDAKMVEITHTRASOTG-----	344
Tcas_EFA05209	--DLHPDDAKMVEITHTRASOTG-----	321
Tcas_XP_968897	--DMDKEDVCKAKN-----	318
Tcas_XP_968970	--DIDKEEIEIVERNRG-----	320
Tcas_XP_967341	-----	301
Tcas_EFA05022	-----	323
Tcas_EFA12799	--DMKQDDMDMVQVHNPSREKFD-----	389
Tcas_XP_968024	--DMNQDEMNLVETLYNPSSKEL-----	393
Tcas_XP_970520	-----	290
Tcas_EFA05245	--OLOK-----	329
Tcas_XP_970732	--OLOK-----	315
Amel_GB48195	--DQTQKDREVITMVYHKAY-----	347
Bimp_XP_003492439	--DQTQODRDVTIMVVNLKKDH-----	351
Bter_XP_003395144	--DQTQODRDVTIMVVNLKKDH-----	351
Mrot_XP_003703958	--DQSODDRDQTMIIHGLKKEQ-----	352
Mrot_XP_003703960	--DQSODDRDQTVIICHGLKKEQ-----	370
Mrot_XP_003703961	--DQSODDRDQTVIICHGLKKEQ-----	360
Hsal_EFN76593	--DQTQEERDQVMITYSSAKNQ-----	350
Bmor_NP_001036971	--DLDKEEIKQAIRINPKDN-----	352
Dple_EHJ76461	--DHSKEEIRAAIRINPTDDKEE-----	355
Msex_CAJ27975	--DHDKEEVNAAIRINPKDD-----	352
Dmel_NP_731710	--DQPKEEIEDAVITHKKSE-----	383
Dmel_NP_650201	--DLTAEDARNVLLVDKSR-----	361
Tcas_NP_001180578	--DQSQEDYQDAIIIHHRKSA-----	350
Tcas_NP_001182164	--DQALEDYEGAIICHHRKSDDFN-----	353
Nvit_XP_003425691	--YKSIHNKEQQLMTE-----	346
Bmor_NP_001037018	--EVATEDKTDTTNLVNSKVL-----	353
Dple_EHJ63142	--EKISQE-----	618
Dmel_NP_651966	--DQLKEDVGVTITIICHORNEK-----	355
Dmel_AAF54920	--DISEEDRKGANVNVNKESECKLD-----	408
Bmor_NP_001036914	--DANEDILKQTPPL-----	339
Dple_EHJ77791	--E-----	527
Msex_CAJ27976	-----	321
Msex_CAJ43430	--NMKKDYVKSTDVHE-----	341
Bmor_NP_001037017	-----	330
Bmor_NP_001040141	-----	326
Hsal_EFN88658	-----	315
Tcas_NP_001137206	--DMAKEEMNYVKIHNKRKD-----	358
Dple_EHJ68613	--EFTEKMKLRYGITNSERKTA-----	357
Amel_GB48193	--DISAEDLQEELLEMDKIKQ-----	368
Bimp_XP_003492440	--DIPIEDLQELKQMDRKKE-----	368
Bter_XP_003395145	--DIPIEDLQELKQMDRKKE-----	368
Mrot_XP_003703934	--DILPEDLEELLEMNNKKR-----	365
Tcas_XP_967943	--DIEKEDLEELNKMEDFN-----	356
Dple_EHJ70677	--SVSSE-----	341
Dple_EHJ66504	-----	294
Dmel_NP_651779	KLDENENEGERMKKSKKAAN-----	461
Nvit_XP_001602540	-----	362
Hsal_EFN76589	-----	357
Nvit_XP_001607533	-----	356
Nvit_XP_001600683	-----	377
Nvit_XP_003425101	-----	328
Nvit_XP_001599836	-----	362
Mrot_XP_003704955	-----	333
Nvit_XP_001599877	--RRQREQQQKKVKTR-----	343
Nvit_XP_001599899	--OKKOEEEQKVR-----	341
Hsal_EFN76591	-----	340
Dple_EHJ73552	-----	315
Dple_EHJ69993	--RNAVTCIGFKHPINPTYNVKYQAPTATLGNRGLPLNHQDDYLEPNVLKRNVIDA-----	394
Tcas_XP_974033	FSDRQVTANG-----	335
Hsal_EFN85122	-----	351
Nvit_XP_001602289	--RRTTPCF-----	330
Nvit_XP_001607893	--PKSL-----	343
Amel_GB42217	--TLIAE-----	220
Bimp_XP_003492461	--TL-AEGLGKLLKEKSMYNAKKLKLMLVKN-----	388
Bter_XP_003395146	--TL-AEGLGKLLKEKSMYNAKRMKLMVRN-----	322
Amel_GB48194	--TL-EDSLEKLKEKSISFMNEKTKLIKHH-----	291
Nvit_XP_001599579	--DV-PEALESVKKIADEETIKAKLRYHH-----	323
Hsal_EFN78052	--PI-NEAFNKLKKKSEENACRESLLYHP-----	334
1050.....1060.....1070.....1080.....1090.....	

Apêndice B

Alinhamento de sequências completas de aminoácidos utilizadas para a construção da árvore filogenética das elongases. À direita tem-se o número de aminoácidos da sequência até o fim do fragmento. Embaixo tem-se o número de aminoácidos do bloco e o gráfico do nível de conservação do aminoácido nas sequências. Acima, a seta azul indica o início do sítio que caracteriza a enzima e a vermelha indica o fim deste sítio. Uma elongase de *A. mellifera* não apresentou o sítio, porém sua expressão foi comprovada. Aminoácidos idênticos em todas as sequências são indicados por “*”, substituições conservadas são indicadas por “:” e semi conservadas por “.”. Para a nomenclatura das sequências, foi utilizado a primeira letra do gênero e as três primeiras letras do nome específico, seguido do número de acesso da sequência.

Rpul_JAA58008
 Dpul_EFX85691
 Amel_GB53872
 Amel_GB53873
 Amel_GB45596
 Bimp_XP_003490277
 Bter_XP_003401825
 Hsal_EFN75445
 Mrot_XP_003707508
 Tcas_XP_970514
 Dmel_NP_730187
 Bimp_XP_003488925
 Bter_XP_003398598
 Bimp_XP_003488983
 Bter_XP_003398349
 Bimp_XP_003488976
 Bter_XP_003402700
 Bter_XP_003401771
 Bimp_XP_003492944
 Bter_XP_003401772
 Bimp_XP_003486801
 Bter_XP_003401883
 Bimp_XP_003492943
 Bter_XP_003401773
 Bimp_XP_003484516
 Rpul_JAÄ57286
 Dpul_EFX8828
 Bimp_XP_003490999
 Bter_XP_003399502
 Mrot_XP_003700522
 Hsal_EFN75681
 Nvit_XP_001600048
 Tcas_XP_971599
 Amel_GB51249
 Bimp_XP_003491013
 Bter_XP_003399534
 Mrot_XP_003700524
 Nvit_XP_001599996
 Hsal_EFN86956
 Tcas_XP_968784
 Dmel_NP_730841
 Dmel_NP_730843
 Tcas_XP_968706
 Amel_GB51247
 Bimp_XP_003491006
 Bter_XP_003399522
 Mrot_XP_003700456
 Nvit_XP_001600017
 Tcas_XP_971544
 Dmel_NP_730846
 Dmel_NP_649754
 Dpul_EFX76285
 Amel_GB54396
 Bimp_XP_003491027
 Bter_XP_003399529
 Hsal_EFN85774
 Mrot_XP_003700518
 Nvit_XP_001599938
 Dmel_NP_651060
 Amel_GB54401
 Bimp_XP_003490969
 Bter_XP_003399613
 Nvit_XP_001599942
 Hsal_EFN76719 MSEQRKVDDVVSOPIKVPQYMGSNRPRTRGAKQYRSSOSGRDSTITTRDEEKRGSQFNAIDPNSDLAFVIRDAGPEKMAS
 Tcas_XP_968636
 Dmel_NP_788716
 Amel_GB54302
 Bimp_XP_003490977
 Bter_XP_003399465
 Mrot_XP_003700520
 Nvit_XP_001599914
 Tcas_XP_968563
 Dmel_NP_651063
 Dpul_EFX74343
 Dpul_EFX74342
 Dpul_EFX74344
 Dpul_EFX74345
 Dpul_EFX74502
 Dpul_EFX74346
 Dpul_EFX74501
 Dpul_EFX74503
 Dpul_EFX76305
 Mrot_XP_003700519
 Nvit_XP_001599867
 Amel_GB46038
 Bimp_XP_003484909
 Bter_XP_003396173
 Mrot_XP_003703286
 Hsal_EFN80181
 Tcas_XP_966527
 Dmel_NP_001097580
 Dmel_NP_729666
 Amel_GB54399
 Tcas_XP_967030
 Dmel_NP_651062
 Dmel_NP_651104
 Amel_GB40681
 Bter_XP_003399626
 Nvit_XP_001607111
 Nvit_XP_001603768
 Mrot_XP_003704078
 Hsal_EFN76075
 Hsal_EFN76074
 Bimp_XP_003489235
 Bter_XP_003395770
 Mrot_XP_003700216
 Nvit_XP_001602545
 Dmel_NP_649955
 Dmel_NP_649956
 Dmel_NP_731419
 Dmel_NP_649958
 Dmel_NP_649957
 Dmel_NP_732912
 Dmel_NP_611365
 Dmel_NP_725820
 Tcas_XP_974047
 Tcas_XP_973993
 Tcas_XP_975397

MAS
MAS
MAS

3
3
3

7

-MKVMEEL

1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80

Rpul_JAA58008	MGGVGGVVEAPLNLLNIKPNVYSEFDFEVNFDKDNLRL--WMN	39
Dpul_EFX85691	M-PRVSYIIFKPFDEFERHEDAKI-WFM	24
Amel_GB53872	MKNLISYTEEVV-T-PNYLYKVFNPEKKNFV--	26
Amel_GB53873	MKNLISYTEEVV-T-PNYSYIIFNPEKKNFV--WMQ	35
Amel_GB45596	MNKLYMEVV-V-PNYSYIIFNPEEETIHMDTKI--WMI	35
Bimp_XP_003490277	MNKVDYME-VV-PNYSYIIFNPEEETIHMDTKI--WMI	34
Bter_XP_003401825	MNKVDYME-VV-PNYSYIIFNPEEETIHMDTKI--WMI	34
Hsal_EFN75445	MNKVDYME-VV-PNYSYIIFNPEEETFSHYETKV--WMW	34
Mrot_XP_003707508	MNKVDYME-VV-PNYSYIIFNPEEETFSHYETKV--WMW	34
Tcas_XP_970514	MKEHQ-VS-PNYSYIIFNPESDFIHQESTR-T--WMK	32
Dmel_NP_730187	MINNDIS-VI-PNYSYIIFDPEENDFIHQRTRK--WML	32
Bimp_XP_003488925	MINKLNHVP-LV-PNYSYIIFNPEKKNFVYSDALT--DIT	35
Bter_XP_003398598	MIDKFNHTS-IZ-PNYSYIIFNPEKSLAYSDTVI--RIT	35
Bimp_XP_003488983	MDELDYTS-IZI-PNYSYIIFNPEKRNLAISIVM--RII	34
Bter_XP_003398349	MDKLDYMP-IZI-PNYSYIIFNPEKRNFDWDTDM--WFK	34
Bimp_XP_003488976	MNNLGHPT-LV-PNYSYIIFDPEKKNFDWDTDM--WFK	34
Bter_XP_003402700	MNNLGHPT-LV-PNYSYIIFDPEKKNFDWDTDM--WFK	34
Bter_XP_003401771	MGNADYMO-LV-PNYSYIIFNPEKTMVSYTNSLT--WSR	34
Bimp_XP_003492944	MSYMO-MQ-PNYSYVNLNEKNFVYNDTVI--PMN	31
Bter_XP_003401772	MDKMKENINYMQ-IL-PNYSYVNLNEKNFVYNDTVI--PMN	38
Bimp_XP_003486801	MNKEGSPU-II-EPSHVFNFPEKNNFISDTK--WIQ	34
Bter_XP_003401883	MNKNEDSPQ-II-EPSHVFNFPEKNNFISDTK--WIQ	34
Bimp_XP_003492943	MDEVNYFVNNGC-PEHWIIFDPETTDIFINVVLI--WMR	35
Bter_XP_003401773	MNDVNYFVNNGC-PEHWIIFDPETTDIFINVVLI--WMR	35
Bimp_XP_003484516	MCEEDLTDPIA-PEPSYVPDFEKNNSYGDTE--WLL	34
Rpul_JAÄ57286	-MEAUVTTDTFLPRDPRTMGWPVL	22
Dpul_EFX88828	-MFAAVKDFIDG--YNDLMIN--RRDPVRDGWFLM	30
Bimp_XP_003490999	-MAQLVRAIYDG--YRDLMDN--KSDPRVNNNPM	30
Bter_XP_003399502	-MAQLVRAIYDG--YRDLMDN--KSDPRVNNNPM	30
Mrot_XP_003700522	-MAOVRTIYDG--YRDLMDN--KSDPRVNDWMLM	30
Hsal_EFN75681	-MALLGSIVDG--YRDLMDN--KSDPRVNDWMLM	30
Nvit_XP_001600048	-MAQLVRMANDG--YRDLMDN--KSDPRVNDWFLM	30
Tcas_XP_971599	-MTOLIRNVIDG--YRDLMDN--KSDPRVNDWFLM	30
Amel_GB51249	-MSILMQVYDVR--FHEILDK--HADORTTNWFLM	29
Bimp_XP_003491013	-MSIVMQVYDVR--LHEILDK--NADORTTDWFLMM	29
Bter_XP_003399534	-MSIVMQVYDVR--LHEILDK--NADORTTDWFLMM	29
Mrot_XP_003700524	-MSIIIMQVYDVR--LHEILDK--NADORTTNWFLM	29
Nvit_XP_001599996	-MSIVMQVYDVR--FHEILDNT--HADKRTTNWFLM	29
Hsal_EFN86956	-MQYINR--FHEDMLDK--HADTRTTNWLLM	25
Tcas_XP_968784	-MAFLDDLMRNR--VNSYLNK--YODPRTADWPLM	29
Dmel_NP_730841	-MALIMKYIDS--ISRYNDS--HSDSRTKGWPM	29
Dmel_NP_730843	-MIDSQTFDSN--TLSLKN--IEDPRTTSNWFML	29
Tcas_XP_968706	-MIAVLSVIDLK--LHEILDK--NADORTTNWFLM	29
Amel_GBS1247	-MIIIMQVYDVR--ISRYNDS--HSDSRTKGWPM	29
Bimp_XP_003491006	-MTAIVTDLVHG--YRDLMDN--KSDPRVNHMM	30
Bter_XP_003399522	-MTAIVTDLVHG--YRDLMDN--KSDPRVNNVMM	30
Mrot_XP_003700456	-MTSIVANLHG--YRDLMDN--KSDPRVNTVLLM	30
Nvit_XP_001600017	-MTSVATIVHG--YRDLMDN--KSDPRVRENPMM	30
Tcas_XP_971544	-MAHLVTSVIDLK--FEDILEN--KSDPRVKGMAMM	30
Dmel_NP_730846	-MAILQEAQKWR--YRDLMDN--KSDPRVNDPFL	30
Dmel_NP_649754	-MDYLTMFWDG--WRLDMLDN--LDRRRVENWLFM	29
Dpul_EFX76285	-MASLVRATVWUDG--INTIW--KHDIMEN--KGDIMEN	26
Amel_GBS4396	-MSVIMEL--KHDIMEN--KGDIMEN	26
Bimp_XP_003491027	-MSTIVDW--KDVINN--KCHPYTQDWFLV	26
Bter_XP_003399529	-MSTIVDW--KDVINN--KCHPYTQDWFLV	26
Hsal_EFN85774	-MEW--KDKLVN--RHDPRTKEWFL	22
Mrot_XP_003700518	-MSGIVEW--KDIIVN--TDPRTQDWFLV	26
Nvit_XP_001599838	-MSGIAEY--KNNLMYN--RNDKRTENWFLL	26
Dmel_NP_651060	-MSVRLNE-TTIVDR--MVNFFVE--HEDLRTKQWFLL	33
Amel_GB54401		
Bimp_XP_003490969	AAAELVVVEREPEPRIEMS---DTNRTFVGAGQGLVRMALDO--TEIILTT--VSDPRVSDWPLM	59
Bter_XP_003399613	AAAELVVVEREPEPRIEMT---DTNRTFVGAGQGLVRMALDO--TEIILTT--VSDPRVSDWPLM	59
Nvit_XP_001599942	AAAELVVVEREPEPRIEMT---DTNRTFVGAGQGLVRMALDO--TEIILTT--VSDPRVSNNPLM	63
Hsal_EFN76719	AAAELVMEREPLEIY---DMNRSFVGAGQGLVKMALDO--XMEILTT--ASDPRVNDWPLM	136
Tcas_XP_968636	-MVGVLVRMAFDR--XHILDR--ISDPRRTSDWPLM	30
Dmel_NP_788716	-MSMNYHNNSSSRFEMVVEIANIALDEFKTHHI-RNNTGVLQRY--KOLVEED--YCDPRAKRPLM	63
Amel_GBS4302	-MSNYYHNNSSSRFEMVVEIANIALDEFKTHHI-RNNTGVLQRY--KOLVEED--YCDPRAKRPLM	63
Bimp_XP_003490977	-MNNSSAHPIDRMSNIYNNSSVLRF--HHVFBHD--LSDPRTTRDWFLI	42
Bter_XP_003399465	-MNIGSAPHIDRMSNIYNNSSVLRF--HHVFBHD--LSDPRTTRDWFLI	42
Mrot_XP_003700520	-MNMNSTPPIDRMSNIYNNSSVMRF--KXLVFBHD--LSDPRTTRDWFLI	42
Nvit_XP_001599914	VHEYMVLTNMISDDDDLTMTNSSLHSQDLASTINNSLVKF--THKVFWD--LSDPRTTRDWFLI	67
Tcas_XP_968563	-MANGTVDKTFKGV--YHVFHD--LSDPRTTRDWFLI	32
Dmel_NP_651063	-MAAVNATQVDY--WFLFTE--LSDPRTTRDWFLI	32
Dpul_EFX74343	-MGSFIEAIVFO--ZFKLW--SRDKRRLDGFPPLM	29
Dpul_EFX74342	-MASLTOAVILE--KKRLW--SRDQRRLDGWPPLM	29
Dpul_EFX74344	-MTTFQVUQDEF--VDKVN--LSDPRTTRDWFLI	29
Dpul_EFX74345	-MDSVVQYIDE--ZIKLW--RDRRTTDGWL--I	29
Dpul_EFX74502	-MCYSSIVQTLIDE--SRIIND--LDRKRTDGWPPLA	31
Dpul_EFX74346	-MGSVAVETLINA--SKRAME--LDRRTTDGWL	29
Dpul_EFX74501	-MSFVLQNLVNE--LSDPRTTRDWFLI	29
Dpul_EFX74503	-MGSIDQAFFL--CRVWEE--LDRKRTDGWPPLM	29
Dpul_EFX76305	-MEYLNV--LHDV--RSQDPRVADWFLV	25
Mrot_XP_003700519	-MTTLIRRIYHG--RYINEE--LADPRTQDFPLI	30
Nvit_XP_001599867	-MATTIREIMRG--RYMNEE--IADPRTKDWFLI	30
Amel_GB46038	-MMAMASLINSTTTLINDAYN--YVLWILS--LADERTRGWLLV	39
Bimp_XP_003484909	-MASLINSTTTLINDAYN--YVLWILS--LADERTRGWLLV	36
Bter_XP_003396173	-MASLINSTTTLINDAYN--YVLWILS--LADERTRGWLLV	36
Mrot_XP_003703286	-MAGIINSTTTLINDYD--YVLWILS--LADERTRGWLLV	36
Hsal_EFN80181	-MANFINSTASLINDAYD--YVLWILS--LADERTRGWLLV	36
Tcas_XP_966527	-MAYLWILS--LADERTRGWLLV	36
Dmel_NP_001097580	-MVNLINSOTTLTKIVD--YEWLWILS--LSDSRTKGWPLV	36
Dmel_NP_729666	-MTSSMGNDKTES--TSYPFAD--LADERTQDWPLV	32
Amel_GB54399	-MASLG--SFHPPFD--OPDERTRNWPLV	25
Tcas_XP_967030	-MSNLQHQMVN--CNEILDTNNNKNEIIIDTTPMM	33
Dmel_NP_651062	-MOKGAVDLPFAKFTDEIMDRIMTSLHMVVEN--NELMES--KRDPPVUDSFLM	52
Dmel_NP_651104	-MOKGAVDLPFAKFTDEIMDRIMTSLHMVVEN--NELMES--KRDPPVUDSFLM	52
Amel_GB40681	-MVAVALYCL--VRLPLI--EDPDP--VRLPLI	27
Bter_XP_003399626	-MELVEI--KNYWNE--RSDSRZNPLI	25
Nvit_XP_001607111	-MGFVEL--KDPYWNQ--NADPRNTSLPFI	25
Nvit_XP_001603768	-MSLSEL--KRYHMD--RADPRNTSWFMV	25
Mrot_XP_003704078	-MEIWNSI--KGYLDT--EKDPRTEWYXA	26
Hsal_EFN76075	-MSILSW--KHYLNED--LADPRTKDWFLV	25
Hsal_EFN76074	-MFELON--IFYVWTD--SLDPRLLYMPII	25
Bimp_XP_003489235	-MSVDFKLGDGDKALPITHVPKVGFLET--KRYIMED--AADSrvADWFLM	48
Bter_XP_003395770	-MSVDFKLGDGDKALPITHVPKVGFLET--KRYIMED--AADSrvADWFLM	48
Mrot_XP_003700216	-MSVDTCKLGDGDKGKFITHVQSQNMGFL--KRYLMERH--AADPRVADWFLM	48
Nvit_XP_001602545	-MPVVLIRLNKSSLISVDKLIDLFDMMPGVEA--KOYLVEE--ISDPRVADWPM	51
Dmel_NP_649955	-MADDINGLI--SEDP--VRLPLI	21
Dmel_NP_649956	-MFA--PDP--VKIPVV	13
Dmel_NP_731419	-MLGDLVDFLGKS--PPDP--VRLPLI	22
Dmel_NP_649958	-MFAHMLDFLNRS--PPDP--VRLPLI	22
Dmel_NP_649957	-MPFVFDKDP--FADP--VQLPLA	18
Dmel_NP_732912	-MLEIFRTP--YADS--KOLPLA	18
Dmel_NP_611365	-MLRLYLRIP--QADP--NPJPLA	18
Dmel_NP_725820	-MNFTLLDLFRGL--PADP--VHLPMF	22
Tcas_XP_974047	-MTTSVQK--FLDVTDSQISDVRMNRF--LM	28
Tcas_XP_973993	-MIDYCINVLSGSPVSEEVKGYINP--LSDPRVKNTFLM	39
Tcas_XP_975397	-MFOYADPRIENWFLM	15

.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160

Rpul_JAA58008	RNWHTSVWVWGLYMLWVFG-GOAIFMAORPAFK-LTRPLQAWNVLLSUVFSVVGACR-	TI	94
Dpul_EFX85691	RYWTCFCVVGIVMLVPIF-GOIDLNNRPRFE-LRGPLLCICWNLILLATFESIIGACR-	TI	79
Amel_GB53872	-----YM--EXXX-XXXXXXXXXXXXXXLFSIIGLSR-	TL	57
Amel_GB53873	NNLTSYYCIIIIIIIFN-GKYIMAKRPRFN-LRGPLLWSLLSLFLSIIIGLFR-	TL	90
Amel_GB45596	KNWJNCFCYCGIYMLIFG-GKHYMSNRPKE-LRGVLALWNLLASFSIIIGLTR-	TL	90
Bimp_XP_003490277	KNWJNCFCYCGIYMLIFG-GOHYMSNRPKE-LRGILALWNLLATFSIIIGTTR-	TA	89
Bter_XP_003401825	KNWJNCFCYCGIYMLIFG-GOHYMSNRPKE-LRGILALWNLLATFSIIIGTTR-	TA	89
Hsal_EFN75445	NNWJNCFCYCGIYMLIFG-GOHYMASRPRFE-LRGILCLWNLLATFSIIIGTTR-	TA	89
Mrot_XP_003707508	KNWJNGFYIYCIGIYMLIFG-GOHYMSNRPKE-LRGLLIWINNLLAMFSIIGFTR-	TA	89
Tcas_XP_970514	DNWJLGFLGVVGIYMLIFG-GOHLWMQRPRFE-LRGVLISLNNLLATFSIIIGACR-	TV	87
Dmel_NP_730187	ENWJTWFLGFLGVVGIYMLIFG-GOHFMONRPRFO-LRGPLLIWINNLLAMFSIMGAAR-	TA	87
Bimp_XP_003488925	NHYDPCFVSYAIYVILIFP-GKHYMSNRPKE-LRGALALWNISLAFLSIFGFPLR-	MW	90
Bter_XP_003398598	NHYDPCFVSYAIYVILIFP-GKHYMSNRPKE-LRGALALWNISLAFLSIFGFPLR-	MS	90
Bimp_XP_003488993	NHYDPCFVSYAIYVILIFP-GKHYMSNRPKE-LRGMLILWSALLAIIFSIFGFPLR-	MG	89
Bter_XP_003398349	NHYDPCFVSYAIYVILIFP-GKHYMSNRPKE-LRGMLILWSALLAIIFSIFGFPLR-	VG	89
Bimp_XP_003488976	DQFPNCFCYCGIYMLIFP-GKHYMSNRPKE-LRGMLILWSALLAIIFSIFGFPLR-	SM	89
Bter_XP_003402700	DQFPNCFCYCGIYVALIFP-GKHYMSNRPKE-LRGMLILWSALLAIIFSIFGFPLR-	IM	89
Bter_XP_003401771	SHYPNCFCYCGIYVLLIFP-GKHYMSNRPKE-LRGMLILWSALLAIIFSIFGFPLR-	TA	89
Bimp_XP_003492944	DHLPVCLVVCAYVILIFP-GKHYMSNRPKE-LRNKLALWNSALALFSIMGFLR-	MG	86
Bter_XP_003401772	NHLPVCFVCAIYVILIFP-GKHYMSNRPKE-LRNWLILWSFLATFSVLFGLRL-	MG	93
Bimp_XP_003486801	NNFQYCICCIYVILIFP-GKYMSSRPRKD-LRKPALALNSGFFAVFIIIGPCR-	TA	89
Bter_XP_003401883	NNFQYCICCIYVILIFP-GKYMSSRPRKD-LRKPALALNSGFFAVFIIIGPCR-	TA	90
Bimp_XP_003492943	NNWKKCFYTAIYLVVIPIF-GKLYMSNRPKE-LRNALALWNSGLLAIFIIIGFIR-	TM	90
Bter_XP_003401773	NNWKKCFYTAIYLVVIPIF-GKLYMSNRPKE-LRNLTALWNSGLLAIFIIIGFIR-	TM	90
Bimp_XP_003484516	DNIVVICICYVYYVYVVIIV-GISHMLEHKYN-LKRSRALWYGLMALLSIIGFSR-	TA	89
Rpul_JAA57286	GSKQFLITLILIYIVLKVIGKGPRFMGRKAFLKPVIMIYVLSMVILNAYFVIN-	--	77
Dpul_EFX88828	SSFFPTTMICSCYIYVFLKSGLRMRDRPKF-LRSAAIIYVIVLASYLIVLVK-	--	84
Bimp_XP_003490999	SSPPPTTIFICLFLYAFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRKVMLFYNLFOVILSTWLFE-	--	84
Bter_XP_003399502	SSPPPTTIFICLFLYAFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRKIMLFYNLFOVILSTWLFE-	--	84
Mrot_XP_003700522	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRRVMIFYNLFOVIFSAWLYE-	--	84
Hsal_EFN75681	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRKVMIWYNLFOVVFSTWLFE-	--	84
Nvit_XP_001600048	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRKVMIWYNLFOVVFSTWLFE-	--	84
Tcas_XP_971599	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRKVMIWYNLFOVVFSTWLFE-	--	84
Amel_GB51249	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRNLSIVVYFLFOVIFSTWLFE-SLMGGWWGHYSFHCOPVDYSDNPIA	108	108
Bimp_XP_003491013	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRNNAIIYVFLFOVIFSAWLYE-	--	83
Bter_XP_003399534	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRNNAIIYVFLFOVIFSAWLYE-	--	83
Mrot_XP_003700524	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRNNAIIYVFLFOVIFSAWLYE-	--	83
Nvit_XP_001599996	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRNNAIIYVFLFOVIFSAWLYE-	--	83
Hsal_EFN86956	SSPPPTTFLAICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRNNAIIYVFLFOVIFSAWLYE-	--	83
Tcas_XP_968784	SSPPFTVFLGICLISYYVVFVFKVGLPKLMENRKPFO-LRNNAIIYVFLFOVIFSAWLYE-	--	83
Dmel_NP_730843	SSPPFTTFLAVCLIDYYVVLVKVLGPRLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	83
Tcas_XP_968706	SSPPFTTFLAVCLIDYYVVLVKVLGPRLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	83
Amel_GB51247	SSPPFTTFLAVCLIDYYVVLVKVLGPRLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	83
Bimp_XP_003491006	SSPPFTTFLAVCLIDYYVVLVKVLGPRLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	84
Bter_XP_003399522	SSPPFTTFLAVCLIDYYVVLVKVLGPRLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	84
Mrot_XP_003700456	SSPPFTTFLAVCLIDYYVVLVKVLGPRLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	84
Nvit_XP_001600017	SSPPFTTFLAVCLIDYYVVLVKVLGPRLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	84
Tcas_XP_971544	SSPPFTTFLAVCLIDYYVVLVKVLGPRLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	84
Dmel_NP_730846	SSPLPFTAVVCLISIVVFLVKVLGPKLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	83
Tcas_XP_968706	SSPLPFTAVVCLISIVVFLVKVLGPKLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	83
Amel_GB54396	SSPLPFTAVVCLISIVVFLVKVLGPKLMENRKPFLN-QNTLVMYNAIQVVFSAWLYE-	--	83
Bimp_XP_003491027	SSGPLPLAVILVTTVYFLCSAGSPRYMKDKPKYE-LRKTIMIVYVFLQVLFSSILYFE-	--	80
Bter_XP_003399529	SSGPLPLAVILVTTVYFLCSAGSPRYMKDKPKYE-LRKTIMIVYVFLQVLFSSILYFE-	--	80
Hsal_EFN85774	SSGPLPLAVILVTTVYFLCSAGSPRYMKDKPKYE-LRKTIMIVYVFLQVLFSSILYFE-	--	76
Mrot_XP_003700518	TGCPPLMMIIVIYVYFSVSAGSPRYMRDKPKYO-LRNRMVIAIYNFIOVILSTWLFE-	--	80
Nvit_XP_001599838	TGPVPLILIMIYTLYFLSISLGPRLMRDRPKFT-LRNLTIVYVNFIOVILSTWLFE-	--	80
Dmel_NP_651060	NAPGFLPMILGAYLYFLCAGYPRYMRDRPKFE-LKNTLILLVYNAVQVLLSWLFY-	--	87
Amel_GB54401	-----MSHFNNININ-----E	--	10
Bimp_XP_003490969	DSP1PTFLIVLLYLGYVIFGPRVMANKKPFK-LRGTLVAYNAFQVVFSLGMLYE	--	113
Bter_XP_003399613	DSP1PTFLIVLLYLGYVIFGPRVMANKKPFK-LRGTLVAYNAFQVVFSLGMLYE	--	113
Nvit_XP_001599949	DSP1PTFLIVLLYLGYVIFGPRVMANKKPFK-LRGTLVAYNAFQVVFSLGMLYE	--	117
Hsal_EFN76719	DSP2PTFLIVLLYLGYVIFGPRVMANKKPFK-LRGTLVAYNAFQVVFSLGMLYE	--	190
Tcas_XP_968636	DSP2PTFLIMMVTYFLVLYFLGPRLMENRKPFLN-QREVLIAYNAQVLYSLFMLME-	--	84
Dmel_NP_788716	EHPMPFTGMMVAVLYLSWLVLIVGFLPFLMRDRPKF-LRKLILAYNLVQQLFSTWIFYE	--	117
Amel_GB54302	PSPVPGTIIYLGYFLFILSWSGPKHMENRKPFLN-QLNILICYFLQILLFSTWIFYE	--	85
Bimp_XP_003490977	PSPVPGASIIIGLYFLFILSWSGPRHEHHRKPFLN-QLKILVFLYFLQVLFSTWIFYE	--	96
Bter_XP_003399465	PSPVPGASIIIGLYFLFILSWSGPRHEHHRKPFLN-QLKILVFLYFLQVLFSTWIFYE	--	96
Mrot_XP_003700520	TSPVPGASIIIGLYFLFILSWSGPRHEHHRKPFLN-QLKILVFLYFLQVLFSTWIFYE	--	96
Nvit_XP_001599914	TSP1PIP1GIGIMVAYIYFLVLSWGRPRHEHHRKPFLN-QLNILVFLYFLQVLFSTWIFYE	--	121
Tcas_XP_968563	THPV-IPFIVGFLYFLVFLGPRLMKDRPFD-FKLRLILYNAFQVLFSTWIFYE	--	85
Dmel_NP_651063	KSP1PLLGLILAFYLFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLNRLVFLYFLQVLFSTWIFYE	--	84
Dpul_EFX74343	NSPVASVVICIAYIYFLVFLGPKLMENRPAFK-LRNRMVYNAIOPFLQVLFSTWIFYE	--	83
Dpul_EFX74342	SSPLPSIILICLTYFVSKVFLGPKLMENRPAFK-LRNRMVYNAIOPFLQVLFSTWIFYE	--	83
Dpul_EFX74344	SSPIPAMVICLIVYVFLVFKVGLPKLMENRPAFK-LRNRMVYNAIOPFLQVLFSTWIFYE	--	83
Dpul_EFX74345	ESPLPTVVICLILYFLVFKVGLPKLMENRPAFK-LRNRMVYNAIOPFLQVLFSTWIFYE	--	83
Dpul_EFX74502	NTPPTVVICLILYFLVFKVGLPKLMENRPAFK-LRNRMVYNAIOPFLQVLFSTWIFYE	--	85
Dpul_EFX74346	EPFLPTVLSIIMTFLVFKVGLPKLMENRPAFK-LRNRMVYNAIOPFLQVLFSTWIFYE	--	83
Dpul_EFX74501	ESPLTPVVICLIALYLSMVKINGPKLMENRPAFK-LRNRMVYNAIOPFLQVLFSTWIFYE	--	83
Dpul_EFX74503	ESPNSPFLICQAYLVLVKVMGPKLMENRPAFK-LRNRMVYNAIOPFLQVLFSTWIFYE	--	83
Dpul_EFX76305	RSP1PIIYGIVSILLVFLYF-CPRFMDKRPFAST-LKYLMIYVFLQVLFSTWIFYE	--	78
Mrot_XP_003700519	GSPNVCILGILGFYLFLYVFLQDLSGPMISARCKPFN-LDRVQAYNAQDIVIYVFLYF-	--	84
Nvit_XP_001599867	GSPNPNPGLALLGFYLFLYVFLQDLSGPMISARCKPFN-LDRVQAYNAQDIVIYVFLYF-	--	84
Amel_GB46038	DSPKPTLIIYTMLYLLIVWA-GPKIMRNRKAKF-LTWAVALPYNLMACLNAYIAIO-	--	92
Bimp_XP_003484909	DSPKPTLIIYTMLYLLIVWA-GPKIMRNRKAKF-LTWAVALPYNLMACLNAYIAIO-	--	89
Bter_XP_003396173	DSPKPTLIIYTMLYLLIVWA-GPKIMRNRKAKF-LTWAVALPYNLMACLNAYIAIO-	--	89
Mrot_XP_003703286	DSPKPTLIIYTMLYLLIVWA-GPKVMKMRKAKF-LTWAVALPYNLMACLNAYIAIO-	--	89
Hsal_EFN80181	DSPKPTLIIYTMLYLLIVWA-GPKAMKKRKAFL-TLWAVALPYNLMACLNAYIAIO-	--	89
Tcas_XP_966527	DSPGPTLIIYTMLYLLIVWA-GPKAMKKRKAFL-TLWAVALPYNLMACLNAYIAIO-	--	89
Dmel_NP_001097580	KSPWNIILAYLMLVWVY-AFPWTARCKPLQ-LRVPFLCHSLAMIFLNGYICLE-	--	85
Dmel_NP_729666	DSFWTWPVPLLSIYLLMVRY-APKWTTRHPLQ-LRPLPFLCHSLAMIFLNGYICLE-	--	78
Amel_GB54399	YSPGPIILCIVCCYLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QFLILLAYFLQVFLNWL-	--	87
Tcas_XP_967030	SSPVWVPLILVLLVLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QFLILLAYFLQVFLNWL-	--	106
Dmel_NP_651062	SSPPVWVPLILVLLVLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QFLILLAYFLQVFLNWL-	--	83
Dmel_NP_651104	GNLWIVLALIAYVAFVFLYHGPGRMANRPF-E-LKRVMOVYVNVVOLANATIFV-	--	81
Amel_GB40681	-----MSHFNNININ-----E	--	79
Bter_XP_003399626	GSP1IIP1IYLGYFLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	79
Nvit_XP_001607111	GSP1IIP1IYLGYFLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	79
Nvit_XP_001603768	KYQPIYMLIIFAGYLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	80
Mrot_XP_003704078	NSPSLFLVTSFLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	79
Hsal_EFN76075	VSMWVYSFISIISLFLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	55
Hsal_EFN76074	NSTWYFLVFLAIVYVAFVFLYHGPGRMANRPF-E-LKRVMOVYVNVVOLANATIFV-	--	79
Bimp_XP_003489235	GSPFPPLGLIILYFLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	102
Bter_XP_003395770	GSPFPPLGLIILYFLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	102
Mrot_XP_003700216	KSPSPPLLAIISVLLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	102
Nvit_XP_001602545	APPVPLFLVLLVLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	105
Dmel_NP_649955	GSPWPSLILIVSLLYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	75
Dmel_NP_649956	SNPWLTGTLIYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	67
Dmel_NP_731419	ASHKPVLMLVLAITYLFFVTKIAGPKIMRNRKAKF-LRGGLKAYIMQIVINVIMCFF-	--	76
Dmel_NP_649958	SSHWPVLLILGIVYFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	76
Dmel_NP_649957	GSIRTSVIIIIYVLLFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	72
Dmel_NP_732912	TGPGPIIILYLGYLLVFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	72
Dmel_NP_611365	GSPWPNIILYLGYLLVFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	72
Dmel_NP_725820	GSPWPNIILYLGYLLVFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	76
Tcas_XP_974047	KSPQPLIITLGYLLVFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	82
Tcas_XP_973993	QTQPLPQIVISLYMLFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	93
Tcas_XP_975397	KSPLOPLIITLGYLLVFLVFLGPKLMENRKPFLN-QLTFIQCYVNFQDIIANAYLVQ-	--	69



	*	
Rpul_JAA58008	PELTH	VLRHGFVFHNSVCN--NSYIEYDRVSGFW--
Dpul_EFX85691	PELVV	VTRHFGLYHSICV--PSYIEDDDKVSGFW--
Amel_GB53872	PEMIIH	ILYIHYGFYHSVCI--PSFIEQDVSGFW--
Amel_GB53873	PEMIIH	ILYIHYGFYHSVCI--PSFIEQDVSGFW--
Amel_GB45596	PELVE	VLRHGFVFHNSVCI--PSFIEQDVSGFW--
Bimp_XP_003490277	PELTH	VLRHGFVFHNSVCI--PSFIEQDVSGFW--
Bter_XP_003401825	PELTH	VLRHGFVFHNSVCI--PSFIEQDVSGFW--
Hsal_EFN75445	PELTH	ALRHHGLHHSICN--TSFIEQNCVSGFW--
Mrot_XP_003707508	PELIY	VLRNYGQFQYSICV--PSYIKADCVSGFW--
Tcas_XP_970514	PEFLH	TLVNRHGLHHSICN--PSFIEQDVSGFW--
Dmel_NP_730187	PELTH	VLRHGFVFHNSVCI--PSFIEQDVSGFW--
Bimp_XP_003488925	SEVYH	ILSYVHGFYHSICI--PSFILTQDPVAAFW--
Bter_XP_003398598	SEMYY	VLSVYVHGFYHSVCV--PSFILTQDPVAAFW--
Bimp_XP_003488983	SELYY	VLSHYGFOHSICI--SYMTYDPMVAFW--
Bter_XP_003398349	SELYY	VLRHGFQFISVCI--SYTYDPMVAFW--
Bimp_XP_003488976	PGMFH	VLRHHGFYHSICI--PSHLTQDPVFGFW--
Bter_XP_003402700	PGMFH	VLRHGFVFHNSVCI--PSHLTQDPVFGFW--
Bter_XP_003401771	PEMFH	TLRHHGFYHSICI--PSHLTQDPVFGFW--
Bimp_XP_003492944	SEMYY	TLSNYGFYVSVCV--PNFLTRDPVAAFW--
Bter_XP_003401772	SEMYY	TLSNYGFYVSVCV--PNFLTRDPVAAFW--
Bimp_XP_003486801	PEMFS	TLRHHGFYHSICI--PSNLLQDHVSGFW--
Bter_XP_003401883	PEMFS	TLRHHGFYHSICI--PSNPFQDHVCGFW--
Bimp_XP_003492943	PELFH	ILYNHGFYVSYICS--NSYIYTHDNVCAFW--
Bter_XP_003401773	PELFH	ILYNHGFYVSYICS--NSYIYTHDNVCAFW--
Bimp_XP_003484516	PELFF	ALLHHSFYHSICI--PSNLYQNPSVGFW--
Rpul_JAÄ57286	--FLK	RSYIFGGYIIC--GIDYQARDQTTME--FILE
Dpul_EFX88828	--GLV	HAWL-FRYSLRC--PVDY-SDDPDELI--VAQ
Bimp_XP_003490999	--SLV	SGWG-GHYSFRCC--PVDY-SDNPCLAIR--MAH
Bter_XP_003399502	--SLV	SGWG-GHYSFRCC--PVDY-SDDPCLAIR--MAR
Mrot_XP_003700522	--SVM	SGWG-GHYSFRCC--PVDY-SNPLALR--MAH
Hsal_EFN75681	--SLL	AGWG-GHYSFKCE--PVDY-SNPLALR--MAH
Nvit_XP_001600048	--CLA	SGWG-GDYSFRCC--PVDY-SRSPQAMR--MAR
Tcas_XP_971599	--SAV	AGWM-NHYSFKCC--PVDY-SRSPLAMR--MAR
Amel_GB51249	IRIGM	SGWLTGDFYSLRC--PVDY-SDRPLA
Bimp_XP_003491013	--IGM	SGWLTGDFYSLRC--PVDY-SDRPQVLRADMVH
Bter_XP_003399534	--IGM	SGWLTGDFYSLRC--PVDY-SDRPQVLRADMVH
Mrot_XP_003700524	VRIAM	SGWLTGDFYSLRC--PVDY-SDRPQAMR--MVH
Nvit_XP_001599996	--IGM	SGWLTGDFYSLRC--PVDY-SDRPQVLRADMVH
Hsal_EFN86956	IRIGM	SGWLTGDFYSLRC--PVDY-SNPKQVLRADMVH
Tcas_XP_968784	--IGM	GGWFTGEYSIRCC--PVDY-SNPKSTIR--MVH
Dmel_NP_730843	-CLM	GGWW-GSYSFRCC--PVDY-TDSDPTSR--MVH
Tcas_XP_968706	-FCA	SGWLTGDFYSLRC--PIDI-SANPRIMR--MVN
Amel_GB51247	-YLM	SGWA-KGYSFRCC--PVDY-SNNALAR--MAN
Bimp_XP_003491006	-YLM	SGWA-KGYSFRCC--PVDY-SNPLALR--MAN
Mrot_XP_003700456	-YLM	YLMMSGWAKGYSFRCOPVDSYSPIALRMVYMSGWA-KGYSFRCC--PVDY-SNPLALR--MAN
Nvit_XP_001600017	-YLM	YLMMSGWAKGYSFRCOPVDSYSPIALRMVYMSGWA-KGYSFRCC--PVDY-SNNTLAIR--MAA
Tcas_XP_971544	-YLM	SGWA-GSYSFRCC--PVDY-SNSPMLR--MAR
Dmel_NP_730843	-YLM	SGWL-YDNTFCR--PVDY-SITTPKSMR--MAR
Amel_GB51247	-SCI	GGWL-NGYNLRCR--PVDY-SYSPKAIR--DAE
Bimp_XP_003399522	-YLM	SGWA-KGYSFRCC--PVDY-SNSPMLALR--MAN
Mrot_XP_003700456	-YLM	SGWA-KGYSFRCC--PVDY-SNSPMLALR--MVN
Nvit_XP_001600017	-YLM	SGWA-KGYSFRCC--PVDY-SNNTLAIR--MAA
Tcas_XP_971544	-YLM	SGWA-GSYSFRCC--PVDY-SNSPMLALR--MVH
Dmel_NP_730843	-YLM	SGWL-YDNTFCR--PVDY-SITTPKSMR--MVN
Amel_GB51247	-SCI	GGWL-NGYNLRCR--PVDY-SYSPKAIR--DAE
Bimp_XP_003491027	-GLM	AGWL-HDYNVYCO--PVDY-TDNPLSLRS--MAN
Bter_XP_003399529	-GLM	AGWL-HDYNVYCO--PVDY-TDNPKSIR--MAK
Hsal_EFN85774	-GLV	AGWL-YDYNVFCR--PVDY-SDNPKSIR--MAK
Mrot_XP_003700518	-GLL	GGWG-QOYSFRCC--PVDY-SNSPQALR--MAR
Nvit_XP_001599838	-GLM	AGWL-YDYSVRCR--PVDY-SITTPKSMR--MAN
Dmel_NP_651060	-GVK	GGWG-GHYNFKCR--PVTY-ESDPISM--MAR
Amel_GB54401	-HLM	SGWL-LDYSVTKC--PVDY-SHNPSALR--MAN
Bimp_XP_003490969	-HLM	SGWL-LDYSVTKC--PVDY-SHNPSALR--MAN
Bter_XP_003399613	-HLM	SGWL-LDYSVTKC--PVDY-SHNPSALR--MAN
Hsal_EFN85774	-GLV	AGWL-YDYNVFCR--PVDY-SDNPKSIR--MAK
Mrot_XP_003700518	-GLL	GGWG-QOYSFRCC--PVDY-SNSPQALR--MAR
Nvit_XP_001599942	-HLM	SGWL-LDYSVTKC--PVDY-SHNPSALR--MAN
Hsal_EFN76719	-HLM	SGWL-LDYSVTKC--PVDY-SHNPSAVR--MAN
Tcas_XP_968636	-HLM	SGWF-WDYSFKCR--PVDY-SNNKKALR--MAN
Dmel_NP_788716	-HLM	AGWL-NYXNLKC--PVDY-SDSPSSKR--MLN
Amel_GB54302	-GLD	AAWL-RKYSWKCC--SVDF-SNSPEALR--VAR
Bimp_XP_003490977	-GLD	AAWL-RKYSWKCC--PVDY-SNSPDALR--VAR
Bter_XP_003399465	-GLD	AAWL-RKYSWKCC--PVDY-SNSPDALR--VAR
Mrot_XP_003700520	-GLD	AAGL-DKYNVSCC--PVDY-SNSPMLALR--VAR
Nvit_XP_001599914	-GLE	GAWL-RHYSWKCE--PVDY-SNSPHALR--VAR
Tcas_XP_9686563	-ALE	GAIW-DKYSVCKC--PVDY-SNSPHALR--VAR
Dmel_NP_651063	-ALE	GAIW-DKYSVCKC--PVDY-SNSPHALR--VAR
Dpul_EFX74343	-LGR	FGWLGSNYSFIGC--PVDY-SNNEAALR--IIL
Dpul_EFX74342	-LGR	FGWLGSNYSFIGC--PVDY-SNSEAALR--IIL
Dpul_EFX74344	-LGR	HGWLSGNYNFIGC--PVDY-SYNEASFR--VLL
Dpul_EFX74345	-ICR	LTIWF-NGYSFIGC--PVDY-SDNEDALQ--LIK
Dpul_EFX74502	-ICR	LTIWF-NGYSFIGC--PVDY-SDNDALQ--LIK
Dpul_EFX74346	-TCR	LTSWF-NGYSFIGC--PVDY-SANEDALQ--LVA
Dpul_EFX74501	-TCR	VTWF-NGYSFIGC--PVDY-SDNKDALQ--IIV
Dpul_EFX74503	-VCR	LTWF-KGYSFIGC--PMDY-SESDALO--IIK
Dpul_EFX76305	-FLV	TSVL-SRDYLTCR--PIDY-SMDPLALR--MAD
Mrot_XP_003700519	-ALQ	TLAWL-GHYSVFCR--PVDY-SYNPRALE--IAR
Nvit_XP_001599867	-ACI	LGWL-KDYNVSCC--PVDY-SDTIPRAVE--IAG
Amel_GB46038	-LF	VASTRLRYSVCC--PIRE-VTRPDELO--IAH
Bimp_XP_003484909	-LF	VASTRLRYSVCC--PIRE-VTRPDELO--IAH
Bter_XP_003396173	-LF	VASTRLRYSVCC--PIRE-VTRPDELO--IAH
Mrot_XP_003703286	-LF	VASTRLRYSVCC--PIRE-VTRPDELO--IAH
Hsal_EFN80181	-LF	LASTRLRYSVCC--PIRE-ITRPDELO--IAH
Tcas_XP_966527	-LL	TASTRLRYSVCC--PIRE-VTRPDELO--IAH
Dmel_NP_001097580	-FL	TAASLJGYNFAAC--ECRV-SNDPHEIR--IAA
Dmel_NP_729666	-LV	AAURDLDYNGFCG--PCRV-SDFPHEMR--LKK
Amel_GB54399	-ALE	PSVSVSILLPKC--NPTS-LNLNKTNT--IIS
Tcas_XP_967030	-AMTV	KALSALPHLNNTCR--NP-S-TKEFOFA--LAN
Dmel_NP_651062	-SIOE	SNVMASIFRKKEC--IN-RTREQNLT--LVS
Dmel_NP_651104	-GLS	NTYLOPGYWSTC--PVDTDRSPTWTC--IUY
Amel_GB40681	-NIS	AGWF-SEISVFCR--IPDV-SYKPGPKV--IAH
Bter_XP_003399626	-FII	VGWF-TEITMYCR--IPDV-SYKPGPKV--IAH
Nvit_XP_001607111	-MIT	AGWI-TEFILGCR--PLRV-STRPIDMR--LNN
Nvit_XP_001603768	-CIK	NGMF-DIGLGCV--FVRD-SPTGKPFME--LWH
Mrot_XP_003704078	-IPD	AGWY-EDYFVYCA--PIDL-TNMPSTMK--ICR
Hsal_EFN76075	-YIR	AGWF-TKYGFKCW--KPDY-SDPNAOM--IEN
Hsal_EFN76074	-FVN	AGIVIWRK--LFCP--VEMDV-TRNVPVITK--LIRCAWGYFLLKLDD
Bimp_XP_003489235	-LLT	SGFT-TKFELGC--THVI-SNDPDSYR--IAR
Bter_XP_003395770	-LLT	SGFT-TKFELGC--THVI-SNDPDSYR--IAR
Mrot_XP_003700216	-LLT	SGFT-TKYSLRC--PHIV-SYDPESYR--MAR
Nvit_XP_001602545	-LLT	SGFT-TNLWGC--PVDY-SLNPEAIS--MAR
Dmel_NP_649955	-GLH	FLEVVKAYQISCIIVSPLMDHKYKDRERL--
Dmel_NP_649956	-GVB	FLEVVKAYQISCIIVSPLMDHKYKDRERL--
Dmel_NP_731419	-AVH	FMLGPGDYFNKCIKLNPPDHEYKWTWERWL--
Dmel_NP_649958	-SVH	FMLGPGNYFNFSCLCINPLDHEYKNWERWL--
Dmel_NP_649957	-GTH	LLFVQRPYNLSCMQVLPODHELKSTERL--
Dmel_NP_732912	-GYV	FMLVFPQYFNRCMIVLQODBPLKNWERCI--
Dmel_NP_611365	-VFY	YLFIIVGICNLHCIESPPEGHERQKLERVL--
Dmel_NP_725820	-GTY	YLFIKKLYDFRCMILSSDPDKDVRLL--
Tcas_XP_974047	--	FVGLSNLNVU--PIEK-SNRQEVQ--MIE
Tcas_XP_973993	--	FAKIVPNLNLCS--PADN-STP--A--MLA
Tcas_XP_975397	--	ALRELPEKLFCS--PIDK-SNHPDALA--VNLNOVATMMLKIFD

.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320

Rpul_JAA58008		125
Dpul_EFX85691		110
Amel_GB53872		88
Amel_GB53873		121
Amel_GB45596		121
Bimp_XP_003490277		120
Bter_XP_003401825		120
Hsal_EFN75445		120
Mrot_XP_003707508		120
Tcas_XP_970514		118
Dmel_NP_730187		118
Bimp_XP_003488925		121
Bter_XP_003398598		121
Bimp_XP_003488983		119
Bter_XP_003398349		119
Bimp_XP_003488976		120
Bter_XP_003402700		120
Bter_XP_003401771		120
Bimp_XP_003492944		117
Bter_XP_003401772		124
Bimp_XP_003486801		120
Bter_XP_003401883		121
Bimp_XP_003492943		121
Bter_XP_003401773		121
Bimp_XP_003484516		120
Rpul_JAÄ57286		109
Dpul_EFX88828		114
Bimp_XP_003490999		114
Bter_XP_003399502		114
Mrot_XP_003700522		114
Hsal_EFN75681		114
Nvit_XP_001600048		114
Tcas_XP_971599		114
Amel_GB51249		135
Bimp_XP_003491013		117
Bter_XP_003399534		114
Mrot_XP_003700524		141
Nvit_XP_001599996		114
Hsal_EFN86956		137
Tcas_XP_968784		114
Dmel_NP_730841		114
Dmel_NP_730843		113
Tcas_XP_968706		114
Amel_GB51247		114
Bimp_XP_003491006		114
Bter_XP_003399522		114
Mrot_XP_003700456		142
Nvit_XP_001600017		114
Tcas_XP_971544		114
Dmel_NP_730846		114
Dmel_NP_649754		113
Dpul_EFX76285		113
Amel_GB54396		110
Bimp_XP_003491027		110
Bter_XP_003399529		110
Hsal_EFN85774		106
Mrot_XP_003700518		110
Nvit_XP_001599938		110
Dmel_NP_651060		117
Amel_GB54401		40
Bimp_XP_003490969		143
Bter_XP_003399613		143
Nvit_XP_001599942		147
Hsal_EFN76719		220
Tcas_XP_968636		114
Dmel_NP_788716		147
Amel_GB54302		115
Bimp_XP_003490977		126
Bter_XP_003399465		126
Mrot_XP_003700520		126
Nvit_XP_001599914		151
Tcas_XP_968563		115
Dmel_NP_651063		112
Dpul_EFX74343		114
Dpul_EFX74342		114
Dpul_EFX74344		114
Dpul_EFX74345		113
Dpul_EFX74502		115
Dpul_EFX74346		113
Dpul_EFX74501		113
Dpul_EFX74503		113
Dpul_EFX76305		108
Mrot_XP_003700519		114
Nvit_XP_001599867		114
Amel_GB46038		122
Bimp_XP_003484909		119
Bter_XP_003396173		119
Mrot_XP_003703286		119
Hsal_EFN80181		119
Tcas_XP_966527		119
Dmel_NP_001097580		115
Dmel_NP_729666		108
Amel_GB54399		118
Tcas_XP_967030		137
Dmel_NP_651062		113
Dmel_NP_651104		113
Amel_GB40681		109
Bter_XP_003399626		109
Nvit_XP_001607111		109
Nvit_XP_001603768		110
Mrot_XP_003704078		109
Hsal_EFN76075		84
Hsal_EFN76074	VVEIVIFVLRKKNNPSVVLHVYHHVSTAIIAWLGIIRRYYCTAPMILICIIINSFVHSVMYIIVYFLASC GDPKOKMTAPMKPW	201
Bimp_XP_003489235		132
Bter_XP_003395770		132
Mrot_XP_003700216		132
Nvit_XP_001602545		135
Dmel_NP_649955		107
Dmel_NP_649956		99
Dmel_NP_731419		108
Dmel_NP_649958		108
Dmel_NP_649957		104
Dmel_NP_732912		104
Dmel_NP_611365		104
Dmel_NP_725820		108
Tcas_XP_974047		110
Tcas_XP_973993		117
Tcas_XP_975397	LLDVFFFVLRKKHSQLTPLHVYHHIMMAVFSWITCKFFIGGOVFFLGLPNLFVHVVMYFYFLTSNDPTYRNSVLKKYI	189
330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	

Rpul_JAA58008		125
Dpul_EFX85691		110
Amel_GB53872		88
Amel_GB53873		121
Amel_GB45596		121
Bimp_XP_003490277		120
Bter_XP_003401825		120
Hsal_EFN75445		120
Mrot_XP_003707508		120
Tcas_XP_970514		118
Dmel_NP_730187		118
Bimp_XP_003488925		121
Bter_XP_003398598		121
Bimp_XP_003488983		119
Bter_XP_003398349		119
Bimp_XP_003488976		120
Bter_XP_003402700		120
Bter_XP_003401771		120
Bimp_XP_003492944		117
Bter_XP_003401772		124
Bimp_XP_003486801		120
Bter_XP_003401883		121
Bimp_XP_003492943		121
Bter_XP_003401773		121
Bimp_XP_003484516		120
Rpul_JAÄ57286	I	110
Dpul_EFX88828	M	115
Bimp_XP_003490999	G	115
Bter_XP_003399502	G	115
Mrot_XP_003700522	G	115
Hsal_EFN75681	G	115
Nvit_XP_001600048	G	115
Tcas_XP_971599	G	115
Amel_GB51249		135
Bimp_XP_003491013	A	118
Bter_XP_003399534	A	115
Mrot_XP_003700524	A	142
Nvit_XP_001599996	A	115
Hsal_EFN86956	A	138
Tcas_XP_968784	A	115
Dmel_NP_730841	A	115
Dmel_NP_730843	A	114
Tcas_XP_968706	V	115
Amel_GB51247		115
Bimp_XP_003491006	T	115
Bter_XP_003399522	T	115
Mrot_XP_003700456	T	143
Nvit_XP_001600017	T	115
Tcas_XP_971544	T	115
Dmel_NP_730846	I	115
Dmel_NP_649754	G	114
Dpul_EFX76285	A	114
Amel_GB54396	A	111
Bimp_XP_003491027	I	111
Bter_XP_003399529	I	111
Hsal_EFN85774	A	107
Mrot_XP_003700518	A	111
Nvit_XP_001599838	G	111
Dmel_NP_651060	A	118
Amel_GB54401	L	41
Bimp_XP_003490969	L	144
Bter_XP_003399613	L	144
Nvit_XP_001599942	I	148
Hsal_EFN76719	L	221
Tcas_XP_968636	L	115
Dmel_NP_788716	L	148
Amel_GB54302	G	116
Bimp_XP_003490977	G	127
Bter_XP_003399465	G	127
Mrot_XP_003700520	G	127
Nvit_XP_001599914	G	152
Tcas_XP_968563	G	116
Dmel_NP_651063	V	113
Dpul_EFX74343	A	115
Dpul_EFX74342	A	115
Dpul_EFX74344	A	115
Dpul_EFX74345	M	114
Dpul_EFX74502	L	116
Dpul_EFX74346	I	114
Dpul_EFX74501	I	114
Dpul_EFX74503	T	114
Dpul_EFX76305	V	109
Mrot_XP_003700519	V	115
Nvit_XP_001599867	G	115
Amel_GB46038	A	123
Bimp_XP_003484909	A	120
Bter_XP_003396173	A	120
Mrot_XP_003703286	A	120
Hsal_EFN80181	A	120
Tcas_XP_966527	A	120
Dmel_NP_001097580	A	116
Dmel_NP_729666	A	109
Amel_GB54399	A	119
Tcas_XP_967030	G	138
Dmel_NP_651062	G	114
Dmel_NP_651104	A	114
Amel_GB40681	A	110
Bter_XP_003399626	I	110
Nvit_XP_001607111	V	110
Nvit_XP_001603768	V	111
Mrot_XP_003704078	I	110
Hsal_EFN76075	I	85
Hsal_EFN76074	IIMQMITVI	211
Bimp_XP_003489235	W	133
Bter_XP_003395770	W	133
Mrot_XP_003700216	W	133
Nvit_XP_001602545	W	136
Dmel_NP_649955		107
Dmel_NP_649956		99
Dmel_NP_731419		108
Dmel_NP_649958		108
Dmel_NP_649957		104
Dmel_NP_732912		104
Dmel_NP_611365		104
Dmel_NP_725820		108
Tcas_XP_974047	L	111
Tcas_XP_973993	A	118
Tcas_XP_975397	GLQIVQHCFIPTAFALPLFNTSCSYPKPLLKVFLQQAIMIVLFTNFYIKAVLRPKKLKVQTLLIKMTSVLEHLVSGV	269
410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480	

Rpul_JAA58008	125
Dpul_EFX85691	110
Amel_GB53872	88
Amel_GB53873	121
Amel_GB45596	121
Bimp_XP_003490277	120
Bter_XP_003401825	120
Hsal_EFN75445	120
Mrot_XP_003707508	120
Tcas_XP_970514	118
Dmel_NP_730187	118
Bimp_XP_003488925	121
Bter_XP_003398598	121
Bimp_XP_003488983	119
Bter_XP_003398349	119
Bimp_XP_003488976	120
Bter_XP_003402700	120
Bter_XP_003401771	120
Bimp_XP_003492944	117
Bter_XP_003401772	124
Bimp_XP_003486801	120
Bter_XP_003401883	121
Bimp_XP_003492943	121
Bter_XP_003401773	121
Bimp_XP_003484516	120
Rpul_JA57286	110
Dpul_EFX88828	115
Bimp_XP_003490999	115
Bter_XP_003399502	115
Mrot_XP_003700522	115
Hsal_EFN75681	115
Nvit_XP_001600048	115
Tcas_XP_971599	115
Amel_GB51249	135
Bimp_XP_003491013	118
Bter_XP_003399534	115
Mrot_XP_003700524	142
Nvit_XP_001599996	115
Hsal_EFN86956	138
Tcas_XP_968784	115
Dmel_NP_730841	115
Dmel_NP_730843	114
Tcas_XP_968706	115
Amel_GB51247	115
Bimp_XP_003491006	115
Bter_XP_003399522	115
Mrot_XP_003700456	143
Nvit_XP_001600017	115
Tcas_XP_971544	115
Dmel_NP_730846	115
Dmel_NP_649754	114
Dpul_EFX76285	114
Amel_GB54396	111
Bimp_XP_003491027	111
Bter_XP_003399529	111
Hsal_EFN85774	107
Mrot_XP_003700518	111
Nvit_XP_001599938	111
Dmel_NP_651060	118
Amel_GB54401	41
Bimp_XP_003490969	144
Bter_XP_003399613	144
Nvit_XP_001599942	148
Hsal_EFN76719	221
Tcas_XP_968636	115
Dmel_NP_788716	148
Amel_GB54302	116
Bimp_XP_003490977	127
Bter_XP_003399465	127
Mrot_XP_003700520	127
Nvit_XP_001599914	152
Tcas_XP_968563	116
Dmel_NP_651063	113
Dpul_EFX74343	115
Dpul_EFX74342	115
Dpul_EFX74344	115
Dpul_EFX74345	114
Dpul_EFX74502	116
Dpul_EFX74346	114
Dpul_EFX74501	114
Dpul_EFX74503	114
Dpul_EFX76305	109
Mrot_XP_003700519	115
Nvit_XP_001599867	115
Amel_GB46038	123
Bimp_XP_003484909	120
Bter_XP_003396173	120
Mrot_XP_003703286	120
Hsal_EFN80181	120
Tcas_XP_966527	120
Dmel_NP_001097580	116
Dmel_NP_729666	109
Amel_GB54399	119
Tcas_XP_967030	138
Dmel_NP_651062	114
Dmel_NP_651104	114
Amel_GB40681	110
Bter_XP_003399626	110
Nvit_XP_001607111	110
Nvit_XP_001603768	111
Mrot_XP_003704078	110
Hsal_EFN76075	85
Hsal_EFN76074	211
Bimp_XP_003489235	133
Bter_XP_003395770	133
Mrot_XP_003700216	133
Nvit_XP_001602545	136
Dmel_NP_649955	107
Dmel_NP_649956	99
Dmel_NP_731419	108
Dmel_NP_649958	108
Dmel_NP_649957	104
Dmel_NP_732912	104
Dmel_NP_611365	104
Dmel_NP_725820	108
Tcas_XP_974047	111
Tcas_XP_973993	118
Tcas_XP_975397	349
SKLVQWSDTSRYPPFMGSPLPIITVLSVYFWYIFDYGPKVMKNAPKDITNVMKTYNLLGIFFNFIGITWGVILWNDTK	
.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560	

Rpul_JAA58008	-----	WWMPVLSKVPBELGDIVFIIILRKK--ELIFLHWYHIIITVLMFSWYF--YQOHIAPARWYVVMNIVVH	187
Dpul_EFX85691	-----	ATMPVLSKVPBELGDIVFIIILRKK--PLIFLHWYHIIATVLVYCWYA--FKEYTAPAPRFIVMNFVH	172
Amel_GB53872	-----	ANMFALSKLLFGDIIIFIVLRLK--ELIFLHWYHIIITVFLYLTWFS--YADNIASARWFMLNLNYFVH	150
Amel_GB53873	-----	SNMFALSKLLFGDIIIFIVLRLK--ELIFLHWYHIIITVLLYSNFS--YSEHTASARWFMLNLNYFVH	183
Amel_GB45596	-----	WWMPVLSKLPBELGDIVFIIILRKK--ELIFLHWYHIIITVLLYSNFS--YSEYTASARWFVVMNFFIH	183
Bimp_XP_003490277	-----	WWMPVLSKLPBELGDIVFIIILRKK--PLIFLHWYHIIITVLLYSNFS--YSEYTASARWFVVMNFFVH	182
Bter_XP_003401825	-----	WWMPVLSKLPBELGDIVFIIILRKK--PLIFLHWYHIIITVLLYSNFS--YSEYTASARWFVVMNFFVH	182
Hsal_EFN75445	-----	WWMPVLSKLPBELGDIIIFIVLRLK--PLIFLHWYHIIITVLLYAWFS--YSEYTASARWFVVMNFFVH	182
Mrot_XP_003707508	-----	WWMPVLSKLPBELGDIIIFIVLRLK--PLIFLHWYHIIITVLLYAWFS--YIEIASARWFVVMNFFVH	182
Tcas_XP_970514	-----	WWMPVLSKLPBELGDIIIFIVLRLK--PLIFLHWYHIIITVLLYAWFS--YIEYTASARWFVVMNFFVH	180
Dmel_NP_730187	-----	WWMPVLSKLPBELGDIIIFIVLRLK--PLIFLHWYHIIITVLLYAWFS--YIEYTASARWFVVMNFFVH	180
Bimp_XP_003488925	-----	SLLFILSKIVEFGDIDFIVLRLK--PLMPFLHWYHIVTVLLYAWLC--FETTTAARWNSLNVNFVH	183
Bter_XP_003398598	-----	SLLFILSKIVEFGDIDFIVLRLK--PLMPFLHWYHIVTVFLYAWLC--FETTTAARWNAVUNNFVH	183
Bimp_XP_003488983	-----	SLLFILSKIVEFGDIDFIVLRLK--PLQFLHWYHIVTVFLYAWLC--FIENTEBSRWCIVNFVH	181
Bter_XP_003398349	-----	ELMPIVSKIVEFGDIDFIVLRLK--PLKFLHWYHIVTVLLYSLNC--FIENAFISRNCAINNFVH	181
Bimp_XP_003488976	-----	ELMPIVSKIVEFGDIDFIVLRLK--PLMPFLHWYHIVTVLLYAWLC--YAEATGNGKWFGLVNSFVH	182
Bter_XP_003402700	-----	SWTPFALSKLVEFGDIDFIVLRLK--PLIFLHWYHIVTVLLYAWLC--YAEATGNGKWFGLVNSFVH	182
Bter_XP_003401771	-----	EFLFILSKVKEVELGDTIIFIVLRLK--PLIFLHWYHIVTVLLYAWLC--YGETTATGRWFTTMNFVH	179
Bimp_XP_003492944	-----	TFSTPLSKVKEVELGDTIIFIVLRLK--PLIFLHWYHIVTVLLYTYWS--YGETSATGRWFTTMNFVH	182
Bter_XP_003401772	-----	EFLFTMSKLLFGDIDFIVLRLK--PLIFLHWYHIVTVLLYTYWS--YABTSADGRWFTTMNFVH	186
Bimp_XP_003486801	-----	WWFVLSKIPPEFGDIDFIVLRLK--PLIFLHWYHIVTVLLFSWFT--YAEATTALSRWYTVMMNFVH	182
Bter_XP_003401883	-----	WWFVLSKIPPEFGDIDFIVLRLK--PLIFLHWYHIVTVLLFSWFT--YETTATATRWYTVMMNFVH	183
Bimp_XP_003492943	-----	SSLFALSKIVEFGDIDFIVLRLK--PLIFLHWYHIVTVLYFTWYS--YALLMCISRWYIVMMNFVH	183
Bter_XP_003401773	-----	SSLFALSKIVEFGDIDFIVLRLK--PLIFLHWYHIVTVLYFTWYS--YALLTCISRWYIVMMNFVH	183
Bimp_XP_003484516	-----	SLALVILKVFQEMDFDPMFVVLRLK--EMIFLHWYHIVTVLLYFTWYS--YETTAAAMRWFSVMEYFV	182
Rpul_JAA57286	-----	CYWILNVRRIADFLDIIFFVLRKKDSHVFLHVVNNFGNGLAYG--PDGQVALGLJLNSFVH	175
Dpul_EFX88828	-----	CWXYFCFKTTEFLDIIFFVFLRKKDHDIIIFLHWYHIVTVLLHSIMPAACCWGVKA--AGGGHITFFGMLNFVH	180
Bimp_XP_003490999	-----	CWXYFCFKTTEFLDIIFFVFLRKKDHSHVFLHVVNNFGNGLAYG--PGGHSFFGMLNFVH	180
Bter_XP_003399502	-----	CWXYFCFKTTEFFDIIFFVFLRKKDHSHVFLHVVNNFGNGLAYG--PGGHSFFGMLNFVH	180
Mrot_XP_003700522	-----	CWXYFCFKTTEFFDIIFFVFLRKKDHSHVFLHVVNNFGNGLAYG--PGGHSFFGMLNFVH	180
Hsal_EFN75681	-----	CWXYFCFKTTEFFDIIFFVFLRKKDHSHVFLHVVNNFGNGLAYG--PGGHSFFGMLNFVH	180
Nvit_XP_001600048	-----	CWXYFCFKTIEFADIIFFVFLRKKDHDIIIFLHWYHIVTVLLHSIMPAACCWGVKA--PGGHSFFGMLNFVH	180
Tcas_XP_971599	-----	CWXYFCFKTIEFADIIFFVFLRKKDHDIIIFLHWYHIVTVLLHSIMPAACCWGVKA--PGGHSFFGMLNFVH	180
Amel_GB51249	VLR-----	-----	138
Bimp_XP_003491013	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	183
Bter_XP_003399534	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Mrot_XP_003700524	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	207
Nvit_XP_001599996	-----	SWWNYYFSKFTTEFFDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Hsal_EFN86956	-----	SWWNYYFSKFTTEFFDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	203
Tcas_XP_968784	-----	SWWNYYFSKFTTEFFDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dmel_NP_730843	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKSSQVTTLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	179
Tcas_XP_968706	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKSSQVTTLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Amel_GB51247	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKSSQVTTLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Bimp_XP_003491006	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Bter_XP_003399522	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Mrot_XP_003700456	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	208
Nvit_XP_001600017	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Tcas_XP_971544	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dmel_NP_730843	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dmel_NP_649754	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	179
Dpul_EFX76285	-----	CWXYFCFKTIEFMDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGCMPSVWFGVFKF--PGGHSFFGMLNFVH	181
Amel_GB54396	-----	VHFYFTCKLIELLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSVWMLGKFA--PGGHSFFGMLNFVH	176
Bimp_XP_003491027	-----	VHFYFTCKLIELLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSVWMLGKFA--PGGHSFFGMLNFVH	176
Bter_XP_003399529	-----	VHFYFTCKLIELLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSVWMLGKFA--PGGHSFFGMLNFVH	176
Hsal_EFN85774	-----	VTFYFCFKLIELLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSVWMLGKFA--PGGHSFFGMLNFVH	172
Mrot_XP_003700518	-----	VHSYLLCALKIELLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	176
Nvit_XP_001599838	-----	VVLYFACKLIELLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	176
Dmel_NP_651060	-----	VWLYYIYAKIITELLDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	183
Amel_GB54401	-----	CWXYFISKFTEFADIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	106
Bimp_XP_003490969	-----	CWXYFISKFTEFADIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	209
Bter_XP_003399613	-----	CWXYFISKFTEFADIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	209
Nvit_XP_001599942	-----	CWXYFISKFTEFADIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	213
Hsal_EFN6719	-----	CWXYFISKFTEFADIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	286
Tcas_XP_968636	-----	CWXYFISKFTEFADIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dmel_NP_788716	-----	CYLYYLSKLIDFFDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	213
Amel_GB54302	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	181
Bimp_XP_003490977	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	192
Bter_XP_003399465	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	192
Nvit_XP_001599942	-----	CWXYFISKFTEFADIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	217
Hsal_EFN6719	-----	CWXYFISKFTEFADIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	286
Tcas_XP_968636	-----	CWXYFISKFTEFADIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dmel_NP_651063	-----	VVYVYLYAKIITELLDIIFFVFLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	178
Dpul_EFX74343	-----	GYWFYIISKFDIIFDFFDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dpul_EFX74342	-----	SVWVFLIKFLIDFFDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dpul_EFX74344	-----	CYVFLYIIFKFDLFDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dpul_EFX74345	-----	GCFYIIFKFDLFDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	179
Dpul_EFX74502	-----	GYYVVIYLKFLIDFFDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	181
Dpul_EFX74346	-----	GCFYIIFKFDLFDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	179
Dpul_EFX74501	-----	GCLVLIYAKIITELLDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	179
Dpul_EFX74503	-----	GIVIALSKLIDFFDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	179
Dpul_EFX76305	-----	CWLFFFISKVIDMDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	174
Mrot_XP_003700519	-----	VWMXFMVKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Nvit_XP_001599867	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Hsal_EFN80181	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	185
Tcas_XP_966527	-----	VVWVYFSKLLLEFCDDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	185
Dmel_NP_001097580	-----	MWFWYIISKLEFLVFLDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Nvit_XP_001599914	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	217
Tcas_XP_9686563	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	181
Dmel_NP_651063	-----	VVYVYLYAKIITELLDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	181
Dpul_EFX74343	-----	GYWFYIISKFDIIFDFFDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dpul_EFX74342	-----	SVWVFLIKFLIDFFDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dpul_EFX74344	-----	CYVFLYIIFKFDLFDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Dpul_EFX74345	-----	GCFYIIFKFDLFDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	179
Dpul_EFX74502	-----	GYYVVIYLKFLIDFFDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	181
Dpul_EFX74346	-----	GCFYIIFKFDLFDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	179
Dpul_EFX74501	-----	GCLVLIYAKIITELLDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	179
Dpul_EFX74503	-----	GIVIALSKLIDFFDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	179
Dpul_EFX76305	-----	CWLFFFISKVIDMDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	174
Mrot_XP_003700519	-----	VWMXFMVKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Nvit_XP_001599867	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	180
Hsal_EFN80181	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	185
Tcas_XP_966527	-----	VVWVYFSKLLLEFCDDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	185
Dmel_NP_001097580	-----	MWFWYIISKLEFLVFLDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	181
Nvit_XP_001599914	-----	VVYIYFLAKLSELLEDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGGHSFFGMLNFVH	214
Hsal_EFN76075	-----	ANWYFIYAKIMDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	184
Tcas_XP_967030	-----	ANWWFFFSKIVLIELLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	203
Dmel_NP_651062	-----	ANWFYFISKFTEFADIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	179
Dmel_NP_651104	-----	SAYYMLKYLKDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	179
Amel_GB40681	-----	MWLFITMLKLIELLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	175
Bter_XP_003399626	-----	MWLFITMLKLIELLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	175
Nvit_XP_001607111	-----	VWHLIYMLKYLKDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	175
Nvit_XP_001603768	-----	YYWESMLKVLIDLLDIIFFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	176
Mrot_XP_003704078	-----	MWYLLLKLIDLYDVEGIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	175
Hsal_EFN76075	-----	SWWLNLKLKIDLYDVEGIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGSRSRIFSLINCNFVH	150
Bimp_XP_003489235	-----	LWNWLLKLIDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	276
Bter_XP_003395770	-----	WNRLLMLKVLLESDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	198
Mrot_XP_00370216	-----	WWRLLMLKVLLESDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	198
Nvit_XP_001602545	-----	WVWMLKLKVLLESDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	198
Dmel_NP_649955	-----	SVYIFFNKFMDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	173
Dmel_NP_649956	-----	SVYIFFNKFMDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	165
Dmel_NP_731419	-----	SVYIFFNKLIDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	174
Dmel_NP_649958	-----	SVYIFFNKLMLDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	174
Dmel_NP_649957	-----	SYMMHLNKVLBLMDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	170
Dmel_NP_732912	-----	SVAYYIINKIVLIDLDEIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	170
Dmel_NP_611365	-----	HAAYLLNLKVLBLMDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	170
Dmel_NP_725820	-----	TYFYFINKVLBLMDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	174
Tcas_XP_974047	-----	BYRWHLLKHLFIDLLDIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	176
Tcas_XP_973993	-----	BHCYLLKLFLBLDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	183
Tcas_XP_975397	-----	LLCPITPIENILVFPHYWYFNLKVLBLDLDIIFVFLVLRKKNDHIVTVLHWYHIVHGIMPFSCSWVGIRYVY--PGQOGAVIIFLNSLVH	428
570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640		

Rpul_JAA58008	SIMYSYFALRSFHVMPRIVG-----CITLQIOMMLMGAATGLGFTTINKR-GSASCA-ISEWALL--AMFMLS	257
Dpul_EFX85691	AFMYSYVALKAMN----RVRPFSVSM-----AIVTAOLSOVGGCAVNLWAQLKQN--GEACN-VSEHNKIM-SLLMF	241
Amel_GB53872	SIMYSYVALKAMR----KTPVFIPM-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECK-NSRHMIF-SILM	219
Amel_GB53873	SIMYSYVALKAMR----KTPPKICAM-----SITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECK-NSRHMIF-SILM	252
Amel_GB45596	SIMYSYVALKAMR----KTPPKICAM-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Bimp_XP_00349027	SIMYSYVALKAMR----KTPPKGIA-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Bter_XP_003401825	SIMYSYVALKAMR----KTPPKGIA-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Hsal_EFN75445	SIMYSYVALKAMR----KTPPKAIAM-----VIITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Mrot_XP_003707508	SIMYSYVALKAMR----KTPPKNIAM-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Tcas_XP_970514	SIMYSYVALRAMG----ISPPPKIAMI-----VIISLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	249
Dmel_NP_730187	SIMYSYVALKAMR----KTPPKGIA-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Bimp_XP_003488925	SIMYSYVALKAT----TRPNPKWIAM-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	253
Bter_XP_003398598	SIMYSYVALKAMR----DTPPKWIAM-----MITTLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	253
Bimp_XP_003488983	SIMYSYVALKAMR----KTPPKWIAM-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	251
Bter_XP_003398349	SIMYSYVALKAMR----KTPPKWIAM-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	251
Bimp_XP_003488976	SWMYSYVALKAMR----KTPPKWIAM-----FVTLLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Bter_XP_003488976	SWMYSYVALKAMR----KTPPKWIAM-----FVTLLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Bter_XP_003402700	SWMYSYVALKAMR----KTPPKWIAM-----FVTLLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Bter_XP_003401771	SWMYSYVALKAMOF----SPPPKWAM-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Bter_XP_003401772	SWMYSYVALKAMOF----SPPPKWAM-----LITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	254
Bimp_XP_003486801	SWMYSYVALKAMOF----KTPPKWAM-----MIITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	252
Bter_XP_003401883	SWMYSYVALKAMOF----KTPPKWAM-----MIITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-NSRLNVKL-SLLMF	253
Bimp_XP_003492943	SWMYSYVALKAMOF----KTPPKFIA-----MIITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-ATTFNAC-GLVMF	253
Bter_XP_003401773	SWMYSYVALKAMOF----KTPPKFIA-----MIITLQIOTIMLGCIISIVSYHYLE--HKECH-ATTLNIV-GLLMF	253
Bimp_XP_003484516	FCIYSYVAVESME----KLPPLCLII-----TCRVMIQLOMMTGTYILTIIANXORDI-HKLNQY-JTHESTAI-GSIYVIA	252
Rpul_JAA57286	VVMYSYVLSL---GPSPVRLW-WKYLQIPLV-----MFIVCIP-AFC-DG-YPMIIMI-TIPQAVFF	241
Dpul_EFX88828	IIMYTYYFLSSM----GPKYDQKWL-WKKYLTSQMOIQFVA-----VFIISQAQL-FPV-DCN-YPKILAYA-MCFNALM	246
Bimp_XP_003490999	IIVMYSYVLSL---GPKYDQKWL-WKKYLTSQMOIQFVA-----VFIISQAQL-FPV-DCN-YPKILAYA-MCFNALM	246
Bter_XP_003399502	IIVMYSYVLSL---GPKYDQKWL-WKKYLTSQMOIQFVA-----VFIISQAQL-FPV-DCN-YPKILAYA-MCFNALM	246
Mrot_XP_003700522	IIVMYSYVLLAAL----GPRIOPVLW-WKKYLTLALQMOQFVL-----VMIHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGMHAVMF	246
Hsal_EFN75681	IIVMYSYVLLAAL----GPQIOPVLW-WKKYLTLALQMOQFVL-----VMIHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGMHAVMF	246
Nvit_XP_001600048	IIVMYSYVLLAAL----GPQIOPVLW-WKKYLTLALQMOQFVL-----VMIHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGMHAVLF	246
Tcas_XP_971599	IIVMYSYVLLAAL----GPQIOPVLW-WKKYLTLALQMOQFVL-----VMIHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Amel_GB51249	-----D-----	139
Bimp_XP_003491013	IIVMFTYVLLAAM----GPRLOPVLW-WKKYLTLALQMOQFIA-----VMIHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	249
Bter_XP_003399534	IIVMFTYVLLAAM----GPRLOPVLW-WKKYLTLALQMOQFIA-----VMIHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Mrot_XP_003700524	IIVMFTYVLLAAM----GPKLQIPLW-WKKYLTLALQMOQFIA-----VMIHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	273
Nvit_XP_001599996	IIVMFTYVLLAAM----GPRMOPVLW-WKKYLTLALQMOQFIA-----VMIHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Hsal_EFN86956	IIVMFTYVLLAAM----GPRVOPVLW-WKKYLTLALQMOQFIA-----VMIHAFDL-LFI-ECN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	269
Tcas_XP_968784	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFIL-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Dmel_NP_730843	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFIL-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	245
Tcas_XP_968706	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFIL-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Amel_GB51247	-----D-----	246
Bimp_XP_003491006	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFIL-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Bter_XP_003399522	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFIL-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Mrot_XP_003700456	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFIL-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	274
Nvit_XP_001600017	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFIL-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Tcas_XP_971544	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFVA-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Dmel_NP_730843	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFVA-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	246
Tcas_XP_968706	IIVMFTYVMSAM----GPDEVOKWL-WKKYLTTLOMVOFVA-----IMVHAFDL-LFI-DCN-YPKAFVWW-IGLHAVMF	245
Amel_GB54396	-----D-----	172
Bimp_XP_003491027	IIMMFTYMLSSI----GSHMNKILW-WKKYIITMLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	242
Bter_XP_003399529	IIMMFTYMLSSI----GSHMNKILW-WKKYIITMLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	242
Hsal_EFN85774	IIMMFTYMLSSI----GPHMNKILW-WKKYIITMLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	242
Mrot_XP_003700518	IIMMFTYMLTSI----GPHMYKVVW-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	242
Nvit_XP_001599942	IIMMFTYMLTSI----GPHMYKVVW-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	242
Tcas_XP_968636	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	246
Dmel_NP_649754	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	246
Dpul_EFX76285	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	245
Amel_GB54401	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	250
Bimp_XP_003490969	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Bter_XP_003399613	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Nvit_XP_001599943	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Tcas_XP_968636	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dmel_NP_651060	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Amel_GB54401	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Bimp_XP_003490969	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Bter_XP_003399613	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Nvit_XP_001599942	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Tcas_XP_968636	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dmel_NP_651063	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dpul_EFX74343	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dpul_EFX74342	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dpul_EFX74344	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dpul_EFX74345	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dpul_EFX74502	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dpul_EFX74346	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dpul_EFX74501	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dpul_EFX74503	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Dpul_EFX76305	IIMMFTYMLTSI----GPEVOKWL-WKKYIITLQLOIQC-----IFINTIDL-FPN-GCN-YPRPIAFL-LLLNATIF	275
Bimp_XP_003490977	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Bter_XP_003399465	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Mrot_XP_003700518	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Nvit_XP_001599942	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Tcas_XP_968636	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Dmel_NP_729666	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Amel_GB54399	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Tcas_XP_967030	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Dmel_NP_651062	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Dmel_NP_651104	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Amel_GB40681	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Bter_XP_003399626	IIMMFTYMLTSI----LPOYOKWL-WKKYIITLQLOFCL-----AFLNSCOL-LIY-DCE-YPRPSFMW-ILPNAMFF	258
Nvit_XP_001607111	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Nvit_XP_001603768	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Mrot_XP_003704078	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Hsal_EFN80181	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Tcas_XP_966527	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Dmel_NP_001097580	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Mrot_XP_00370286	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Amel_GB46038	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Bimp_XP_003484909	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Bter_XP_003396173	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Mrot_XP_003703286	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Hsal_EFN80181	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Tcas_XP_966527	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Dmel_NP_729666	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Amel_GB54399	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Tcas_XP_967030	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Dmel_NP_651062	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Dmel_NP_651104	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Amel_GB40681	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Bter_XP_003399626	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Nvit_XP_001607111	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Nvit_XP_001603768	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Mrot_XP_003704078	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Hsal_EFN76075	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Tcas_XP_974047	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Tcas_XP_973993	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
Tcas_XP_975397	IIMMFTYMLTSI----LQSTOGLNFPIKIIIRQIOIIQFL-----LLWNSQSAQ-LFT-DCE-YPRPSVFF-ILPNNAFF	247
650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720	249



Rpul_JAA58008	FILEFAVFFYGAVAL-	-K	271
Dpul_EFX85691	FVLFLARFFYKAYASPGGRRGRPASILTAAPTAERPRKSSREPPRNSRNRAWPATNKGITELLREETGKQKMAKNIPPDFEK	-K	321
Amel_GB53872	FILFCKFFYKSYI	-DKNG	237
Amel_GB53873	FILFCKFFYKSYI	-KSH	269
Amel_GB45596	FILFCKFFYKSYI	-NKGG	270
Bimp_XP_003490277	FVLFAKFKQSKYL	-SKSNN	271
Bter_XP_003401825	FVLFAKFKQSKYL	-SKSNN	271
Hsal_EFN75445	FVLFLARFFHKTYL	-ADK	269
Mrot_XP_003707508	FILFLAKFFFQNSYL	-NRRHGT	272
Tcas_XP_970514	FVLFLARFFHKAYL	-SGDKRG	269
Dmel_NP_730187	FVLFLARFFHKAYLAPGGHKSERMAASLAAQNVVKDSSPOO-	-A	293
Bimp_XP_003488925	FILFARFFKQAYL	-SSKRGM	273
Bter_XP_003398598	FILFGRFFQOAYM	-SNKHGK	273
Bimp_XP_003488983	LVLFSRFFKQAYL	-SNNCRKT	272
Bter_XP_003398349	FILFSLRFFKQAYL	-SNNCRKT	272
Bimp_XP_003488976	FILFPARFFQOAYL	-SNKHIC	272
Bter_XP_003402700	FILFPARFFQOAYL	-SNKHIN	272
Bter_XP_003401771	FILFSLIFFKNSYL	-SGKRTK	272
Bimp_XP_003492944	FILFARFFQOAYL	-SNKSK	266
Bter_XP_003401772	FILFARFFQOAYL	-SKKSE	273
Bimp_XP_003486801	LILFGKFFFKAYL	-EKKRN	272
Bter_XP_003401883	LILFGKFFFKAYL	-FDKRKN	273
Bimp_XP_003492943	FVLFLAMFFYKAYL	-SGNSRT	273
Bter_XP_003401773	FVLFLAMFFYKTYL	-AGNSRT	273
Bimp_XP_003484516	ACFWAKFFFYSTYI	-SRKQK	271
Rpul_JAÄ57286	FGMPIRFIVQAYN	-K	255
Dpul_EFX88828	LSLFSNFVYIQV-	--	257
Bimp_XP_003490999	VFLFRNFVYNQSYG	--	260
Bter_XP_003399502	VFLFRNFVYNQSYG	--	260
Mrot_XP_003700522	VFLFRDFVIQSYK	--	259
Hsal_EFN75681	VFLFRNFVIESYSK	--	259
Nvit_XP_001600048	VFLFRDFVHQAYT	--	260
Tcas_XP_971599	VFLFSNFVHQTYV	--	260
Amel_GB51249	--	--	139
Bimp_XP_003491013	FFLFLNEFYQOSYQ	-Q	263
Bter_XP_003399534	FFLFLNEFYQOSYQ	-Q	260
Mrot_XP_003700524	FFFLFNEFYQOSYL	-Q	287
Nvit_XP_001599996	FFFLFNEFYQOSYA	-Q	260
Hsal_EFN86956	FFFLFKEFYQOSYQ	-Q	283
Tcas_XP_968784	FFFLFKEFYIQTYN	-K	260
Dmel_NP_730841	FFFLFNEFYKAAYR	-S	260
Tcas_XP_968706	YTLFKNFVDEKTYK	-S	259
Amel_GB51247	LGLFSDFVYKARYV	-D	260
Bimp_XP_003491006	LGLFSDFVYKARYV	-G	260
Bter_XP_003399522	LGLFSDFVYKARYV	-G	260
Mrot_XP_003700456	LGLFSDFVYKARYG	-D	288
Nvit_XP_001600017	LGLFSDFVYKARYT	-G	260
Tcas_XP_971544	LFLFSDFVYKARYT	-N	260
Dmel_NP_730846	LFLFSDFVYKARYL	-N	260
Dmel_NP_649754	VFLFSNFVYKRAYV	-K	260
Dpul_EFX76285	FCLFSDFYKRSYK	-N	259
Amel_GB54396	IYLGPGSFVIEENYI	-K	256
Bimp_XP_003491027	IYMPGSFVYKVN	-R	255
Bter_XP_003399529	IYMPGSFVYENY	-R	255
Hsal_EFN85774	IYMPGSFVTNNYG	-K	252
Mrot_XP_003700518	IYMPGKFVITNYT	-K	256
Nvit_XP_001599838	IYLPGSFVYANYN	-N	256
Dmel_NP_651060	IYMPSAFVYANVYK	-K	264
Amel_GB54401	FILFSDFYRRAVY	-N	186
Bimp_XP_003490969	FVLFSDFVHQAYN	--	289
Bter_XP_003399613	FVLFSDFVHQAYN	--	289
Nvit_XP_001599942	FVLFYDFVYQAYR	-R	293
Hsal_EFN6719	FVLFSDFVYQRAY	-Q	365
Tcas_XP_968636	FALFTHFVYQTYTS	-R	260
Dmel_NP_788716	FCLFMNFVMSQSYR	-K	294
Amel_GB54302	VFLFSDFVYNTTYK	-S	261
Bimp_XP_003490977	FVLFADFVYSNAYK	-Y	272
Bter_XP_003399465	VFLFADFVYSNAYK	-Y	272
Mrot_XP_003700520	VFLFADFVYNHAYS	-S	272
Nvit_XP_001599914	YFLFSEFYINKAYT	-P	297
Tcas_XP_968563	YYLFDNFYKQAYK	-Y	261
Dmel_NP_651063	VFLFNDFYQSKYK	-K	258
Dpul_EFX74343	LCLFINFYRKTYF	-K	260
Dpul_EFX74342	LCLFINFYKHTYV	-E	260
Dpul_EFX74344	LGMPFLNFYRQTYL	-K	260
Dpul_EFX74345	FNLFKNPFFSSAYK	-Q	259
Dpul_EFX74502	FILFKRPFHSRAYK	-T	261
Dpul_EFX74346	FNLFKNPFHSQTYS	-K	259
Dpul_EFX74501	FILEFKNYHAGAYT	-K	259
Dpul_EFX74503	FLLFKNGHLKSYF	-Q	259
Dpul_EFX76305	LVFFSHFVYQAYL	-R	254
Mrot_XP_003700519	IILFGDFVYKAYI	-R	258
Nvit_XP_001599867	IILFGDFVYQTYV	-K	258
Amel_GB46038	IVLPGNFVYAKAYI	-A	268
Bimp_XP_003484909	IVLPGNFVYAKAYI	-A	265
Bter_XP_003396173	IVLPGNFVYAKAYI	-A	265
Mrot_XP_003703286	IVLPGNFVYAKAYI	-A	265
Hsal_EFN80181	IVLPGNFVYAKAYI	-A	265
Tcas_XP_966527	IVLPGNFVYKAYM	-E	265
Dmel_NP_001097580	LFMPGRFYAQKVC	-V	261
Dmel_NP_729666	LFMPGKFYMQKVT	-V	254
Amel_GB54399	IYLFSDFYRKAYA	-K	264
Tcas_XP_967030	LYLFDSNFVYRKAYI	-K	283
Dmel_NP_651062	LYLFDSNFVYRKTYK	-K	259
Dmel_NP_651104	FSMFPDFVYCKTYI	-R	259
Amel_GB40681	FLLFYKFWYRQNYR	-K	256
Bter_XP_003399626	FILFYNFYQRKVY	-K	256
Nvit_XP_001607111	LLLFLNFVYKKSYS	-K	256
Nvit_XP_001603768	FVLFYQFYRQNYK	-K	257
Mrot_XP_003704078	FYLFYQFYQEAAYV	-K	256
Hsal_EFN76075	IFLFYDFVYRKTYT	-K	233
Hsal_EFN76074	LCLFYKFWYRQTYI	-T	357
Bimp_XP_003489235	FCMPCDYVKKSYL	-R	280
Bter_XP_003395770	FCMPCDYVKKSYL	-R	280
Mrot_XP_003700216	FYMPCDYVKKSYL	-R	280
Nvit_XP_001602545	FYMPFDVYKAYL	-S	283
Dmel_NP_649955	ILMPFANFYIHNYI	-L	253
Dmel_NP_649956	AVIFSQFYHNYI	-K	246
Dmel_NP_731419	IILFSNFVYFHAYI	-R	255
Dmel_NP_649958	IILFSNFVYVRYYI	-L	255
Dmel_NP_649957	FLMLPTKFVYIKTYI	-R	251
Dmel_NP_732912	FIMPFANFYFOCYL	-R	247
Dmel_NP_611365	IYLFGKFYIDNYL	-R	252
Dmel_NP_725820	MTMPGNFVYQTYV	-K	256
Tcas_XP_974047	IILFGKFYKNTYL	-D	255
Tcas_XP_973993	IFLFTKFYRDNYG	-K	264
Tcas_XP_975397	IYLFTDVFVNAYV	-K	509



Rpul_JAA58008	PKRKTAVKAD-	281
Dpul_EFX85691	LKIQFQNEKREKMIKKKKKRL-	344
Amel_GB53872	FQKKMTINGTMHD---KKFKAN	256
Amel_GB53873	FKEKIT-NERENY---NKFKTN	287
Amel_GB45596	FQKKGFTNGTVEY---DKLKN	289
Bimp_XP_003490277	VGKKVYANGTVEY---DKLKVN	290
Bter_XP_003401825	VGKKVYANGTVEY---DKLKVN	290
Hsal_EFN75445	AKKKHFANDAASHIDYNNDKLKAN	292
Mrot_XP_003707508	VEKKSYVNCGTEY---DKLKN	290
Tcas_XP_970514	TKSKVH---	275
Dmel_NP_730187	SESSKFIAGEDQAAYLRKAKAO	316
Bimp_XP_003488925	VKKNNNIND---KLIKAN	288
Bter_XP_003398598	VGRKSDTN-----KLIKVN	288
Bimp_XP_003488983	ESSKHAQD-	280
Bter_XP_003398349	ESSKHAQD-	280
Bimp_XP_003488976	IGKKD-	277
Bter_XP_003402700	IGKKD-	277
Bter_XP_003401771	VGKKDYAN-----DKLKN	286
Bimp_XP_003492944	KAKKAYANKTSSN---DKVKIK	285
Bter_XP_003401772	KAKRAYVNETSRD---DKMK-	290
Bimp_XP_003486801	VGENVHVDGKREY---YKPKTS	291
Bter_XP_003401883	VEENIHVNNGRKEC---YKPKAS	292
Bimp_XP_003492943	VE	275
Bter_XP_003401773	VE	275
Bimp_XP_003484516	RGRKTK-	277
Rpul_JAÄ57286	QPAKLAATDKSQ-	267
Dpul_EFX88828	-	257
Bimp_XP_003490999	R--KLPNALTTKETESQNEKKQON	293
Bter_XP_003399502	R--KSPNALTTKETESQNEKKQON	295
Mrot_XP_003700522	--KKQFSVEKKKREAAEELRREQNSAPRK-	300
Hsal_EFN75681	--KKKSTSALKKAQTLKNTEDNKQHOOQQQQQQQQQQQQAQGVRDDSQESTEASENNIYANQY	319
Nvit_XP_001600048	KAQRKATAEAKAAQKEALKEKLESEKLLKEQESEKQ---SENGSVYPSQY	309
Tcas_XP_971599	KDKKKVKSDDHQDEEVKTKRSNIYGICFTTQTALYEKTTDDVK-	301
Amel_GB51249	-	139
Bimp_XP_003491013	RRKPVANGMKKDHQONHQAONGVTST	289
Bter_XP_003399534	RRKPVANGMKKDHQONHQAONGVTNTG	286
Mrot_XP_003700524	RRKPKDQGSVHANGVANGTVNSG-	312
Nvit_XP_001599996	001599996AAAASAVGVSNSGKLSNGEHQ-	292
Hsal_EFN86956	KPRKRAAAGAVANGVAK-----SHRGSVEGHVANGNVNGTUVANGVAT-----NGV-----V	330
Tcas_XP_968784	RTAAAAAAAAGAAAAGVVONGVQNGTGAHONGVKSNSQYIVNGTADLHORIKSO-	313
Dmel_NP_730841	RMMKK--NGALANGHAKPNGYCKSINAHDLLAMPQTTEATATATPASKANGSSTPPSNCHANGVEN-	329
Dmel_NP_730843	RMMKK--NGALANGHAKPNGYCKSINAHDLLAMPQTTEATATATPASKANGSSTPPSNCHANGVEN-	328
Tcas_XP_968706	QKNNKCK-	267
Amel_GB51247	RREKSAKKYSV-----QNG-STGLCMPVIL-ED-SAP---RONGVSSYI-----TLYNK	302
Bimp_XP_003491000	KTTPKPTDK-SL-----QNG-STGLCMPVIL-ED-SVP---RONGVSSYI-----TLYNK	298
Bter_XP_003399522	KTTPKPTDK-SL-----QNG-STGLCMPVIL-ED-SVP---RONGVSSYI-----TLYNK	298
Mrot_XP_003700456	RSK---SKQSA-----ONGSSTGVCMPVIL-EDKSTP---RONGVSSYI-----TLYNK	326
Nvit_XP_001600017	GKSPRRAIS-----SRGNPGACMPVIL-EDNQTTSRHKGONGVSSYI-----TLYNK	303
Tcas_XP_971544	--NAKAV-----SNS---GACMPVIL-EDEK---QONGVTKSDS-GLANTYIKS	301
Dmel_NP_730846	AARRP-AKAVKANGVHSANGHSKHLGE-----DALIANGCNTGAMPV-----EDEVVKSKGOSNGA	321
Dmel_NP_649754	RDGDKDQSKVANGHANGVHSKHLGE-----DALIANGCNTGAMPV-----EDEVVKSKGOSNGA	329
Dpul_EFX76285	AKSRIAAATNLGKANGHSNGVSNGSTSNSGHSNSGHTNGHANGHSNGHANGKTH-	312
Amel_GB54396	NEKRKKNKTEKTTKTNKME-	276
Bimp_XP_003491027	KRQRTQVKDEQINMAAKVKE-	275
Bter_XP_003399529	KRQRTQVKDEQINMAAKVKE-	275
Hsal_EFN85774	PSKQREPANGCATVSNGAAALTEYYMSLNDAHGCKSD-	291
Mrot_XP_003700518	NRSINEKSCCTNGAIKKNNE-	275
Nvit_XP_001599838	KSSAKSDKAVDQDKLKANSLSNGNTKTNGVSNGHNNGHTKGHNNGHTNGHANGHTNGQTNGHIDKKIE	329
Dmel_NP_651060	EAAAQAKLAAKKE	277
Amel_GB54401	DR--TMKELKND-	196
Bimp_XP_003490969	DR--PKKELKDE-	299
Bter_XP_003399613	DR--PKKELKDE-	299
Nvit_XP_001599942	ROQTANKQLKSE-	305
Hsal_EFN6719	RKRFAQAKLKDE	377
Tcas_XP_968636	KQKSVKAE-----TQAQOLOQQQQQQKOOQOLDATPCKADSNNNTAMLAQQLKAN-	268
Dmel_NP_788716	NEKHSKVLQDKETEIAKTVSNESMQNERKVD-	337
Amel_GB54302	NEKHSKVLQDKETEIAKTVSNESMQNERKVD-	293
Bimp_XP_003490977	NENYSKSLEGGENRVAKKVANGINTONGKRMN-----	304
Bter_XP_003399465	NENYSKSLEGGENRVAKKVANGINTONGKRMN-----	304
Mrot_XP_003700520	GKR-TKSIQEK-NGETKVMVNGNMONGKGKD-	302
Nvit_XP_001599914	EQQAQYDAAKKKNDAAAAAATLTNGKANGV-----PQNQGRIVQNGVSANGVSANGKSSVNGKTKSA-	357
Tcas_XP_968563	GRRMEKNEKSMGIONGYHIKTH	283
Dmel_NP_651063	KQAAAKEKALSADNNNCACADLNKAIQLOQEKQKAL-	295
Dpul_EFX74343	KKAITNGPSSTPMQTOKDL-	280
Dpul_EFX74342	KKETAGSVSLSPAAIPRKRKQ-	282
Dpul_EFX74344	NKKQKADSLLVINNNNNITKKTH-	284
Dpul_EFX74345	KQINNNNNNISKKIK-	274
Dpul_EFX74502	IAVDLKKFKKTA	273
Dpul_EFX74346	NVNLPSNSMCISDAIOKKLL	279
Dpul_EFX74501	NVNPSSTIAAKSVSPKRQOKQKQ-	281
Dpul_EFX74503	NKKDIDNEKNLNWELNFTK-	278
Dpul_EFX76305	KSKKLS-----	260
Mrot_XP_003700519	KPKVAQNGVSSEVPGKLKSQ-	279
Nvit_XP_001599867	KKPQKVAQNGQANVESSNGKAKNO-	285
Amel_GB46038	KGKQAYAEROLEKMKVDTQSKKEI-TDGTVCNGN-----ISNGHANGYANGVGC-KKIQ	319
Bimp_XP_003484909	KGKQAYAEROLEKMKADTQSKKEI-TGAAMCNGN-----IMNGHANGYANGVGC-KKIQ	316
Bter_XP_003396173	KGKQAYAEROLEKMKADTQSKKEI-TGAAMCNGN-----ITNGHANGYANGVGC-KKIQ	316
Mrot_XP_003703286	KGKQAYAEROLEKMKAAAQLKEL-TDGAVCNGN-----VTNGHANGYANGVGC-KKIQ	316
Hsal_EFN80181	KGKQVYAEKRLERLKAQAAAASASTSSALSGI-----VTNGHANGYANGVGC-KKIQ	318
Tcas_XP_966527	KGSQVF-----	298
Dmel_NP_001097580	SAVVKKAK-----	269
Dmel_NP_729666	SAVGKPK-----	262
Amel_GB54399	QKV-----	267
Tcas_XP_967030	PKSSLTGDVVKTIKSQ-----	298
Dmel_NP_651062	AKSVDGGSRRTGSSLQASLRAAGGMGCMQPTMNAKGKHLQNLQNGQVKGAKYIDLNNNSVKPMKLE-----	322
Dmel_NP_651104	QQRKSAEHHLKAS-----	272
Amel_GB40681	SVQKKQ-----	262
Bter_XP_003399626	SASKER-----	262
Nvit_XP_001607111	RSKLK-----	261
Nvit_XP_001603768	PVKPKKS-----	264
Mrot_XP_003704078	KNKRS-----	261
Hsal_EFN76075	TTKOKN-----	239
Hsal_EFN76074	KAK-----	360
Bimp_XP_003489235	KKTE-----	284
Bter_XP_003395770	KKTQ-----	284
Mrot_XP_003700216	KKAD-----	284
Nvit_XP_001602545	KKAV-----	287
Dmel_NP_649955	NGSKQKSALKSD-----	265
Dmel_NP_649956	PGKKSQAKQNK-----	257
Dmel_NP_731419	PKKRQKQNI-----	264
Dmel_NP_649958	PKKTKSAVG-----	265
Dmel_NP_649957	PKEVKSKGKVN-----	262
Dmel_NP_732912	PKHKEN-----	253
Dmel_NP_611365	PPKAKINAKQS-----	263
Dmel_NP_725820	AKSKEQ-----	262
Tcas_XP_974047	KKRQ-----	259
Tcas_XP_973993	ATSDKVK-----	271
Tcas_XP_975397	KKPPKAVQ-----	517

.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880

Rpul_JAA58008	281	
Dpul_EFX85691	344	
Amel_GB53872	256	
Amel_GB53873	287	
Amel_GB45596	289	
Bimp_XP_003490277	290	
Bter_XP_003401825	290	
Hsal_EFN75445	292	
Mrot_XP_003707508	290	
Tcas_XP_970514	275	
Dmel_NP_730187	316	
Bimp_XP_003488925	288	
Bter_XP_003398598	288	
Bimp_XP_003488983	280	
Bter_XP_003398349	280	
Bimp_XP_003488976	277	
Bter_XP_003402700	277	
Bter_XP_003401771	286	
Bimp_XP_003492944	285	
Bter_XP_003401772	290	
Bimp_XP_003486801	291	
Bter_XP_003401883	292	
Bimp_XP_003492943	275	
Bter_XP_003401773	275	
Bimp_XP_003484516	277	
Rpul_JAÄ57286	267	
Dpul_EFX8828	257	
Bimp_XP_003490999	--KMATGYISDSG-LRNRVFIGDR--GFQK--	318
Bter_XP_003399502	--KMATGYISDSG-LRNRVFIGDR--GFQK--	320
Mrot_XP_003700522	--KMATGYISDSG-LRNRVFIGDR--GFKE--	325
Hsal_EFN75681	--KMATGYISDSG-LRNRVFIGDR--GFDE--	344
Nvit_XP_001600048	--KMATAYISDSG-LRNRVFIGDR--GGFDE--	335
Tcas_XP_971599	--EMTKGYTSQGNRLRMRVFIGDRPRA--	325
Amel_GB51249	139	
Bimp_XP_003491013	--NSNSGRRDAADYYVKGD-SLAASELNLRKSG--VTTTE	324
Bter_XP_003399534	--NSNSGRRDAADYYVKGD-SLAASELNLRKSG--VTTTE	321
Mrot_XP_003700524	--NSTSGGRDAADYYVKGD-SLAASELNLRKSG--VTTTE	347
Nvit_XP_001599996	--QSNGGRRREAAADYYVKGD-SIAASELHLRKPAFAAAAGSE	331
Hsal_EFN86956	ANGV-VANGGRRDAADYYVKGD-SLAATELNLRKPG--VATTE	369
Tcas_XP_968784	ANGS-AHKGSNGGLSNCYATKLL-DDASOELKQRT--PK--	313
Dmel_NP_730841	ANGS-AHKGSNGGLSNCYATKLL-DDASOELKQRT--PK--	365
Dmel_NP_730843	ANGS-AHKGSNGGLSNCYATKLL-DDASOELKQRT--PK--	364
Tcas_XP_968706	267	
Amel_GB51247	EINKEYNSCYING-TNNGYVANN-N-TEKKLA--	331
Bimp_XP_003491006	-YNKEYNSCYING-TNNGYVANN-N-TEKKLA--	326
Bter_XP_003399522	-YNKEYNSCYING-TNNGYVANN-N-TEKKLA--	326
Mrot_XP_003700456	-YNKEYNSCYING-TNNGYVANN-N-TEKKHA--	354
Nvit_XP_001600017	-YNKEYNSCYING-TNNGYVANN-NASDKKLA--	332
Tcas_XP_971544	EYSDSYKACYING-STNGFVSQTVIERNSSKKIN--	333
Dmel_NP_730846	-YKEGF---FKEGVLSNDAIIFNP--DSSSSSLHORKV--K--	354
Dmel_NP_649754	329	
Dpul_EFX76285	-EKNQHSNNGHNGYINGALHSKNE--	335
Amel_GB54396	276	
Bimp_XP_003491027	275	
Bter_XP_003399529	275	
Hsal_EFN85774	291	
Mrot_XP_003700518	275	
Nvit_XP_001599838	329	
Dmel_NP_651060	277	
Amel_GB54401	196	
Bimp_XP_003490969	299	
Bter_XP_003399613	299	
Nvit_XP_001599942	305	
Hsal_EFN76719	377	
Tcas_XP_968636	268	
Dmel_NP_788716	337	
Amel_GB54302	293	
Bimp_XP_003490977	304	
Bter_XP_003399465	304	
Mrot_XP_003700520	302	
Nvit_XP_001599914	357	
Tcas_XP_968563	283	
Dmel_NP_651063	295	
Dpul_EFX74343	280	
Dpul_EFX74342	282	
Dpul_EFX74344	284	
Dpul_EFX74345	274	
Dpul_EFX74502	273	
Dpul_EFX74346	279	
Dpul_EFX74501	281	
Dpul_EFX74503	278	
Dpul_EFX76305	260	
Mrot_XP_003700519	279	
Nvit_XP_001599867	285	
Amel_GB46038	319	
Bimp_XP_003484909	316	
Bter_XP_003396173	316	
Mrot_XP_003703286	316	
Hsal_EFN80181	318	
Tcas_XP_966527	298	
Dmel_NP_001097580	269	
Dmel_NP_729666	262	
Amel_GB54399	267	
Tcas_XP_967030	298	
Dmel_NP_651062	322	
Dmel_NP_651104	272	
Amel_GB40681	262	
Bter_XP_003399626	262	
Nvit_XP_001607111	261	
Nvit_XP_001603768	264	
Mrot_XP_003704078	261	
Hsal_EFN76075	239	
Hsal_EFN76074	360	
Bimp_XP_003489235	284	
Bter_XP_003395770	284	
Mrot_XP_003700216	284	
Nvit_XP_001602545	287	
Dmel_NP_649955	265	
Dmel_NP_649956	257	
Dmel_NP_731419	264	
Dmel_NP_649958	265	
Dmel_NP_649957	262	
Dmel_NP_732912	253	
Dmel_NP_611365	263	
Dmel_NP_725820	262	
Tcas_XP_974047	259	
Tcas_XP_973993	271	
Tcas_XP_975397	517	
890.....900.....910.....920.....	