

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Nathalia Goulart Beraldini

RESPOSTA DO ANFÍPODE *Quadrivisia lutzi* (CRUSTACEA, MAERIDAE) AO
ESTRESSE OSMÓTICO EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

Macaé

Junho de 2016

Universidade Federal do Rio de Janeiro

RESPOSTA DO ANFÍPODE *Quadrivisio lutzi* (CRUSTACEA, MAERIDAE) AO ESTRESSE OSMÓTICO EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

Nathalia Goulart Beraldini

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Coorientador: José Luciano Nepomuceno da Silva

Macaé

Junho de 2016.

RESPOSTA DO ANFÍPODE *Quadrivisio lutzi* (CRUSTACEA, MAERIDAE) AO
ESTRESSE OSMÓTICO EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

Nathalia Goulart Beraldini

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Coorientador: José Luciano Nepomuceno da Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovada por:

Presidente, Profa. Dra. Laura Isabel Weber da Conceição

Prof. Dr. Marcos Paulo Figueiredo de Barros – UFRJ (Titular Interno)

Prof. Dr. Manildo Marciao de Oliveira – IFF (Titular Externo)

Prof. Dra. Raquel de Souza Gestinari – UFRJ (Membro Suplente Externo)

Prof. Dr. Maurício Mussi Molisani -UFRJ (Membro Suplente Interno)

Macaé

Junho de 2016.

RESPOSTA DO ANFÍPODE *Quadrivisia lutzi* (CRUSTACEA, MAERIDAE) AO
ESTRESSE OSMÓTICO EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

Nathalia Goulart Beraldini

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Coorientador: José Luciano Nepomuceno da Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovada por:

Presidente, Profa. Dra. Laura Isabel Weber da Conceição

Prof. Dr. Marcos Paulo Figueiredo de Barros – UFRJ (Titular Interno)

Prof. Dr. Manildo Marciao de Oliveira – IFF (Titular Externo)

Prof. Dra. Raquel de Souza Gestinari – UFRJ (Membro Suplente Externo)

Prof. Dr. Maurício Mussi Molisani -UFRJ (Membro Suplente Interno)

Macaé

Junho de 2016.

Beraldini, Nathalia Goulart

Resposta do anfípode *Quadrivisio lutzi* (Crustacea, Maeridae) ao estresse osmótico em condições experimentais./Nathalia Goulart Beraldini - Macaé UFRJ, 2016.

xvi, f.91: 19 il.; 31 cm.

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Coorientador: José Luciano Nepomuceno da Silva

Dissertação (mestrado) – UFRJ/Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2016.

Referências Bibliográficas: f. 49-59

1. Amphipoda. 2. *Quadrivisio*. 3. Osmorregulação . 4.Osmolalidade 5. Expressão gênica.

I. Weber, Laura Isabel da Conceição. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação. III. Resposta do anfípode *Quadrivisio lutzi* (Crustacea, Maeridae) ao estresse osmótico em condições experimentais.

*DEDICO A TODOS AQUELES QUE FIZERAM A DIFERENÇA AO LONGO DA MINHA VIDA ACADÊMICA E
TORCERAM PELO MEU SUCESSO"*

"A PERSISTÊNCIA É O MENOR CAMINHO DO ÊXITO."

(CHARLES CHAPLIN)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao NUPEM/UFRJ e ao curso de pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação pela oportunidade. Agradeço a CAPES pela bolsa de Mestrado durante todo o curso. Agradeço a Deus por ter me dado forças para me manter firme e ter colocado tantas pessoas especiais ao longo desse caminho. Aos meus orientadores que sempre acreditaram em mim e no meu potencial, ouvindo-me, aconselhando e ajudando sempre a encontrar as melhores soluções para os imprevistos do projeto. Laura Weber e José Nepomuceno são verdadeiros amigos que a ciência me proporcionou. Aos meus amigos de turma pela força. Agradeço aos professores Marcos Paulo Figueiredo de Barros e Mauricio Musse Molisani pela facilitação no uso dos equipamentos para verificar os parâmetros ambientais e ao professor Jackson de Souza Menezes por facilitar o uso do equipamento para medição da osmolalidade. Aos meus familiares que suportaram minha ausência e não me deixaram esmorecer. E ao meu noivo Vinicius de Oliveira Rodrigues que soube lidar muito bem com o meu nervosismo e ausência. A Thais Porto, que foi um verdadeiro anjo durante os biensaíes e coletas, além da companhia que também ajudou bastante. Ao João Marcelo S. de Souza e ao prof Dr. Moisés Basilio da Conceição pela ajuda nas coletas. Aos amigos Victor Ferrão, Amanda Ferreira Pinto e Viviane da Conceição Silva que estão comigo desde a graduação e mesmo de longe me ajudaram muito com conselhos me dando ânimo. E por último agradeço ao Arthur Justen, que além de compartilhar a mesma orientadora e turma, também compartilhamos laboratório e muitos assuntos que ajudaram muito na construção dessa dissertação.

RESPOSTA DO ANFÍPODE *Quadrivisio lutzi* (CRUSTACEA, MAERIDAE) AO ESTRESSE OSMÓTICO EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.

Nathalia Goulart Beraldini

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Resumo da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação

As lagoas costeiras são ambientes instáveis com constantes variações de salinidade, levando aos organismos a uma alta demanda energética exigida pela osmorregulação. Assim, os processos de osmorregulação e estresse oxidativo são parcialmente interligados. Os crustáceos osmorregulam em duas etapas subsequentes: a regulação anisiosmótica extracelular (RAE) e a regulação isosmótica intracelular (RII). O objetivo deste estudo foi investigar a perda da homeostase do anfípode *Quadrivisio lutzi* em incrementos de salinidade e analisar sua relação com o estresse oxidativo. Foram realizados bioensaios em salinidades entre 3,9 a 32,5, avaliando a osmolalidade do meio e da hemolinfa dos anfípodas e a expressão gênica de enzimas antioxidantes através de amplificação em tempo real. As análises de expressão gênica foram realizadas para os genes da catalase (*Qlcat*), glutathiona peroxidase (*Qlgpx*), da actina (*Qlactb*, gene referência) e da superóxido dismutase (*Qlactb*). Este último foi obtido no presente trabalho. A mortalidade foi maior para as salinidades de 18 e 32. O anfípode mostrou ser capaz de hiper-regular em salinidades de 3,9; osmoconformar entre 9 e 12 e hiporregular a partir de 13, como mostrado pelos valores de osmolalidade. As expressões relativas dos genes da *Qlcat* e *Qlsod* não apresentaram diferenças significativas com o aumento da salinidade, enquanto o gene da *Qlgpx* teve um aumento a partir da salinidade de 30, sendo altamente significativo a 32, sugerindo o aumento do estresse oxidativo. Estes resultados e o aumento significativo da osmolalidade da hemolinfa em salinidades de 30 a 32, sugerem o início da fase RII e do estresse oxidativo.

RESPONSE OF THE AMPHIPOD *Quadrivisio lutzi* (CRUSTACEA, MAERIDAE) TO OSMOTIC STRESS UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS.

Nathalia Goulart Beraldini

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Abstract da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação

Coastal lagoons are unstable environments suffering constantly with variations in salinity, leading the organisms to a high energy demand required in osmoregulation. So, osmoregulation and oxidative stress processes are partially linked. Crustaceans osmoregulate in two subsequent phases: an extracellular anisosmotic regulation (RAE) and an intracellular isosmotic regulation (RII). The aim of this study was to investigate the homeostasis loss in the amphipod *Quadrivisio lutzi* at increasing salinities and to analyze their relation with oxidative stress. Bioassays were performed at salinities between 3.9 and 32.5, evaluating osmolality of the medium and amphipod hemolymph and the gene expression of antioxidant enzymes by real time amplification. Gene expression analysis was performed by obtaining first the superoxide dismutase (*Qlsod*) gene for *Quadrivisio lutzi*. Catalase (*Qlcat*), glutathione peroxidase (*Qlgpx*) and actina (*Qlactb*, reference gene) genes were already known. Mortality was higher at salinities of 18 and 32. The amphipod was capable of hiper-regulating at 3.9 of salinity, osmocomforming from 9 to 12 and hiporegulating over salinities of 13, as shown by the osmolality values. *Qlcat* and *Qlsod* relative expression did not showed differences with salinity increases, while the *Qlgpx* showed an increase in relative expression at the salinity of 30, being highly significant at the salinity of 32, suggesting the increase of the oxidative stress. These results and the significative increase of the hemolymph osmolality at salinities of 30 to 32, suggest the beginning of the RII phase and the oxidative stress.

Sumário

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
SUMÁRIO.....	X
INDICE DE FIGURAS.....	XII
INDICE DE TABELAS.....	XIV
INDICE DE ANEXOS.....	XVI
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. LAGOAS COSTEIRAS DO NORTE FLUMINENSE.....	1
1.2. PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA.....	2
1.3. OSMORREGULAÇÃO EM CRUSTÁCEOS.....	4
1.4. ESTRESSE OXIDATIVO E OSMORREGULAÇÃO.....	7
1.5. O ANFÍPODE <i>QUADRIVISIO LUTZI</i>	10
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. OBJETIVO GERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. METODOLOGIA.....	14
3.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS LAGOAS COSTEIRAS E SUA RELAÇÃO COM A PRESENÇA DO ANFÍPODE <i>QUADRIVISIO LUTZI</i>	14
3.2. OBTENÇÃO DE REGIÕES DOS GENES ENVOLVIDOS NA OSMORREGULAÇÃO.....	16
3.2.1 <i>Alinhamento de sequências e desenho de primers degenerados</i>	16
3.2.2 <i>Amplificação com primers degenerados, sequenciamento e análise dos fragmentos obtidos</i>	178
3.3. DESENHO DE <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS PARA PCR EM TEMPO REAL E ESTABELECIMENTOS DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO.....	20
3.4. RESPOSTAS DO <i>Q. LUTZI</i> DURANTE AO ESTRESSE OSMÓTICO.....	22
3.4.1. <i>Bioensaios</i>	22
3.4.2. <i>Obtenção da Osmolalidade</i>	25
3.5. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	25
3.5.1. <i>Extração de RNA e síntese do cDNA</i>	25
3.5.2. <i>Quantificação da expressão gênica através da amplificação por PCR em tempo real</i>	28

3.5.3. Análises estatística da expressão gênica.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS LAGOAS E REGISTRO DO ANFÍPODE <i>QUADRIVISIO LUTZI</i>	30
4.2. REGIÃO DO GENE DA <i>QLSOD</i> OBTIDO.....	32
4.3. <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS E AMPLIFICAÇÃO COM PCR EM TEMPO REAL.....	34
4.4. SOBREVIVÊNCIA DOS ANFÍPODE COM O INCREMENTO DE SALINIDADE DURANTE OS BIOENSAIOS.....	36
4.5. VARIAÇÃO DA OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA E DO MEIO COM O AUMENTO DA SALINIDADE.....	37
4.6. VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA SOB INCREMENTOS GRADUAIS DE SALINIDADE.....	40
5. DISCUSSÃO.....	44
5.1. PARÂMETROS AMBIENTAIS E DISTRIBUIÇÃO DO <i>Q. LUTZI</i>	44
5.2. OSMOLALIDADE DA HEMOLINFA E OSMOLALIDADE DO MEIO.....	45
5.3. EXPRESSÃO GÊNICA.....	46
6. CONCLUSÃO.....	49
7. BIBLIOGRAFIA.....	50
8. ANEXOS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alteração de concentração de efetores intracelulares (Modificado de Fernandes, 2010).....	6
Figura 2. Exemplar macho do anfípode <i>Quadrivisio lutzi</i>	11
Figura 3. Alteração da osmolalidade da hemolinfa do anfípode <i>Quadrivisio lutzi</i> e do meio a diferentes salinidades . Extraído e modificado de Souza (2015).....	12
Figura 4. Lagoas visitadas, cujos parâmetros físico-químicos foram obtidos.....	14
Figura 5. Região do gene da Glutaciona peroxidase (<i>Qlgpx</i>) obtida do anfípode <i>Quadrivisio lutzi</i> por Vieira (2014).....	19
Figura 6. Desenho experimental para a avaliação de respostas durante a osmoregulação do anfípode <i>Quadrivisio lutzi</i>	24
Figura 7. Parâmetros físico-químicos das lagoas da região Norte Fluminense amostradas.....	30
Figura 8. Fragmentos do gene da Superóxido dismutase do anfípode <i>Quadrivisio lutzi</i>	31
Figura 9. Sequência nucleotídica de 673 pb correspondente a parte do gene da <i>Qlsod</i> no anfípode <i>Quadrivisio lutzi</i>	32
Figura 10. Alinhamento da sequência nucleotídica do gene da superóxido dismutase (<i>sod</i>) nos anfípodas <i>Parhyalle hawaiienses</i> e <i>Quadrivisio lutzi</i>	33
Figura 11. Fragmentos de DNA amplificados a partir dos <i>primers</i> específicos desenhados para o gene da Glutaciona peroxidase (<i>Qlgpx</i>) para.....	34
Figura 12. Fragmentos de DNA amplificados a partir dos <i>primers</i> específicos desenhados para o gene da Superóxido dismutase.....	34
Figura 13. Fragmentos de DNA amplificados a partir dos <i>primers</i> específicos desenhados para o gene <i>Qlactb</i>	35
Figura 14. Sobrevivência do anfípode <i>Quadrivisio lutzi</i> por bioensaio ao longo do tempo e com o aumento gradual de salinidade.....	36
Figura 15. Alteração da osmolalidade do meio e da hemolinfa do anfípode <i>Q. lutzi</i> em resposta ao aumento gradual da salinidade do meio.....	37
Figura 16. A. Amplificação por PCR em tempo real mostrando o limiar utilizado para a determinação do Cq (expressão gênica). B. Curva de fusão (<i>melting</i>) correspondente a reação de PCR em tempo real	39
Figura 17. Distribuição da frequência dos valores de Cq (expressão gênica), para os genes analisados: (ACT) <i>Qlactb</i> , (SOD) <i>Qlsod</i> , (GPx) <i>Qlgpx</i> e (CAT) <i>Qlcat</i>	40

Figura 18. Valores de Cq por gene e salinidade na análise da expressão gênica absoluta.....41

Figura 19. Expressão relativa a *Qlactb* dos genes (SOD) *Qlsod*, (Gpx) *Qlgpx* e (CAT) *Qlcat* no anfípode *Quadrivisio lutzi* durante o aumento gradativo de salinidade.....42

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Etapas da osmorregulação e sua função; genes e as principais enzimas antioxidantes com suas respectivas funções e unidade catalítica.....	5
Tabela 2. Função do estresse oxidativo, genes envolvidos e suas respectivas enzimas antioxidantes, com suas funções e unidades catalíticas.....	9
Tabela 3. Locais de coleta, datas e coordenadas.....	15
Tabela 4. <i>Primes</i> degenerados senso e antisenso desenhados para amplificação dos genes de interesse e o tamanho esperado do fragmento amplificado.....	17
Tabela 5. Componentes da reação de amplificação dos genes de interesse por PCR.....	18
Tabela 6. Ciclos de temperatura programados no termociclador para amplificação dos genes de interesse por PCR.....	18
Tabela 7. <i>Primers</i> específicos desenhados para os genes <i>Qlactb</i> e <i>Qlcat</i> (Vieira, 2014) e para os genes <i>Qlgpx</i> e <i>Qlsod</i> obtidos no presente trabalho.....	20
Tabela 8. Ciclos de temperatura programados no termociclador para teste dos <i>primers</i> específicos.....	21
Tabela 9. Componentes da reação de amplificação para o teste dos <i>primers</i> específicos por PCR.....	21
Tabela 10. Parâmetros físico-químicos da água da lagoa no momento da amostragem dos anfípodes para os bioensaios, sendo esta a água utilizada nos controles e para preparação das soluções salinas.....	22
Tabela 11. Tratamento do RNA com DNase, constituintes e volumes adicionados.....	25
Tabela 12. Condições da reação de RT-PCR.....	26
Tabela 13. Componentes do kit <i>Hight capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)</i>	26
Tabela 14. Reação utilizada no PCR em tempo real para a amplificação das regiões gênicas da <i>Qlactb</i> , <i>Qlcat</i> , <i>Qlsod</i> e <i>Qlgpx</i> , com seus respectivos <i>primers</i> específicos.....	27
Tabela 15. Parâmetros físico-químicos de cada local de coleta e registro da matéria orgânica vegetal	29
Tabela 16. Resultados do test U de Mann-Whitney na comparação da mortalidade entre controles e tratados.....	36
Tabela 17. Resultado da ANOVA na avaliação do efeito da salinidade sobre a hemolinfa, comparando controle com tratados.....	38
Tabela 18. Resultado do Teste de Tukey para Bioensaio I.....	38

Tabela 19. Resultado do Teste de Tukey para o Bioensaio III	38
--------------------------------------------------------------------------	----

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da Na ⁺ /K ⁺ ATPase.....	60
Anexo 2. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da Na ⁺ /K ⁺ ATPase.....	64
Anexo 3. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da Anidrase carbônica citoplasmática..	69
Anexo 4. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da Anidrase carbônica aderida a membrana.....	70
Anexo 5. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da V-H ⁺ -ATPase.....	72
Anexo 6. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da V-H ⁺ -ATPase.....	75
Anexo 7. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da Glutathiona desidrogenase.....	78
Anexo 8. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da Glutamato piruvato transaminase.....	82
Anexo 9. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da Leucina aminopeptidase.....	85
Anexo 10. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da Superóxido dismutase citoplasmática.....	88
Anexo 11. Salinidades obtidas após a preparação da soluções salinas.....	91

1. INTRODUÇÃO.

O fenômeno do aquecimento global tem causado grandes modificações no planeta, dentre as principais podemos citar as mudanças climáticas (Germani et al., 2015). Aparentemente, o aumento gradual da temperatura do planeta é um processo natural, que vem sendo intensificado pela destruição da camada de ozônio e pelo acúmulo dos gases causadores do efeito estufa na atmosfera. Embora esses gases sejam emitidos naturalmente, as atividades antrópicas vêm contribuindo significativamente para esse aumento (Hoegh-Guildberg e Bruno, 2010). Tal fato tem repercussão direta sobre a biodiversidade, podendo causar danos irreversíveis aos ecossistemas ou modificá-los drasticamente (Bellard et al., 2012.). Marengo et al. (2007) alertaram que o Brasil é um país vulnerável às mudanças climáticas, especialmente quanto à ocorrência de eventos como secas e enchentes (Almeida e Kovac., 2014). Esta instabilidade da pluviosidade pode causar alterações significativas nas condições ecológicas e da biodiversidade dos ecossistemas (Aarset e Zachariassen., 1988).

1.1. Lagoas Costeiras do Norte Fluminense.

Lagoas são corpos de água continentais sensíveis aos impactos ambientais adversos, de baixa resiliência, ou seja, são ecossistemas extremamente frágeis (Gomes e Pereira, 2014). Em contrapartida, estudos já comprovaram a grande diversidade biológica apresentada por esses ambientes (Reid e Esteves, 1984; Aguiaro e Caramaschi, 1995; Suzuki, 1997; Branco, 1998). Os sistemas aquáticos naturais são abertos e dinâmicos e por isso sofrem modificações contínuas na sua composição química (Costa et al. 2008). As lagoas costeiras atuam como filtros, retendo a matéria orgânica e inorgânica oriunda do continente (Esteves et al 2004), o que colabora para o aumento da sua produtividade (quantidade de carbono orgânico produzido por unidade de área e de tempo). Esse quadro vivenciado por esses ambientes sem dúvidas contribui para a biodiversidade, assim como a sua localização em regiões de interfase (entre o mar e águas interiores) indicam sua grande importância ecológica (Esteves, 1998).

Distribuídos ao longo da costa brasileira, esses corpos de água sofrem constantemente com ressacas, *spray* marinho, intrusão de águas subterrâneas e de rios, taxas de precipitação e evaporação (Minello, 2004), e outros eventos naturais que contribuem significativamente para a variação da salinidade. A salinidade é definida como a concentração em gramas dos sais minerais dissolvidos em 1 kg de água, destacando-se o cálcio, magnésio, sódio, potássio,

bicarbonato, cloreto e sulfato (Esteves, 2011a). Além disso, a salinidade das lagoas costeiras pode ser influenciada por ações antrópicas como abertura de barra, construção de portos, descargas de fertilizantes (Silva et al., 2000; Piscart et al., 2005) e utilização de sal para remoção de gelo e neve (Blasius e Merritt, 2002). A fauna que compõe esses ecossistemas em constante mudança precisa conviver com essas variações, que podem se tornar grandes problemas para reprodução e sobrevivência dos indivíduos (Huszar e Silva, 1992).

As propriedades físico-químicas, como salinidade e temperatura, são importantes fatores na evolução geomorfológica das lagoas costeiras (Esteves et al., 2004), além de afetar significativamente a atividade biológica desses ecossistemas (Costa et al., 2008). Segundo Kjerfve (1994) outra característica comum às lagoas costeiras é sua profundidade, em geral elas são rasas, o que as torna ainda mais vulneráveis a variações no balanço hídrico, térmico e salino (Smith, 1994).

As lagoas da região do norte do estado do Rio de Janeiro estão localizadas na bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul e abrange as cidades de Campos dos Goytacazes, Cardoso Moreira, São Fidélis, São Francisco de Itabapoana, São João da Barra, Carapebus, Conceição de Macabu, Quissamã e Macaé (Suzuki, 1997).

1.2. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA) com uma dimensão de 14.992,39 ha (<http://www.icmbio.gov.br/parnajurubatiba/>) corresponde a uma importante unidade de conservação ambiental da região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro. O número de lagoas distribuídas ao longo do parque varia entre 14 e 18, de acordo com os períodos de estiagem e cheias podendo ser doce ou salobra (Esteves, 2011a). São elas: Cabiúnas, Comprida, Carapebus, Casa Velha, Paulista, Lagoa das Garças, Piri-piri I, Piri-piri II, Maria Menina, Robalo, Preta, Pires, Visgueiro e Ubatuba.

Esses ecossistemas caracterizam-se tanto pela fauna única e diversificada quanto pela gama de ambientes em termos de parâmetros ambientais como concentração de matéria orgânica, volume de água, temperatura e salinidade (Esteves, 1998; Farjalla et al., 2009). Tais parâmetros são influenciados pelo volume de chuvas e interferência marinha, que podem ocorrer sazonal ou anualmente, sendo previsíveis ou imprevisíveis (Esteves, 1998).

Algumas lagoas do Parque são ricas em substâncias húmicas (SH), moléculas complexas formadas por estruturas aromáticas, originárias da decomposição da matéria orgânica alóctone, o que confere uma coloração escura bem característica às lagoas (Esteves

2011a). As SH compõem a maior fração do carbono orgânico dissolvido das lagoas (Esteves, 2011a; Steinberg et al., 2008), e em baixas concentrações, em organismos não adaptados levam ao estresse oxidativo, pois diminuem a capacidade antioxidante (Steinberg et al., 2010). Já em altas concentrações essas substâncias diminuem o pH do ambiente podendo afetar a biodiversidade e estimular o endemismo (Esteves, 1998).

De acordo com dados obtidos por Esteves (1998) as lagoas Piri-piri I, Piri-piri II, Maria Menina, Robalo, Preta, Pires e Visgueiro são consideradas hipersalinas, com salinidade superior à marinha de 35. A lagoa de Ubatuba é salina, já a das Garças, Paulista, Casa Velha, Carapebus e Cabiúnas variam de doces a salobras, com salinidades entre 0 e 21, respectivamente, dependendo da pluviosidade. Dentre as lagoas citadas a de maior salinidade documentada até hoje é a lagoa Visgueiro em 2001, que atingiu os 70,1 (Farjalla et al., 2001). Em relação ao pH, foi observado por Esteves (1998), Farjalla et al. (2001) e Hollanda-Carvalho (2002) que as lagoas Comprida, Paulista e Garças apresentam caráter ácido atingindo no máximo pH 6. Assim, as lagoas com maior concentração de substâncias húmicas são as Comprida, Paulista e das Garças. No entanto, as lagoas Cabiúnas, Carapebus, Paulista, Piri-piri I e II e Casa Velha foram classificadas por Esteves (1998) como intermediárias em relação às substâncias húmicas; enquanto as outras são consideradas claras, ou seja, com baixa concentração de substâncias húmicas. A lagoa Casa Velha pertence ao grupo de lagoas que desaparece nas épocas de estiagem, no entanto mesmo cheia apresenta baixa profundidade, atingindo até 0,80 m (Hollanda-Carvalho, 2002).

A lagoa de Carapebus é a maior dentre as que compõem o PARNA, com 6,5 km² de extensão e aproximadamente 4 m de profundidade (Farjalla et al., 2001). A lagoa abrange a área urbana da cidade de Carapebus e sofre as consequências geradas pela constante presença do homem. Além de ser utilizada para atividades recreativas, sofre com despejo de efluentes domésticos e abertura de barra em períodos de cheia (Farjalla et al., 2001). Esta lagoa também é rica em substância húmicas, porém de pH básico.

Dentre os animais que compõem esses ambientes aquáticos estão alguns crustáceos, capazes de sobreviver e se reproduzir em ambientes sensíveis, como os representados pelas lagoas. Os crustáceos são originalmente marinhos (Barnes et al., 2005) e, tendo colonizado ambientes salobros e de água doce, tiveram que enfrentar barreiras osmóticas e iônicas severas. Esses animais desenvolveram mecanismos para se adaptar à variação de salinidade para que a sobrevivência, a distribuição e as estratégias reprodutivas do grupo não fossem afetadas bruscamente (Augusto, 2005). Isso inclui desenvolver a capacidade de regular a

osmolalidade da hemolinfa em relação ao ambiente em que vive o que contribui para explicar o sucesso evolutivo desses animais (Charmantier et al., 2009). Adaptações como redução da concentração dos líquidos corporais até valores compatíveis com a função celular; redução da ingestão de água; redução da permeabilidade do tegumento; aumento da excreção de água pela glândula antenal; e presença de transporte ativo de solutos permitiu aos crustáceos colonizar os ambientes mais diversos já que essas adaptações reduzem os gastos energéticos para a manutenção dos gradientes osmóticos e iônicos elevados (Gilles e Delpire, 1997).

Devido às características mencionadas, os crustáceos em geral, são considerados bons bioindicadores de ambientes aquáticos (Barnes et al., 2005), ou seja, são animais capazes de gerar uma resposta biológica mediante alterações no meio físico em que vivem (Baptista et al., 2003). A salinidade é um dos mais importantes fatores abióticos que afetam as condições fisiológicas dos crustáceos, além de também influenciar sua distribuição e abundância. Ainda não há um consenso sobre como os crustáceos lidam com a osmorregulação (Romano e Zeng, 2012), sendo importante o estudo desse tema a fim de elucidar os mecanismos envolvidos e prever possíveis consequências em casos de alterações ambientais.

1.3. Osmorregulação em Crustáceos

Os crustáceos apresentam duas fases consecutivas de osmorregulação (Mantel e Farmer, 1983; Augusto, 2005). A primeira fase denominada Regulação Anisomótica Extracelular (RAE) é a responsável pela manutenção da osmolalidade e composição da hemolinfa, onde ocorrem alterações na permeabilidade à água e íons pela superfície do corpo ou por mecanismos ativos de absorção ou excreção pelos epitélios de interfase entre o organismo e o meio externo (brânquias e glândulas antenais). Durante esta fase, enzimas como Na^+/K^+ ATPase, Anidrase carbônica (CA) e V-H^+ ATPase têm um papel importante promovendo estes eventos (Firmino et al., 2011) (Tabela 1). As duas primeiras enzimas citadas são consideradas o componente molecular central no processo sistêmico de transporte e regulação de íons, visto que estão presentes nas brânquias de todas as espécies eurialinas, aquelas capazes de tolerar uma ampla variação de salinidade (Henry et al., 2003).

Tabela 1. Etapas da osmorregulação e sua função; genes, códigos enzimáticos (E.C) com suas respectivas funções e unidade catalítica.

Etapas	Função da Etapa	Gene de interesse (Sigla)	E.C	Função da Enzima (produto gênico)	Unidades Catalítica
RAE	Manter a osmolaridade e composição da hemolinfa	Na ⁺ /K ⁺ ATPase	3.6.3.9	Transporte de íons	A
		Anidrase carbônica (CA)	4.2.1.1	Transporte e dissociação do CO ₂ e controle do pH	Sítio A
		Vacuolar-H ⁺ -ATPase (V-ATPase; ATPsintase)	3.6.3.14	Bombeamento de prótons	B
RII	Ajustar os níveis de efetores osmóticos orgânicos e inorgânicos, mantendo o volume e composição do meio intracelular	Glutamato desidrogenase (GDH GTDH)	1.4.1.2	Síntese de aminoácidos	-
		Alanina aminotransferase 1; pyruvato transaminase (GPT 1; ALAT)	2.6.1.2	Síntese de Alanina	-
		Leucina aminopeptidase 1 (LAP)	3.4.11.1	Liberação de aminoácidos em terminais amino de proteínas ou substratos peptídicos	-

A Anidrase carbônica apresenta duas isoformas principais: a citoplasmática e a aderida à membrana. Essas enzimas respondem de maneiras diferentes à variação de salinidade. De acordo com Serrano e Henry (2008), em crustáceos decápodes, por exemplo, a CA associada à membrana responde melhor em animais aclimatados a alta salinidade enquanto que a CA citoplasmática apresenta maior ação em baixas salinidades, visto que esta enzima está amplamente envolvida com a captação de íons.

A V-H⁺-ATPase é composta por dois domínios, um citoplasmático e um associado à membrana, estes por sua vez são formado por várias subunidades diferentes. Esses domínios precisam estar acoplados para que a enzima esteja no seu modo ativo (Firmino et al., 2011). Estudos feitos por Weihrauch et al. em 2001 com caranguejos da espécie *Carcinus maenas* verificaram a presença dessa enzima nas brânquias de animais expostos a alterações de salinidade, através da expressão da subunidade B do domínio citoplasmático, pois além de fazer parte do domínio catalítico, é também a porção mais conservada da enzima. Mas, as respostas obtidas indicaram que os animais extremamente euralinos apresentaram uma maior expressão da enzima, enquanto aqueles animais denominados moderados não demonstraram o mesmo padrão de expressão.

O início da segunda fase da osmorregulação, a Regulação Isosmótica Intracelular (RII), indica o estresse osmótico, caracterizado pela alteração do volume celular, induzida pela diferença de concentração de soluto entre o meio intra e extracelular (Fernandes, 2010). Sendo assim a principal função da RII é reverter essa perda da homeostase mantendo o volume e composição do meio intracelular através do ajuste dos níveis internos de efetores osmóticos orgânicos como peptídeos e aminoácidos livres (Figura 1), e inorgânicos como K^+ e Ca^{2+} . Quando submetidos a meio hipo-osmótico as células tendem a inchar enquanto no meio hiperosmótico elas murcham acionando assim diferentes sistemas de transporte de íons e solutos orgânicos na membrana plasmática para recuperar o volume celular (Häussinger et al., 1994). Mudanças no volume celular interferem nas funções metabólicas. Mediante a perda de volume celular a degradação de proteínas, glicogênio e lipídeos é estimulada enquanto sua síntese é inibida, visando aumentar a concentração de efetores osmóticos (Häussinger, 2004).

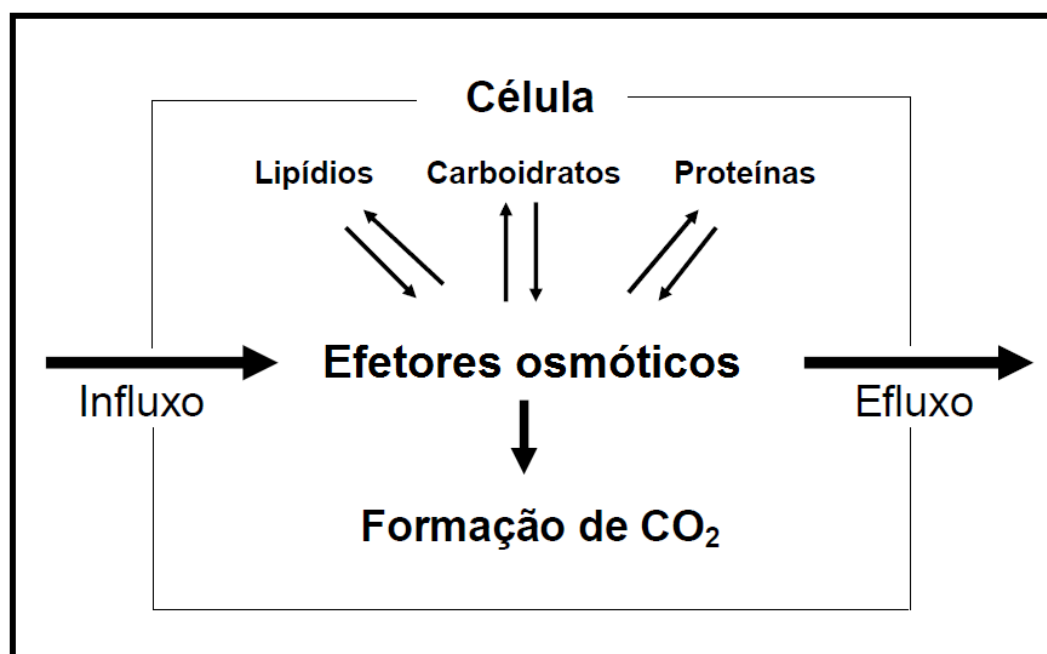


Figura 1. Alteração da concentração de efetores intracelulares (Modificado de Fernandes, 2010).

Na etapa RII é importante a atividade de enzimas como a Glutamato desidrogenase (GDH) (Wang et al., 2012), Glutamato piruvato transaminase (GTP) (Burton e Feldman, 1983) e a Leucine aminopeptidase (LAP) (Gillespie, 1991) (Tabela 1). A GDH está dividida

em quatro classes, mas apenas a GDH-1 e GDH-2 têm uma ampla distribuição taxonômica. Essas enzimas, localizadas nas mitocôndrias, são mais expressas nos tecidos musculares e estão diretamente ligadas a degradação de proteínas liberando aminoácidos no meio. No entanto, em estudos feitos com o crustáceo copépode *Tigriopus californicus* (Baker, 1912), não se observou aumento significativo na atividade e expressão da GDH mediante estresse hiperosmótico (Wang et al., 2012). Já a GPT é uma isoenzima que participa da fase final da síntese da alanina e está presente no citoplasma de células do hepatopâncreas (Burton e Feldman, 1983). A LAP é uma das maiores aminopeptidases citosólicas, quando considerado o tamanho. Esta enzima tem sido identificada em muitos micro-organismos, mas pouco é conhecido ainda sobre sua estrutura, atividade e funções biológicas (Hatta et al., 2006). Aloenzimas específicas da LAP foram responsáveis pela sobrevivência diferencial de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* submetidos a diferentes condições de salinidade (Koehn et al., 1980).

As duas etapas da osmorregulação em crustáceos se complementam. A hemolinfa funciona como um tampão contra alterações no volume intracelular. Então, quanto mais eficaz for a primeira etapa RAE, mais protegida ficará a célula, reduzindo o papel da fase RII (Batista, 2010). A ativação ou inativação dessas etapas ajuda a classificar os organismos em osmorregulares ou osmoconformadores. Durante a osmorregulação as enzimas presentes na primeira fase tendem a aumentar sua atividade para manter a concentração iônica da hemolinfa estável (Batista, 2010). Hiper-regulação consiste em manter a osmolalidade da hemolinfa superior ao meio; enquanto na hiporegulação, a concentração de íons da hemolinfa se mantém inferior a do meio. Quando o animal não é capaz ou deixa de realizar esses processos, ele passa a ser denominado osmoconformador, condição na qual a concentração osmótica da hemolinfa acompanha a do meio externo. Os íons presentes na água, devido ao gradiente eletroquímico, entram na hemolinfa e a célula tem que começar a trabalhar para que suas estruturas não sejam danificadas.

1.4. Estresse oxidativo e osmorregulação

A ativação do metabolismo energético como resultado do estresse osmótico, com a consequente alteração do equilíbrio eletrolítico (Lignot et al., 2000), leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo causar dano oxidativo (Lushchak, 2011). Sabe-se que 5% dos processos de oxidação biológica em organismos aeróbicos levam ao surgimento dessas moléculas (Hermes-Lima e Gonçalves., 2001).

No entanto, os organismos que sofrem as consequências da presença dessas ERO desenvolveram um mecanismo de defesa contra os efeitos dessas moléculas. Estes podem ser tanto enzimáticos quanto não enzimáticos (vitaminas). As enzimas que participam desse processo de defesa são as chamadas antioxidantes, responsáveis por diminuir a presença das ERO e assim evitar os problemas causados pelo estresse oxidativo (Segall et al., 2000). Dentre elas estão a glutathiona peroxidase (gpx), a superóxido dismutase (sod) e a catalase (cat) (Tabela 2).

A gpx é a principal enzima antioxidante responsável por eliminar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pela respiração celular (Aruoma, 1998), além de ser conhecida por desempenhar um papel fundamental na reprodução de crustáceos (Xia et al., 2013). Esta enzima apresenta 6 classificações, variando em estrutura molecular, substrato e sítio catalítico (Freitas, 2011). A expressão e atividade da gpx demonstraram ser significativamente reguladas positivamente em estudos envolvendo camarões da espécie *Penaeus monodon* e *Macrobrachium rosenbergii* infectados com micróbios, indicando uma tentativa do organismo de eliminar ERO excessivas provocadas pela infecção (Liu et al. 2010 e Yeh et al., 2013).

Tabela 2. Função do estresse oxidativo, genes envolvidos seus códigos enzimáticos (E.C) e suas respectivas enzimas antioxidantes com suas funções e unidades catalíticas.

Função do estresse oxidativo	Gene de interesse	E.C da Enzima	Função da Enzima	Unidade Catalítica
Eliminar as espécies reativas de oxigênio, evitando dano oxidativo das células.	Superóxido dismutase mitocondrial e citoplasmática (<i>sod</i>)	1.15.1.1	Remove o radical superóxido das ERO	Manganês dependente (Mn)
	Catalase (<i>cat</i>)*	1.11.1.6	Evita o acúmulo de metahemoglobina e decompõe o peróxido de hidrogênio	-
	Glutaciona peroxidase (<i>gpx</i>)	1.11.1.9	Reduz qualquer peróxido de hidrogênio	Selênio dependente

*Gene já caracterizado para o anfípode *Q. lutzi* por Vieira (2014).

A enzima *sod* faz parte da primeira linha de defesa do organismo contra o dano oxidativo. Ela é responsável por catalisar a quebra do ERO superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Marchand et al., 2009). Em geral ela está presente em todos os organismos vivos e é dependente de um cofator metálico para realizar a catálise. Assim, a *sod* se divide em dois grandes grupos a Cu/Zn *sod*, que é a forma citoplasmática dependente de cobre e zinco, e a Mn *sod*, que é a forma mitocondrial, dependente de magnésio. Mas, em animais onde o transporte de oxigênio é feito por meio da hemocianina dependente de cobre (Cu), como nos crustáceos, a Cu/Zn *sod* passou a ser extracelular e a Mn *sod* citoplasmática substituiu sua função (Marchand et al, 2009). De acordo com Brouwer et al (2003) a *citMn sod* é a forma precursora da enzima que é transportada para a mitocôndria onde é clivada, perdendo sua sequência sinal N-terminal e dando origem a *mitMn sod*.

A *cat* completa esse grupo de enzimas que desempenham um papel central na desintoxicação enzimática (Arockiaraj, 2012). Esta é uma das enzimas mais eficientes encontradas dentro da célula, fortemente expressa, sua função resume-se em manter o equilíbrio redox celular promovendo a eliminação do peróxido de hidrogênio (Zhang, et al, 2008). A enzima é altamente conservada e apresenta estrutura tetramérica, sendo cada subunidade idêntica com um sítio ativo muito estável (Arockiaraj, et al, 2012).

Mediante a alteração físico-química no ambiente e a resposta do organismo em questão, a expressão gênica e atividade dessas enzimas podem ser moduladas (Batista, 2010). Dessa forma, a expressão aumentada das enzimas antioxidantes nos indica a tentativa do

organismo em combater o estresse oxidativo para permanecer vivo (Batista, 2010). No camarão *Litopenaeus vannamei* foi possível observar mudanças na atividade das enzimas cat, sod, gpx e da Na⁺/K⁺ - ATPase já nas 24 h de exposição a alterações agudas de salinidade (Liu et al., 2007; Erchao et al., 2011).

Estudos que envolvem análise de expressão gênica são realizados atualmente por PCR em tempo real, técnica de alta precisão, que fornece exatamente a quantidade de ácidos nucleicos amplificáveis a partir de uma determinada reação (Randoc, et. al., 2004). Sendo assim, como saber se a expressão de um determinado gene foi efetivamente alterada pelas condições do experimento ou se foi um artefato da técnica? Para solucionar essa questão e obter resultados mais robustos e confiáveis, deve-se utilizar um gene de referência, ou seja, um gene que não seja influenciado pelas condições experimentais e assim possa ser comparado com os genes de interesse (Randoc, et. al., 2004). Os genes de referência mais utilizados, em diferentes táxon e tratamentos são os correspondentes as seguintes proteínas: β -actina, uma proteína citoplasmática que constitui os microfilamentos do citoesqueleto (Perrim e Ervasti, 2010); β -tubulina que é uma proteína globular de 55 kDa e responsável por constituir os microtúbulos do citoesqueleto; e o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH - EC 1.1.2.12), que com 37 kDa, participa efetivamente da via glicolítica.

1.5. O anfípode *Quadrivisio lutzi*.

O gênero *Quadrivisio* foi descrito pela primeira vez por Stebbing (1907) e caracteriza-se por quatro olhos bem desenvolvidos. O anfípode *Q. lutzi* (Figura 1) foi descrito por Shoemaker (1933) em Georgetown, Guiana. Os machos podem atingir 11 mm de comprimento com uma média de $7,2 \pm 2,2$ mm com sua curvatura natural (LB), enquanto as fêmeas podem chegar a 10 mm de comprimento com uma media de $5,7 \pm 1,8$ mm (Medeiros e Weber, 2016). A espécie já foi relatada em São Paulo, Brasil (Leite et al., 1980) e corresponde a uma das diversas espécies de invertebrados observados nas lagoas costeiras do norte do estado do Rio de Janeiro (Henriques-de-Oliveira et al., 2007.; Medeiros e Weber, 2016).

Este crustáceo é encontrado no sedimento das lagoas, associado a matéria orgânica vegetal ou eventualmente, associado às macrófitas na coluna de água. A ordem Amphipoda abrange invertebrados considerados como bons bioindicadores por serem sensíveis a estressores (Domingues e Bertolotti, 2006) e de fácil manejo em laboratório por apresentar ciclo de vida curto e desenvolvimento direto. Os anfípodos representam também um

importante papel nas cadeias tróficas, pois são animais omnívoros decompositores que degradam a matéria orgânica morta, principalmente vegetal.



Figura 2. Exemplar macho do anfípode *Quadrivisio lutzi*.

O anfípode *Quadrivisio lutzi* representa um modelo invertebrado interessante para estudos de monitoramento ambiental e já tem sido utilizado em estudos de ecotoxicologia (Weber et al., 2013; Souza, 2015). Esta espécie, que pode ser abundante em algumas lagoas e em algumas épocas do ano (como nos períodos de chuva), se torna extremamente rara em períodos de estiagem. Em um estudo recente constatou-se que o anfípode *Quadrivisio lutzi* apresenta um alto potencial reprodutivo que lhe permite recuperar seus tamanhos populacionais em pouco tempo nos ambientes altamente instáveis das lagoas costeiras da região (Medeiros e Weber, 2016).

A necessidade de avaliar a persistência desta espécie nas lagoas costeiras do Norte Fluminense, levou à realização de um estudo sobre sua tolerância à salinidade e temperatura (Souza, 2015). Este autor observou que o anfípode *Q. lutzi* hiper-regula até aproximadamente 18 de salinidade (Figura 3) igualando a concentração da hemolinfa a do meio numa salinidade de 20, caracterizando um quadro de osmoconformação. Ainda como resultado desse estudo, a concentração letal (LC50) de sal para o anfípode *Q. lutzi*, foi de 35,9. A maior concentração sem efeito observado (CENO) foi de 18 de salinidade, enquanto a menor concentração com efeito observado (CEO) foi de 26,9 (Souza, 2015).

Vieira (2014) avaliou a expressão de enzimas do estresse oxidativo no anfípode *Q. lutzi* submetidos a fração solúvel de petróleo. Neste estudo foi estabelecida a *Qlactb* como o melhor gene de referência quando avaliada junto com os outros genes candidatos a β -tubulina e GAPDH. Também foram obtidas nesse estudo as sequências nucleotídicas da *Qlcat* e *Qlgpx* do anfípode *Q. lutzi*.

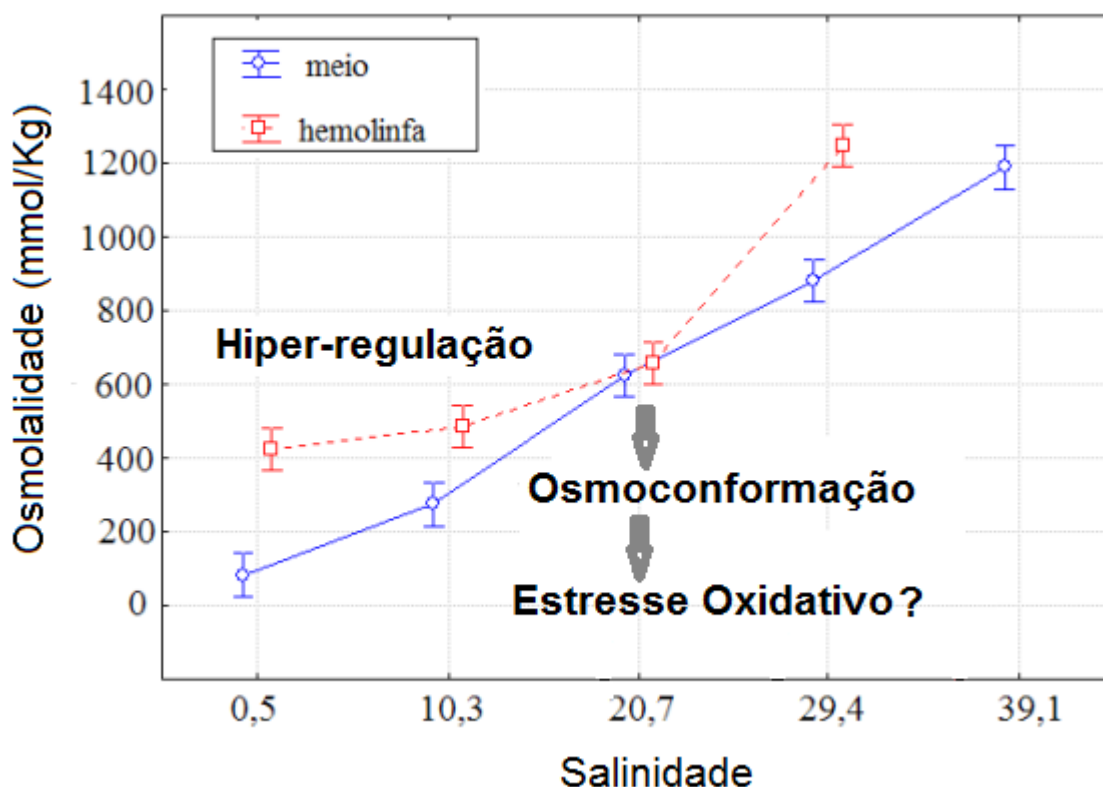


Figura 3. Alteração da osmolalidade da hemolinfa do anfípode *Quadrivisio lutzi* e do meio a diferentes salinidades. As setas indicam o ponto de osmoconformação e o possível início do estresse oxidativo. Extraído e modificado de Souza (2015).

O estudo da análise da expressão gênica das enzimas antioxidantes no anfípode *Q. lutzi* mediante o aumento gradativo da salinidade permitirá observar a relação entre osmorregulação e estresse oxidativo. No momento da perda da capacidade de hiper-regular observada por Souza (2015) acredita-se que enzimas antioxidantes comecem a ser mais expressas visando reverter o quadro de estresse oxidativo, já o aumento da expressão desses genes poder comprovar um quadro prévio de estresse osmótico responsável por desencadear o estresse oxidativo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar o momento no qual ocorre a perda da homeostase do anfípode *Quadrivisio lutzi* frente ao aumento de salinidade e nestas condições avaliar um possível aumento do estresse oxidativo.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros ambientais das lagoas costeiras da região norte do estado do Rio de Janeiro em relação à ocorrência do anfípode *Quadrivisio lutzi*.
- Identificar e caracterizar o gene que codifica para a enzima Superóxido dismutase no anfípode *Quadrivisio lutzi*.
- Desenhar *primers* para o gene da Superóxido dismutase do anfípode *Quadrivisio lutzi* e estabelecer as condições de amplificação por PCR em tempo real.
- Analisar o processo de osmorregulação através da avaliação da osmolalidade da hemolinfa e da expressão de genes possivelmente envolvidos nestes processos.

3. METODOLOGIA

3.1. Parâmetros físico-químicos das lagoas costeiras e sua relação com a ocorrência do anfípode *Quadrivisio lutzi*.

Os parâmetros físico-químicos, de turbidez, dureza, temperatura, pH, oxigênio dissolvido e salinidade foram obtidos de 22 lagoas presentes na região norte fluminense no município de Campos: Lagamar; no município de Quissamã: Pitanga, Ubatuba, Casa Velha, Barrinha, Preta, Pires, Catingosa, Visgueiro, Robalo, Maria Menina, Peri-peri I, Peri-peri II, Garças, Bezerra, Amarra-boi, Paulista e Encantada; município de Carapebus: Carapebus; município de Macaé: Cabiúnas, Comprida e Imboassica (Tabela 3, Figura 4). A transparência da água das lagoas, foi determinada através da profundidade na qual desaparece completamente o disco de Secchi, de acordo com Esteves (2011b). A dureza da água foi obtida utilizando um kit comercial da marca LabconTest, onde cada ponto de dureza (1° dH) corresponde a 71,6 ppm de CaCO₃. Os parâmetros das lagoas foram obtidos com um aparelho portátil

multiparamétrico marca YSI, modelo 556. As informações correspondentes às coletas como data, coordenadas e município são encontradas na Tabela 3. Para cada lagoa foi verificada a ocorrência do anfípode *Q. lutzi*.

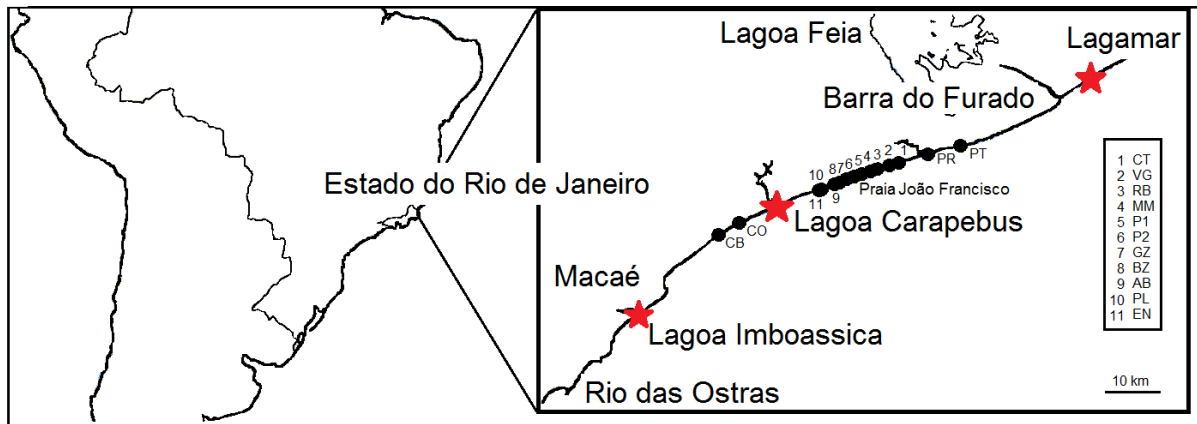


Figura 4. Lagoas visitadas, cujos parâmetros físico-químicos foram obtidos. As lagoas indicadas com estrelas indicam a ocorrência do anfípode *Quadrivisio lutzi*; as indicadas com círculos foram avaliadas, mas não foram encontrados anfípodas. Município de Quissamã: (PT) Pitanga, (PR) Preta, (CT) Catingosa, (VG) Visgueiro, (RB) Robalo, (MM) Maria Menina, (PI) Peri-peri I, (PII) Peri-peri II, (GZ) Garças, (BZ) Bezerra, (AB) Amarra-boi, (PL) Paulista e (EN) Encantada; Município de Carapebus: (CP) Carapebus; Município de Macaé: (CO) Comprida, (CB) Cabiúnas e (IB) Imboassica.

Tabela 3. Locais de coleta, datas e coordenadas.

PONTO	LOCAL	MUNICÍPIO	COORDENADAS	DATA
1	Lagamar (LM)	Campos	22°03'35,1''S; 41°05'00,7''W	29/02/2016
2	Pitanga (PT)	Quissamã	22°09'40,8''S; 41°17'53,3''W	29/02/2016
3	Ubatuba (UB)*	Quissamã	Não amostradas	29/02/2016
4	Casa Velha (CV)*	Quissamã	Não amostradas	29/02/2016
5	Barrinha (BR)**	Quissamã	Não amostradas	29/02/2016
6	Preta (PR)	Quissamã	22°10'25,7''S; 41°20'51,3''W	29/02/2016
7	Pires (PE)**	Quissamã	Não amostradas	29/02/2016
8	Catingosa (CT)	Quissamã	22°11'12,7''S; 41°23'45,7''W	29/02/2016
9	Visgueiro (VG)	Quissamã	22°11'21,4''S; 41°24'21,7''W	29/02/2016
10	Robalo (RB)	Quissamã	22°12'02,4''S; 41°26'09,7''W	03/03/2016
11	Maria Menina (MM)	Quissamã	22°12'02,4''S; 41°27'03,0''W	03/03/2016
12	Peri-peri I (PPI)	Quissamã	22°12'14''S; 41°27'34,1''W	03/03/2016
13	Peri-peri II (PPII)	Quissamã	22°12'27,2''S; 41°28'19,1''W	03/03/2016
14	Garças (GZ)	Quissamã	22°12'44''S; 41°29'15,6''W	03/03/2016
15	Bezerra (BZ)	Quissamã	22°13'03,6''S; 41°30'11,2''W	03/03/2016
16	Amarra boi (AB)	Quissamã	22°13'14,6''S; 41°30'47,5''W	03/03/2016
17	Paulista (PL)	Quissamã	22°14'02,5''S; 041°32'40,4''W	03/03/2016
18	Encantada (EM)	Quissamã	22°14'12,1''S; 41°32'59''W	03/03/2016
19	Carapebus (CP)	Carapebus	22°14'11,9''S; 41°35'28,8''W	03/03/2016
20	Comprida (CO)	Macaé	22°16'53,3''S; 41°39'21,8''W	17/03/2016
21	Cabiúnas (CB)	Macaé	22°17'57,0''S; 41°41'19,9''W	17/03/2016
22	Imboassica (IB)	Macaé	22°15'11,9''S; 41°35'28,8''W	07/03/2016

*Completamente secas; **Quase seca e extremamente lodosa o que impossibilitou a amostragem.

3.2. Obtenção de regiões dos genes envolvidos na osmorregulação

3.2.1 Alinhamento de sequências e desenho de primers degenerados

Visto que o modelo animal escolhido não apresenta seu genoma sequenciado, obtivemos os genes de interesse a partir da sequência de outros organismos, em sua maioria crustáceos, disponíveis no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, EUA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), do projeto genoma do anfípode *Parhyale hawaiensis*

(<http://asgard.rc.fas.harvard.edu>) e do genoma do cladócero *Daphnia pulex* (*Daphnia* Genomics; <http://wfleabase.org>). Foram obtidas as sequências e alinhadas dos seguintes genes: Na⁺/K⁺ ATPase; anidrase carbônica citoplasmática; anidrase carbônica aderida à membrana; V-ATPase; leucine aminopeptidase; glutamato desidrogenase; glutamato piruvato transaminase; superoxide dismutase citoplasmática e mitocondrial (Tabela 4).

As ferramentas de bioinformática *blast* e *tblastn* foram empregadas visando obter as sequências gênicas com a maior similaridade possível. As fases abertas de leitura (ORFs) das sequências obtidas foram extraídas com o programa *ORF Finder* (NCBI, EUA).

As sequências obtidas para cada gene foram alinhadas com o auxílio do programa *online ClustalW2* (EMBL-EBI, Inglaterra), que permitiu identificar as regiões mais conservadas de cada gene (Anexo 1 a 10). A partir desses pequenos fragmentos com pouca variação entre as espécies foram desenhados os *primers* degenerados (Tabela 4). Outras características indicadas por *PCR Primer Design Guidelines* - Premier Biosoft (<http://premierbiosoft.com>) também foram levadas em consideração (18 a 24 nucleotídeos; 40 a 60% de CG; 50 a 60°C; *Hairpin* > -3 e *Self-dimer* > -6) e o programa *Oligoanalyser* (IDT, Integrated DNA Technologies; <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) foi empregado para otimização de condições como T_m (temperatura de fusão), potencial de autoanelamento e potencial de formação de homo e heterodímeros. Além disso, foi observada a posição da última base no extremo 3'OH do *primer*, pois esta não poderia corresponder a última base de um códon, visto que essa é a posição mais variável, podendo levar a ineficácia do mesmo. Os *primers* foram sintetizados pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul) e foram ressuspendidos em TE (10 mM de Tris-HCl e 0,1 mM de EDTA) a uma concentração de 100 µM.

Tabela 4. *Primes* degenerados senso e antisenso desenhados para a amplificação dos genes de interesse, mostrando o tamanho esperado de cada fragmento.

Gene	Nome dos <i>primers</i>	Sequências (5'-3')		Tamanho fragmento esperado (pb)	
		<i>Primer</i> senso (nt)	Nome dos <i>primers</i>		<i>Primer</i> antisenso (nt)
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	PNaK-F1	tcaactcyaccaacaartacc (21)	PNak-R1	atgataccyacrgacttg (18)	418
Anidrase carbônica citoplasmática	PCA1-F2	cagtcscyattgacatc (18)	PCA2-R1	aggaacatcccvagayacr (18)	296
			PCA3-R1	gtygatggtgtgctcrga (18)	173
Anidrase carbônica aderida à membrana	PCA3-F1	cagtcbccatcaacmtyg (19)	PVATP-R1	atctccttggggaaratwc(19)	726
V-ATPase	PVATP-F1	gtgtgyctsttctgaactt (20)	PLAP-R2	catccgtgtrrttgatyc (19)	850
Leucine aminopeptidase	PLAP-F2	tyggcaaggcatygtmta (19)	PLAP-R3	crtgatayttgccwgtkg (18)	630
			PGDH-R1	tggttsaggttcttbagcc (19)	886
Glutamato desidrogenase	PGDH-F1	agaaratcaacycgtcgctt (19)	PGPT-R1	cyttsgagcakgacatgaa(19)	341
Glutamato piruvato transaminase	PGPT-F1	cscartatccdmgtattc (19)	PGPT-R2	cttctgaacgasyrgaac (19)	691
	PGPT-F2	agaaggaactggadmagg (18)			

(r) a ou g; (y) c ou t; (s) g ou c; (k) g ou t; (m) a ou c; (d) a, g ou t; (w) a ou t; (v) a, g ou c; (b) g, c ou t.

3.2.2 Amplificação com *primers* degenerados, sequenciamento e análise dos fragmentos obtidos.

Com o objetivo de testar os *primers* degenerados, foi utilizado o DNA genômico do anfípode *Q. lutzi* disponível no laboratório. As reações de amplificação dos genes de interesse foram realizadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os componentes descritos na Tabela 5, e submetidas ao ciclos de temperatura descrito na tabela 6 utilizando o termociclador *Mastercycler (Eppendorf)*. Os *primers* foram testados utilizando um gradiente de temperaturas de 46°C a 60°C para a etapa de anelamento, variando as concentrações de MgCl₂ da reação, visando aumentar a especificidade dos *primers*.

Tabela 5. Componentes da reação de amplificação dos genes de interesse por PCR.

Componentes	1 reação (µl)	Concentração Final
Água livre de nucleases	Para ajustar volume final	
Tampão de reação 5x	5	1x
MgCl ₂ [25mM]*	1,5 à 3	1,5 – 3 mM
dNTPs [10mM]	1	0,4 mM
<i>Primer</i> senso [10mM]	0,1	0,04 µM
<i>Primer</i> antisenso [10mM]	0,1	0,04 µM
Enzima Taq DNA polimerase 10 U/µl	0,3	3U
Total dos componentes	24	
DNA	1	100-200 ng/µl
Volume final da reação	25	

*Componente que sofreu variação no decorrer dos testes visando otimizar a reação e aumentar a especificidade dos *primers*.

Tabela 6. Ciclos de temperatura programados no termociclador para amplificação dos genes de interesse por PCR.

Ciclos	Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	Desnaturação inicial	94	4
	Desnaturação	94	1
35-40*	Anelamento dos <i>primers</i>	Gradiente de 46,1 a 60	1
	Extensão	72	1
1	Extensão final	72	7

*Número de ciclos variou no decorrer dos testes, visando obter os fragmentos desejados.

Em seguida o produto de PCR foi submetido a eletroforese durante 50 min em um gel de agarose 1,5% em tampão TEB 1x (0,9 M Tris-borato; 0,02 M EDTA). Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 30 min e logo foi digitalizado com fotodocumentador sobre um transiluminador com luz UV 254 nm. Os fragmentos com tamanho esperado foram isolados a partir do gel e purificados com o *Kit Wizard Purification Systems* (Promega). Uma vez conferido o sucesso da purificação, os fragmentos de DNA foram enviados à empresa MacroGen Inc. para seu sequenciamento.

Aqueles com apenas um fragmento amplificado foram enviados para sequenciamento como produto de PCR. As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa *ChromasPro* version 1.6 (Technelysium Pty Ltd). Essas sequências foram comparadas com sequências de outros organismos, através das ferramentas de bioinformática *blastx* e *tblastx* (NCBI, EUA), visando identificar se o fragmento em questão correspondia ao gene esperado.

3.3. Desenho de *primers* específicos para PCR em tempo real e estabelecimento das condições de amplificação.

Devido a não ter conseguido amplificar os fragmentos dos genes da Tabela 4, com exceção do *Qlsod*, foi dada continuidade ao trabalho apenas com os genes *Qlactb*, *Qlcat*, *Qlgpx* e *Qlsod*. Foi necessário desenhar somente *primers* específicos para *Qlgpx* e *Qlsod*, já que se dispunha de *primers* para *Qlactb* e *Qlcat* (Vieira, 2014).

Após a análise das sequências obtidas do *Qlsod* e confirmada sua correspondência com a região gênica de interesse, foi comparada com sequências homólogas de outros crustáceos para identificar regiões de éxons e íntrons e em seguida desenhar *primers* específicos adequados para ensaios de PCR em tempo real. O processo de desenho dos *primers* específicos se deu com o auxílio da ferramenta online *Real-time PCR* (IDT-Integrated DNA Technologies, EUA). Para o desenho de *primers* específicos do gene da *Qlgpx* foi utilizada a sequência obtida por Vieira (2014) (Figura 5). Na Tabela 7 são apresentados os *primers* específicos utilizados neste estudo.

```
TGCAACCAGTTCGGCAAGCAAGAGCCTGGAGCAACTGCCGAGGAGATCATGAACGGCATCAGATA
CGTGCGTCCAGGAGGAGGCTTCCAGCCCGCCATCGACCAATTCTTCGCGAAGGTGGACGTCAACG
GCGCGGACGAGCTGCCTCTCTACACCTACCTCAAGGGCTCCTGCAGTCACACGTTCACTGAATTC
AAGCGCCCCAGCGTTCCTTTCTACTCGCCGTTGCGTTTGGGCGACATTTACTGGAACCTTCGAGAA
ATTCTG
```

Figura 5. Região do gene da Glutathione peroxidase obtida do anfípode *Quadrivisia lutzi* por Vieira (2014).

Tabela 7. *Primers* específicos desenhados para os genes da *Qlactb* e *Qlcat* (Vieira, 2014) e para os genes *Qlgpx* e *Qlsod* obtidos no presente trabalho.

SEQUÊNCIAS (5'-3')				
Gene	Nome do primer	Primer senso (nt)	TM (°C)	Tamanho do fragmento esperado (pb)
<i>Qlactb</i>	Act-q1-F1	ctggtattgtgctcgactctg (21)	62,2	147
	Act-q1-R1	aaccacgctcagtcgatgac (20)	60,4	
<i>Qlcat</i>	Cat-q1-F1	gacttgacacaacgccattg (19)	60,2	145
	Cat-q1-R1	gaatcagaggatagtcaccgtg (22)	62,7	
<i>Qlgpx</i>	GPx-q-F	tcatgaacggcatcagatacg (21)	62,2	143
	GPx-q-R	agtgaacgtgtgactgcag (19)	62,2	
<i>Qlsod</i>	SODC-q-F	caaacatggctccaaactcc (20)	58,4	142
	SOD-q-R	caacctgagcccttcaactc (19)	59,5	

Os *primers* específicos foram testados por PCR nas condições descritas na Tabela 8 e 9. Foram utilizados amostras de DNA genômico e controles negativos (sem DNA) para verificar a ocorrência de possível contaminação. Em seguida o produto de PCR foi submetido a eletroforese em um gel de agarose 1,5% como descrito anteriormente, para verificar a eficácia dos *primers*.

Tabela 8. Ciclos de temperatura programados no termociclador para teste dos *primers* específicos

Ciclos	Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	Desnaturação inicial	94	4
30	Desnaturação	94	0,5
	Anelamento dos <i>primers</i>	60	0,25
	Extensão	72	0,25
1	Extensão final	72	5

Tabela 9. Componentes da reação de amplificação para teste dos *primers* específicos.

Componentes	1 reação (µL)	Concentração final
Água livre de nucleases	Para ajustar volume final	
Tampão de reação 5x	3	1x
MgCl ₂ [25mM]	1	1,5 mM
dNTPs [10mM]	0,3	0,2 mM
<i>Primer</i> senso [10mM]	0,3	0,2 µM
<i>Primer</i> antisenso [10mM]	0,3	0,2 µM
Enzima Taq DNA polimerase 10 U/µl	0,4	4U
Total dos componentes	14,5	
DNA	0,5	100-200 ng/µL
Volume final da reação	15 µL	

3.4. Resposta do *Q. lutzi* durante ao estresse osmótico.

3.4.1. Bioensaios

Exemplares do anfípode *Q. lutzi* foram coletados na lagoa de Carapebus (ver Tabela 3), acondicionados em recipientes plásticos com vegetação e água da lagoa, e transportados para o laboratório. As coletas para os três bioensaios foram realizadas nos dias 11 de agosto de 2015; 13 de janeiro de 2016 e 13 de abril de 2016, respectivamente. Vinte litros de água da lagoa também foram coletadas para a manutenção dos anfípodas, cujos parâmetros físico-químicos foram determinados (Tabela 10). A dureza foi determinada com o kit dureza total Gh da empresa LabconTest e os outros parâmetros foram determinados pelo aparelho

multiparamétrico especificado anteriormente (Ponto 3.1). Durante a triagem, os anfípodes foram separados com o auxílio de uma pipeta plástica pasteur por sexo e acondicionados em recipientes de vidro de 1 L contendo água da lagoa filtrada em filtro de papel e esterilizada com UV 254 nm da lagoa. O alimento consistiu em restos de matéria vegetal seca obtidas da lagoa, esterilizados por autoclavagem, mais um suplemento alimentar neon-MEP200 da marca Alcon. Eles foram mantidos em incubadora com fotoperíodo de 12/12h (dia/noite) e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Durante o período de aclimação de cinco dias no laboratório, a água na qual foram mantidos os anfípodes era substituída a cada dois dias.

Tabela 10. Parâmetros físico-químicos da água da lagoa no momento da amostragem dos anfípodes para os bioensaios, sendo a água utilizada nos controles e para preparação das soluções salinas.

Parâmetros físico-químicos	Bioensaio I	Bioensaio II	Bioensaio III
Salinidade	9,0	5,4	3,9
pH	7,51	6,7	6,7
O ₂ dissolvido (mg/L), Saturação (%)	7,2 95	7,2 89	7,9 92
Dureza (ppm CaCO ₃)	>450	>450	>450
Temperatura (°C)	26,5	27	29,3

A água com as diferentes salinidades foi preparada da seguinte forma: o sal marinho artificial (Natural Ocean, Up-Acqua, Anexo 11) foi pesado de acordo com a salinidade de desejada e dissolvido em água da lagoa filtrada, esterilizada e misturada com o auxílio de um agitador magnético. Uma vez alcançada a salinidade desejada esta era incubada por 24h para atingir a temperatura necessária para o bioensaio. No momento da exposição dos anfípodes à salinidade era medida novamente, para conferir possíveis variações.

Devido ao quadro de agressividade descrito por Souza (2015) nessa espécie, os machos utilizados neste experimento foram individualizados. De acordo com Buikema e Benfield (1979) as fêmeas podem apresentar alteração na osmolalidade durante a produção de ovos e incubação dos mesmos, devido a demanda energética exigida pelo processo. Portanto é recomendada a utilização somente de machos para este tipo de análise. Em todos os bioensaios os anfípodes foram acondicionados em recipientes tipo *fingerbowl* contendo 70 mL de água proveniente da lagoa, devidamente filtrada e esterilizada, onde permaneceram por mais dois dias em período de aclimação na unidade experimental.

No bioensaio I (Figura 6), um total de 110 anfípodes foram expostos em duplicata ao aumento gradual de salinidade (9, 12, 15, 18, 21 e 24) a cada 48 h. Neste bioensaio o controle correspondeu à salinidade de 9, na qual foram encontrados os anfípodes na lagoa Carapebus. Cinco indivíduos do controle e de cada tratamento após 48h eram encaminhados para retirada imediata da hemolinfa e posterior análise da osmolalidade; outros cinco eram preservados na solução *RNAlater* (Qiagen) e congelados em ultrafreezer (-74°C) para as análises da expressão gênica.

No bioensaio II (Figura 6), um total de 148 anfípodes foram expostos em duplicata ao aumento gradual de salinidade (5, 4, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30) a cada 48 h. Neste bioensaio o controle correspondeu à salinidade de 5,4 na qual foram encontrados os anfípodes na lagoa Carapebus. Cinco indivíduos do controle e de cada tratamento eram preservados em *RNAlater* (Qiagen) e armazenados em ultrafreezer após 48h de exposição a cada salinidade.

No bioensaio III (Figura 6), um total de 43 anfípodes foram expostos ao aumento gradual de salinidade (3,9, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 32) a cada 48 h. Neste bioensaio o controle correspondeu à salinidade de 3,9 na qual foram encontrados os anfípodes na lagoa Carapebus. Cinco indivíduos do controle e nas salinidades de 27, 30 e 32 foram retiradas após 48h de exposição para análise da osmolalidade. Para a análise da expressão gênica dos indivíduos expostos por 48h a salinidade de 32, foram extraídos dois grupos de cinco indivíduos para preservação em *RNAlater*.

A sobrevivência foi avaliada para cada bioensaio e comparadas pelo Teste U de Mann-Whitney a um nível de significância de 0,05. Essa análise foi realizada com o pacote estatístico STATISTICA, v7 (Statsoft, Inc.).

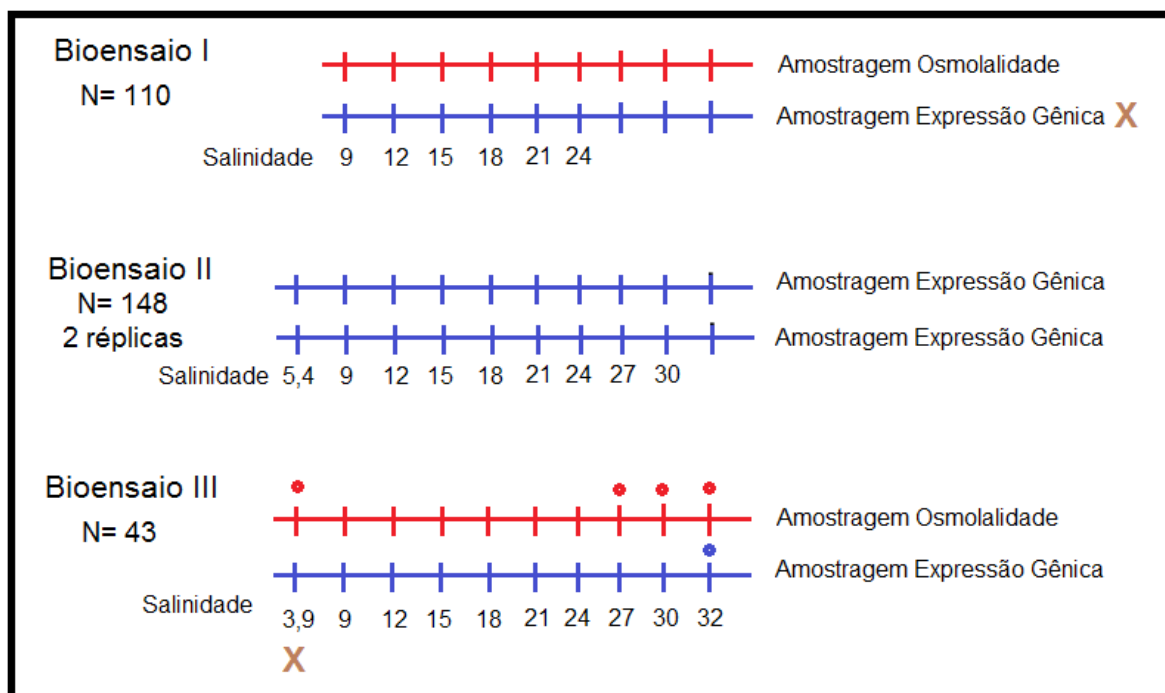


Figura 6. Desenho experimental para a avaliação de respostas durante a osmoregulação do anfípode *Quadriovio lutzi*. “X” representa as salinidades que não foram possíveis a amostragem de indivíduos; as bolas vermelhas representam as salinidades em que foram amostrados indivíduos para a análise da osmolaridade e a azul indica a salinidade em que foram amostrados indivíduos para a análise da expressão gênica.

3.4.2. Obtenção da Osmolaridade.

Os animais foram anestesiados em gelo e sua hemolinfa foi obtida com seringa de insulina (0,3 mL; agulha de 6 mm e 0,25 mm de calibre) alcançando o canal sanguíneo dorsal. A hemolinfa de cinco indivíduos de um mesmo tratamento era coletada num mesmo microtubo e congelada a -20°C e logo descongeladas para a avaliação da osmolaridade. A análise foi realizada no osmômetro de pressão de vapor VAPRO® da empresa WESCOR, no Laboratório de Ciências Morfo-fisiológicas do NUPEM/UFRJ. A análise do efeito da salinidade sobre a osmolaridade da hemolinfa e do meio foi realizada por uma ANOVA para os bioensaios I e III de forma independente. Dada a significância do efeito da salinidade sobre a osmolaridade se procedeu a realizar um teste *post-hoc* de Tukey HSD de comparação de médias, com o valor de 0,05 de significância, através do programa STATISTICA, v7.

3.5. Quantificação da Expressão gênica.

3.5.1. Extração de RNA e síntese do cDNA.

O RNA de um grupo de 4 anfípodas machos, dos bioensaios II e III, foi extraído com o *minikit RNeasy* (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Esse processo foi realizado para os anfípodas dos diferentes tratamentos de salinidade. A quantificação e estimativa da pureza do RNA foram obtidas num aparelho Nanodrop (Thermo Scientific), através da determinação da sua absorvância a 260 e 280 nm.

Após a extração de RNA, para dar seguimento à síntese do cDNA, as amostras foram tratadas com a enzima DNase, livre de RNases (RQ1, Promega). Isto, foi necessário para evitar a amplificação a partir de resquícios de DNA genômico, possivelmente presentes em amostras a concentrações padronizadas de 50 µg/µL. O preparo da reação foi feito de acordo com a Tabela 11. As reações eram incubadas a 37 °C durante 30 min e logo eram adicionados 2 µL de tampão de inativação (20mM de EGTA, pH 8), sendo então incubadas a 65 °C durante 10 min adicionais. Em seguida foi realizada a reação de transcrição reversa (RT) seguindo as condições descritas na Tabela 12 e utilizando o *kit High capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) (Tabela 13), de acordo com o protocolo do fabricante, visando obter a primeira fita de DNA complementar (cDNA) por RT-PCR. O cDNA foi utilizado na etapa seguinte, como molde para a amplificação por PCR em tempo real. Nas reações de transcrição reversa (RT) foram feitos controles negativo (sem RNA) para aumentar a confiabilidade do processo, excluindo a possibilidade de contaminação e confirmando a eficácia dos reagentes e condições de reação. As reações ocorreram no termociclador *Mystercycler Gradiente* (Eppendorf).

Tabela 11. Tratamento do RNA com DNase, constituintes e volumes adicionados.

Componentes	1x	Concentração Final
H ₂ O	Ajustar	-
RQ1 DNase tampão 10x	2 µL	1x
RQ1 DNase exp 11/13	2 µL	2U
RNA	Variável	50 µg/ µL
Volume total da reação	22µL	

Tabela 12. Condições da reação de RT-PCR.

Etapas	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Incubação	10	25
Incubação	60	37
Incubação	60	37
Inativação da enzima	5	85

Tabela 13. Componentes do kit *Hight capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*

Componentes	1 reação (µL)	Concentração Final
H ₂ O livre de enzimas nucleases	4,2	
Tampão RT buffer 10 x	2	1 x
dNTPs (100 mM)	0,8	0,4 mM
<i>Rondon Primer</i> 10 x	2	1 x
Enzima transcriptase Reversa (50 U/µl)	0,3	15U/ µL
Total dos componentes	9	
RNA	10	
Inibidor de RNase	1	
Volume final da reação	20	

Para confirmação da síntese de cDNA as amostras foram submetidas a uma PCR para a amplificação do fragmento do gene *Qlactb*, nas condições do PCR em tempo real. Amplificando os fragmentos esperados, seguia-se para o PCR em tempo real. Foram feitas curvas de diluição dos cDNAs para determinar a melhor concentração dos mesmos para uso nas reações de PCR em tempo real. Reações foram conduzidas utilizando diluições de cDNA nas proporções de 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/1000 e 1/10000, com os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes *Qlactb*, *Qlcat*, *Qlsod* e *Qlgpx*.

3.5.2. Quantificação da expressão gênica através da amplificação por PCR em tempo real.

A expressão gênica no anfípode *Q. lutzi* a diferentes salinidades do meio foram feitas em triplicata no termociclador Rotor-GeneQ (QIAGEN®) utilizando o *kit* SYBR®Green, de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 14). A programação de ciclagem utilizada para esta reação seguiu as seguintes etapas: desnaturação inicial, 5 min a 95°C; e 40 ciclos de 5 min a 95°C e 10 s a 60°C.

Tabela 14. Reação utilizada no PCR em tempo real para a amplificação das regiões gênicas do *Qlactb*, *Qlcat*, *Qlsod* e *Qlgpx*, com seus respectivos *primers* específicos.

Componentes PCR em tempo real	Volume (µL)
SYBR®Green	5
Água	3
Primer senso(10 µM)	0,5
Primer anti-senso(10 µM)	0,5
cDNA (50 µg/µL)	1
Total	10

Foi construída uma curva padrão para cada gene, com fator de diluição seriada do cDNA (1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:1.0000) partindo com a concentração inicial, que corresponde à amostra de cDNA sem diluição. Esta curva padrão permitiu obter a eficiência da reação de amplificação, necessária para o cálculo da expressão relativa.

3.5.3. Análises estatística da expressão gênica

A normalidade dos dados de Cq (Número de ciclos no momento de cruzar o limiar de fluorescência do sinal de fundo) obtidos como expressão gênica para os genes analisados foi verificado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a uma significância de 0,05. A eficiência da amplificação determinada pelos *primers* utilizados para a amplificação por PCR em tempo real das regiões gênicas, foi utilizada para o cálculo da concentração da expressão dos genes

alvo no tratamento, já descontando a resposta de seu respectivo controle como mostra a formula a seguir:

Concentração gene alvo = $(E_{\text{alvo}})^{\Delta Cq}$; onde E representa a eficiência dos *primers* para o gene alvo e ΔCq corresponde à diferença entre o Cq do controle respectivo e do tratamento (Pfaffl et al., 2002).

A expressão relativa foi obtida a partir destas concentrações calculadas a partir da eficiência dos *primers*, considerando o *Qlactb* como gene de referência:

$$\text{Expressão relativa}_{\text{alvo}} = \frac{\text{Concentração}_{\text{alvo}}}{\text{Concentração}_{\text{Actina}}}$$

Em seguida os dados foram analisados estatisticamente por uma ANOVA pelo programa STATISTICA, V7.

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros físico-químicos das lagoas e registro do anfípode *Quadrivisio lutzi*.

As lagoas Ubatuba, Casa Velha, Barrinha e Pires se encontravam completamente secas ou em condições de muita densidade e lodo, não permitindo obter os parâmetros físico-químicos da água. Os parâmetros determinados das outras lagoas são apresentados na Tabela 15. Anfípodas da espécie *Q. lutzi* foram encontrados somente em três das 22 lagoas amostradas: Lagamar, Carapebus e Imboassica.

Tabela 15. Parâmetros físico-químicos de cada local de coleta e registro de vegetação e do anfípode *Q. lutzi*.

Local (Sigla)	Transparência (m)	Dureza (ppm CaCO ₃)	Temperatura (°C)	pH	OD (mg/L)	Salinidade	Vegetação	<i>Q. lutzi</i>
Lagomar (LM)	0,2	71,6	29,69	7,53	5,3	6,7	Gramínea e alga	presente
Pitanga (PT)	0,05	17,9	29,9	3,68	4,15	2,99	Macrófitas	ausente
Preta (PR)	0,48	35	32,65	6,33	3,74	23,85	Gramínea	ausente
Catingosa (CT)	0,26	17,9	31,8	6,94	9,5	24,48	-	ausente
Visgueiro (VG)	-	71	37,44	8,04	7,98	55,32	-	ausente
Robalo (RB)	0,20	125,3	29,5	8,8	7,96	53,89	Gramínea	ausente
Maria Menina (MM)	0,2	161,1	29,4	8,2	7,3	20,28	Gramínea	ausente
Peri -peri I (PPI)	0,2	71,6	28,9	8,13	7,2	10,11	Gramínea	ausente
Peri -peri II (PPII)	26	89,5	29,7	7,73	7,14	7,74	Gramínea	ausente
Garças (GZ)	45	71,6	29,6	7,6	7,6	22,16	Gramínea	ausente
Bezerra (BZ)	0,2	35,8	30,4	7,64	7,61	3,18	Gramínea e Macrófitas	ausente
Amarra boi (AB)	0,27	17,9	30,98	3,56	9,6	0,2	-	ausente
Paulista (PL)	100	17,9	29,37	3,7	8,09	1,04	Macrófitas	ausente
Encantada (EM)	1	35,8	29,44	5,2	7,82	8,16	Gramínea	ausente
Carapebus (CP)	0,95	17,9	29,5	5,9	9,4	4,4	Gramínea	presente
Comprida (CO)	35	17,9	28,91	4,44	6,33	0,08	Gramínea	ausente
Cabiúnas (CB)	120	17,9	28,61	5,7	4,15	0,23	Gramínea e Macrófitas	ausente
Imboassica (IB)	0,49	20	28,38	7,24	5,97	0,30	Macrófitas	presente

A figura 7 apresenta os valores de cada um dos parâmetros obtidos nas lagoas, indicando os limites máximos e mínimos da ocorrência do anfípode. Os limites estabelecidos para a temperatura e salinidade seguiram os valores obtidos por Souza (2015) no estudo da tolerância de *Q. lutzi* a estes fatores, sendo 8°C o limite inferior de temperatura e 0,2 de salinidade.

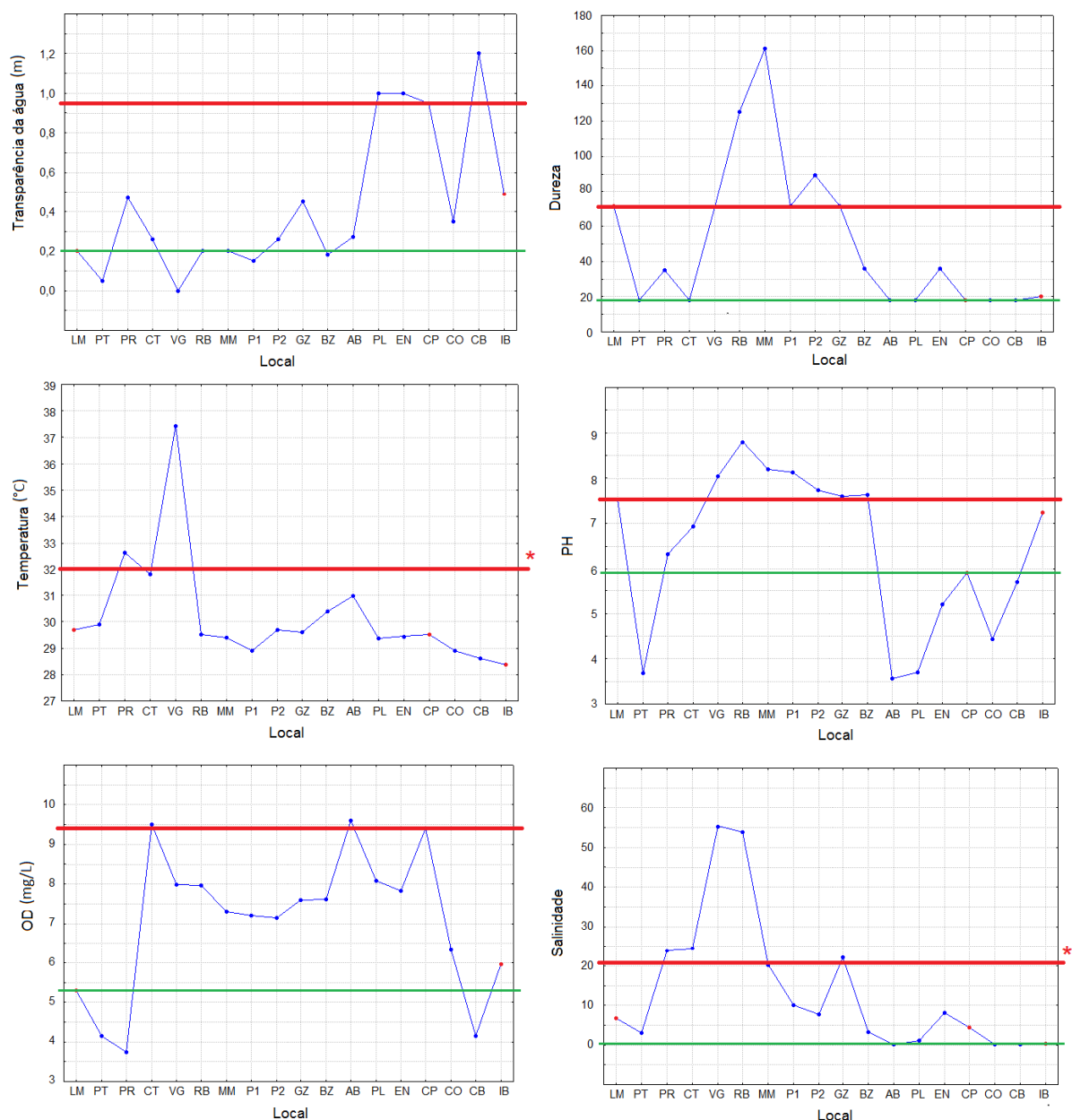


Figura 7. Parâmetros físico-químicos das lagoas da região Norte Fluminense amostradas. São destacados os valores mínimos (linha verde) e máximos (linha vermelha) da ocorrência da espécie *Quadrivisio lutzi*. (LM) Lagamar; (PT) Pitanga; (PR) Preta; (CT) Catingosa; (VG) Visgueiro; (RB) Robalo; (MM) Maria Menina; (PI) Piri-piri I; (PII) Piri-piri II; (GZ) Garças; (AB) Amarra-boi; (PL) Paulista; (EM) Encantada, (CP) Carapebus; (CO) Comprida; (CB) Cabiúnas e (IB) Imboassica. *Valores obtidos de Souza (2015).

Entre as lagoas onde já foi encontrada a espécie em outras ocasiões, temos a lagoa Preta com valor de oxigênio baixo (< 4 mg/L) e salinidade levemente acima de 23; a lagoa Paulista com pH abaixo de 4 e a lagoa das Garças, que se mostrou levemente acima de 21 de salinidade e levemente acima do pH 7,5. Entre as lagoas onde esta espécie nunca foi encontrada até o momento, as lagoas Pitanga, Amarra-boi, Encantada, Comprida e Cabiúnas

apresentaram pH baixos, geralmente abaixo de 5,5. Pitanga e Cabiúnas apresentaram além do pH ácido, oxigênio dissolvido (O.D) menor que 4,5 mg/L. Outras são hipersalinas, como Catingosa (S >23), Vesgueiro e Robalo com salinidades acima de 50. As lagoas Maria Menina e Peri-peri I apresentaram pH maior que 8. Peri-peri II apresenta leve aumento da dureza e Bezerra diminuição da transparência quando comparadas com os limites colocados para o anfípode.

4.2. Região do gene *Qlsod*.

O fragmento obtido do gene *Qlsod* com os *primers* degenerados mostrou o tamanho esperado de aproximadamente 700 pb (Figura 8) e a análise da sequência (Figura 9) revelou similaridade (54%) com o gene da Mn *Phsod2* do anfípode *Parhyalle hawaienses* (Figura 10) indicando que corresponde efetivamente a sequência nucleotídica do gene da *Qlsod* do anfípode *Q. lutzi*. Esta sequência foi obtida utilizando os *primers* desenhados a partir do alinhamento da Mn *Phsod2*.

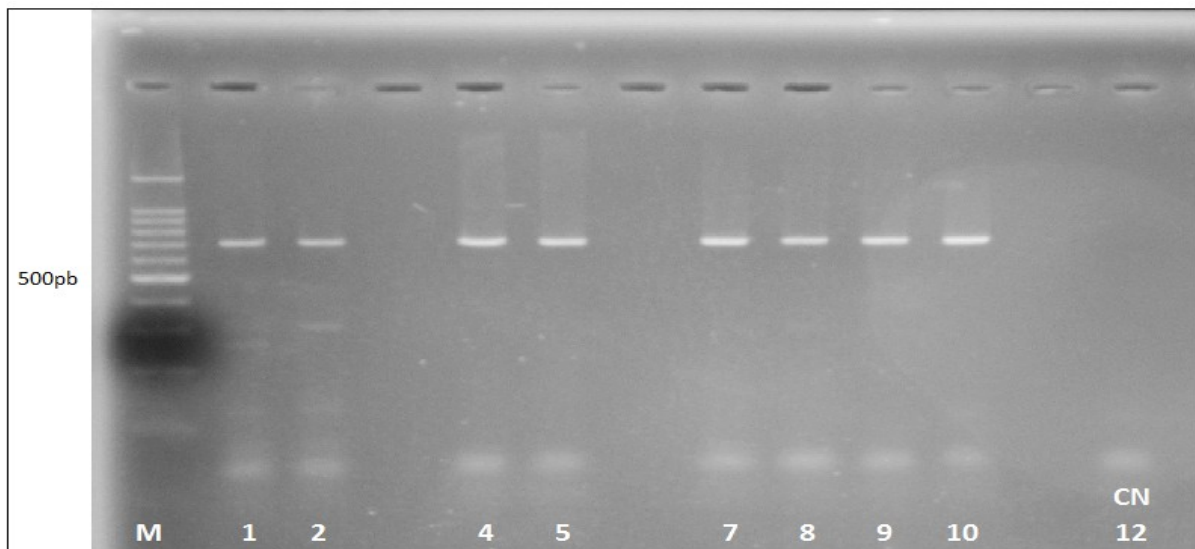


Figura 8. Fragmentos do gene da Superóxido dismutase do anfípode *Q. lutzi*, amplificado com *primers* degenerados PSODC-F1 e PSODC-R1. (M) Marcador molecular de 100 pb;. (1 e 2) produto amplificado do indivíduo 5; (4 e 5) produto amplificado do indivíduo 6; (7 e 8) produto amplificado do indivíduo 7; (9 e 10) produto amplificado do indivíduo 8. (CN) controle negativo, sem DNA.

TTTCTG GACAAACATGGCTCCAAACTCCTCTACGTCTGCTCCTCAGCCCCTGGTGATCT	60
TCTGGCAGCCATTAACTCCAGATTTGGTTCCTTCCAAGCCTTCCAGGTAAACTTTGTAGG	120
ATCACACGTTTCTTTCTAGTTTTTTGTATGAAACTCAATTCTTCTCCAGAGTATTGTGCT	180
TCAACAATTTTCAGCTATATGAAAAGATTAAATATGAACTTTTGAACTTTCCTTCGTGAT	240
TGCATAATCTGTTGATCGGCAAGTTACTGCTGAACCTGATGATGATTGTATCATTTTCGG	300
TTGCTATGCGTAGTAACGCCACAATCCGATAGCCTAGTGGTAGGAGGCTCTGAGTCAGTA	360
TCAAAGGCACTGCYATCACATTTGGACCAGCGTGTACCTGATATAAGCTACCATTTCTAG	420
CGTGATTGCTTTTCTTGGCTGAGGGATTATTGAGCACTTCCTTAAAATACATCCGCTTCC	480
TATGGATGATCTAGATGAAAAATAAGTCGCTCTGGAATGTTGTGGAAATTATTTTATTGAA	540
AAATGTATTTTTCTAATTTGCGACTTATGTTTGTGTACAGGAGAAGTTCAGCACCGCCAG	600
CGTGGGAGTGAAGGGCTCAGGTTGGGGCTGGCTTGGCTACTGCCCCACTAAAGATCAACT	660
TGAGATCGCC ACCTGCCA	720

Figura 9. Sequência nucleotídica de 673pb correspondente à parte do gene *Qlsod* do anfípode *Quadrivisio lutzi*. Em Negrito é representada a região de anelamento dos *primers* degenerados.

P.hawaienses	CCAAGACCGTCCACCGCTACCGCTCGAGTAAGAAGAACCCCGTCATCGGCTCGGTCCGGG
Q.lutzi	-----ACGTCCACCGCTAGAGTTCACACTAGAAATCACCCCGTCATCGGTTCCGGTCCGGG
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	TCGGCCTCGGGAAGTCCGCTGTGAGCGACGCGACTTAAGCGAGACCTTCAAGACTATCC
Q.lutzi	TTGGACTCGGGAAGTGAAGGTGCCACCGCAGACTTGAAGAGGACATGTGTTTGTATTC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	TGGGCTTGAACCGTTGTTACCGTGAACCTCTAGGGGGCACCCGAGTCCCCGCCTCGAAC
Q.lutzi	AGCGTTTADATC-TTTTTATGTDAAAAGTTATTTTATTAAGGTTGTGAAGGTCTG-C
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	TTCGTAACCCGCGGTACAACAGGTTTCTAC---CACACCAAGTCCACTGGAGGTGGTA
Q.lutzi	TGAATAAAAAGTAGATCTAGTAGGTATCCTTCGCCTACATAAAATTC-CTTCACGAGTTA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	ACTTAAACTCCCCTCCCTTGTCTCGCAACGT-CCGCCGTGCAGCAAGAACCGGACCCGC
Q.lutzi	TTAGGAGTCGGTCTTTTCGTTAGTGMCGTATCTTTACCATCGAATATAGTCCATGTGC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	AGCAA--CTCGAACCCGGCGTGTCCGAACTCCAACAACCTACATCGGGACTACTACGAACC
Q.lutzi	GACAGGTTTACACTATCGTACGGAACT---ATGACTGAGTCTCGGAGGATGGTGTATC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	ACACCACCTAGAGGTTACTCCG-GTCTCTATACCCCGAGGTCGGGGAACATTAGTATA
Q.lutzi	CGATAGCCTAACACCGCAATGATGCGTATCGTTGGCTTTACTATGTTAGTAGTAGTCCA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	AATTCGCCACCGTTCCGCACGAGAGAAACGAGAGGGGGTCGAGACGGAAGTACACCAGT
Q.lutzi	AGT-CGTCATTGAACGGCTAGTTGTCTAATACGTTAGTGCTTCCTTTCAAGTTTTCAAGT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	TTCTACCTTAAGTAGACTCCCAACTCTTGACAAC--CGACTCGTCGGACCCGGTGGACGA
Q.lutzi	ATA-AATTAGAAAAGTATATCGACTTTTAAACAACCTTCGTGTTATGAGACCTCTT--CTTA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	CCTGACACTACGGTTCGTTGATTAGACGCTAGTGTGACCTACGACGCTCGGAGTAGACGTC
Q.lutzi	ACTCAAAGTATGTTWTTTGTATCWTTCTTTGCACAC-TAGGATGTTCAAATGGACCTT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	GTAATCGTTCGACTAAAGAGCCCTAAACAGTGAAGTTACGGCCTCTCGAGTCGATTA
Q.lutzi	CCGAACCTTCCTTGGTTTACCTCAATTACCG-----ACGGTCT-TCTAGTGCTC---
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	ATGCGAGTCTCGTCTGTTATATCCGTTAGGAATAAAGGTAAACCTGTACCCTCTTACACA
Q.lutzi	ACCCGAGTCCCTCGCCTGCCTCTCAACCTCGGTACAACACAGGTCTTTTACCAGGAC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.hawaienses	TCAAATGACTA
Q.lutzi	CAAGTTCCCTA
	* * * * *

Figura 10. Alinhamento da sequência nucleotídica do gene da Superóxido dismutase nos anfípodes *Parhyalle hawaienses* e *Quadrivio lutzi*. a qual teve 53,7% de similaridade com o gene da Mn *Phsd2* do anfípode *Parhyalle hawaienses*. Região inicial do fragmento representa uma região de exons mostrando uma maior similaridade entre as sequências.

4.3. Primers específicos e amplificação com PCR em tempo real.

A amplificação dos genes alvo por PCR utilizando os *primers* específicos foi positiva para o gene da *Qlpx* com os *primers* GPx-q-F e GPx-q-R; obtendo o fragmento esperado de 143 pb (Figura 11). Os *primers* específicos para o *Qlsod* (SODC-q-F e SOD-q-R) também amplificaram os fragmentos de 142 pb esperado para o gene (Figura 12).

O fragmento do *Qlactb* de 147 pb foi amplificado com sucesso com os *primers* Act-q1-F1 e Act-q1-R1 (Figura 13), obtidos de Vieira (2014); e também o gene da *Qlcat* foi amplificado com os *primers* Cat-q1-Fe Cat-q1-R1 obtendo-se um fragmento de DNA de 145 pb (Figura 12). Todos os genes amplificados a partir de amostras de cDNA, eliminando as chances de contaminação por DNA genômico, como demonstrado pela ausência de amplificação no branco.

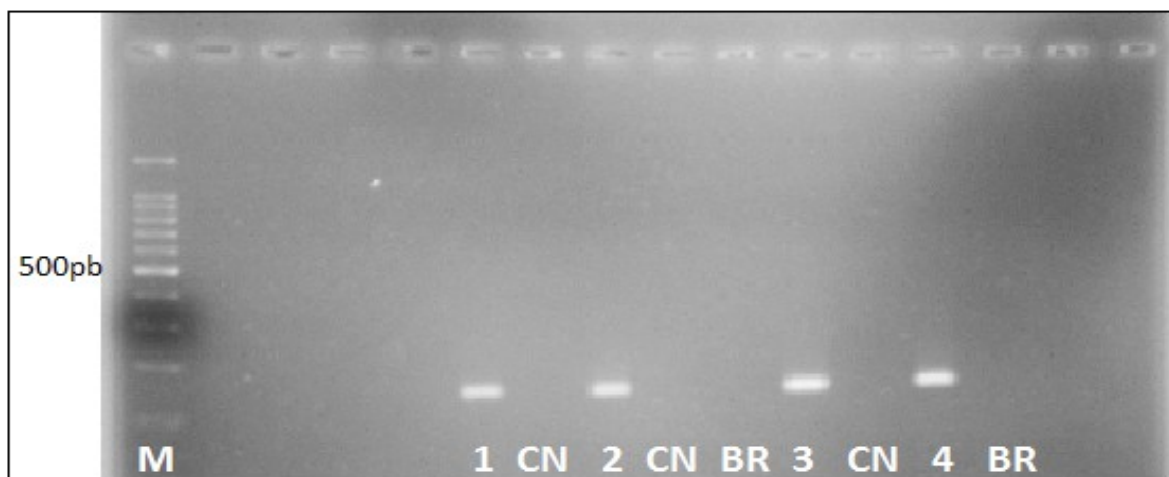


Figura 11. Fragmentos de DNA amplificados a partir dos *primers* específicos desenhados para o gene da Glutathione peroxidase para PCR em tempo real. (M) Marcador molecular de 100 pb (Promega); (CN) Controle negativo do RT-PCR; (BR) Branco, sem cDNA; (1 e 3) produto amplificado do indivíduo 1; (2 e 4) produto amplificado do indivíduo 2

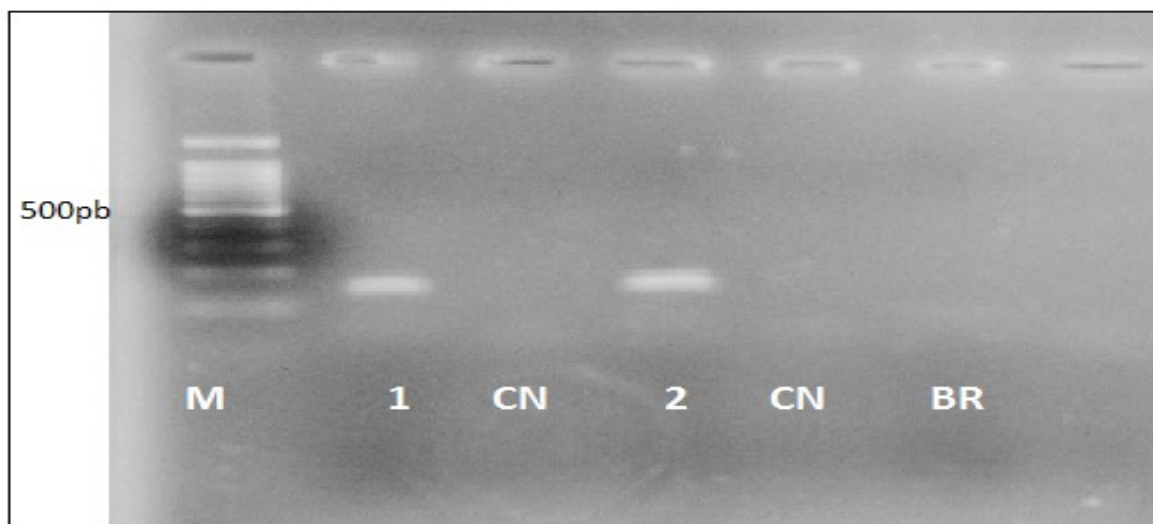


Figura 12. Fragmentos de DNA amplificados a partir dos *primers* específicos desenhados para o gene da Superoxido dismutase para PCR em tempo real. (M) Marcador molecular de 100 pb (Promega); (CN) Controle negativo do RT-PCR; (BR) Branco sem cDNA. (1 e 2) produto amplificado do indivíduo 1.

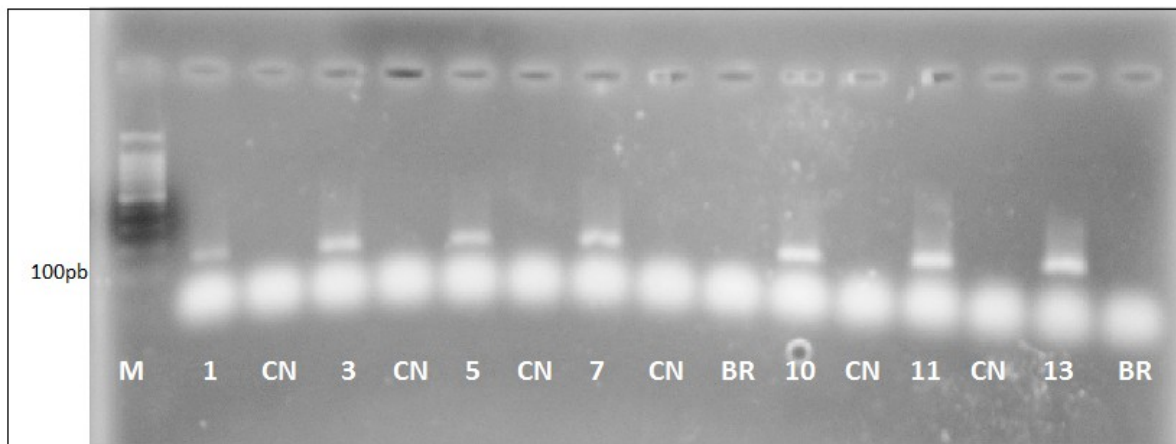


Figura 13. Fragmentos de DNA amplificados por PCR em tempo real, a partir dos *primers* específicos desenhados para o gene (1 a 9) *Qlactb* e (10 a 15) *Qlcat*, observado em gel de agarose 1%. (M) Marcador molecular de 100 pb (promega); (CN) Controle negativo do RT-PCR; (BR) Branco sem cDNA. (1 e 10) produto amplificado indivíduo 1; (3 e 11) produto amplificado do indivíduo 2; (5 e 13) produto amplificado indivíduo 3; (7), produto amplificado do indivíduo 4.

4.4. Sobrevivência dos anfípodas com o incremento de salinidade durante os bioensaios

As sobrevivências dos anfípodas da espécie *Q. lutzi* nos bioensaios são apresentadas na Figura 14. Não houve diferença significativa entre a sobrevivência dos controles e tratados do bioensaio I. Já nos bioensaios II e III, os tratados mostraram uma sobrevivência significativamente menor que os controles (Tabela 16), portanto houve influência da salinidade na sobrevivência dos anfípodas.

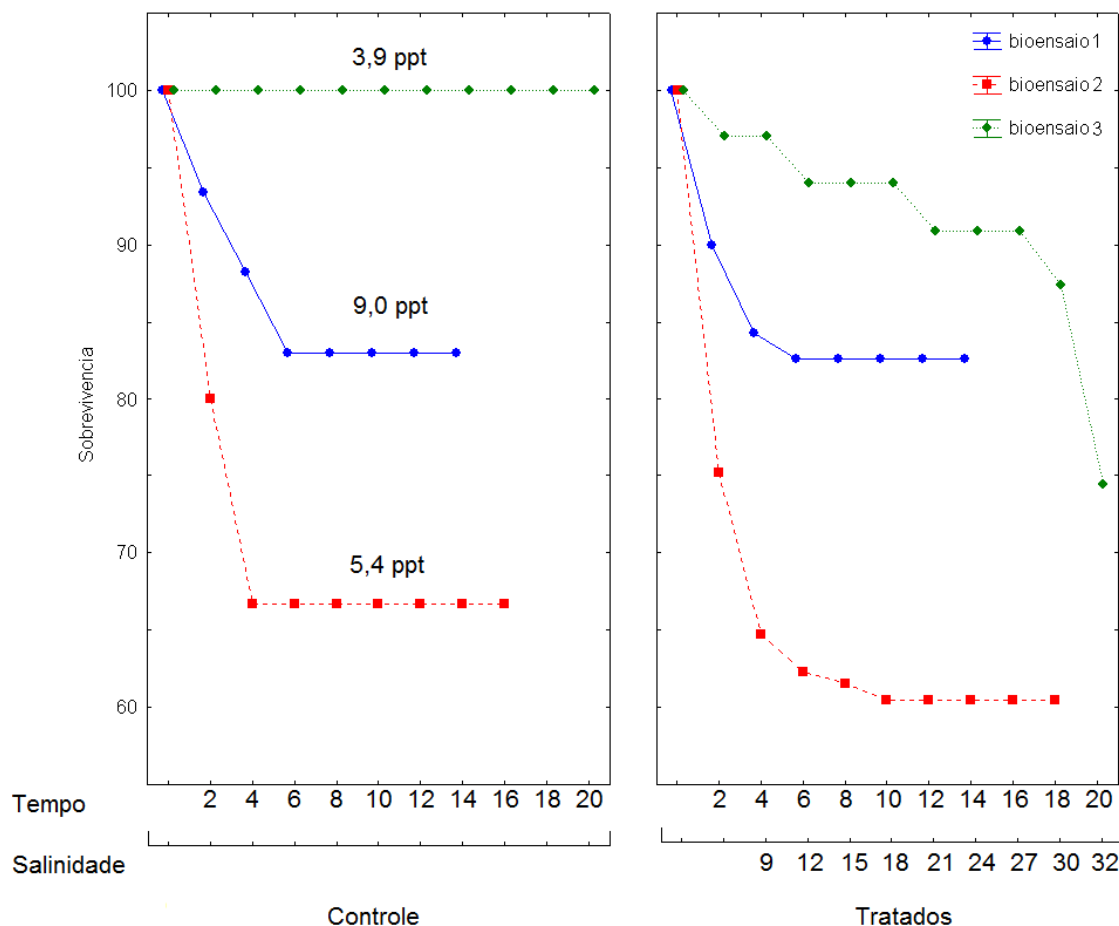


Figura 14. Sobrevivência do anfípode *Q. lutzi* por bioensaio ao longo do tempo (dias) com o aumento gradual da salinidade.

Tabela 16. Resultados do Test U de Mann-Whitney para comparação da mortalidade entre controle e tratados.*Valores significativos

Comparação	Z ajustado	<i>p</i>
C x T		
Bioensaio 1	-1,46	0,14358
Bioensaio 2	-2,94	0,01261*
Bioensaio 3	-3,95	0,00008*

4.5. Variação da osmolalidade da hemolinfa e do meio com o aumento da salinidade

A variação da osmolalidade do meio e da hemolinfa do anfípode *Q. lutzi* com o aumento da salinidade pode ser observada na Figura 15. A osmolalidade da hemolinfa do anfípode se manteve sempre menor ao do meio a partir da salinidade de 9, mostrando sua capacidade de hiporegular. No entanto na salinidade de 3,9 os anfípodas se encontravam

hiper-regulando. Na salinidade de aproximadamente 30, ocorreu um abrupto aumento da osmolalidade.

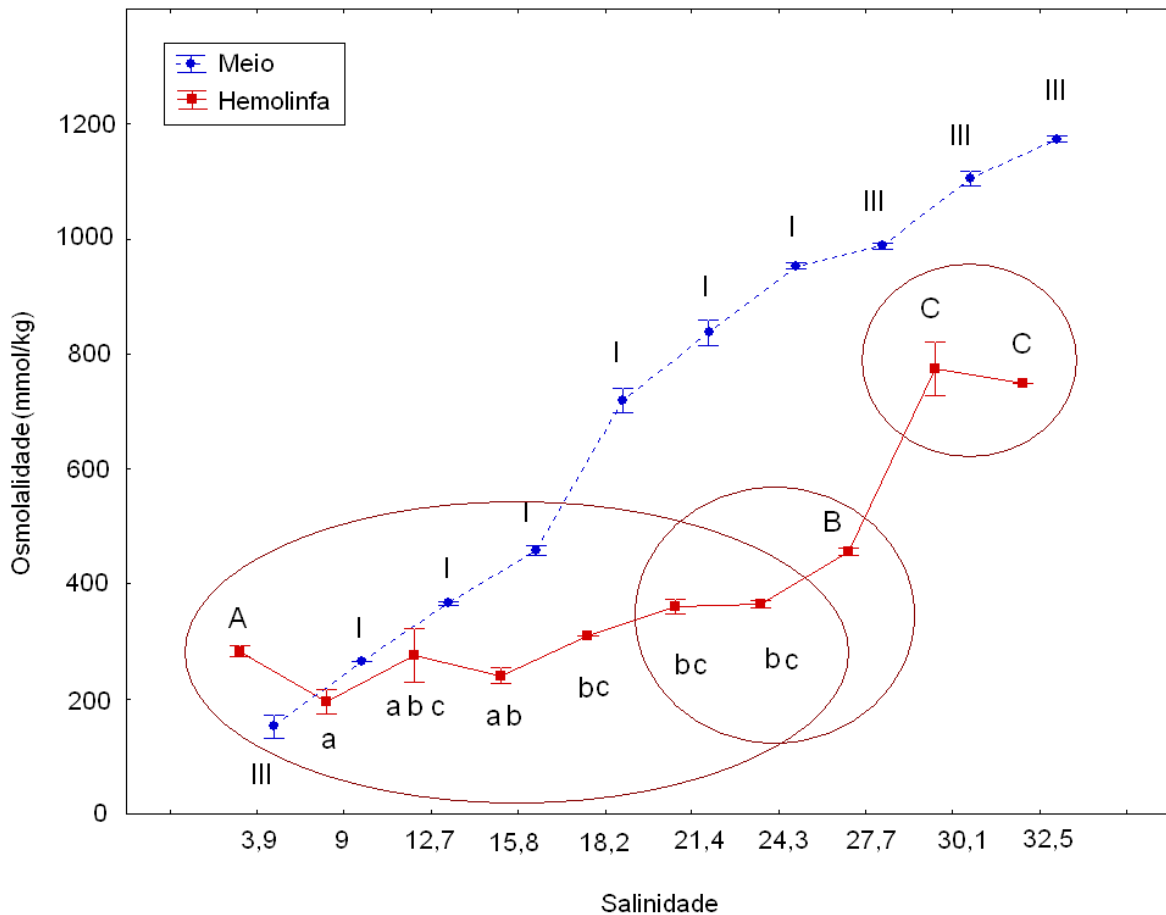


Figura 15. Alteração da osmolalidade do meio e da hemolinfa do anfípode *Q. lutzi* em resposta ao aumento gradual da salinidade do meio. Letras maiúsculas diferentes representam médias diferentes do bioensaio (III) e letras minúsculas representam a comparação de médias no bioensaio (I) de acordo com o teste de Tukey. Os círculos representam agrupamentos de médias similares que diferem significativamente de outros agrupamentos de acordo com a ANOVA, quando comparadas todas as médias sem a distinção de bioensaios.

Comparando os controles e tratados de cada bioensaio houve diferença significativa na osmolalidade da hemolinfa e meio (Tabela 17). Lembrando que a salinidade dos controles corresponde a mesma do local de onde os anfípodes foram obtidos.

Tabela 17. Resultado da ANOVA da avaliação do efeito da salinidade sobre a hemolinfa comparando controles com tratados.

Bioensaio	Comparação C x T	F	p
I x III	Hemolinfa	139,4	<0.00000*
I x III	Meio	1.458	<0.00000*
I	Hemolinfa	16,2	=0,001974*
I	Meio	787,6	<0,00000*
III	Hemolinfa	173,8	=0,000108*
III	Meio	2.638,4	=00000000*

No bioensaio I a osmolalidade da hemolinfa do controle se mostrou significativamente diferente da osmolalidade observada nas salinidades igual e acima de 18 (Tabela 18). Já no bioensaio III houve diferença significativa entre as quatro salinidades observadas exceto entre as salinidades de 30 e 32 (Tabela 19).

Tabela 18. Resultado do Teste de Tukey HSD de comparação de média para o Bioensaio I

	1	2	3	4	5	6
Salinidade	195	275	240	310	360	365
1 9	-	0,09534	0,47700	0,02045*	0,00343*	0,00294*
2 13		-	0,68697	0,8697	0,07565	0,06008
3 16			-	0,15292	0,0167*	0,01377*
4 18				-	0,38633	0,30903
5 21					-	0,99991
6 24						

Tabela 19. Resultado do Teste de Tukey HSD de comparação de médias para o Bioensaio III.

	1	2	3	4
Salinidade	282,50	455,00	775,0	750
1 4	-	0,00879*	0,00038*	0,00041*
2 27		-	0,00102*	0,00131*
3 30			-	0,76934
4 32				-

4.6. Variação da expressão gênica sob incrementos graduais de salinidade

A amplificação por PCR em tempo real dos genes *Qlactb*, *Qlcat*, *Qlgpx* e *Qlsod* foi obtida como podemos observar na Figura 16.

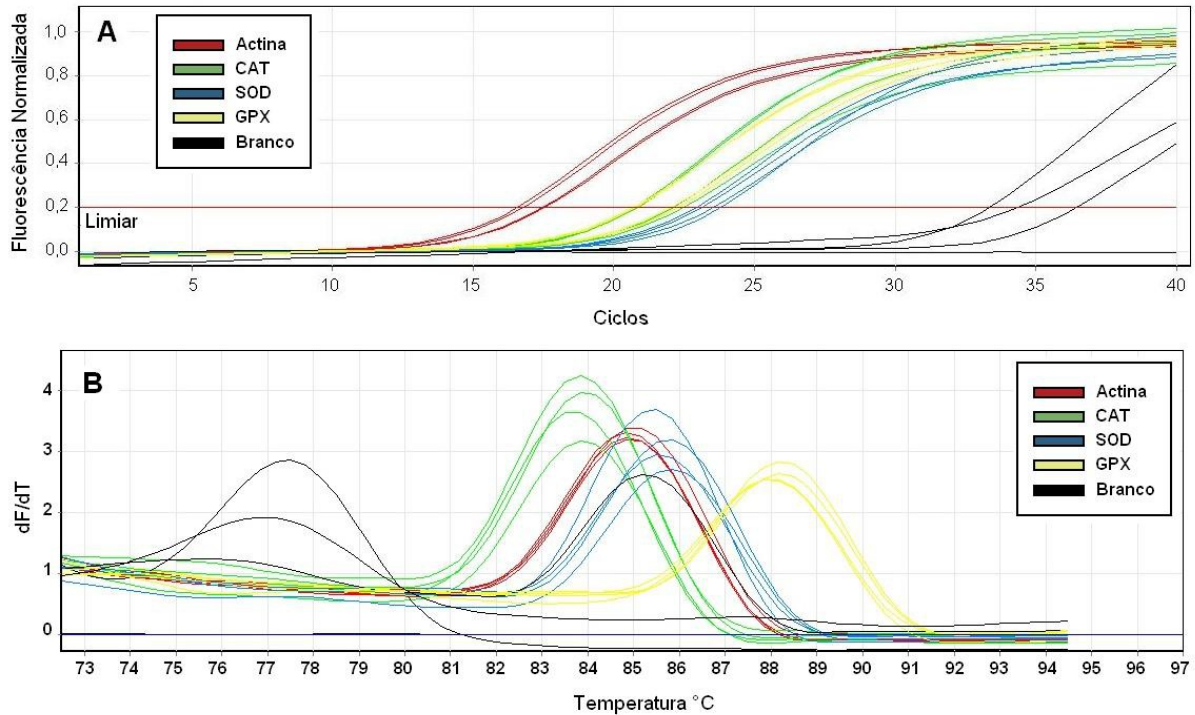


Figura 16. A. Amplificação por PCR em tempo real mostrando o limiar utilizado para a determinação do Cq. B. Curva de fusão (*melting*) correspondente a reação de PCR em tempo real com *primers* para os genes (Actina) *Qlactb*, (CAT) *Qlcat*, (SOD) *Qlsod* e (GPx) *Qlgpx* a partir das amostras de cDNA do anfípode *Quadrivisio lutzi*. Branco, sem amostra de cDNA (preto).

Os valores de Cq obtidos para os genes apresentaram distribuição normal como pode ser observado nos histogramas de frequência dos valores de Cq por gene (Figura 17). Os valores de Cq como expressão absoluta obtidos nas diferentes salinidades, se observam na Figura 18. Analisando os valores absolutos por uma ANOVA fatorial, não foi encontrado efeito da salinidade. Ao analisar por gene e comparando as salinidades também não foram encontradas diferenças significativas.

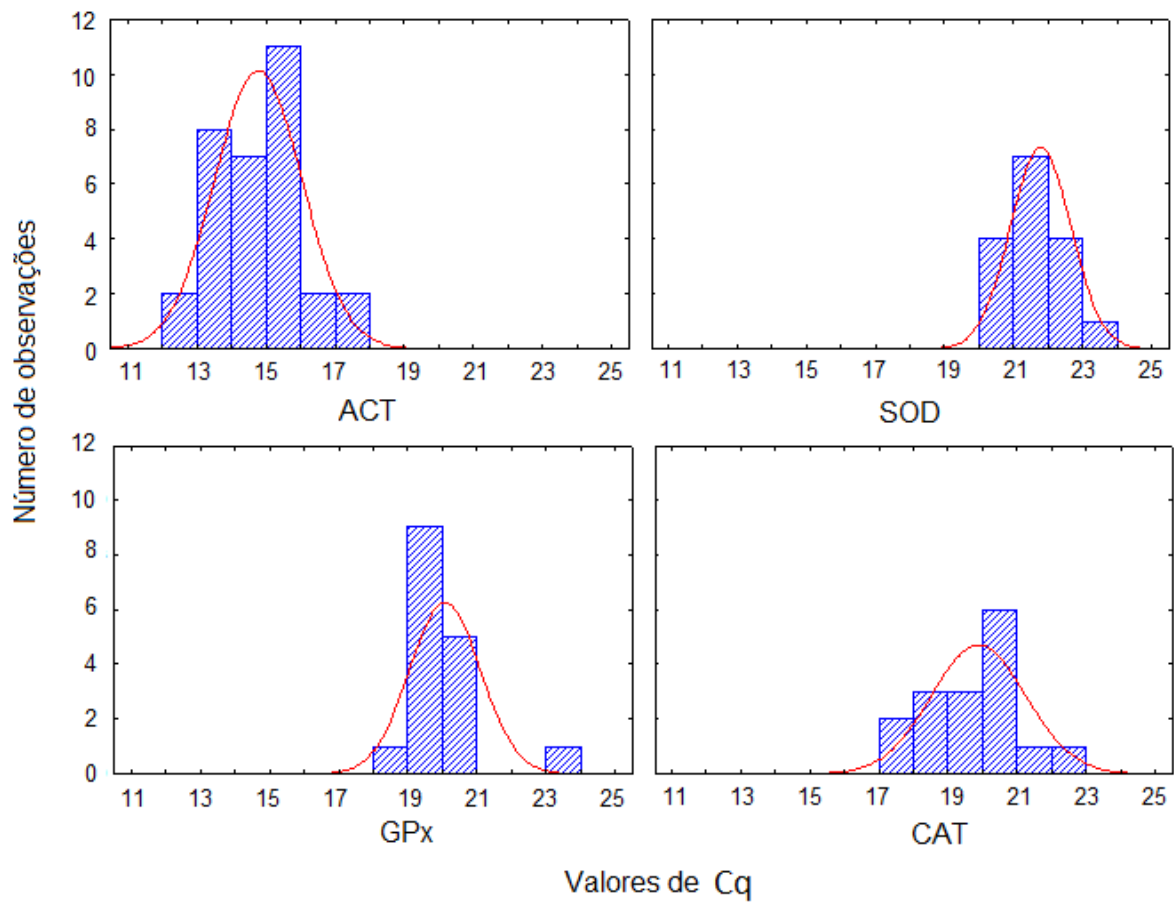


Figura 17. Distribuição da frequência dos valores de Cq(expressão gênica),para os genes analisados: (ACT) *Qlactb*; (SOD) *Qlsod*; (Gpx) *Qlgpx* e (CAT) *Qlcat* . Em vermelho predição de distribuição normal de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov, mostrando a normalidade dos dados.

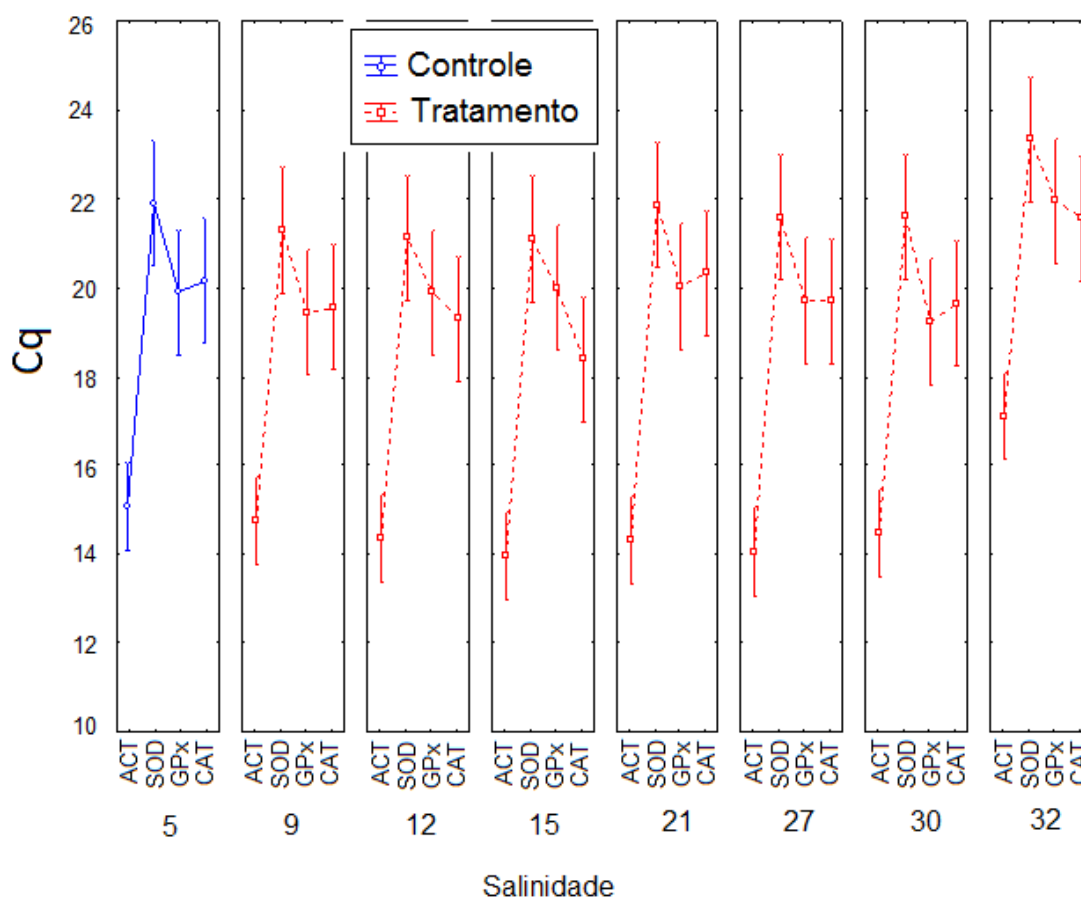


Figura 18. Valores de Cq por gene e salinidade na análise da expressão gênica absoluta. (ACT) *Qlactb*; (SOD) *Qlsod*; (GPx) *Qlgpx* e (CAT) *Qlcat*.

Ao fazer a análise da expressão gênica relativa ao gene de referência *Qlactb*, podemos observar uma elevação da *Qlgpx* na salinidade de 32 (Figura 19). Nesta análise, todos os valores relativos do *Qlactb* passam a ser igual a 1, indicando que valores menores a 1 dos outros genes representam expressão reduzida em relação ao *Qlactb* e maiores a 1, expressão aumentada em relação a esta referência. A ANOVA mostrou que não há diferenças significativas na expressão gênica relativa nas diferentes salinidades para os genes *Qlsod* ($p = 0,6048$) e *Qlcat* ($p = 0,9147$). A expressão gênica relativa da *Qlgpx* na salinidade de 32 foi significativamente superior ($p = 0,000435$) às observadas nas outras salinidades.

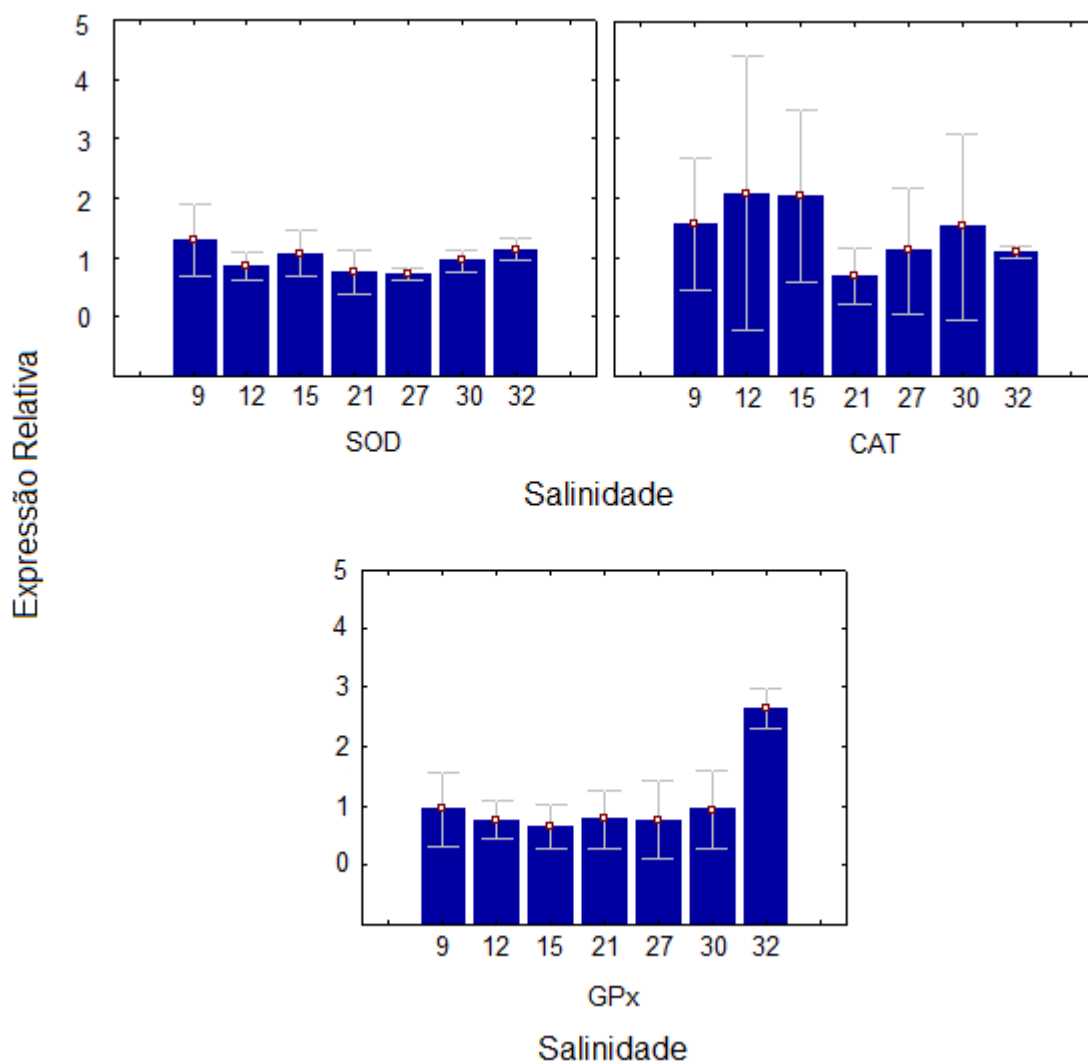


Figura 19. Expressão relativa ao gene *Qlactb* dos genes da (SOD) *Qlsod*, (CAT) *Qlcat* e (GPx) *Qlgpx* no anfípode *Q. lutzi* durante o aumento gradativo de salinidade.

5. DISCUSSÃO

5.1. Parâmetros ambientais e distribuição do *Q. lutzi*.

Os parâmetros físico-químicos da água das lagoas podem influenciar significativamente a sobrevivência da biota. A temperatura, enquanto parâmetro físico, afeta o metabolismo dos organismos. Quanto maior for a temperatura dentro dos limites tolerados para cada espécie, mais acelerado será o crescimento da mesma (Vinatea et al., 2010). Já além dos limites toleráveis ocorre o aumento do metabolismo podendo levar até a inativação de enzimas (Cairns et al., 1975). O anfípode *Q. lutzi* mostra pouca tolerância ao aumento de temperatura observando-se que 20 % e 100 % morrem em 48 h a 32°C e 37°C, respectivamente (Souza, 2015).

Os parâmetros químicos de pH, OD (oxigênio dissolvido) e dureza apresentam relação com a decomposição da matéria orgânica, pois esse processo é responsável pela maior parte do carbono presente nesses ambientes, além de aumentar o consumo de oxigênio pelos organismos decompositores e conseqüentemente acidificar o meio (Rollof, 2006). A vida aquática depende do pH, pois alterações nesse parâmetro afetam o crescimento e a reprodução da biota, sendo o valor ideal entre 6,0 e 9,0 (Vinatea et al., 2010). Neste estudo foi observado que a presença do anfípode se enquadra nesse intervalo, já que até o momento não foi registrado ocorrência da espécie em águas com valores de pH inferior ou superior aos mencionados.

Acredita-se que naquelas lagoas onde as condições são próximas das condições onde anfípodes têm sido encontrados, sua ausência possa estar explicada pela ausência de vegetação como mostra a Tabela 15. A matéria orgânica vegetal serve como fonte de alimento e microhabitat, já que os anfípodes são encontrados entre as raízes, na dobra de folhas ou apenas associados à matéria vegetal morta. Zaabar et al. (2015) observou em seu estudo que a riqueza de espécies de anfípodes diminui em épocas do ano em que a vegetação também é escassa, corroborando essa associação.

A salinidade é um parâmetro químico muito importante que, em ambientes como os representados pelas lagoas costeiras, sofre variações constantes. De acordo com Zaabar et al. (2015) a salinidade e a temperatura são os principais fatores abióticos responsáveis pela distribuição dos anfípodes. Espécies eurialinas são adaptadas a sobreviver com constantes variações de salinidade. No entanto, pudemos observar neste estudo que o aumento gradativo

de salinidade acima de 21 influência negativamente a sobrevivência desses animais, assim como já havia sido observado por Souza (2015).

5.2. Osmolalidade da hemolinfa e osmolalidade do meio.

Os crustáceos apresentam um eficiente mecanismo osmorregulatório, com duas etapas consecutivas RAE e RII, onde a primeira é típica da osmoregulação, quando a osmolalidade da hemolinfa é mantida diferente do meio. Segundo Freire (2013) os organismos eurialinos osmoreguladores são menos dependentes da RII devido a eficiência da RAE.

No presente estudo, onde os animais foram encontrados em salinidade de 9, foi observado um comportamento osmoconformador entre 9 e 12 de salinidade mantendo a hemolinfa em aproximadamente 200 mmol/Kg e hiporregulador a partir de 15 de salinidade com aproximadamente 300 mmol/kg. No entanto, aqueles indivíduos coletados a 3,9 de salinidade se encontravam hiper-regulando a 300 mmol/kg. Já estudos realizados por Souza (2015) com o anfípode *Quadrivisio lutzi* retirado da lagoa Carapebus vivendo com 0,6 de salinidade, se encontrava hiper-regulando na osmolalidade de 400-500 mmol/Kg de concentração interna. Quando submetidos à salinidade próxima de 21, eles passaram a osmoconformar em aproximadamente 600 mmol/Kg. Em salinidades superiores a 21, acredita-se iniciar o estresse osmótico, já que houve uma notável perda de homeostase do organismo (Souza, 2015).

A diferença de resposta do anfípode *Q. lutzi* entre o presente trabalho e o de Souza, (2015) pode ser explicada possivelmente pelo tempo de aclimação que os animais tiveram a diferentes salinidade da lagoa de procedência. Ainda assim, devemos levar em consideração a possibilidade de que existam diferenças genéticas que determinem linhagens diferentes que se comportem e sobrevivam de maneiras diferentes a variação de salinidade.

Esse comportamento hiper-regulador e hiporregulador é comum em crustáceos que habitam água doce (Houston, 2013) e é o padrão observado em várias espécies de camarões estuarinos (Freire et al., 2003; Augusto et al., 2009). Augusto et al. (2009) observaram em seus estudos com camarões da espécie *Palaemon northrop*, que vivem em ambientes com variação constantes de salinidade, um comportamento fisiológico semelhante de hiper e hiporregulação. No entanto, em anfípodas este não é um padrão comum de osmorregulação, tendo sido observado apenas em duas espécies; no *Gammarus fossarum*, um anfípode de água doce capaz de tolerar altas salinidades (Dorgelo, 1977) e na espécie estuariana *Gammarus chevreuxi*. No presente trabalho o *Q. lutzi*, apresentou o mesmo comportamento

hiper-regulador em baixa salinidade e hiporegulador em alta salinidade conforme observado por Houston (2013) no anfípode *G. chevreuxi*. Esta resposta fisiológica levou o autor a hipotetizar que espécies com esse padrão osmorregulatório possam ter evoluído de linhagens de água doce que tenham sido expostas posteriormente a variações de salinidade, como segundo passo evolutivo.

5.3. Expressão gênica

Para analisar a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo e sua relação com as fases da osmorregulação através do PCR em tempo real, é essencial a comparação com um gene que não mude sua expressão mediante às condições experimentais, para que seja usado como referência na determinação da expressão relativa. Alguns dos genes mais utilizados na literatura são os da β -actina, GAPDH e β -tubulina (Heckmann et al., 2006). Recentemente os três genes mencionados foram testados no anfípode *Q. lutzii* em experimentos envolvendo exposição ao petróleo, onde o *Qlactb* foi o que melhor respondeu como gene de referência de expressão invariante (Vieira, 2014). O gene da β -actina, teve também confirmada sua estabilidade de expressão para uso como gene referência em *Daphnia magna* (Lyu et al., 2014). A proteína β -actina compõe os microfilamentos do citoesqueleto dos animais e demais eucariotos e é altamente conservada entre as espécies (Perrim e Ervasti, 2010).

A partir dos dados observados de osmolalidade, já podíamos prever que os genes de resposta ao estresse oxidativo estudados não apresentariam mudanças significativas de expressão gênica nas primeiras salinidades (3,9 a 18). A partir da salinidade de 15 e até 32, os anfípodas permaneceram hiporegulando. No entanto, a partir de 30 de salinidade, a osmolalidade da hemolinfa sofreu uma elevação considerável, sugerindo que possa ter iniciado a fase RII de controle do volume celular, pois as medidas de osmolalidade superaram os valores em que previamente foi descrito hiper-regulando (400-500 mmol/Kg) (Souza, 2015). Espera-se que as enzimas que participam das defesas antioxidantes só tenham sua expressão aumentada a partir do início da fase RII, que seria ativada previamente pelo estresse osmótico e levaria conseqüentemente ao estresse oxidativo, pois a demanda de ATP exigida pela fase RII é muito superior a da RAE (Fernandes, 2010).

Os genes *Qlsod* e *Qlcat* não apresentaram uma variação significativa nas suas expressões relativas mediante o aumento da salinidade. No entanto, a expressão relativa da *Qlgpx* apresentou uma diferença significativa na salinidade de 32 em relação a expressão nas

salinidades menores. A maior expressão da *Ql_{gpx}* na salinidade de 32 pode ser uma resposta ao início do estresse oxidativo e também pode representar uma tentativa de se combater aumentos ainda maiores do estresse oxidativo. Considerando que a alteração da osmolalidade da hemolinfa ocorreu a partir da salinidade de 30, com a expressão de *Ql_{gpx}* superior aos valores obtidos para as salinidades menores e podendo refletir o início da RII, pode-se considerar um retardo de 24-48 h para o início do estresse oxidativo após o deflagrar da RII.

A *sod* é uma enzima mitocondrial que faz parte da primeira linha de defesa do organismo ao estresse oxidativo, já que é capaz de eliminar o superóxido (O_2^-) mesmo ele estando em baixas concentrações (Barreiros et al., 2006; Marchand et al., 2009). No entanto a catalase presente nos peroxissomos é capaz de interferir na atividade da *sod* já que ao decompor o peróxido de hidrogênio, ocorre a liberação de H_2O e O_2 , o que leva ao aumento da concentração de O_2^- . O superóxido (O_2^-) em altas concentrações são eliminados naturalmente, diminuindo assim a atividade da *sod* e/ou a expressão do *sod* (Weydert et al., 2008). Esse quadro pode ser observado na Figura 18, ainda que não tenham sido verificadas diferenças significativas, podemos notar uma relação entre a *Ql_{cat}* e a *Ql_{sod}*, de forma que enquanto um tem sua expressão aumentada a outra diminuí, e vice-versa.

As enzimas *gpx* e *cat* apresentam basicamente a mesma função bioquímica, que é de transformar H_2O_2 derivada da atividade da *sod* e de enzimas oxidases peroxissomais, em moléculas menos reativas (Hipara et al., 2004). A *gpx*, presente nas mitocôndrias e citosol, devido sua alta afinidade ao H_2O_2 , é mantida em concentrações mais estáveis sendo responsável por reduzir os peróxidos de hidrogênio gerados a todo momento pela respiração celular, em duas moléculas de água. Já a catalase (peroxissomal) é naturalmente mais expressa devido a sua pouca afinidade pelo H_2O_2 que é degradado em H_2O e O_2 . A sutil diminuição da expressão da catalase em 21 de salinidade, observada no presente estudo, coincide com o momento crítico para a osmorregulação indicado por Souza (2015), onde o anfípode encontra-se com a máxima concentração osmótica interna que pode suportar (osmoconformação), sinalizando o início da RII.

O aumento dos níveis de expressão da *Ql_{gpx}* observados em 32,5 de salinidade pode estar indicando um início prévio do estresse osmótico com a posterior estabilização do estresse oxidativo, já que alta afinidade da *gpx* pela H_2O_2 permite que sua concentração se mantenha estável até que sua atividade não seja compatível com o aumento da geração de moléculas de H_2O_2 (Oga et al., 2008). Na literatura há registros do aumento da atividade dessa enzima logo nos primeiros momentos de exposição à baixa salinidade no carangueijo *Uca*

maracoani, que vive em estuários (Batista, 2010). No presente estudo mostramos que ao menos um dos genes envolvido na resposta ao estresse oxidativo tem seus níveis de expressão aumentados durante um estresse osmótico.

6. CONCLUSÃO

Os parâmetros físico-químicos que se mostraram mais efetivos em limitar a ocorrência do anfípode *Q. lutzi* nas lagoas do Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro, foram o pH, menor que 6 e superior a 9, a salinidade superior a 20 e a temperatura sendo suportada até 32°C.

O anfípode *Q. lutzi* é capaz de hiper-regular a salinidades com osmolalidade menor que 200 mg/L, osmoconformar em salinidades de 200 mg/L e hiporegular em salinidade com osmolalidade superior a 300 mg/L.

A salinidade da lagoa na qual se encontra os anfípode pode modificar o comportamento osmorregulatório do *Q. lutzi*.

A osmolalidade interna tolerável para o anfípode *Q. lutzi* é entre 200 e 500 mmol/kg.

Os altos valores de osmolalidade encontrados nas salinidades de 30 e 32, além da faixa de osmolalidade tolerável pelo anfípode, sugerem que nestas salinidades a fase RII já se encontra ativa.

A alta expressão da *Ql_{gpx}* na salinidade de 32 é um indicativo do início prévio do estresse osmótico e do estresse oxidativo.

Pode-se concluir que antes do início do estresse osmótico a *Ql_{gpx}* é transcrita a níveis basais.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aarset, A.V.; Zachariassen, K.E. 1988. Low temperature tolerance and osmotic regulation in the amphipod *Gammarus oceanicus* from Spitsbergen waters. *Polar Research*, 6 (1): 35–41.
- Aguiaro, T.; Caramaschi, E. 1995. Ichthyofauna composition of three coastal lagoons in the north of the state of Rio de Janeiro (Brazil). *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 38 (4): 1181-1189.
- Almeida, P.M.M.; Kovac, M.S. 2014. Análise multitemporal do padrão de chuvas na zona oeste do rio de janeiro no âmbito das mudanças climáticas. Universidade Estadual Do Rio de Janeiro.
- Arockiaraj, J.; Easwvaran, S.; Vanaraja, P.; Singh, A.; Othman, R.Y.; Bhassu, S. 2012. Molecular cloning, characterization and gene expression of an antioxidant enzyme catalase (MrCat) from *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(5): 670-682.
- Aruoma O.I. 1998 Free radicals, oxidative tress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2): 199-212.
- Augusto, S.A.A. 2005. Invasão da água doce pelos crustáceos: o papel dos processos osmorregulatórios.. Tese de Doutorado em Biologia Comparada, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 148p.
- Augusto, S.A.; Pinheiro, A.S.; Greene, L.J.; Laure, H.J.; Mcnamara, J.C. 2009. Evolutionary transition to frehwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. *Aquatic Biology*, 7: 113-122.
- Baker, C.F., 1912. Notes on the Crustacea of Laguna Beach. First Annual Report of the Laguna Marine Laboratory, 1: 100-11
- Barnes, D.R.; Fox, S.R.; Ruppert, E.E. 2005 Crustacea. In: Barnes, D.R.; Fox, S.R.; Ruppert, E.E. *Zoologia dos invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva*. São Paulo: Roca, 702-813p.

- Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M.; David, J.P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*, 29(1): 113.
- Batista, U.H. 2010. Osmorregulação e ativação do sistema antioxidante por alteração de salinidade nas espécies de caranguejos *Uca maracoani* (Latreille, 1802-1803), *Uca thayeri* (Rathbun, 1900) e *Uca mordax* (Smith, 1870). Dissertação de Mestrado em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade do Paraná, Curitiba. 62p.
- Baptista, C., Pinheiro, M.A.A.; Blankensteyn, A.; Borzone, C.A. 2003. Estrutura populacional de *Callinectes ornatos* Ordway (Crustacea, Portunidae) no Balneário Shangri-lá, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20: 661-666.
- Bellard, C.; Bertelsmeier, C.; Leadley, P.; Truiller, W.; Courchamp, F. 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, 15(4): 365–377.
- Blasius, B.J.; Merritt, R.W. 2002. Field and laboratory investigations on the effects of road salt (NaCl) on stream macroinvertebrate communities. *Environmental Pollution*, 120(2): 219-231.
- Branco, C.W.C. 1998. Comunidades zooplactônicas e aspectos limnológicos de três lagoas costeiras da região Norte Fluminense (Macaé, RJ). Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro – IBCCF, Rio de Janeiro, 277p.
- Brouwer, M.; Brouwer, T.H.; Grater, W.; Brown-Peterson, N. 2003. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochemical Journal*, 374(1): 219-228.
- Buikema, A.L., Benfield, E.F. 1979. Use of macroinvertebrate fauna and water quality of saline river system in south-western Australia. *Hydrobiologia*, 248: 143-160.
- Burton, R.S.; Feldman, M.W. 1983. Physiological effects of an allozyme polymorphism : Glutamate-pyruvate transaminase and response to hyperosmotic stress in the copepod *Tigriopus californicus*. *Biochemical Genetics*, 21: 239–251.

- Cairns, J.Jr.; Heath, A.G.; Paker, B.C. 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organism. *Hydrobiologia*, 47: 135-171.
- Charmantier G.; Charmantier-Daures M.; Towle D. 2009. Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. In: Evans D. H. (ed.) *Osmotic and ionic regulation cells and animals*. CRC Press, Boca Raton, Flórida. 165-230 p.
- Conti, B.J. 2011 Considerações sobre as mudanças climáticas globais. *Revista do departamento de Geografia*. 16: 70-75.
- Costa, C.R.; Olivi, P.; Botta, C.M.; Espindola, E.L. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7): 1820-1830.
- Dorgelo J. 1977. Comparative ecophysiology of gammarids (Crustacea: Amphipoda) from marine, brackish and fresh-water habitats exposed to the influence of salinity-temperature combinations. IV. Blood sodium regulation. *Netherlands Journal of Sea Research*, 11: 184-199.
- Domingues, D.F.; Bertoletti, E. 2006. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. (eds), *Ecotoxicologia aquática. Princípios e aplicações*. Editora Rima, São Carlos, SP: 153-184.
- Erchao, L.; Arena, L.; Lizama G.; Gaxiola G.; Cuzon, G.; Rosas, C.; Chen, L.; Wormhoudt, V.A. 2011. Glutamate dehydrogenase and Na⁺- K⁺ ATPase expression and growth response of *Litopenaeus vannamei* to different salinities and dietary protein levels. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29: 343–349.
- Esteves, F.A. 1998. Lagoas costeiras: origem, funcionamento e possibilidades de manejo. In Esteves, F. A. (ed.), *Ecologia das lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ)*. NUPEM. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 63-87p
- Esteves F.A. 2011a. Do índio Goitacá à economia do petróleo: Uma viagem pela história e ecologia da maior restinga protegida pelo Brasil. Rio de Janeiro: Editora Essentia, 225 pp.
- Esteves F.A. 2011b. *Fundamentos de Limnologia*. 3ª Ed . São Paulo: Editora Interciência, 790 pp.

- Esteves, F.A.; Enrich-Prast, A.; Bozelli, R. L.; Meirelles, F.P. 2004. Lagoas costeiras da Restinga de Jurubatiba: descrição de suas variáveis limnológicas. Rocha, C.F.D., Esteves, F.A.; Scarano, F.R. Pesquisas de longa duração na Restinga de Jurubatiba: ecologia, história natural e conservação. Rio de Janeiro: Rima, 376.
- Farjalla, V.F.; Faria, B.M.; Esteves, F.A.; Bozelli, R.L. 2001. Bacterial density and biomass, and relation with abiotic factors, in 14 coastal lagoons of Rio de Janeiro state. In: Faria, B.M.; Farjalla, V. F.; Esteves F. A. (eds), Aquatic microbial ecology in Brazil. Serie Oecologia Brasiliensis, 9:65-76.
- Farjalla V.F.; Farias B.M.; Esteves F.A. 2002 The relationship between DOC and planktonic bacteria in tropical coastal lagoons. Arch. Hydrobiol. 16: 97-119.
- Farjalla, V.F.; Amado, A.M.; Suhett, A.L.; Meirelles-Pereira, F. 2009. DOC removal paradigms in highly humic aquatic ecosystems. Environmental Science and Pollution Research, 16: 531-538.
- Firmino, K.C.S.; Faleiros, R.O.; Masui, D.C.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M. 2011. Short- and long-term, salinity-induced modulation of V-ATPase activity in the posterior gills of the true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). Comparative Biochemistry and Physiology, 160: 24-31.
- Fernandes, F.A. 2010. Estresse Osmótico: Proteínas de estresse e balanço oxidativo em *Neohelice granulata* (Crustacea, Decapoda, Veronidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 175p.
- Freire C.A.; Cavassin F.; Rodrigues E.N.; Torres A.H.; McNamara J.C. 2003 Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. Comparative Biochemistry and Physiology - A, Molecular and Integrative Physiology, 136: 771-778.
- Freire, C.A.; Souza-Bastos, L.R.; Amado, E.M.; Prodocimo, V.; Souza, M.M. 2013. Regulation of muscle hydration upon hypo- or hyper-osmotic shocks: differences related to invasion of the freshwater habitat by decapod crustaceans. Journal of Experimental Zoology - Ecological Genetics and Physiology, 319A(6): 297-309.

- Freitas, A.S. 2011. Avaliação do disseleneto de difelina e análogos como substratos da tioredoxina redutase. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria. 153p.
- Germani, Y.F.; Figueiredo, S.A.; Calliari, L.J.; Tagliani, C.R.A. 2015 Vulnerabilidade costeira e perda de ambientes devido à elevação do nível do mar no litoral sul do Rio Grande do Sul. *Revista de Gestão Costeira Integrada*, 15(1): 121–131.
- Gilles, R. e Delpire, E. 1997. Variations in salinity, osmolarity and water availability: vertebrates and invertebrates. In: Dantzeler, W. H. (ed). *Handbook of Comparative Physiology*. Oxford University Press, New York. 1523-1586.
- Gillespie, J.H. 1991. *The causes of molecular evolution*. Oxford University Press, 336 pp.
- Gomes, M.A.F.; Pereira, L. C. 2014 Aspectos geoambientais e áreas frágeis no Brasil. *Revista Intellectus*, 01: 5–19.
- Hatta, T.; Kouji, K.; Miyoshi, T.; Umemiya, R.; Liao M.; Inoue, N.; Xuan, X.; Tsuji, N.; Fujisaki, K. 2006. Identification and characterization of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *International Journal for Parasitology*, 36: 1123–1132.
- Häussinger, D. 2004 Neural control of hepatic osmolytes and parenchymal cell hydration. *The Anatomical Record*, 280A (1): 893-900.
- Häussinger, D.; Lang, F.; Gerok, W. 1994. Regulation off cell function by the hydration state. *American journal physiology- Endocrinology and Metabolism*, 267(3): 343-345.
- Henriques-de-Oliveira, C.; Baptista, D.F.; Nessimian, J.L. 2007. Sewage input effects on the macroinvertebrate community associated to *Typha domingensis* Pers in coastal lagoon in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 67: 73-80.
- Heckmann, L-H.; Connon, R.; Hutchinson, T.H.; Maund, S.J.; Sibly, R.M.; Callaghan, A. 2006. Expression of target and reference genes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *BMC Genomics*, 7(175): 1-8.

- Henry, R.P.; Gehrich, S.; Weihrauch, D.; Towle, D.W. 2003. Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136(03): 243–258.
- Hermes-Lima, M.; Gonçalves, M.S. 2001. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazine (PIH) prevents copper mediated free radical formation. *Molecular Cellular Biochemistry*, 228: 73-82.
- Hipara, J.L.; Clemente, M.V.; Pervaiz, S. 2004. Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 514-521.
- Hoegh-Guildberg, O.; Bruno, J.F. 2010. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*, 328(5985): 1523–1528.
- Hollanda-Carvalho, P. 2002. Caracterização e distribuição da ictiofauna de lagoas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. Monografia de Bacharelado, UFRJ, RJ. 72p.
- Houston, S. 2013. Osmotic regulation of the amphipod *Gammarus chevreuxi* (Sexton, 1912). *The Plymouth Student Scientist*, 6(1): 104-118.
- Huszar, V.L.M.; Silva, L.H. 1992. Comunidades fitoplanctônicas de quatro lagoas costeiras do norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Limnologica Brasil*, 4: 291-314.
- Koehn, R.K.; Newell, R.I.; Immermann, F. 1980. Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(9): 5385-5389.
- Kjerfve, B. 1994. Coastal lagoons. In: Kjerfve, B. (ed.) *Coastal lagoon processes*. Elsevier Oceanography, 68: 1-8.
- Leite, F.P.P.; Tararam, A.S.; Wakabara, Y. 1980. Composição e distribuição da fauna de Gammaridea na região da Enseada da Fortaleza – Ubatuba, Estado de São Paulo. *Boletim do Instituto de Oceanografia, São Paulo*, 29: 279-299.

- Lignot, J.H.; Spanings-Pierrot C.; Charmantier, G. 2000 Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1): 209–245.
- Liu, Y.; Wang, W.N.; Wang, A.L.; Wang, J.M.; Sun, R.Y. 2007. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture*, 265: 351-358.
- Liu KF, Yeh MS, Kou GH, Cheng W, Lo CF. 2010. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(9): 935 – 944.
- Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101: 13-30.
- Li, E.; Arena, L.; Lizama, G.; Gaxiola, G.; Cuzon, G.; Rosas, C.; Chen, L. Wormhoudt, V.A. 2010. Glutamate dehydrogenase and Na⁺/K⁺ ATPase expression and growth response of *Litopenaeus vannamei* to different salinities and dietary protein levels. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29: 343–349.
- Lyu, K.; Zhu, X.; Chen, R.; Chen, Y.; Yang, Z. 2014. Molecular cloning of manganese superoxide dismutase gene in the cladoceran *Daphnia magna*: effects of microcystin, nitrite, and cadmium on gene expression profiles. *Aquatic Ecotoxicology*, 148: 55-64.
- Mantel, L.H.; Farmer, L.L. 1983. Osmotic and ionic regulation. In: Mantel, L.H. (Ed.) *The Biology of Crustacea*. Academic Press, Nova York, 5: 53-161.
- Marchand, J.; Leignel, V.; Moreau, B.; Chénais, B. 2009. Characterization and sequence analysis of manganese superoxide dismutase from *Brachyura* (Crustacea: Decapoda): Hydrothermal Bythograeidae versus littoral crabs. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 153(2): 191–199.
- Medeiros, T.B.; Weber, L.I. 2016. Aspects of the reproductive biology of the freshwater/brackish amphipod *Quadrivisia lutzi* (Crustacea, Amphipoda) from an unstable coastal lagoon of southeastern Brazil. *Nauplius*, 24p.

- Minello, M. 2004. Metanogênese sob a variação de salinidade em lagoas costeiras do Norte Fluminense: Implicações nas condições osmóticas e na competição por substratos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 56p.
- Marengo, J.A.; Alves, L.; Valverde, M.; Rocha, R.; Laborbe, R. 2007. Eventos extremos em cenários regionalizados de clima no Brasil e América do Sul para o Século XXI: Projeções de clima futuro usando três modelos regionais. Relatório, 5, Ministério do Meio Ambiente - MMA, Secretaria de Biodiversidade e Florestas – SBF, Diretoria de Conservação da Biodiversidade - DCBio Mudanças Climáticas Globais Efeitos sobre a Biodiversidade - Sub projeto: Caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do Século XXI, 495-516.
- Morritt, D.; Spicer, J.I. 1996. Developmental ecophysiology of the beachflea *Orchestia gammarellus* (Pallas) (Crustacea: Amphipoda) II. Embryonic osmoregulation. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 207: 205-216.
- Oga, S.; Camargo, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O. 2008. Fundamentos de Toxicologia. 3ª Ed. São Paulo: Etheneo editora, 515p.
- Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, 30(9): 1-10.
- Piscart, C.; Lecerf, A.; Usseglio-Polster, P.; Moreteau, J.C.; Beisel, J.N. 2005. Biodiversity patterns along a salinity gradient: the case of net-spinning caddisflies. Biodiversity and Conservation, 14: 2235-2249.
- Perrim, B.J.; Ervasti, J.M. 2010. The actin gene family: function follows isoform. Cytoskeleton, 67: 630-634.
- Radonic, A.; Thulke, S.; Mackay, I. M.; Land, O.; Siegert, W.; Nitschu, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications, 313(4): 856–862.
- Reid, J.W.; Esteves, F.A. 1984. Considerações ecológicas e biogeográficas sobre a fauna de copépodos (Crustacea) planctônicos e bentônicos de 14 lagoas costeiras do estado do Rio

- de Janeiro, Brasil. In: Lacerda, L.D.; Araujo, D.S.D.; Cerqueira, R.; Turcq, B. (Orgs.) Restingas: Origem, estrutura, processos. CEUFF, Niterói, 195-216.
- Rollof, T.A. 2006. Efeitos da não aplicação do controle de qualidade da água nas indústrias alimentícias. *Saúde e Biologia*, 1(1): 52-57.
- Romano, N.; Zeng C. 2012. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture*, 334: 12-23.
- Ruppert, E. E.; Fox, R.S.; Barnes, R.D. 2005. *Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. 7ª Ed. São Paulo: Editora Roca, 1168p.
- Segall, L.; Daly, S.E.; Boxenbaum, N.; Lane, L.K.; Blostein, R. 2000. Distinct catalytic properties of the $\alpha(1)$, $\alpha(2)$ and $\alpha(3)$ isoforms of the rat (Na⁺,K⁺)-ATPase. *Biophys*, 78: 456.
- Serrano, L.; Henry, R.P. 2008. Differential expression and induction of two carbonic anhydrase isoforms in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 3:186–193.
- Silva, E.I.L.; Shimizu, A.; Matsunami, H. 2000. Salt pollution in a Japanese stream and its effects on water chemistry and epilithic algal chlorophyll-a. *Hydrobiologia*, 437: 139–148.
- Smith, N.P. 1994. Water, salt and heat balance of coastal lagoons. Elsevier Oceanography Series, 60: 69-102.
- Souza, H.O. 2015 O modelo animal *Quadrivisia* aff. *lutzi* (Crustacea, Gammaridea): Estudo da tolerância a variações ambientais (salinidade e temperatura) e contribuição na padronização de bioensaios. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 77p.
- Steinberg, C.E.; Meinelt, T.; Timofeyev, M.A.; Bittner, M.; Menzel, R. 2008. Humic substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(2):128-135.
- Steinberg, C.E.; Ouerghemmi, N.; Herrmann, S.; Bouchnak, R.; Timofeyev, M.A.; Menzel, R. 2010. Stress by poor food quality and exposure to humic substances: *Daphnia magna*

- responds with oxidative stress, lifespan extension, but reduced offspring numbers. *Hydrobiologia*, 652(1): 223-236.
- Suzuki, M.S. 1997. Abertura da barra na Lagoa de Grussaí, São João da Barra – RJ. Aspectos hidroquímicos, dinâmica da comunidade fitoplanctônica e metabolismo. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro. 117p.
- Stebbing, T.R.R. 1907. The fauna of brackish ponds at Port Canning, Lower Bengal. Part V.- Definition of a new genus of amphipoda, and description of the typical species. *Records of the Indian Museum*, 1: 159-162.
- Shoemaker, C.R. 1933. Amphipoda from Florida and The West Indies. *American Museum Novitates*, 598: 1-24.
- Vieira, P.N. 2014. Resposta ao estresse oxidativo na exposição ao petróleo: escolha de um gene de referência e análise da expressão do gene da catalase no anfípode *Quadrivisia aff. lutzi* (Crustacea, Gammaridea). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 65p.
- Vinatea, L.; Gálvez, A.O.; Browdy, C.L.; Strokes, A.; Venero, J.; Haveman, J.; Lewis, B.L.; Lawson, A.; Shuler, A.; Leffler, J.W. 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*, 42: 17–24.
- Xia, X.F.; Zheng, J.J.; Shao, G.M.; Wang, J.L.; Liu, X.S.; Wang, Y.F. 2013. Cloning and functional analysis of glutathione peroxidase gene in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish & shellfish immunology*, 34(6): 1587-1595.
- Wang, Y.; Li, E.; Yu, N.; Wang, X.; Cai, C.; Tang, B.; Chen, L.; Wormhoudt, V.A. 2012. Characterization and expression of glutamate dehydrogenase in response to acute salinity stress in Chinese Mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Plos One*, 7(5): 1–10.
- Weber, L.I.; Carvalho, L.J.; Sá, N.; Silva, V.; Beralдини, N.; Souza, V.; Conceição, M. 2013. Genotoxic effects of heavy oil water-soluble fraction in the brackish/freshwater amphipod

Quadrivisia aff. lutzii (Gammaridea) assessed by the comet assay. *Ecotoxicology*, 22: 642-655.

Weihrauch, D.; Ziegler, A.; Siebers, D.; Towle, D.W. 2001. Molecular characterization of V-type H⁺-ATPase (b-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *The Journal of Experimental Biology*, 37: 25–37.

Weydert, C.J.; Zhang, Y.; Sun, W.; Waugh, T.A.; Teoh, M.L.; Andringa, K.K.; Oberley, L.W. 2008. Increased oxidative stress created by adenoviral MnSOD or CuZnSOD plus BCNU (1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea) inhibits breast cancer cell growth. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(5): 856-867.

Yeh SP, Liu KF, Chiu ST, Jian SJ, Cheng W, Liu CH. 2009. Identification and cloning of a selenium dependent glutathione peroxidase from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2):181 – 191.

Zaabar, W.; Zakhama-Sraieb, R.; Charfi-Cheikhrouha, F.; Achouri, M. S. 2015. Abundance and diversity of amphipods (Crustacea: Peracarida) on shallow algae and seagrass in lagoonal ecosystem of the Mediterranean Tunisian coast. *Zoological Studies*, 54(1): 1-11.

Zhang, Q.; Li, F.; Zhang, X.; Dong, B.; Zhang, J.; Xie, Y.; Xiang, J. 2008. cDNA cloning , characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 24: 584–591.

8. ANEXOS

Anexo 1. Alinhamento de sequências nucleotídicas do gene da Na⁺k⁺ ATPase das espécies *Callinectes sapidus* (GenBank AF327439.1); *Caprella sp.*(GenBank AY303369); *Drosophila melanogaster* (GenBank 48971); *Eriocheir sinensis* (GenBank KC691291); *Exopaleamon carinicauda* (GenBank JQ360623); *Litipenaeus stylirostris* (GenBank JN561324); *Parhyale hawaiienses*; *Pennaeus monodon* (GenBank KF177338); *Portunus trituberculatus* (GenBank JX173959). (*) Indica as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os primers.

P.monodon	ACAACACCATCATTGAGGCTGATACATCTGAAGATCAGTCTGGCTGCCAGTATGACAAGA
L.stulirostris	ACAATACCATCATTGAAGCTGATACATCTGAAGATCAGTCTGGCTGCCAGTATGACAAGA
E.carinicauda	ATAACACCATTATTGAGGCAGATACTTCAGAAGATCAGTCTGGTTGTTCAGTATGATAAGA
P.trituberculatus	ACAACACCATCATTGAGGCAGATACCTCAGAGGACCAATCTGGCTGCCAGTACGACAAGA
C.sapidus	ACAACACCATCATTGAGGCAGATACCTCAGAGGACCAGTCCAGGCTGCCAGTACGACAAGA
E.sinensis	ACAACACCATTATTGAAGCCGACACCTCTGAGGATCAGTCCAGGCTGCCAGTATGACAAGA
Caprella sp.	-----CATTGAAGCTGACACCTCAGAGGATCAATCTGGTGGACAGATCGACAAGG
P.Hawaiienses	ACAACCAGATCGTCGAAGCCGACACATCTGAGGATCAGTCTGGCGGTTCAGATCGACAAGG
D.melanogaster	ATAATCAGATCATCGAGGCCGACACAACCTGAGGATCAGTCCGGTGTTCATACGATAGAA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CCTCACAAGGCTGGAAGGCTCTGTCCAGAATTGCTGCCCTCTGTAACCGTGCTGAATTCA
L.stulirostris	CCTCACAAGGCTGGAAGGCTCTGTCTAGAATTGCTGCCCTCTGTAACCGTGCTGAATTCA
E.carinicauda	CTTCAGAAGGCTGGAAGGCTCTCCAGAATTGCTGCTCTATGTAATAGGGCTGAATTCA
P.trituberculatus	CTTCTGAGGGATGGAAGGCTCTCTCCGAATTGCTGCTCTCTGCAACCGTGCCGAATTCA
C.sapidus	CTTCCGATGGATGGAAGGCTCTCTCCCGATTGCTGCTCTCTGCAACCGTGCTGAATTCA
E.sinensis	GCTCTGAAGGCTGGAAGGCTCTCTCCAGGATCGCTGCTCTATGCAACCGTGCTGAGTTCA
Caprella sp.	CATCTGACGGATGGAAGGCTCTCCACCATTGCTGCCCTATGCAACAGAGCTGAATTCA
P.Hawaiienses	GATCCACAGGATGGAAGGCTCTCCACCATTGCTGCCCTATGCAACAGGCTGAGTTCA
D.melanogaster	CCAGCCCTGGATTCAAGGCGCTCTCGCATTGCCACTCTCTGTAACCGTGCCGAGTTCA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	AGAGTGGCATGGAAGGCTCTCCATCCTGAAACGTGAAGTAAACGGCGATGCTTCTGAAG
L.stulirostris	AGACTGGTATGGAAGGCTCTCCATCCTGAAACGTGAAGTAAACGGCGATGCTTCTGAAG
E.carinicauda	AAACAGGCCAAAACGATGTTCATCCTGAAACGTGAAGTAAATGGTGTATGCTTCCGAAAG
P.trituberculatus	AGACAGGTCAGGAAGATGTTCATCCTGAAACGAGAAAGTAAACGGTGTATGCTTCCGAAAG
C.sapidus	AGACAGGTCAGGAAGATGTACCCATTCTGAAACGAGAGGTGAATGGTGTATGCTTCTGAGG
E.sinensis	AAACTGGCCAGGAAGATGTTCATCCTGAAACGAGAGGTGAACGGTGTATGCTTCTGAGG
Caprella sp.	GGTCTGGTCAAGATGGTGTATCTATCCTGAAAGAGAGAAGTAAACGGTGTATGCTTCTGAAG
P.Hawaiienses	AGTCCGGACAAGACGGAGTGTCCATCCTGAAACGTGAAGTCAACGGCGATGCTTCCGAGG
D.melanogaster	AGGGAGGCCAAGATGGCGTCCCAATCCTCAAGAAAGAAGTCAAGTGGAGATGCTTCCGAGG
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CTGCTCTGCTGAAGTGCCTAGAAATTGGCTGTTGGTGTATGTAAGGGCTGGCGTGCACGCA
L.stulirostris	CTGCTCTGCTGAAGTGTGTAGAAATTGGCTGTTGGTGTATGTTAAGGGCTGGCGTGCACGCA
E.carinicauda	CTGCTCTATTGAAATGTGTTGAATTAGCTTGCCTGATGTTAAGGGCTGGCGTGCACGAA
P.trituberculatus	CTGCTCTGCTGAAGTGTGTGGAACCTGCCATAGGAGATGTGAGGGCTGGCGTCCCGCA
C.sapidus	CTGCTCTGCTGAAGTGTGTGGAACCTGCTATTGGAGACGTGAGGGCTGGCGTCCCGCA
E.sinensis	CAGCCCTACTGAAGTGTGTGGAACCTGGCTGTTGGAGATGTCAGAGGCTGGCGTCCCGCA
Caprella sp.	CTGCTCTGCTCAAGTGTGTGAACTTGCTGTTGGTGTATGTCATGGGCTGGAGGAAGAAGA
P.Hawaiienses	CTGCTCTCCTCAAGTGTGTGAACTGGCTGTTGGTGTATGTCATGGAATGGAGGAACGCA
D.melanogaster	CTGCTCTGCTCAAGTGCATGGAACCTGGCTCTGGCGATGTGATGAACATTGCAAGCGTA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ACAAGAAGGTATGTGAAATTCCTTTCAACTCAACCAACAAGTACCAAGTATCCATTACACA
L.stulirostris	ACAAGAAGGTATGTGAAATTCCTTTCAACTCAACCAACAAGTACCAAGTATCCATCCACG
E.carinicauda	ACAAGAAGGTATGCGAGATTCCTTTCAATTCTACTAACAAGTACCAAGTGTCTATTTCATG
P.trituberculatus	ACAAGAAGGTCTGTGAGATTCCTTTCAACTCAACCAACAAGTACCAAGTGTCTATCCACG
C.sapidus	ATAAGAAGGTTTGTGAGATTCCTTTCAACTCAACCAACAAGTACCAAGTGTCTATCCACG
E.sinensis	ACAAGAAGGTTTGTGAGATTCCTTTCAACTCAACCAACAAGTACCAAGTGTCTATCCACG
Caprella sp.	ACAAGAAGATCTGTGAAATTCCTTTCAACTCAACCAACAAGTACCAAGTGTCTATCCACG

P.Hawaienses	ACAAGAAGATCTGCGAGATTCCCTTCAACTCCACCAACAAATACCAGGTGTCTATCCACG
D.melanogaster	ATAAGAAGATTGCCGAGGTGCCCTTCAACTCCACCAACAAATACCAAGTGTCCATCCACG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ATACTGAGGATAAGAACGACCCACGATACCTTCTTGTGATGAAGGGAGCCCCGAGAGGA
L.stulirostris	AGACCGAGGATAAGAACGACCCACGATACCTTGTGTGATGAAGGGAGCCCCGAGAGGA
E.carinicauda	AAACTGAAGACAAGAACGACCCACGATATCTTCTTGTAAATGAAGGGCGCTCCTGAGAGAA
P.trituberculat	AGACCCAGGACAAGAACGACCTCCGCTACCTGCTTGTAAATGAAGGGTGCTCCAGAGAGGA
C.sapidus	AGACCCAGGACAAGAATGACCTCCGCTACCTGCTTGTGATGAAGGGTGCTCCAGAGAGGA
E.sinensis	AGACACAGGACAAGAATGATCCTCGCTACCTCCTCGTAATGAAGGGTGCCCCGAGAGAA
Caprella sp.	AGACTGAGGATAAGAGCGACCTTAGATACCTTCTTGTGCATGAAGGGTGCCCCGAGAGAA
P.Hawaienses	AAACCGAAGACAAGAGCGATCCCAGGTACCTGCTTGTGATGAAGGGCGCTCCGAGAGGA
D.melanogaster	AAACCGAGGATACCAACGATCCCCGCTACTTGTGCTGTAATGAAGGGAGCCCCGAACGTA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TCCTGGAACGTTGCTCCACCATCTACATCAATGGAGAAGAAAAGGCCCTCGACGAAGAAA
L.stulirostris	TCCTGGAACGTTGCTCCACCATCTACATCAATGGAGAGGAAAAGGCCCTCGACGAAGAAA
E.carinicauda	TATTGGAAAGATCTACAACCATATTCATCAATGGCCAAGAAAAGAACTGGATGAGGAAA
P.trituberculat	TCCTCGAACGATGCTCTACTATCTTATAAAATGGCGAGGAGAAGTCTTTGGATGAGGAGA
C.sapidus	TCCTTGAACGATGCTCCACCATCTTCATGAATGGTGAGGAGAAGCCTTTGGATGAGGAGA
E.sinensis	TCCTTGAGCGATGCTCAACCATCTTCATGAATGGTGAGGAAAAGGCTCTGGATGAGGAAC
Caprella sp.	TCTTGGAAAGTGCTCCACCATTTTCATCAACGGAGAAGATAAGCCCCGATGAAGAAC
P.Hawaienses	TCCTCGAGCGCAGCTCCACTATTTTCGTCAACAACGAAGACAAGCCATTGGACGAGGACC
D.melanogaster	TCTTGGAGCGCTGCTCTACCATTTTTATCAACGGCAAGGAGAAGGTTCTGGACGAGGAGA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TGAAGGAAGCTTTCAACAATGCCTACCTTGAATGGGTGGCCTTGGAGAGCGTGTACTTG
L.stulirostris	TGAAGGAAGCTTTCAACAATGCCTACCTTGAATGGGCGGTCTTGGAGAGCGTGTACTTG
E.carinicauda	TGAAGGAAGCTTTCAACAATGCCTACCTTGAATGGGAGGTCTTGGAGAGCGTGTGCTTG
P.trituberculat	TGAAGGAATCTTTCAACAATGCTTACTTGGAGTTGGGTGGGCTTGGAGAGCGTGTGCTAG
C.sapidus	TGAAGGAATCTTTCAACAATGCTTACTTGAATGGGTGGGCTGGGAGAGCGTGTGCTGG
E.sinensis	TGAAGGAATCTTTCAACAATGCCTACCTTGAAGCTCGGAGGTCTTGGAGAGCGTGTGCTGG
Caprella sp.	TCAAGGAATCTTTCAACAATGCCTACTTGAATGGGAGGTCTTGGAGAGCGTGTGCTTG
P.Hawaienses	TCAAGGAAGCCTTCAACAACGCCTATCTCGAACTCGGAGGCTGGGTGAGCGTGTACTGG
D.melanogaster	TGAAGGAGGCGTTCAACAATGCCTACATGGAACCTCGGTGGACTGGGTGAGCGCTGCTCG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	GTCTCTGCGACTATGTGCTGCCAAGTACACCTCATGGATACCCCTTTGATGCTG
L.stulirostris	GTTTCTGTGACTACATGCTGCCAAGTACACCTCTTGGATACCCCTTCGATGCTG
E.carinicauda	GATTTTGTGATTATTTGCTGCCTTCAGACAAATATCCTCTTGGTTATCCCTTTGATGCAG
P.trituberculat	GCTTTTGTGACTATGTCCTGCCCTCCGACAAGTATCCCTTGGCTATCCCTTCGATGCTG
C.sapidus	GCTTCTGTGACTATGTTCTGCCCTCCGACAAGTACCCCTCGCTATCCTTTTCGATGCTG
E.sinensis	GCTTCTGTGACTACATACTTCCCTCAGACAAGTATCCCTGGGTTATCCCTTCGATGCTG
Caprella sp.	GTTTCTGTGACTACAGACTGCCTGTGACAAATACCCTGTTGGTTTCCCATTCGATTCTG
P.Hawaienses	GCTTCTGCGACTACAGACTGCCTGCTGACAAGTACCCTATTGGCTTCCATTCGATGCTG
D.melanogaster	GTTTCTGTGACTTTATGCTGCCATCCGACAAGTATCCCAACGGCTTTAAGTTCAACACCG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ATGCTGTAAACTTCCCTGTCCATGGTCTGCGCTTCGTTGGTCTGATGTCTATGATTGATC
L.stulirostris	ATGCTGTGAACTTCCCTGTCCATGGTCTGCGCTTCGTTGGTCTGATGTCCATGATTGATC
E.carinicauda	ACAACGTAAACTTCCCGGTTACGGGCTTCGATTGTAGGTTGATGTCCATGATTGATC
P.trituberculat	ATGCTGTAACTTCCCTGTGACGGCTTCGATTGTAGGTTGATGTCCATGATTGATC
C.sapidus	ATGCTGTCAACTTCCCGGTTGACGGTCTTCGATTTCGTTGGCTCATGTCCATGATTGATC
E.sinensis	ATTCTGTCAATTTCCCGGTTACATGGCCTCAGGTTTGTGCGACTCATGTCCATGATTGATC
Caprella sp.	ACAACGTAAACTTCCCGGTTGACTCCCTCGGTTTCGTTGGTCTCATCTCTCTGATTGATC
P.Hawaienses	ATAACTGCAACTTCCCGGTTGACGGCCTCCGCTTCGTTGGGCTCATCTCACTCATTGATC
D.melanogaster	ACGACATCAACTTCCCCATCGATAATCTGCGTTTCGTTGGGCTTATGTCCATGATTGATC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CTCCACGTGCTGCTGTACCTGATGCTGTAGCAAAGTGCAGATCTGCTGGTATCAAGGTTA
L.stulirostris	CTCCTCGTGTGCTGTACCCGATGCTGTAGCAAAGTGCAGATCTGCTGGTATCAAGGTTA
E.carinicauda	CTCCCAGGGCTGCTGTACCTGACGCTGTTGCAAAGTGCCGATCTGCTGGTATTAAGGTAA
P.trituberculat	CTCCCCGTGCTGCCGTGCCGACGCTGTGGCCAAGTGCCGTTCTGCTGGTATCAAGGTCA
C.sapidus	CTCCCCGTGCTGCTGTGCCGACGCTGTGGCCAAGTGCCGTTCTGCTGGTATCAAGGTCA
E.sinensis	CTCCCCGTGCTGCTGTGCCGACGCTGTGGCCAAGTGCCGTTCTGCTGGTATCAAGGTCA
Caprella sp.	CCCCAAGAGCTGCCGTGCCGATGCCGTCAACAAGTGCCGATCTGCTGGTATCAAGGTCA
P.Hawaienses	CTCCCCGTGCTGCTGTGCCGATGCCGTGCCAAGTGCAGGTTCTGCCGGTATCAAGGTCA

D.melanogaster	CCCCACGTGCTGCCGTGCCGGATGCCGTTGCCAAGTGCCGATCGGCCGGCATCAAGGTCA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TCATGGTTACTGGTGATCACC C ATCACTGCCAAGGCTATTGCC <u>CAAGTCTGTAGGTATCA</u>
L.stulirostris	TCATGGTTACTGGTGATCACC C ATCACTGCCAAGGCTATTGCC <u>CAAGTCTGTAGGTATCA</u>
E.carinicauda	TCATGGTACTGGTGATCACC C TATCACTGCCAAGCTATTGCC <u>CAAGTCTGTAGGTATCA</u>
P.trituberculat	TCATGGTTACTGGTGATCACC C TATCACTGCCAAGGCCATTGCC <u>CAAGTCTGTGGGTATCA</u>
C.sapidus	TCATGGTTACTGGTGATCACC C ATCACTGCCAAGGCCATTGCC <u>CAAGTCTGTGGGTATCA</u>
E.sinensis	TCATGGTTACTGGTGATCACC C TATCACTGCCAAGGCTATTGCC <u>CAAGTCTGTGGGTATCA</u>
Caprella sp.	TCATGGTCACTGGTGATCATCC C ATCACTGCCAAGGCTATTGCC <u>CAAGTCCGTGGGTATCA</u>
P.Hawaienses	TCATGGTTACCGGTGACCATCC C ATCACTGCCAAGGCTATTGCC <u>CAAGTCCGTAGGTATCA</u>
D.melanogaster	TCATGGTACCGGCATCACCC G ATCACTGCCAAGGCCATCGC <u>CAAGTCTGTCCGTATTA</u> ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	<u>TCTCTGAAGGAAACGAGACTGTTGAGGATATTGCACAGAGGCTGAACATTCCATCAAGG</u>
L.stulirostris	<u>TCTCTGAAGGAAACGAGACTGTTGAGGACATTGCACAGAGGTTGAACATTCCCATCAAGG</u>
E.carinicauda	<u>TTTCAGAAGGAAATGAAACTGTTGAAGATATTGCTCAAAGATTAACATCCCATCAAGG</u>
P.trituberculat	<u>TTTCTGAGGGCAATGAGACTGTGGAGGACATTGCCAAAGACTCAACATCCCATCAAGG</u>
C.sapidus	<u>TTTCTGAGGGCAATGAGACTGTGGAGGACATTGCCAGAGACTCAACATCCCATCAAGG</u>
E.sinensis	<u>TTTCTGAGGGCAACGAGACTGTGGAGGACATTGCCAGAGGCTCAACATCCCATCAAGG</u>
Caprella sp.	<u>TCAGCGAGGGTAACGAAACTGTTGATGATATTGCAAACAGACTGAACATCCCATCAAGG</u>
P.Hawaienses	<u>TCAGCGAGGGTAACGAAACCGTCGAGGATATTGCCAACCGCCTCAACATCCCATCAAGG</u>
D.melanogaster	<u>TATCCGAGGGCAACGAGACCGTCGAGGACATTGCCAGCGCCTCAACATACCCGTCTCTG</u> * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	AGGTTGACCCCACTGAAGCAAAGGCTGCTGTAGTTACGGCTCTGAACTTCGTGACATGA
L.stulirostris	AGGTCGACCCCACTGAAGCAAAGGCTGCTGTAGTTACGGTTCGAACTTCGTGACATGA
E.carinicauda	AAGTTGACCCAGAGAAGCAAAGGCTGCTGTTGTTTCATGGCTCAGAACTCCGTGACATGA
P.trituberculat	AGGTTGACCCCGCGAGGCCAAGGCTGCTGTGGTCCACGGCTCCGAGTTGAGGGACATGA
C.sapidus	AGGTCGACCCCGCGAGGCCAAGGCTGCTGTGGTCCACGGCTCTGAGTTGAGGGACATGA
E.sinensis	AAGTTGATCCTCGTGAAGCAAAGGCTGCTGTGGTTCACGGCTCTGAGCTGAGGGACATGA
Caprella sp.	AGGTTGATCCAGACAAGCTAAAGCTGCTGTTGTTGCACGGTATTGAACTCAGGGACATGA
P.Hawaienses	AGGTCGACCCAGACAAGCGAAGGCTGCTGTTGTTGCACGGTATTGAACTCAGGGACATGA
D.melanogaster	AAGTGAAATCCCGCGAGGCCAAGGCCCGCGTCCATGGCGCTGAGCTTCGTGATGTGT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CATCTGAGCAGTTGGATGATGTCTCCTCCACCACACTGAAATCGTGTTTGCCCGTACCT
L.stulirostris	CATCCGAGCAGTTGGATGATGTCTCCTCCACCACACTGAAATCGTGTTTGCCCGTACCT
E.carinicauda	CTTCCGAACAGTTGGATGATATCCTCCTTCATCACACTGAGATTGTGTTGCTCGTACTT
P.trituberculat	CTTCTGAACAGCTGGATGACGTCTCCTTATCCATCACACTGAGATTGTGTTGCCCCGTACCT
C.sapidus	CTTCTGAACAGCTGGATGATGTCTCCTTATCCACCACACTGAGATTGTGTTGCCCCGTACCT
E.sinensis	CTTCTGAGCAGCTTGGATGATGTCTCATCCATCACACAGAAATGTGTTTGCCCGTACCT
Caprella sp.	CTTCTGATCAGTTCGACGACATCTCAGGCCACACACCGAGATCGTGTTGCTCGTACAT
P.Hawaienses	CCAGCGACCGCTGGATGAAATCCTCCGCTACCACACCGAGATCGTCTTCGCCCCGTACCT
D.melanogaster	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CCCCACAACAGAAACTGATCATTGTAGAGGTTGCCAGCGTATGGGTGCCATTGTGGCTG
L.stulirostris	CCCCACAACAGAAGCTGATCATTGTAGAGGTTGCCAGCGTATGGGTGCCATTGTGGCTG
E.carinicauda	CTCCACAACAAAAGCTGATCATTGTAGAGGTTGCCAGCGTATGGGTGCCATTGTGGCTG
P.trituberculat	CCCCACAGCAGAAGCTCATCATTGTGGAGGCTGCCAGCGTATGGGAGCCATTGTAGCTG
C.sapidus	CCCCACAGCAGAAGCTCATCATTGTGGAGGCTGCCAGCGTATGGGAGCCATTGTAGCTG
E.sinensis	CTCCACAGCAGAAGCTGATCATTGTAGAGGCTGCCAGCGCATGGGAGCCATTGTGGCCG
Caprella sp.	CTCCCCAGCAGAAACTCATTATCGTAGAAGGTTGCCAGAGGCTTGGTGCTATCGTAGCTG
P.Hawaienses	CACCCCAACAGAAGCTCATTCGTCGAGGTTGCCAACGGTTGGGTGCCATTGTGCCCG
D.melanogaster	CGCCCCAGCAGAAATGATCATTGTGCGAGGTTGCCAGCGCATGGGAGCTATTGTGGCCG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TAAGTGGTGATGGTGTGAATGATTCTCCTGCTCTGAAGAAGGCTGATATTGGGGTTGCTA
L.stulirostris	TAAGTGGTGATGGTGTGAATGATTCTCCTGCTCTGAAGAAGGCTGATATTGGTGTGCTA
E.carinicauda	TGACTGGTGATGGTGTAAATGATTCTCCTGCTCTGAAGAAGGCTGATATTGGTGTGCTA
P.trituberculat	TAAGTGGAGATGGTGTAAATGACTCCCCTGCCCTCAAGAAGGCCGATATTGGTGTGGCCA
C.sapidus	TAAGTGGAGATGGTGTAAATGACTCCCCTGCCCTCAAGAAGGCCGATATTGGTGTGGCCA
E.sinensis	TGACTGGAGATGGTGTGAATGACTCCCCAGCTCTCAAGAAGGCTGATATTGGCGTGGCCA
Caprella sp.	TCACAGGAGATGGTGTCAATGACTCCCCTGCTCTCAAGAAGCTGATATTGGTGTGCTA
P.Hawaienses	TAACGGGTGATGGTGTCAACGACTCACCCGCTCTCAAGAAGCTGATATTGGTGTGCTA
D.melanogaster	TGACTGGTGATGGTGTCAACGATTCTCCCGCTCTGAAGAAGCCGATATCGGTGTGCCA

```

* * * * *
P.monodon      TGGGTATTGCTGGTTCTGATGTGTCCAAGCAAGCTGCTGACATGATCCTGTTGGATGACA
L.stulirostris TGGGTATTGCTGGTTCTGATGTGTCCAAGCAAGCTGCTGACATGATTCTGTTGGACGACA
E.carinicauda  TGGGTATTGCTGGTTCTGATGTATCAAACAAGCGGCTGACATGATTTTGGATGATA
P.trituberculat TGGGTATTGCTGGATCCGACGTGTCTAAGCAGGCTGCTGACATGATCCTGTTGGATGACA
C.sapidus      TGGGTATTGCTGGATCAGACGTGTCTAAGCAGGCTGCCGACATGATTCTGTTGGATGACA
E.sinensis     TGGGTATTGCGGGTCCGACGTGTCCAAGCAGGCTGCTGACATGATTCTGTTGGACGACA
Caprella sp.   TGGGTATTGCTGGATCTGACGTATCAAACAAGCTGCTGACATGATCTTGCTTGATGATA
P.Hawaienses   TGGGTATTGCCGGCTCGGACGTATCAAACAAGCCGCTGACATGATCTTGCTCGACGACA
D.melanogaster TGGGTATAGCCGGTCCGATGTGTCCAAGCAGGTAA--GAAATCAGATTATT--ATGATA
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P.monodon      ACTTTGCTTCCATTGTCACCTGGTGTGGAAGAGGGCAGACTTATTTTCGACAACCTGAAGA
L.stulirostris ACTTTGCTTCCATTGTCACCGGTGTTGAAGAGGGCAGACTTATTTTCGACAACCTGAAGA
E.carinicauda  ACTTTGCTTCCATTGTCACCTGGTGTGGAAGAGGGTAGACTGATTTTGGATAACCTGAAGA
P.trituberculat ACTTTGCTTCTATTGTCACCTGGTGTGGAAGAGGGCAGGCTTATTTTGGATAACCTGAAGA
C.sapidus      ACTTTGCTTCTATTGTCACCTGGTGTGGAAGAGGGCAGGCTTATTTTGGATAACCTGAAGA
E.sinensis     ACTTTGCCCTCCATTGTCACCGGGGTGGAAGAGGGCAGGCTTATTTTGGATAACCTGAAGA
Caprella sp.   ACTTCGCTTCCATTGTTACTGGTGTGGAAGAAGGTCGTCTCATTTTCGACAACCTGAAGA
P.Hawaienses   ACTTCGCTTCCATTGTCACCTGGCGTCGAGGAGGGTCGTCTTATCTTCGATAATCTGAAGA
D.melanogaster AAAGTGGGACCGG-ACAAAAAATATCACCAAAATTGGCCTTCCATTAGGCAGTAATTATA
* * * * *

P.monodon      AATCCATTGCT-TACACCCTGACATCTAACATCCCTGAGATCTCTCCTTTCTGTTCTT-
L.stulirostris AATCCATTGCT-TACACCCTGACATCTAACATCCCTGAAATCTCTCCTTCTGTTCTT-
E.carinicauda  AGAGTATTGCT-TACACACTGACCTCCAACATCCCTGAGATCTCCCCCTTCTGTTCTT-
P.trituberculat AATCTATTGCC-TACACCCTCACTTCAAACATCCCTGAGATCTCCCCCTTCTGTTCTT-
C.sapidus      AATCTATTGCC-TACACCCTCACTTCAAACATCCCTGAGATCTCCCCCTTCTGTTCTT-
E.sinensis     AATCTATCGCC-TACACCCTCACTTCAAACATCCCCGAGATCTCACCTTCTGTTCTT-
Caprella sp.   AGTCCATTGCC-TACACCCTCACTTCAAACATCCCTGAGATCTCTCCTTCTGTTCTT-
P.Hawaienses   AGTCCATCGCT-TACACTCTCACTTCAAACATCCCTGAAATTTCTCCTTCTGTTCTT-
D.melanogaster ATTTTAAAGCAGCATAAAATTAATTTGAAAATGAGTGTGATATTTT-TTCTTGTCCACG
* * * * *

P.monodon      CATGATTGCCTCAGTCCCCTTCTCTTGGAACTGTGACCATCCTCTGCAT--TGATCTG
L.stulirostris CATGATTGCCTCAGTCCCCTTCTCTTGGAACTGTGACCATCCTCTGCAT--TGATCTG
E.carinicauda  CATGATTGCATCTACTCCCTGCTTCTTGGAACTGTGACCATCTCTGCAT--TGATTTG
P.trituberculat CATGATTGCCTCCGTGCCTCTTCTCTGGGCACCGTCACCATTCTCTGCAT--TGATCTG
C.sapidus      CATGATTGCCTCCGTGCCTCTACCTCTGGGCACTGTTACCATTCTCTGCAT--TGATCTG
E.sinensis     CATGATTGCCTCCGTGCCTCTTCTCTGGGAACAGTTACCATCCTCTGCAT--CGATCTG
Caprella sp.   CATGGTTGGCTCAGTACCCCTGCCCTTGGAACTGTAACCATTCTTTGCAT--TGATCTG
P.Hawaienses   CATGTGTGCCTCTGTGCCACTTCTCTAGGCACTGTACCATTCTTTGCAT--CGATCTC
D.melanogaster CATTAACCATCCATATTAACATTTAAAAGGATTTTGTGAAATACGCGTTTAAATGTTTT
*** * * * *

P.monodon      GGTACTGACATGGTGCCTGCCATTTCCCTTGCCATGAAGAAGCTAAGTCTGATATTATG
L.stulirostris GGTACTGACATGGTGCCTGCCATTTCCCTTGCCATGAAGAAGCTGAGTCTGATATTATG
E.carinicauda  GGTACTGACATGGTCCCTGCCATTTCACTTGATATGAAGAAGCTGAATCTGACATTATG
P.trituberculat GGTACTGACATGGTGCCTGCCATTTCCCTTGCCATGAAGAAGCTGAGTCAGATATTATG
C.sapidus      GGTACTGACATGGTGCCTGCCATTTCCCTTGCCATGAAGAAGCTGAGTCAGATATTATG
E.sinensis     GGTACTGACATGGTGCCTGCCATTTCCCTTGCCATGAAGAAGCTGAGTCAGATATTATG
Caprella sp.   -----
P.Hawaienses   GGTACCGACATGGTAAGTACCACACTAAGATCTAGCTAG-----
D.melanogaster AGTATGGGAAAATACGGTATAATTTTCCTTTC---TGCATGAACTCATGTTTTCGGTTTA

```

Anexo 2. Alinhamento de sequências nucleotídicas do gene da Na⁺/K⁺ ATPase das espécies *Daphnia pulex* (Genome *Daphnia* ID hxAUG25p2s4g75t1); *Litopenaeus stylirostris* (GenBank: JN561324.1); *Parhyale hawaiienses* (Sequence ID isotig11552); *Penaeus monodon* (GenBank: KF177338.1). (*) Indica as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os primers.

P.monodon	GCTTCAAGGTCGACAACCTCTTCCCTGACTGGAGAATCCGAACCCAGAGCCGATCATCCG
L.stylirostris	GCTTCAAGGTTGACAACCTCTTCCCTGACTGGAGAATCCGAACCCAGAGCCGATCACCCG
P.hawaiienses	-----CAGGAGAGTCTGAGCCCCAGTCTCGGTCCGCG
D.pulex	AGTTCAAAGTCGACAACCTCTTCAATTGACTGGAGAATCCGAGCCTCAGAGCCGATCTCCCG * * * * *
P.monodon	AATACACTTCCGAGAATCCCTTGGAGACCAAGA <u>AACTTGGCTTTCTTCTCCACCAATGCTG</u>
L.stylirostris	AATACACTTCCGAGAACCCCTTGGAGACCAAG <u>AACTTGGCTTTCTTCTCCACCAATGCTG</u>
P.hawaiienses	ACTTTACAAACGACAACCCCTCTGGAGACGAGGA <u>ACTTGGCTTTCTTCTCTACCAACGCCG</u>
D.pulex	AATTCACCAACGACAACCCGCTGGAAACCAAG <u>AACTTGGCTTTCTTCTCCACCAACGCCG</u> * * * * *
P.monodon	TCGAAGGTA-----
L.stylirostris	TCGAGGGTA-----
P.hawaiienses	TCGAAGGTA-----
D.pulex	TCGAAGGTAATCAAATCTAACCATTTTACACAGAGACCCTTTTTAAACGTTAATTT * * * * *
P.monodon	-----CCTGCAAGGGTGTCTGTTATCATGATTGGTGACAACACTGT
L.stylirostris	-----CTTGCAAGGGTATCGTTATCATGATTGGTGACAACACTGT
P.hawaiienses	-----CTGCCCGGGTGTCTCATCAACATCGGTGACCACCCGT
D.pulex	TTTCTGTTTCATTCAGGTACTGCCAAAGGTATTATTATCAGCATCGGTGACAACACAGT * * * * *
P.monodon	GATGGGTGCTATTGCTGGTTTGGCATCTGGATTGAAACTGGTGAACCCCATGCCAA
L.stylirostris	GATGGGTGCTATTGCTGGTTTGGCATCCGGATTGAAACTGGTGAACCCCATGCCAA
P.hawaiienses	CATGGGTGCTATTGCTGGCCTGGCCACCGCCCTGGAGACTGGAGACACCCCATGCCAA
D.pulex	GATGGGTGCTCATCGCTGGATTGGCTTCCGGTTTGGAGCTCCGGACAGACGCCCATGCCAA * * * * *
P.monodon	GGAAATTACCCATTTCAATTCACATCATTACTGGTGTGGCTGTGTTCTTGGGTGTGACCTT
L.stylirostris	GGAAATTACCCATTTCAATTCACATCATTACTGGTGTGGCTGTGTTCTTGGGTGTGACCTT
P.hawaiienses	GGAAATCGCTCACTTCATCCACATCATACCCGGTGTGGCTGTCTTCCCGAGTGACTTT
D.pulex	GGAGATTGAGCATTTTCAATTCACATCATTACGGGAGTGGCCGTCTTCTTGGGAGTTCCCTT * * * * *
P.monodon	CTTCGTTATTGCCTTCATCCTTGGGTACCATTGGTTGGATGCTGTTGTGTTCCCTCATTTGG
L.stylirostris	CTTCGTTATTGCCTTCATCCTTGGGTACCATTGGTTGGATGCTGTTGTGTTCCCTCATTTGG
P.hawaiienses	CTTCGTCGTTGCCTTCATGTTGGTTACTACTGGCTGGACGCCGTTGTGTTCCCTTATTTGG
D.pulex	TTTCATTATCGCTCTCGCTCTCGGCTACAACCTGGCTCGATGCCGTCATCTTTTAAATCGG * * * * *
P.monodon	TATCATGTAGCCAATGTGCCTGAGGGTCTGCTAGCCACTGTCACTGTGTGCTTGACTCT
L.stylirostris	TATCATGTAGCCAATGTGCCTGAGGGTCTGCTAGCCACTGTCACTGTGTGCTTGACTCT
P.hawaiienses	TATCATGTGCGCCAACGTGCCCGAAGGTCTGCTGGCCACTGTAAGTGTGTCTCACCCCT
D.pulex	CATCATGTGCGCCAACGTACCCGAGGGTCTGCTCGCCACCGTCACCGTCTGTTTGACCCCT * * * * *
P.monodon	TACTGCCAAGCGCATGGCTGCCAAGAAGTGCCTTGTAAAGAAGTGGAGCTGTGGAAC
L.stylirostris	TACTGCCAAGCGCATGGCTGCCAAGAAGTGCCTTGTAAAGAAGTGGAGCTGTGGAAC
P.hawaiienses	CACTGCCAAGCGAATGGCTGCCAAGAAGTGTCTCGTCAAGAAGTGGAGCCGTCGAAAC
D.pulex	GACGGCCAAGCGCATGGCCAAGAAGTGTGTTGGTCAAGAATCTGGAGGCTGTGGAAC * * * * *
P.monodon	CCTGGTTCCACTTCCACCATTTGCTCTGATAAGACTGGTACCCTCACCAGAATCGTAT
L.stylirostris	CCTGGTTCCACTTCCACCATTTGCTCTGATAAGACTGGTACCCTCACCAGAATCGTAT
P.hawaiienses	CCTGGCTCTACGTCCACCATTTGCTCAGATAAGACCGGAACCCCTCACCAGAACCCTAT
D.pulex	CCTGGATCCACATCGACCATCTGCTCAGATAAGACTGGAACCTTGACACAGAACCCTAT * * * * *

P.monodon	GACAGTAGCACATATGTGGTTCGACAACACCATCATTGAGGCTGATACATCTGAAGATCA
L.stylirostrys	GACAGTAGCACATATGTGGTTCGACAATACCATCATTGAAGCTGATACATCTGAAGATCA
P.hawaienses	GACTGTGCGCCACATGTGGTTCGACAACCCAGATCGTCGAAGCCGACACATCTGAGGATCA
D.pulex	GACCGTTGCCCATATGTGGTTCGACGCGCCAAATTATCGAAGCCGATACCAGCGAAAACCA *** * * * * ***** ** * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	GTCTGGCTG-----
L.stylirostrys	GTCTGGCTG-----
P.hawaienses	GTCTGGCGG-----
D.pulex	ATCCGGTAAATTCAAAGAAAACAAAAATGTTTCAATTCGTTTTAGGTTTCATCCGTGATT * * *
P.monodon	-----CCAGTATGACAAGACCTCACAAGGCTGGAAGGCTCTG
L.stylirostrys	-----CCAGTATGACAAGACCTCACAAGGCTGGAAGGCTCTG
P.hawaienses	-----TCAGATCGACAAGGGATCCACAGGATGGAAGGCCCTC
D.pulex	CTGTTTTTTTTTTTGCAGGTGCCCAATACGACAAGACCAGTTTGGGATGGAAGGCCCTG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TCCAGAATTGCTGCCCTCTGTAACCGTCTGTAACCGTCTGTAATTCAGAGTGGCATGGAAAACACTCCC
L.stylirostrys	TCTAGAATTGCTGCCCTCTGTAACCGTCTGTAACCGTCTGTAATTCAGACTGGTATGGAAAACACTCCC
P.hawaienses	TCCACCATCGCTGCCCTCTGCAACAGGCTGAGTTCAGTCCGGACAAGACGGAGTGTCC
D.pulex	TGCCGCGTCTGCTTGCCTGTGCAGCCGAGCCGAATTCAAAATGGGCCAACAGAGCATGCC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ATCCTGAAACGTGAAGTAAACGGCGATGCTTCTGAAGCTGCTCTGCTGAAGTGCGTAGAA
L.stylirostrys	ATCCTGAAACGTGAAGTAAACGGCGATGCTTCTGAAGCTGCTCTGCTGAAGTGTGTAGAA
P.hawaienses	ATCCTGAAACGTGAAGTCAACGGCGATGCTTCCGAGGCTGCTCTCCTCAAGTGTGTGAA
D.pulex	GTTTTGAAACGCGAAGTCAACGGCGAGCCTCTGAGCCGCCCTGTTGAAATGCGTCGAA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TTGGCTGTTGGTGATGTAAGGGCTGGCGTGCACGCAACAAGAAGGTATGTGAAATTCCT
L.stylirostrys	TTGGCTGTTGGTGATGTTAAGGGCTGGCGTGCACGCAACAAGAAGGTATGTGAAATTCCT
P.hawaienses	CTGGCCTGTGGTGACGTATGGAATGGAGGAAACGCAACAAGAAGATCTGCGAGATTCCT
D.pulex	TTGGCCACCGGTGATGCCATGAACATTCGCGGCCGAAACAAGAAGTCTGCCAATCCCG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TTCAACTCAACCAACAAGTACCAAGTATCCATTACAATACTGAGGATAAGAACGACCCA
L.stylirostrys	TTCAACTCCACCAACAAGTACCAAGTATCCATCCACGAGACCGAGGATAAGAACGACCCA
P.hawaienses	TTCAACTCCACCAACAATAACCAGGTGCTATCCACGAAACCGAAGACAAGAGCGATCCC
D.pulex	TTCAACTCGTCCAACAAGTACCAGGTGTCGATCCACGAGAACGAAGACAAGAACGACGGC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CGATACCTTCTTGTGATGAAGGGAGCCCTGAGAGGATCCTGGAACGTTGCTCCACCATC
L.stylirostrys	CGATACCTTGTGATGAAGGGAGCCCTGAGAGGATCCTGGAACGTTGCTCCACCATC
P.hawaienses	AGGTACCTGCTTGTGATGAAGGGCGCTCCCGAGAGGATCCTCGAGCGCAGCTCCACTATT
D.pulex	CGCTACTTTATGGCCATGAAGGGAGCGCCGAGCGCATCTCGATCTCTGCTCGACCATT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TACATCAATGGAGAAGAAAAGGCCCTCGACGAAGAAATGAAGGAAGCTTTCAACAATGCC
L.stylirostrys	TACATCAATGGAGAGGAAAAGGCCCTCGACGAAGAAATGAAGGAAGCTTTCAACAATGCC
P.hawaienses	TTCGTCAACAACGAAGACAAGCCATTGGACGAGGACCTCAAGGAAGCCTTCAACAACGCC
D.pulex	TTCATCAATGGGCAAGAGAAGGTGTTGGACAACGAAGTGAAGGACGCTTTCAACACGGCT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TACCTTGAATTGGGTGGCCTTGGAGAGCGTGTACTTGGTCTCTGCGACTATGTGCTGCCA
L.stylirostrys	TACCTTGAATTGGGCGGTCTTGGAGAGCGTGTACTTGGTCTCTGCGACTATGTGCTGCCA
P.hawaienses	TATCTGAACTCGGAGGCTGGGTGAGCGTGTACTGGGCTTCTGCGACTACAGACTGCCCT
D.pulex	TACATGAGCCTGGGAGGTCTCGGCGAGCGAGTCTCGGCTTCTGCGATTTCAACTTGCCG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ACTGACAAGTACCCTCATGGATACCCCTTTGATGCTGATGCTGTAAACTTCCCTGTCCAT
L.stylirostrys	ACTGACAAGTACCCTCTTGGATACCCCTTCGATGCTGATGCTGTGAACTTCCCTGTCCAT
P.hawaienses	GCTGACAAGTACCCTATTGGCTTCCCATTCGATGCTGATAACTGCAACTTCCCGTGCAC
D.pulex	CTGGACCAGTTCCCAAGGCTTCAAATTCGACGCCGATGAAGTCAATTTCCCATCAAC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P.monodon	GGTCTGCGCTTCGTTGGTCTGATGTCTATGATTGATCCTCCACGTGCTGCTGTACCTGAT
L.stylirostrys	GGTCTGCGCTTCGTTGGTCTGATGTCCATGATTGATCCTCCTCGTGTGCTGTACCCGAT
P.hawaienses	GGCCTCCGCTTCGTTGGGCTCATCTCACTCATTGATCCTCCCCGTGCTGCTGTGCCCGAT
D.pulex	GGATGCGATTTCGTCCGACTCATGTCCATGATCGATCCCCACGTGCCCGGTACCCGAT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	GCTGTAGCAAAGTGCAGATCTGCTGGTATCAAGG-----
L.stylirostrys	GCTGTAGCAAAGTGCAGATCTGCTGGTATCAAGG-----
P.hawaienses	GCCGTGCGCAAAGTGCAGGTCTGCCGGTATCAAGG-----
D.pulex	GCCGTGCGCAAAGTGCCGCTCCGCCGAATTAAGGTAATTGTTTTTCATTTCAACCATTT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	-----TTATCATGGTTACTGGTGATC
L.stylirostrys	-----TTATCATGGTTACTGGTGATC
P.hawaienses	-----TCATCATGGTTACCGGTGACC
D.pulex	AATTGGAATCTTTTTCTAATAATCTTTTATTTATTTAGTTATCATGGTTACCGGTGACC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ACCCCATCACTGCCAAGGCTATTGCCAAGTCTGTAGGTATCATCTCTGAAGGAAACGAGA
L.stylirostrys	ACCCCATCACTGCCAAGGCTATTGCCAAGTCTGTAGGTATCATCTCTGAAGGAAACGAGA
P.hawaienses	ATCCCATCACTGCCAAGGCTATTGCCAAGTCCGTAGGTATCATCAGCGAGGGTAACGAAA
D.pulex	ACCCCATCACTGCCAAGGCTATCGCCCGATCTGTCCGGTATCATTTCCGAGGAGAGTGAAA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CTGTTGAGGATATTGCACAGAGGCTGAACATTCCATCAAGGAGGTTGACCCCACTGAAG
L.stylirostrys	CTGTTGAGGACATTGCACAGAGGTTGAACATTCCCATCAAGGAGGTCGACCCCACTGAAG
P.hawaienses	CCGTGAGGATATTGCCAACCGCCTCAACATTCCCATCAAGGAGGTCGACCCAGACAAG
D.pulex	CCGTGGAAGATATCGCCGAGCGTCTCAACATTCCCGTCGACCGTGTCAACCCGAGAGACG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CAAAGGCTGCTGTAGTTACCGGCTCTGAACTTCGTGACATGACATCTGAGCAGTTGGATG
L.stylirostrys	CAAAGGCTGCTGTAGTTACCGGCTCTGAACTTCGTGACATGACATCCGAGCAGTTGGATG
P.hawaienses	CGAAGGCTGCTGTTGTGCACGGTATTGAACTCAGGGACATGACTTCTGATCAGCTCGACG
D.pulex	CCAAGGCCCGCTCATCCAGGTTGGTGAATTGCGTGACTTGACCCCGCCCAACTCGACG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ATGTCCTCCTCCACCACACTGAAATCGTGTGTTGCCCGTACCTCCCCACAACAGAACTGA
L.stylirostrys	ATGTCCTCCTCCACCACACTGAAATCGTGTGTTGCCCGTACCTCCCCACAACAGAACTGA
P.hawaienses	ACATCCTCAGGCACCACACCGAGATCGTGTGTTGCTCGTACATCACCCCAACAGAACTCA
D.pulex	ACATCCTTCGCTACCACACGGAGATTGCTTTGCCCGCACGTACCTCAACAGAACTCA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TCATTGTAGAAGGTTGCCAGCGTATGGGTGCCATTGTGGCTGTAACCTGGTGATGGTGTGA
L.stylirostrys	TCATTGTAGAAGGTTGCCAGCGTATGGGTGCCATTGTGGCTGTAACCTGGTGATGGTGTGA
P.hawaienses	TCATCGTCGAGGTTGCCAACGGTTGGGTGCCATTGTGCGCCGTAACGGGTGATGGTGTCA
D.pulex	TCATCGTCGAGGTTGCCAACGTGGAGGAGCTATTGTGGCCGTACCGGTGACGGTGTCA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ATGATTCTCCTGCTCTGAAGAAGGCTGATATTGGG-----
L.stylirostrys	ATGATTCTCCTGCTCTGAAGAAGGCTGATATTGGT-----
P.hawaienses	ACGACTCACCCGCTCTCAAGAAAGCTGATATTGGT-----
D.pulex	ACGATTGCGCCGCTTTGAAGAAAGCCGATATCGGTACATGCCCGCACTTAATGTCAATTC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	-----GTTGCTATG
L.stylirostrys	-----GTTGCTATG
P.hawaienses	-----GTTGCTATG
D.pulex	TCTGTAGGATTTTTTCAAATTCATTTGTGTATGATTTCAATTGTAGTGTTGCCATG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	GGTATTGCTGGTTCATGATGTGTCCAAGCAAGCTGCTGACATGATCCTGTTGGATGACAAC
L.stylirostrys	GGTATTGCTGGTTCATGATGTGTCCAAGCAAGCTGCTGACATGATCCTGTTGGATGACAAC
P.hawaienses	GGTATTGCCGGCTCGGACGTATCCAACAAGCCGCTGACATGATCTTGCTCGACGACAAC
D.pulex	GGTATTGCCGGTTCGGATGCTCCTCAACAAGCCGCTGACATGATCTTGTTGGACGACAAC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TTTGCTTCCATTGTCACTGGTGTGAAGAGGGCAGACTTATTTTCGACAACCTGAAGAAA

L.stylirostrys	TTTGCTTCCATTGTCACCGGTGTTGAAGAGGGCAGACTTATTTTCGACAACCTGAAGAAA
P.hawaienses	TTCGCTTCCATTGTCACTGGCGTCGAGGAGGGTCGTCTTATCTTCGATAATCTGAAGAAG
D.pulex	TTCGCTTCCATCGTTACCGGTGTAGAGGAGGGTCGTCTGATTTTCGACAACCTGAAGAAG
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CCATGCTTACACCCGTGACATCTAACATCCCTGAGATCTCTCCTTTCTTGTTCCTCATG
L.stylirostrys	TCCATTGCTTACACCCGTGACATCTAACATCCCTGAAATCTCTCCCTTCTTGTTCCTCATG
P.hawaienses	TCCATCGCTTACACTCTCACTTCCAACATTCCTGAAATTTCTCCCTTCTTGTTCCTCATG
D.pulex	TCCATCGCTTACACCCGTGACATCCAACATTCCTGAGATTTCCCCCTTTTGTATGTTTCAT
	***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ATTGCTTCACTCCACTTCTCTTGGAACTGTGACCATCTCTGACATTCATTCATCTGGGTACT
L.stylirostrys	ATTGCTTCACTCCACTTCTCTTGGAACTGTGACCATCTCTGACATTCATTCATTCATTCATTCAT
P.hawaienses	TGTGCTTCTGTGCCACTTCTCTTAGGACTGTGACCATTCCTTTCATTCATTCATTCATTCATTCAT
D.pulex	CTGCTTGTATTCCTCTCCCTCTCGGAACCGTCACCATCTTGTGTATGATTTGGGTACT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	GACATGGTGCCT-----
L.stylirostrys	GACATGGTGCCT-----
P.hawaienses	GACATGGTAAGT-----
D.pulex	GACATGGTAAATCATTTAGAATTCTCTGACACAAAATACGACGTGGCATTCTAATAT
	***** * * * * * * * *
P.monodon	-----GCCATTTCCCTTGCCTATGAAGAAGCTAAGTCTGATATTATGA
L.stylirostrys	-----GCCATTTCCCTTGCCTATGAAGAAGCTGAGTCTGATATTATGA
P.hawaienses	-----ACCA---CACTAAGATCTAGCTAGGGTACCTGTCAGACTAGAT
D.pulex	TTTACCAACAGGTACCGGCCATCTCTTGCCTACGAAGAATCCGAATCCGACATCATGA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	AGCGCCAGCCCCGAAACCCATTCACCGACAAGCTTGTAACGAGAGGC-----
L.stylirostrys	AGCGCCAGCCCCGAAACCCATTCACCGACAAGCTTGTAACGAGAGGC-----
P.hawaienses	CACGTTTTATAGTGTCTCTGTCCCTACGACGGAGAAGCTCCCAATAT-----
D.pulex	AGCGTCGCCCTCGTAATCCATTACTGACAAAAGCTCAACGAAAGGTAATTGCTTTAAT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	-----TCAT
L.stylirostrys	-----TCAT
P.hawaienses	-----AGTT
D.pulex	TTCTCTAACACTTTATTTGACTTTAAACTGATTTTGTTTATGCTGTCCATTTAGATTGAT
	*
P.monodon	CTCAATGGCCTA--TGTCAGATTGGTATGATTCAAGCCCTGGCAGGATTCTT-----CA
L.stylirostrys	CTCAATGGCCTA--TGTCAGATTGGTATGATTCAAGCCCTGGCAGGATTCTT-----CA
P.hawaienses	GAACATAACCTACATAGTAATATTGACAGGATGTGA--CTTGAAGAGATCCTTGTAGGCA
D.pulex	TCCATGGCCTA--CGGTCAAATTGGTATGATGCAAGCTTCGGCCGGTTTCTT-----CA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CCTATTTCTGATCATGGCTGAGAACGGCTTCCTGCCACCCCATCTGTTCGGTCTCCGTG
L.stylirostrys	CCTATTTCTGATCATGGCTGAGAACGGCTTCCTGCCACCCCATCTGTTCGGTCTCCGTG
P.hawaienses	GCTTGAATGAGACTCAGTGGTAGGATACGATGGTGCAACTGACAATATTATAGAATTCG
D.pulex	CCTATCTTGTCAATTATGGCCGAAACGGATTCAAGCCCGACCTGCTGTTGGGTATCCGTA
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	AGCGCTGGGACAGCAAGCCATCAACGATCTGGAGGATCACT-ATGGACAGGAATGG---
L.stylirostrys	AGCGCTGGGACAGTAAGCCATCAACGATCTGGAGGATCACT-ATGGACAGGAATGG---
P.hawaienses	TATACAGGTAAATGACGTCGGTTTTGTATGAAATGGGCTACTTGTAAATCCTGCTG---
D.pulex	AGCGATGGGATTTCCGATCCGTCAACGATCTCGAAGATTCCT-ACGGACAGGAATGGGTA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	-----
L.stylirostrys	-----
P.hawaienses	-----
D.pulex	AGGAGAAATCAAATGTCACACTGGATTTGATTTTGTGGTTTCATCAATTTTATTCATCC
P.monodon	-----ACCTTCCACGACCGTAAGATTCTTGAGTACACCT----GCCATAC
L.stylirostrys	-----ACCTTCCACGACCGTAAGATTCTTGAGTACACCT----GCCACAC

P.hawaienses	-----ATATTCATAGACTGTTGCACCGTAGAATATACTTTGGGACAAC
D.pulex	GCCAACTTCATTCAGACGTACGATGCCCGCAAGCAACTCGAGTACACCT----GCCACAC * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	TGCCTTCTTCACCTC-TATTGTGATTGTGCAGTGGGCTGATTTGATCATTGCAAGACCC
L.stylirostrys	TGCTTCTTCACCTC-CATTGTGATTGTGCAGTGGGCGGATTTGATCATTGCAAGACCC
P.hawaienses	GGTGTACTACATTAAGTACTATAGCCGACCAGGGCTTAGGATAGACTATTGAAAGGACTA
D.pulex	TGCCTTCTTCGTATC-GATCGTTATTGTGCAATGGGCGGATTTGCTCATTGCAAAACCA * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	GCCGTAACTCCATTGT-CCACCAGGGCATGAAGAAGTGGGTGCTGA-ACCTTGGCCTCGT
L.stylirostrys	GCCGTAACTCCATTGT-CCACCAGGGCATGAAGAAGTGGGTGCTGA-ACCTTGGTCTCGT
P.hawaienses	GAAGCAATACTGATGAGCCATGTGGAGATGAAGTCCAAACTGCCGGCGTCTCACATGGC
D.pulex	GACGCAACTC-ACTCTTCCAGCAAGGCATGCGCAATCACGTCTCTCA-CCTTCGGTCTCTT * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CTTTGAAACCACTTTGGCTGCCTTCCCTTTCCTACACTC--CAGGCATGGACAAGGGTCTT
L.stylirostrys	CTTTGAAACCACTTTGGCTGCCTTCCCTTTCCTACACCC--CAGGCATGGACAAGGGTCTT
P.hawaienses	TGATGGAATGGTTTTTAAAGAGACAAAATCCTTGCAATTTGCAGAAAATTGAAGTGAACCTT
D.pulex	TTTCGAGACGGCCGTCGCTGCTTCCCTCTGCTACACGC--CCGGCATGGACAAGGGTCTT * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CGCATGTACCC-----ACTGAAGTTCT---ACTGGTGGCTGCCTGCTC-TTCCGTTCTC
L.stylirostrys	CGCATGTACCC-----ACTGAAGTTCT---ATTGGTGGCTGCCTGCTC-TTCCGTTCTC
P.hawaienses	GGGTGTACTTTTT--AGTTTTAGCTTTCCG-AATTCTGTCAAATTCAGT-TTCAGTAGAA
D.pulex	CGCATGTACCCGCTCAAGTAAGGATTTGTTTCAATTTGTTGTGGTGTATTCTTCCGGAATA * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	CCTCCTTAT--CTTCATCTATGATGAGATAC---GTCGCTT-----CATCCTGCGTAGGA
L.stylirostrys	CATCCTTAT--CTTCATCTACGATGAGATAC---GTCGCTT-----CATCCTGCGAAGGA
P.hawaienses	TCTATTTAATACGCCACCTCTGATCTCATTCA--GTTGATCAAGGGCAGCCAGAGCGTGG
D.pulex	TTTACTAAA-AAAACAACCTTTCATGAATGCAGGATCAACTGGTGGGGCCCGCTCTTCC * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	ACCCTGG-TGGTTGGATGGAAGTGG----GAGACCTACTA-TTAA-----
L.stylirostrys	ACCCTGG-TGGTTGGATGGAAGTGG----GAGACCTACTA-TTAA-----
P.hawaienses	GTCACGCCTCGCCCTATAGAAATC----GAG--CGGCAA-TCGACCCAAATGGGGTTTAC
D.pulex	GTTCTCTCTCCTCATCTTCACCTACGATGAAATTCGCAAGTTTATTCTTCTGTAACAATCC * * * * * * * * * * * * * *
P.monodon	-----
L.stylirostrys	-----
P.hawaienses	CAGTACTCAAGGTTGCCGGTCAGAGGAAAAGAAAGTACCTAGTCTCTCACAGACGTATTG

Anexo 3. Alinhamento de seqüências nucleotídicas do gene da anidrase carbônica citoplasmática das espécies *Callinectes sapidus* (GenBank: EF375490.1); *Pennaeus monodon* (GenBank: EF672697.1) e *Parhyale hawaiienses* (Sequence ID: GIAFTRM02FUWBU).(*) Indicam as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os *primers*.

<i>C. sapidus</i>	----GTGTGTCACAAAGTATCAGTGGAGGAACACGTCACCTCGCT-ACAACTAACCATGGT
<i>P. hawaiienses</i>	-----
<i>P. monodon</i>	CTGTACCAGAAACACGTGCTCGCCCGCTTTCCTTCCTCTCTCTGACAGTTAAAC ATGGT
<i>C. sapidus</i>	CGGCTGGGGATACGCAAAGGCAAATGGACCAAGCACGTTGGCCAGCAATGTTCCAGTGGC
<i>P. hawaiienses</i>	-----GGATACGCTAAGGCCAACGGCCCCCATACTGGAGCAAGGAGTTCCCCATTGC
<i>P. monodon</i>	TGGCTGGGGATATTTCAAGACAAACGGTCCCGCTACTTGGGCCAGCCTTACCCCATTCG
	***** * ** * ** ** ** * ** * ** * * ** * ** *
<i>C. sapidus</i>	GGGGGCGAGCAAGCAGTCCCCATTGACATCAAGAGGGCAGGCTGCCCTGAGGACCCGAG
<i>P. hawaiienses</i>	TGCAGGAAAGAATCAGTCGCCCATTTGACATCAAGCGCGCCATCTGCTCCCAAGACTCTGC
<i>P. monodon</i>	TGGTGGCAGTCACCAGTCCCCTATTGACATCAAGGGGTCAAGTTGCCCATGCGACGGTAA
	* ** * * ***** ** ***** * ** * ** *
<i>C. sapidus</i>	GCTCAACAAGATCCGCGCTGCCTACGCCGACATCATGATCTCCGAACTCTCCAACAGCGG
<i>P. hawaiienses</i>	CCTGAAGCCCATCGCTGTGGACTACCCGCCGTGGAGGTGGGGGAGCTTGGCAACACGGG
<i>P. monodon</i>	CCTAACTGCCATTTCAGGGCAGATATCAAGACATCAGGATCTCTGAGCTCTCCAACAGCGG
	** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
<i>C. sapidus</i>	AGCCTCGTGGAAAGGCGCAGATCGGCAGCGGCAGGTCAAGCCTGCGCGGAGGACCTCTTGG
<i>P. hawaiienses</i>	CAGCTCCTGGAAGGCGCAGGTACCGGGGGAAAGTCTAGCCTGACTGGAGGGCCACT---
<i>P. monodon</i>	ACATTTCATGGAAGGCTCAGGTTGCTGGGGAAAGTTCAAGCCTAAAAGGAGGACCTCT---
	** ***** ** * * ** * ** * ** * ** * ** *
<i>C. sapidus</i>	GGATGATGAGTACGTGTTGGAGCAGTTCACCCCTCACTGGGGCAAGACTAACGAGAGAGG
<i>P. hawaiienses</i>	ATCCTCCAAGTACGCCCTGGAACAGTTCACGCCACTGGAGTAACACCAGAGAGTGGG
<i>P. monodon</i>	GTCGGACGAATACGTATTTGGAACAGTTCATTGCCATTGGGGTAAGACAAATGAACTGG
	* **** * ** * ***** ** * ** * ** * ** *
<i>C. sapidus</i>	CTCTGAACACACTGTAGATGGCACCTGCTACCCCGTGAGCTTACCTGGTACTACTGGAA
<i>P. hawaiienses</i>	CAGCGACACACCGTCGACGGAATTGCCCTACGCTGCAGAGCTCCATCTCGTTCACTGGGA
<i>P. monodon</i>	ATCTGAACACACCGTCAATGGTCACTGCTACTCTGGGGAGTTGCATTTGGTGCCTGGAA
	** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
<i>C. sapidus</i>	CAAGAGCAAGTTTTCCA-GCTT-CGCCAGGCTGCGGCCAGTGAAGGAGGTCTGGCCGTG
<i>P. hawaiienses</i>	CACGGAAAAATTCAAAAAGCTTACGGAGAGGCAGCGTCTGTGAAGGGCGGACTGGCTGTA
<i>P. monodon</i>	CAAGACCAAGTTTAAACA-GTTT-TGCTGAAGCTGCAGCTGCTGAGGGTGGTCTTGCTGTA
	** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
<i>C. sapidus</i>	CTGGGGATGTTCCCTAACTATTGGACAGGAGCACCCGGAGATGTCCAAGATC--TGTAACC
<i>P. hawaiienses</i>	CTCGGGATGTTCCCTAAAGGTTGGCAAAGCGAATGCTGAGCTGGAGAAACTCAACGAAGCT
<i>P. monodon</i>	CTTGGGATGTTCCCTTGTGTTGGCAACGAGCATGCTGAGCTGGGTAAGGTTA--GCAAGC
	** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
<i>C. sapidus</i>	TGCTGCCCTTCATCAGCCACAAGGGTCAGGCCATCACCGTGACGAACCCTGTGCGCCAG
<i>P. hawaiienses</i>	AGCTGTCATTCA-----
<i>P. monodon</i>	TGCTCCCTTCATTTCAGCACAAAGGCCAAGCTATTACATTAAGTATCCAGTTAACCAG
	** * ** * ** *
<i>C. sapidus</i>	AGACCTTCTGCCAAAGAATGGGTCTTACTACACATACAGCGGCTCCCTCACCACCCCGC
<i>P. hawaiienses</i>	-----
<i>P. monodon</i>	CAGCTTTCCTGCCTGGCAGTGGATCTTATTTGGACCTATTCTGGCTCCCTCACTACCCAC

Anexo 4. Alinhamento de sequências nucleotídicas do gene da anidrase carbônica aderida a membrana das espécies *Litopenaeus vannamei* (GenBank: JX975725.1); *Portunus trituberculatus* (GenBank: JX524150.1) e *Parhyale hawaienses* (Sequence ID: isotig09088).(*) Indica as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os *primers*.

L.vannamei	GGCAGTTGGCCGCGTGCCTCGCAAGTGATCAGTCACACATAGGAAACCATCCGGCCTCCC
P.tritubercul	---AGTCAGCCTCCCGCACCTCC--TCCTCTTCTACGCCTCC---TTCTCTGACCCTCC
P.hawaienses	-----GGAATTTTCACTGTTCCTT * * *
L.vannamei	TGCCGCTGTCTGCTGTCTGTCTGCCCTTCATTAGCTAACATGGCTCTCTCCTTCGTGCTCG
P.tritubercul	C-----TCTGCAGCAGTCTCGCCGCCACCGCCCATGGTCGCGCTTCAAGTGGTGA
P.hawaienses	TACCACGTTTTACTGGTATC----CTATAATAGAGACAATGATGACGCGTGCAGCCATCA * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TTCTCGCCTTGGCAATCTTCGCTGAAGAACCCTCGCCGCCGCGGAGCCCAGTGGGGTT
P.tritubercul	TCTGTGTGTCTGTCTCTCGTGCAAGGTGCCCTCTGGTTCAGGAGGCTCCGAGTGGACCT
P.hawaienses	TTC-----TGGGCCTCATAGCGACGTGCTTTGTTTCACGAAGGAAAGTCGCACTGGGGCT * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	ACACAGGGGAACATGGGACGGCGCACTGGGGCTCCATCTTCAGGTCTGCAGCGGCCAGC
P.tritubercul	ATACGGGACAGCATGGACCTTTCAGTGGGGTCCATGTTCCAGTCTGCAGCAGGCAGCC
P.hawaienses	ATATGGGCCACGAAGGTTTTGACCGCTGGCCTGAGCTGTACCCACCTGCAATGGGTCTC * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	GGCAGTCGCCCATCAACATCGAGACGAGCAATGTCAATGTCGAGTACTGGCGTCCATTCA
P.tritubercul	GTCAGTCCCCCATCAACATTGAGACCCTGAACGTGAAGCAGGAATACTGGAAGCCCCTGC
P.hawaienses	ACCAGTCTCCCATCAACCTTGACCCGTTCTTTTCATCCGTGGGGGCTTTTCGAACTTTCT * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TACTCAAGAACTACGACCAGCCTCCACGCGCATGCGCATCAAGAACAATGGCCATTTTCG
P.tritubercul	GTCTCAAGAACTACGAGAAGGCGCCCTCCAAGATGCGTGTCAAGAACAATGGCCATTTCAG
P.hawaienses	ACTTCAGTACTATCACGAGGTGCCATTGGAAGCCACCCTCATCAACAACGGCCACGCGC * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	CCCAGGTTGAGATGGACGCCAGGCGGCGCCCGCGTGCAGCGACGGAGGACTCAAGGGCG
P.tritubercul	CCCAGGTGGAGATCGACGCCCGCGTGGCCCAAGAGTACTGGTGGAGGACTCAAGGGTG
P.hawaienses	TGGAGGTGAAGATGAAAGCTGCAACCAACCCGAAGTGTGCGGGGGGAACCTGGGCTCTT * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	AGTACATCTTCGCTCAGTTCCTTCCACTGGGGGCACGACTCCAGCCTCGGC <u>TCCGAGC</u>
P.tritubercul	AATACATCTTGCCAGTTCCTTCCACTGGGGGGCAGACTTACTCGCGGCTCTGAGC
P.hawaienses	CCTACACCTTCGACCAGTACCACATGCACTGGGGGGTGGACGACCTCAGGGGGTCTGAGC * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	<u>ACACCATCGAC</u> GGCGTCAAGTACCCGATGGAGCTCCATCTCGTCCACTACAAGGGCGCCT
P.tritubercul	<u>ACACCATCGAC</u> GGCGTCAAGTACCCGATGGAGCTCCACATGGTGCCTACAAGGGTTCCT
P.hawaienses	<u>ACACCATCAACT</u> TACGTCAAGTACCCGATGGAGCTGCATCTGGTGCACCACAAGACAGAGT * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	ACGGATCCCTGGCAGAGGCTGTGAAGAAGGCCGACGGTCTGGCAGTTTTGGGCGTGATGC
P.tritubercul	ACGGCACTCTGGGTGAGGCTGTGAAGAGGAGGACGGCCTGGCTGTGCTTGGCGTGATGC
P.hawaienses	ACGGCAACCTGTGCGCGGCCCTCGAGCATCCAGACGGGGTTCGGGTTCTCGGGCTTCTCT * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TTGAGGTCTCCAACAGCGACAACCCCGCCCTCACCCCCCTCGTCACCGCCCTCAGAAATA
P.tritubercul	TCGAGGTATCCAGTAATGATAACCCAGCCCTTGCTCCCTCGCCACTGCCCTTCTCAACG
P.hawaienses	TCGTGATTTTCAAGACACGACAACCTGCCCTCGCACCCTCATCTCGCAGTGCAGCGCCA * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TCACCGACTCAGGCATGTTTTGCCGAAGTGGACGCCAGGCACCCCTCCGTGCCTTCCTGC
P.tritubercul	TGACGGATGCTGATATGTTCCGCTGAGATCTCCGCCATGTACCCACTGAAGGCCCTCCTGC
P.hawaienses	CCGAAGAAGTTGGGGAACATGTGGTTACGACCGATATGTAC <u>CCCT</u> CTGACGTCCGTCTCTGC * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	CGAGGAACCTGGACACCTTCTACAGGTACTCGGGCTCCCTCACCACGCCCACTTGAACG
P.tritubercul	CGCGTAACATCGAGAAGTTTTACCGATACGAAGTTCCTCACCACCCCGACTTGAACG

P.hawaienses	CCAGGGACCTCTCCCCTTCTACCGCTACCGTGGATCCCTTACAACCTCCCACGTGCAACG * * * * * ** *** * *** ** ***** ** * * * * * *****
L.vannamei	AAGTAGTAACCTGGACTGTCTTCGCGGACGCCATCACCATCTCCGAGAAGCAGCTGAACG
P.tritubercul	AGGTGGTCACGTGGACTGTTTTGACGAGGCTATCTCCATCTCTGAGCGACAGCTGAACA
P.hawaienses	AAGTCGTCACGTGGACCATTTTTGATGATCACGTGCCCGTCTCTGAGAAGCAAATGGCAA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	CCTTCCGGGCCCTTGTAGACGACCACAACCAGCCAATCGTCAACAACCTCCGACCTCCTC
P.tritubercul	ACTTCCGTGCCATGATGGATCCCCACGGCGGCAAGATTGTCGACAACCTCCGCCCCCCCC
P.hawaienses	GTATCAGTCCCTTGAAGACTCCGACGAAGAGCAGCTGGTGAACAATTTCCGGCTCTAC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	AGCCACTCAACCACCGCAAGGTAATGGTGTGTCAGGCAAGTCTGATGCTGATTCTGCTGCCT
P.tritubercul	AGCCACTCAACAACAGGAAGGTGTTTCGTGTCCGCCGAGAGCAGCGCTGACTCCTCCACCA
P.hawaienses	AAGACCTCAACGACCGCACTGTGTACCGTCTTTAAAA--AGTAA-AGCTCCGCCCCCT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TGAAGAAAGTTGGGCTCACCTTTACTTTCATGACCTCCATGGCCGTCCTGATGATGAACA
P.tritubercul	TGAAGAAGTTCGGGCTCACTTTTTACTTTCATGACCTCTATGGCAGTGCTCATGATGAATA
P.hawaienses	TAGATTCTGCCCCGAGCCACGCAGATGCAGCTTCACTCTACACGTCTTCCCCTGCAC- * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TGTAGAATCCTTT-----TCTGCCACCATTGCCAACACCTTCTTCTCCTCCACTACGCC
P.tritubercul	TGTAAATGCCTTCTCCTCCACCTCCACCATCACAACAACCTTCTCCTGCATTTTCTCC
P.hawaienses	TGAGGCCATTTTCT---TTCACAGGCCATGTTGAAATGGTTATTACGGGATCTTATT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	AATATCATT--ACAAACACCTGAACGTGGTGGGAGATGAGTCGAGAGATTGCCCATCGAA
P.tritubercul	CTCCCCACTCTTCTCCTCCTCCCTCCGGTGCAGGGGGCGGTGGAGGGGGCGGACGGGGTGA
P.hawaienses	TTCTCTGAT-----ACTTCATGTCCTAATCAGTGGACCAGTCAA-----CTCATATCTAT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	GGAAGTGTGATGCGGCTTCCCTGACGCTCCCCGCCCGGGGACAAGATCACAAGACT
P.tritubercul	GGGG-TGTGGGTGCAGGG--CGTGGTGTCTCTGCC-----ACT
P.hawaienses	TGTG--TTAACTACTTGATTTGTGGTGGCATCTAGT-----AAT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TGGCTGACGACAAGCTGCAGCGCCACATACAAGTCTAGCAAAGAAAGTACATTCAGCTA
P.tritubercul	TTTGTGACGTCGG--TGCCTCGC-GCACAC---TTTTGC-----GTCAC--CCAG---
P.hawaienses	TTG--AACCTCAACTATCAGCTGAAATTTGTGACCTATGG-----ATTACAGCAA--- * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TGTTTTGACTAACAATAGAAAATCAGGGGGCCTTGTAACATTTGTTCCGACAGCAGTTTT
P.tritubercul	TGGAAGGAGAACCGACGGAGAACCGAAGAG---GTGAACCGCTGCCATCATCACCATCA
P.hawaienses	-ATAGGAACCTATGACTAACAATAAAGCTTGTATTGGCATCAGTTAAAACCTTCGGACT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TTAGGGTATTTTTACTAATACAAGGG-AATTTTGACAGATTTCTGGGTACTTCTCAAT
P.tritubercul	CCACCATTGTCGCCACCATCAGTATTGTTAATAGTGAAGTTTTTACGTTGCC---
P.hawaienses	TATGAGTAATAAATA--GTAAATATTTCAATACTAAGATAACAGCTGGAA----- * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	CAAGAGCGATGGAGATAGCTGGCAAAGACTGGTGTATTAGGCAACTCAAGTGTCTTCT-GG
P.tritubercul	CAGTACCGA-GTAATTTACT--CATGAACCGCCGCT-----TCACACACTCACT-CA
P.HAWAIENSES	-ACGGACTAAATGAGTTACTGGTAAAAACTTGACATTTA-----TGAGAAACAGACTACA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	CTGCGAGGGCCACGGCGCCCTTAGGTGTTTCAGCATTGTAGGATCTTTTTTGAACACAT
P.tritubercul	CTGTATGAAGCTC--CGAATTTGAGACACTTTTCATTTTTTTT-TCTTTTTTCAATGTCAT
P.hawaienses	AAGTAGGACCTAT----- * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
L.vannamei	TATCTAAGGACTTTCTAGGAATTTTTGATTAC--ACATTGTTTTTAAGCTGACCTTAA
P.tritubercul	TGTTTTATGCTTTTCAATTTACTCAAGACTACGAGAAATAAGTTCAAGGAGTATGACGAA
P.hawaienses	----- * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Anexo 5. Primeiro alinhamento de sequências nucleotídicas do gene da V-H⁺-ATPase das espécies *Artemia franciscana* (GenBank AY197611); *Drosophila melanogaster* (GenBank NM057560.4); *Expaleomon carinicauda* (GenBank KF442413).(*) Indica as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os primers.

P.hawaienses	-----
D.melanogaster	CATCGACAAGGGACCCCAATTTCTGGCTGAGGATTTCTGGACATCCAGGGCCAGCCCAT
A.franciscana	CATTGACAAGGGACCAAGTATTTTGCCGAAGAGTTTTTTAGATATTC AAGGT CAGCCAAT
E.carinicauda	CATTGATCAAGGCCCAACTGTGCTAGCTGAAGATTTCTTGGATATCCAAGGT CAGCCCAT
P.hawaienses	-----ATGATCCAGACTGGTATTTCTTCTATTGA
D.melanogaster	CAACCCCTGGTCGCGTATCTACCCCGAGGAGATGATCCAGACCGGTATCTCGGCCATCGA
A.franciscana	TAATCCCTGGTCCCCTATTTTCCAGAAGAAATGATTCAAACAGGAGTATCATCAATTGA
E.carinicauda	TAACCCCTGGTCCCCTACTTACCAGAGGAGATGATT CAGACCGGTATTTCTTCCATTGA ***** ** ** * * ** * ** * ** **
P.hawaienses	TGTGATGAACTCTATTGCCAGAGGTCAGAAGATTTCCATCTTTTCGGCTGCTGGTTTGCC
D.melanogaster	TGTGATGAACTCGATTGCCCGTGGCCAGAAGATTTCCATCTTTCTCCGCCCGCGTCTGCC
A.franciscana	TGTGATGAACTCGATTGCTCGGGTCAGAAAATTTCCATTTTCTGCTGCTGGTCTTCC
E.carinicauda	CGTTATGAATTCCATTGCTCGAGGTCAGAAGATTTCCATCTTCTCAGCTGCTGGTCTACC ** ***** ** ***** * ** ***** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
P.hawaienses	GCACAACGAGATCGCCGCCAGATCTGTGACAGGCCGGTCTCGTGAGCGCCGCCAGGC
D.melanogaster	CCACAACGAAATCGCCGCCAGATCTGTGTCAGGCCGGTCTCGTCAA-GCTGCC-GGGC
A.franciscana	TCACAATGAAATGCTGCTCAAATTTGTCGACAGGCTGGTTTGGTCAA-ACTTCCTGGA-
E.carinicauda	CCACAATGAAATGCGAGCTCAGATTTGTCGACAGGCTGGTTTGGTCAA-GCTTCCATCA- ***** ** * ** * ** * ** * ** ***** ***** ** * ** * * ** *
P.hawaienses	CACTAAAGGCAGCGTTATTGACGACCACCAGGACAACCTTCGCTATTGTCTTCGCTGCCAT
D.melanogaster	-----AAGTCCGTGCTG--GATGACCACACCGACAACCTTCGCCATCGTGTTCGCCGCTAT
A.franciscana	-----AAATCCGTTTTA--GATGACCACGAGGATAATTTGCCATTTGTTTTGCAGCTAT
E.carinicauda	-----AAGGTTGTTTTA--GATGACCACAAAGACAACCTTTGCCATTTGTGTTTTGCTGCTAT ** * * * ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
P.hawaienses	GGGTGTCAACATGGAGGCTGCCAGGTTCTTCAAACAGGACTTCGAAGAGAATGGCTCCAT
D.melanogaster	GGGTGTGAACATGGAGACTGCCCGATTCTTCAAGCAGGACTTCGAGGAGAACGGTTCCAT
A.franciscana	GGGGGTGAATATGGAACTGCTCGGTTCTTCAAGCTAGATTTTGAGGAAAATGGATCCAT
E.carinicauda	GGGTGTCAATATGGAGACTGCTAGGTTCTTCAAGCAGGACTTCGAAGAAAATGGTCTAT *** ** * ** ***** ** * ***** * ** ** * ** * ** * ** * ** *
P.hawaienses	GGAGAATGTGTGCTCTTCTTGAACCTTGGCCAACGATCCGACCATCGAGCGCATCATCAC
D.melanogaster	GGAGAACGTGTGTCTGTTCTTGAACCTTGGCCAACGATCCGACCATCGAGCGTATCATCAC
A.franciscana	GGAGAACGTCTGTCTCTTTTGAACCTTGGCTAACGACCCGACAATTGAGCGTATTATTAC
C5ATP2	GGAGAATGTGTGCTCTTCTTGAACCTTAGCCAACGATCCCACAATTGAACGTACCATCAC ***** ** * ** * ** ***** ** ***** ** ** * ** * ** * ** * ** *
P.hawaienses	ACCTCGTCTTGCCCTCACCCTGCGAGTACCTCGCCTATCAGTGCGAGAAGCAGCTGCT
D.melanogaster	TCCCCGCTGGCTTTGACTGCCGCCGAGTTCTTGGCCTACCAGTGCGAGAAGCAGCTGCT
A.franciscana	TCCCCGCTGACCTTAACCGCTGCCGAATATTAGCATACCAGTGTGAGAAAATATGTGCT
E.carinicauda	TCCTCGACTCGCTTTAACAACCGCAGAATATCTTGCCATCAGTGTGAGAAGCAGTTCT ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
P.hawaienses	TATCATCCTTACGGACATGAGTTCATACGCCGAGGCTTTGCGTGAGGTATCTGCTGCTCG
D.melanogaster	GGTCATCCTTACCGACATGTCCTCGTACGCCGAGGCTCTGCGTGAGGTGTCTGCTGCCCG
A.franciscana	CGTCATATTGACAGATATGTCCTCATATGCAGAGGCCCTTCGTGAGGTATCAGCAGCTAG
E.carinicauda	CATTATCCTTACTGATATGCTTTCATATGCAGAGGCTTTGCGAGAGGTATCTGCTGCTCG * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
P.hawaienses	TGAGGAGGTGCCCGGTCGTCGAGGTTTCCCTGGTTACATGTACACCGATTTGGCTACCAT
D.melanogaster	TGAGGAGGTGCCCGGTCGTCGAGGTTTCCCGGTTACATGTACACCGATTTGGCCACCAT
A.franciscana	GGAAGAAGTGCCAGGTAGACGCGGTTTCCCTGGTTACATGTACACAGATTTGGCTACAAT
E.carinicauda	TGAAGAAGTGCCAGGTAGACGTCGTTTCCAGGTTACATGTACACCGATTTGGCCACTGT ** * ** ***** ** * ** ***** ***** ***** ***** ** *
P.hawaienses	TTATGAACGAGCTGGTCGAGTTGAAGGTCGTCAAGGATCTATTACTCAGATCCCCATTCT
D.melanogaster	CTACGAGCGTGCCGGTCGTCGAGGGACGCAACGGATCCATCACCAGATCCCCATTCT

A. franciscana	CTACGAAAGAGCTGGCAGAGTTGAAGGCAGAAATGGATCTATTACACAAATTCCCCTTCT
E. carinicauda	TTATGAAAGAGCCGGACGAGTAGAAGGAAGACAAGGGTCCATCACACAAATTCCTATTTT * * * * *
P. hawaiienses	CACTATGCCTAACGACGATATTACTCATCCCATTCCTGATTTGACTGGATACATCACTGA
D. melanogaster	GACCATGCCCTAACGATGATATTACCCATCCCATTCCTGATTTGACCGGTTACATTACCGA
A. franciscana	AACTATGCCCAATGATGATATAACACATCCAATTCCTGATTTGACTGGCTATATTACTGA
E. carinicauda	GACTATGCCCTAACGATGACATCACCCATCTATTCTGATCTTACGGGGTACATTACCGA * * * * *
P. hawaiienses	GGGTCAGATCTACGTCGACCGTCAACTACACAACCGTCAAATTTACCTCCCATCAACGT
D. melanogaster	GGGCCAGATCTACGTCGATCGTCACTGCACAACAGACAGATCTACCCACCAGTCAACGT
A. franciscana	GGGACAGATCTATGTCGATCGTCAACTGTATAATCGACAAATCTATCCTCCAATTAACGT
E. carinicauda	GGGCCAGATTTACGTTGATCGTCACTGCACAACAGACAGATCTACCCACCCATCAATGT * * * * *
P. hawaiienses	ACTGCCCTCCCTGTCCCGTCT ATGAAGTCTGCTATTGGTGA GGCATGACCCGCGGAGA
D. melanogaster	GCTGCCATCGCTGTCGCGTTT ATGAAGTCTGCCATCGGCGA GGCATGACCCGTAAGGA
A. franciscana	GCTCCCATCCCTTTCTCGTCT ATGAAATCGGCTATTGGTGA GGGATGACTAGAAAGGA
E. carinicauda	GCTGCCTTCTTTGTCTCGATT ATGAAATCTGCTATTGGTGA GGCATGACAAGGAAAGA * * * * *
P. hawaiienses	CCACAGCGACGTCTCCAACCAGCTCTACGCTTGCTACGCCATTGGCAAGGACTTGCAGGC
D. melanogaster	CCACTCTGACGTGTCCAACCAGCTGTACGCTTGCTACGCCATCGGCAAGGACGTCAGGC
A. franciscana	TCACTCTGATGTCTCAAATCAGCTGTATGCTTGCTATGCTATTGGCAAAGATGTTCAAGC
E. carinicauda	TCACTCTGATGTATCCAACCAGCTGTATGCTTGCTATGCCATTGGCAAAGATCTCCAGGC * * * * *
P. hawaiienses	CATGAAAGCCGTTGTGCGGTGAGGAAGCTTTGACGTCCGACGATCTTCTATATCTCGAATT
D. melanogaster	CATGAAGGCTGTGGTGGGTGAGGAGGCCCTGACGCCGACGATCTGCTGTATCTGGAGTT
A. franciscana	TATGAAAGCTGTTGTAGGCCAAGAAGCTCTTACTCCGGATGATCTTTTATTTGGAATT
E. carinicauda	CATGAAAGCTGTTGTAGGTGAAGAAGCCTTGACAGCAGATGACTTGCTGTACTTTGGAGTT * * * * *
P. hawaiienses	CTTGGGTAAGTTTGAGAAGACGTTCTCACCAGCAAG-----
D. melanogaster	CTTGACCAAGTTTCGAGAAGAAGCTTCTCAGGTTGAGTTGAACGCGCTTGATATTAAG
A. franciscana	TTTAACGAAATTTGAGAAGAAGCTTCAATTTCTCAAG-----
E. carinicauda	CCTTGGTAAGTTTGAGAAAACCTTCAATTTCCAGGG----- * * * * *
P. hawaiienses	-----GTTCCCTACA-----CAAAGAGAAGCG-----TCT
D. melanogaster	TGGGTTTGTTACAAAAGTTTCTCTGTACCTGCAGGGCAACTATGAGAACCGCACTGTCT
A. franciscana	-----GAAG-----CTATGAAAATCGAACGGTTT
E. carinicauda	-----TCCA-----TACATGAAGCGCACTATCT * * * * *
P. hawaiienses	TCGAGTCTCTTGATATCGGCTGGCAGTTGCTACGAATTTTCCCAAGGAGATGCTCAAGC
D. melanogaster	TCAATCCCTGGACATTGGCTGGCAGCTGCTGCGTATCTTCCCAAGGAGATGCTCAAGC
A. franciscana	TTGAGTCCCTTAGACATTGGATGGCAACTTCTTCGTATCTTCCCAAGGAAATGCTTAAGC
E. carinicauda	TTGAATCCCTGGATATTGGCTGGCAACTTTGCGTATCTTCCCAAGGAGATGCTTAAGC * * * * *
P. hawaiienses	GTATTCCTGCAAAGACCCCTGGCCGAGTTCTACCCCGTGACAGGCCACAGTAA-----
D. melanogaster	GTATCCCGCCTCCATCCTGGCCGAATTCACCTAGGGACTCGCGCCATTAGATCCTGT
A. franciscana	GTATTCAGCGTCAGTTTGGCCGAATACTACCCAAGAGACGC-CAGAGGGAGACACAAT
E. carinicauda	GTATTCCTGCTTCAACACTTGCTGAATTCATCCCAGAGATAGACCCGAGTAGA--CAAT * * * * *
P. hawaiienses	-----
D. melanogaster	TTATTGTTTT-----GTTTTTGATTTTTGTCCAAA--TTTGTTTCATT-----CA
A. franciscana	GAGTAAATGTAACGCGGGCCAGTGCTACCTATTTAGAA--TGTAAGACTGTA-----TA
E. carinicauda	CAATCACGGTGTATTTTTGTTGTGATCTAATTTAGAAAAGTAACTGGTTGTATGTCA
P. hawaiienses	-----
D. melanogaster	TAATTTAAGCTGGCGGGCGCAACGTGCGGCGCTCTCCACC---TCCTGCAATATCC

A.franciscana	GGCACTGATGAAATGACGATATTACATTCCTTCGTTTTAAGTCGT--TTCTTAAAAATTW
E.carinicauda	GTTGTCAGTTTGAACCTGGAGTAATTTTTCTTGGTGCATAGACTTTTTTTTTTATATGA

Anexo 6. Segundo Alinhamento de seqüências nucleotídicas do gene da V-H⁺-ATPase das espécies *Daphnia pulex* (*Daphnia* genome ID: hxAUG26rep2s5g42t1); *Parhyale hawaienses* (Sequence ID: contig37399); *A. franciscana* (GenBank AY197611); *Cherax quadricarinatus* (GenBank:KM880151.1) *Exopalaemon carinicauda* (GenBank:KF442413.1).(*) Indica as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os primers.

C.quadricari	ATATGTTAGGGCGTATTTTTCAATGGTCTGGCAAACCTATTGATCAGGGTCTACAGTGT	452
E.carinicauda	ACATGTTGGGTCGTGTTTTCAATGGTCTGGTAAGCCCATTGATCAAGGCCCAACTGTGC	402
P.hawaienses	-----	
D.pulex	ATATGCTTGGTTCGTGCTTTAATGGATCTGGTAAACCTATTGACAAAGGTCCAACGTCT	720
A.frasciscana	ATATGCTAGGAAGAATTTTCAATGGTAGTGGTAAGCCCATTGACAAGGGACCAAGTATTT	455
C.quadricari	TGGCTGAAGACTTCTCGACATTCAAG-----	479
E.carinicauda	TAGCTGAAGATTTCTTGGATATCCAAG-----	429
P.hawaienses	-----GAAGATTTCTTGTATATTCAAG	22
D.pulex	TGGCTGAAGACTTTTGTAGATTTCAAGGTAAGGTTATTTCCATGTATACTATGCCGTAAA	780
A.frasciscana	TGGCCGAAGAGTTTTAGATATTCAAG-----	482
	***** ** * ** * ** *	
C.quadricari	-----GTCAGCCCATCAACCCCTTGGTCTCGCACC	508
E.carinicauda	-----GTCAGCCCATTAACCCCTTGGTCCCGTACT	458
P.hawaienses	-----GTCAGCCTATCAACCCGTGGGCTCGCACC	51
D.pulex	AATGTATTGTTAATTTTGTAGTGTGTATGCAGGTACAGCCAATCAATCCTCATTACAGTATC	840
A.frasciscana	-----GTCAGCCAATTAATCCCTGGTCCCGTATT	511
	***** ** * ** * ** *	
C.quadricari	TATCCAGAGGAGATGATTTCAGACTGGCATCTCTTCCATTGATGTCATGAACCTCTATTGCT	568
E.carinicauda	TACCCAGAGGAGATGATTTCAGACCCGGTATTCTTCCATTGACGTTATGAATTCATTGCT	518
P.hawaienses	TACCCAGAGGAGATGATTTCAGACTGGTATTCTTCTATTGATGTCATGAACCTCTATTGCT	111
D.pulex	TACCCAGAGGAGATGATTTCAGACAGGTATTCTGCTATCGATATCATGAACCTCTATTGCT	900
A.frasciscana	TATCCAGAGGAGATGATTTCAGACAGGATATCATCAATTGATGTCATGAACCTCGATTGCT	571
	** *: * ** .***** ** .** * ** . * ** : * ** * ** . * ***** ** *****	
C.quadricari	CGAGGGCAGAAGATTCCAATCTTCTCAGCTGCAGGTCTACCCACAATGAA-----	619
E.carinicauda	CGAGGTGAGAAGATTCCCATCTTCTCAGCTGCAGGTCTACCCACAATGAA-----	569
P.hawaienses	AGAGGTGAGAAGATTCCCATCTTCTCAGCTGCAGGTCTACCCACAATGAA-----	162
D.pulex	CGTGGTCAAAAAATTCCAATCTTCTCAGCTGCAGGTCTACCCACAATGAA-----	960
A.frasciscana	CGGGGTGAGAAGATTCCCATCTTCTCAGCTGCAGGTCTACCCACAATGAA-----	622
	. * ** * ** .** .***** .** * ** * ** *****:*** * ** ***** ** .	
C.quadricari	-----AT	621
E.carinicauda	-----AT	571
P.hawaienses	-----AT	164
D.pulex	AAGTTTCATAAAGCCATAATTAACCTAGTTAACTCGATTACTCTATCTGTGGATCTAGAT	1020
A.frasciscana	-----AT	624
	**	
C.quadricari	TGCTGCTCAGATTTGTCGTCAAGCAGGTTTGGTTAAA-----CTGCCACCAAG---AG	672
E.carinicauda	TGCAGCTCAGATTTGTCGACAGGCTGGTTTGGTCAAG-----CTTCCATCAAAG---GG	622
P.hawaienses	CGCCGCCAGATCTGTCGACAGGCCGGTCTGTCGAGCGCCGCCAGGCCACTAAAGGCAG	224
D.pulex	TGCCGCTCAAATCTGTCGTCAGGTGGCTTGGTTAAA-----GTCCCGGTAAA---TC	1071
A.frasciscana	TGCTGCTCAAATTTGTCGACAGGCTGGTTTGGTCAA-----CTTCTGGAAAA---TC	675
	** ** * ** .** .*****:*** * ** * ** * . : * ** .	
C.quadricari	TGTTTCATGATGACCATAAAGACAACCTTTGCCATTGTGTTGCTGCTATGGGTGTAACAT	732
E.carinicauda	TGTTTTAGATGACCACAAAGACAACCTTTGCCATTGTGTTGCTGCTATGGGTGTCATAT	682
P.hawaienses	CGTTATTGACGACCACCAGGACAACCTTCGCTATTGTCTTCGCTGCCATGGGTGTCACAT	284
D.pulex	GGTCTTGTATGATCATGATGATAACTTTGCCATTGTTTTCGCCGCTATGGGTGTTAAT	1131
A.frasciscana	CGTTTTAGATGACCACGAGGATAATTTGCCATTGTTTTGCAGCTATGGGGTGAATAT	735
	*** : ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **	
C.quadricari	GGAGACTGCCAGATTCTTCAAACAGGACTTTGAAGAAAAATGGCTCCATGGAGAATGTGTG	792
E.carinicauda	GGAGACTGCTAGGTTCTTCAAACAGGACTTCAAAGAAAAATGGTTCTATGGAGAATGTGTG	742
P.hawaienses	GGAGGCTGCCAGGTTCTTCAAACAGGACTTCAAAGAAAAATGGCTCCATGGAGAATGTGTG	344
D.pulex	GGAGACGGCCCGTTCTTCAAACAGGACTTCAAAGAAAAATGGCTCCATGGAAAAATGTTTG	1191
A.frasciscana	GGAAACTGCTCGGTTCTTCAAACAGGACTTCAAAGAAAAATGGATCCATGGAGAACGCTG	795
	*** . * ** * ** . * *****:*** * ** * ** .***** ** ***** .** * ** *	
C.quadricari	CCTCTTCTGAATCTTGCCAACGATCCAACCATTTGAACGTATCATCACACCAGCTCTTG	852
E.carinicauda	TCTCTTCTGAACCTTAGCCAACGATCCAACAATTTGAACGTACCATCACTCTCGACTCG	802
P.hawaienses	CCTCTTCTGAACCTTAGCCAACGATCCAACCATTTGAACGTATCATCACACCAGCTCTTG	404
D.pulex	CCTGTTCTTGAACCTTAGCCAACGATCCAACCATTTGAGCGCATTATTACTCCCCGCTTG	1251
A.frasciscana	TCTCTTTTGAACCTTAGGTAACGACCCGACAATTTGAGCGTATTATTACTCCCCGCTG	855

D.pulex	TGTCAGGCCATGAAAGCAGTTGTTGGTGAAGAAGCTCTTACTCCCGACGATTTGTGTGA	1911
A.frasciscana	TGTTCAAGGCTATGAAAGCTGTTGTAGGCGAAGAAGCTCTTACTCCGGATGATCTTCTTTA * ***** ** ** ** **	1374
C.quadricari	TCTAGAGTTTCTTGAAAGTTTGAGAAGTCGTTTCATCTCTCAAGGATCGTATATGAAGCG	1431
E.carinicauda	CTTGGAGTTCCTTGTAAGTTTGAGAAAACCTTCATTTCCAGGGTCCATACATGAAGCG	1381
P.hawaienses	TCTCGAATCTTGGGTAAGTTTGAGAAGACGTTCTCACGCAAGGTTCCACACAAAGAG	983
D.pulex	CCTCGAGTTTTTGAATAAATTCGAAAAGAACTTTATCGCGCAAGGAAATTACGAAAATCG	1971
A.frasciscana	TTTGAATTTTTAACGAAATTTGAGAAGAACTTCATTTCTCAAGGAAGCTATGAAAATCG * **.* * . **.* **.***.: ** .* * **.*: ** . ** .*	1434
C.quadricari	CACTGTCTTTGAGTCTCTGGACATTGGATGGCAGTTGCTTCGTATCT <u>TCCCCAAAGAAAT</u>	1491
E.carinicauda	CACTATCTTTGAATCCCTGGATATTGGCTGGCAACTTTTGCATCTCT <u>TCCCCAAGGAGAT</u>	1441
P.hawaienses	AAGCGTCTTCGAGTCTCTTGATATCGGCTGGCAGTTGCTACGAAATTT <u>TCCCCAAGGAGAT</u>	1043
D.pulex	TACTGTCTTTGAGTCTCTGGATATTGGCTGGCAGTTACTGCGTATCT <u>TCCCTAAGGAGAT</u>	2031
A.frasciscana	AACGGTTTTTGAATCCTTAGACATTGGATGGCAACTTCTTCGTATCT <u>TCCCTAAGGAAAT</u> * . * ** **.* * ** ** **.***.* * * **.* ***** **.***	1494
C.quadricari	<u>GCTCAAGCGTATCCAGCCTCTACTCTTGAGAGTTCTACCCACGAGACCG</u> -----A	1543
E.carinicauda	<u>GCTTAAACGTATTCTGCTTCAACACTTGCTGAATCTATCCCAGAGATAG</u> -----A	1493
P.hawaienses	<u>GCTCAAGCGTATTCTGCAAGACCCTGGCCGAGTTCTACCCCGTGACAG</u> -----G	1095
D.pulex	GCTTAAACGTATTCCCGCTAGTGTTTTGGCTGAGTTTTATCCGCGTGATGCGCGCAAGG	2091
A.frasciscana	GCTTAAAGCGTATTCAGCGTCAGTTTTGGCCGAATACTACCCAAGAGACGC----- *** **.***.* ** ** : . * ** **.*: ** ** .*:**	1545
C.quadricari	CCACAGTAG-----TGTGTATATATCT-----	1565
E.carinicauda	CCGCAGTAGACAATCAATCACGGTGTATTTTTGTTGTGATCTAATTTTCAGAAACTGTAA	1553
P.hawaienses	CCACAGTAAG-----	1105
D.pulex	CAAATAAGGACACAAATCGAGTTGGTACCCCATACGGTTGATTAGATAATAATCCCTTT	2151
A.frasciscana	CAGAGGGAGACACAATGAGTAAATGTAACGCGGC----- *... ..	1580
C.quadricari	-----CCAGGTG-----	1572
E.carinicauda	CTGTTGTATGTGTCAGTTGTGAGTTGAA-----CCTGGAG-----	1588
P.hawaienses	-----CAGTTC-----	1111
D.pulex	CCGCATTTGCGTCTTTCAATAATCCATCTTTTACTGTGTTGATTGGTGGGAATTC	2211
A.frasciscana	-----CAGTG-----	1585

:

Anexo 7. Alinhamento de seqüências nucleotídicas do gene da glutamato desidrogenase das espécies *Drosophila melanogaster* (GenBan k42832); *Eriocheir sinensis* (GenBank JN628041); *Litopenaeus vannamei* (GenBank EU496492); *Parhyale hawaiienses* (Sequence ID: isotig04621).(*) Indica as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os *primers*.

E. sinensis	GTGGTGTGCTGTGGCGTGTGGTGGCAAGATGCTTCGAGTCGGGACAGCGCGGTGCGGG
L. vannamei	--GGCACGAGGGCGCGCGGAAGCTG-AATATGTTGCGGTTAGGAACATCCGTAGTGAGGG
P. hawaiienses	-----ATGCTGCGCTTCAGCAACACGCTGGTGGCGC
D. melanogaster	CCAATAAAGCAGCATTATATTTATCGATCCATAAAAAGCGGGCACTTTGCACTTTTAAG * * *
E. sinensis	CGGT---GGTGCAGGCGGGGTGCAGGCTGAGGGCCGCATGCTGAGGGCCGTGGTAGCTC
L. vannamei	CCGT---GGTGCAGGCCGGGGCA---GCGGAGACCC---TGCTGAAGGCCAGCG---CTC
P. hawaiienses	TGGT---GG-GCAGCCGAGAGCTGCTGCACAGTGGCGC-TGCTGCCTCCTTCTG----CA
D. melanogaster	TTCTTACAATTA AACACCCCTTGTTAAATTCGAATTACAAGCACGAAATTTGGCTTATC * * * * ** *
E. sinensis	CGGCCGC-CACCACCACCACCACACAAGCCCCAACCCAGCAGCCGCGGGCATGGCAAGGG
L. vannamei	CTGCCGC-CGGCGTGGCCA-----AGCGATGGCAGGGC
P. hawaiienses	CCACTGC-CAAGCAGTTCAGT-----GCTGCTGCTCCTGCT-GGA
D. melanogaster	TAATCGCGCCGACTTCCCAAAGATATAAACATTATATGTGCCAAGCAAATAAGATAAGA ** * * * *
E. sinensis	GACTTCGAGCGACACCAGATTCCCGAACGGCTGCAGTACATCCCCGACGCCGAGGACCCG
L. vannamei	GACTACGAGCGTCACCAGATCCCGAGCGCCTTCAGTACATCCCCGACGGGAAGACCCT
P. hawaiienses	GAGTATGAGAAACATAAAATTCCTGAGAGACTTCACTACATCCCTGATGCTGAGGACCCG
D. melanogaster	GCCAAGGAGGGTTTTATGGTTTCTGTTCATGGGATTGTTGCGCCATCGGCGAAAGGTTT * *** * * * * * * *
E. sinensis	TCGTTCTTCGAGATGGTGGAACTTCTTCCACCGTGGCTGTGAGGTGGTTGAGGACCAG
L. vannamei	TCGTTCTTCGAGATGGTTCGAGTACTTCTCCATCGCGGGTGCCAGGTTGTGGAGGACCAG
P. hawaiienses	TCCTTCTTCGAGTCTGTGAGTATTTCTTCCACCGAGGCTGCCAGATTGTAGAGGACCAG
D. melanogaster	CCCCACGTCTGCCAGATGCAATGATTTTGTTTTTAGGGCA--CGTGTCTTAGTAAACAG * * * * * * * * * * * * * * *
E. sinensis	TTGGTTGAAGAGATGAAGGAGCGCATCACC--CTGGAGGAGAAGAGGAACAAGACGAAGG
L. vannamei	TTGGTCGAGGAGATGAAGGAGCGCATCCCC--CTTGAGGAGAAGCGCAACAAGACCCGTC
P. hawaiienses	CTGATCGAGGAGATGAAGGACCGTATATCC--CTGCAAGATAAGCGTAACCGCACCAAGG
D. melanogaster	CC-----AAGAAATGTTGCGTTGTATCATCGATTTCGAGGAGAAGCTTTTGTCTTCCGCGAG * * * * * * * * * * * * * * *
E. sinensis	GCATCC-TCAAGATCATGG---AGCCCTGCCACCACGTGCTCGAGGTGG-CCTTCCCCGT
L. vannamei	GCATCC-TGAAGATCATGG---AGCCCTGCCACCACGTGCTGGAGGTGG-CCTTCCCCGT
P. hawaiienses	GTATCC-TGGCCATCATGG---AACCGTGCCACCACGTGCTGGAGGTGG-CGTTCCTGT
D. melanogaster	AAGTTCTGTAGTTTTGTGCTCTATTTTGTATTTGTCTGTTGGATTTAGACCAAAAATGA * * * * * * * * * * * * * * *
E. sinensis	CAAGAGGGACGACGGCAGTATGAGATGGTGCACGGCTACCGGGCACAGCACTCCCTCCA
L. vannamei	CAAGAGGGACAACGGCACCTACGAGATGATCCACGGCTATCGCGCCAGCACTCTCTCCA
P. hawaiienses	GAAGCGGACAACGGTACCTATGAAATGATACACGGCTGGAGAGCTCAGCACTCCCTCCA
D. melanogaster	AAGCTGCAACAAGGTCGCGGAAAGTTCTGAGCACACCTGTCGTATACGTAATGTGCTTAT * * * * * * * * * * * * * * *
E. sinensis	CCGCACGCCACCAAGGGGGTATCCGCTACTCCATGGACGTGTGTGCTGATGAGGTGAA
L. vannamei	CCGTACCCCAACCAAGGGCGGTATCCGTTACTCCTTAGACGTGTGCGCCGACGAAGTAAA
P. hawaiienses	CCGGACCCCTACCAAAGGAGGTATTCGCTACTCCATGGACGTGTGCGCTGACGAGGTCAA
D. melanogaster	GCAATCTTTTCCCTTGACGGCATCCGTTTCTCGTTGGATGTGTACGCGATGAGGTCAA * ** * * * * * * * * * * * * * * *
E. sinensis	GGCCTTGTGCTGCTCTCATGACCTTCAAATGCTCATGCGTGGACGTGCCCTTCGGAGGAGC
L. vannamei	GGCTTTGTCTGCCCTGATGACATTTCAAGTGTTCCTGCGTAGACGTCCCTTCGGCGGTGC
P. hawaiienses	GGCTCTGTCTGCGCTGATGACATTTCAAGTGTGCTGTGTGGACGTACCATTCGGCGGGGC
D. melanogaster	AGCCCTGTCCGCCCTGATGACCTTCAAAGTGGCCTGCGTGGATGTGCCATTCGGCGGAGC ** * * * * * * * * * * * * * * *
E. sinensis	CAAGGCCGGCCTGCAGATCGACCCCGCAACTACTCCATCAATGAAGTGGAGAAGATCAC
L. vannamei	CAAGGCTGGTCTCAAGATAAACCCAGGGACTACTCCATCAATGAGCTGGAGAAGATCAC

P.hawaienses GAAGGCCGGCCTTAAGATCGACCCAAGGAAATATTCTGTAAACGAGCTCGAGAAAATCAC
D.melanogaster CAAGGCCGGTCTGAAGATCAACCCTAAGGAGTACTCCGAGCACGAGCTGGAGAGATCAC
***** ** ** ***** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** *

E.sinensis CCGCCGCTTACCCCTCGAGCTGGCCAAGAAGGGATTATTTGGCCCGGGGGTGGATGTCCC
L.vannamei CCGTCGATTCACTCTCGAGTTGGCCAAGAAGGGGTTTCATTGGACCTGGTGTGGATGTGCC
P.hawaienses TCGTCGCTTCACGCTCGAGCTCGCTAAGAAAGGATTATTTGGCCCTGGTGTGTATGTGCC
D.melanogaster CCGTCGCTTACCCTTGAGTTGGCCAAGAAGGGCTTCATTGGACCCGGTGTGCATGTGCC
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

E.sinensis GGCTCCTGATATGGGTACGGGTGAGCGCGAGATGTCTTGGATTGCTGACACTTACGCCAA
L.vannamei GGCCCCGACATGGGTACTGGTGAACGTGAGATGTCATGGATTGCTGACACCTATGCCAA
P.hawaienses TGCTCCCGATATGGGCACTGGAGAACGAGAGATGTCTGGATCGCTGACACCTTCTCACA
D.melanogaster CGCCCCGACATGGGAACCGGTGAGCGCGAGATGTCTGGATTGCCGATACTTATGCCAA
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

E.sinensis GACCGTTGGCCATGACGACATCAATGCCACGCGCTGCGTCACTGGCAAGCCCGTTAACCA
L.vannamei CACAATTGGACATCTTGACATCAATGCTCATGCCTGTGTCACTGGCAAGCCCATCAACCA
P.hawaienses TACAATTGGCCATCATGACATCAACGCCACGCGTGTGTCACTGGCAAGCCCATCAACCA
D.melanogaster GACCATCGGTCACTGGACATCAATGCTCATGCCTGTGTCAACGGCAAGCCCATCAACCA
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

E.sinensis GGGAGGCATCCATGGCCGACCTCAGCCACCGGCCGGGTGTCTTCCACGGCCTTGAAAA
L.vannamei AGGTGGTATCCATGGCCGTACACTGCCACTGGGCGAGGTGTGTTCACGGGCTGGAGAA
P.hawaienses GGGTGGTATTACGGCCGTACTCAGCCACTGGTGTGTTCCACGGACTCGAGAA
D.melanogaster GGGCGGTATCCACGGACGCGTCTCGGCCACCGGTGCGGTGTCTTCCACGGCCTGGAGAA
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

E.sinensis CTTTCATCAATGAGGCCTCTACATGG-----CCATGATCG----
L.vannamei TTTCATCAATGAGGCCTCATAATGT-----CTATGATTG----
P.hawaienses CTTTCATCAATGAGGCCTCTATATGG-----CACTTGTGG----
D.melanogaster CTTTCATCAACGAGGCCAATCATAGGCCAGATCGGTGAGTGTTCATCATGATTGCTTA
***** ***** ** *** * ** *

E.sinensis -----GCATCACCCCTGGCTG
L.vannamei -----GTATCACTCCGGGATG
P.hawaienses -----GGGCCACCCCGGGCTG
D.melanogaster GTTATGAAAGTGCATCATCCTAATGGTAATATCTACATTCTTAGGCCACTCCCGGCTG
* ** * ** * ** *

E.sinensis GGGGGCAAGACCTTCATCGTTCAGGGCTTTGGTAACGTGGGTCTGCACTCCATGAGGTA
L.vannamei GGGTGGAAAACTTTTCATTGTGCAGGGCTTTGGTAATGTCGGTCTCCACAGTATGAGATA
P.hawaienses GGGCAACAAGACTTTTATTGTACAGGGCTTCGGTAACGTAGGCCTGCACACCATGCGTTA
D.melanogaster GGGCGGCAAGACCTTCATCGTTCAGGGCTTCGGTAACGTGGGCCTGCACACCCTCGCTA
*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

E.sinensis CCTGCACCGTGCAGGACCACTGCATTGGCATCAAGGAGGTGGATGGAGAGATCTACAA
L.vannamei TCTTACCGTGCAGGAGCCACTTGCATAGGTATCAAGGAAGTGCACGGCTCAATCTACAA
P.hawaienses CCTCCACCGTGCAGGCGCCACGTGCATCGGTGTCAAGGAGGTGATGGTAAAATCTTCAA
D.melanogaster TCTGACCCGCGCCGAGCCACCTGCATCGGTGTGATTGAGCACGACGGCACTCTGTACAA
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

E.sinensis TGCTAGTGGCATTGATCCCAAGGAACCTGAGAAGTTGGAAGATTGAAAATGGCACCATCAT
L.vannamei CCCCATTGGTATTGATCCTAAGGAACCTGAGAATTGGAAGATTGAAAATGGTACAATCAT
P.hawaienses CCCCAGGGCATTGATCCTAAGGAGCTGGAGAAGTCAAGTTGGAGCATGGAACCATCGT
D.melanogaster CCGGAGGGCATTGACCCCTAAGCTGCTGGAGGACTACAAGAAGAGCAGGCACCATTGT
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

E.sinensis GGGCTTCCCCGGTGCAGAGACATACAAGGGAGAGAAGCTTGTGTATGAGAAGTGTGACAT
L.vannamei GGGATTCCCTGGTGTGACTTATGAAGGAGAGAACCCTTGTGTATGAGAAGTGTGACAT
P.hawaienses TGGCTACCCTGGTGTAAAGCCTACGATGGGAGAACCCTTGTGTACGAGCAGTGCACAT
D.melanogaster GGGCTACCAGAACGCCAAGCCCTACGAGGGCGAGAACCCTCATGTTGAGAAGTGTGACAT
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

E.sinensis CCTGATCCCTGTGCCATGAGAAGGTTCATCACAAGGGCAACGCCGCGGAGATTCAAGC
L.vannamei CCTCATCCCGCTGTGCTATTGAGAAGGTTCATCACAAGGGCAATGCTCACAAGATCCAGGC
P.hawaienses CCTCATCCCTGTGCTGTGGAGAAGTTATTATAAGAACCAACGCCCATAAAGGTCCAGTG
D.melanogaster CTTTCATCCCGCTGCGGTCGAGAAGGTTCATCACCAGCGAGAATGCCAACCCTTCATCAAGC

E.sinensis	CAAGAGTTTGTAGATAATGAGGAACCTGAGTGGAGGTCA-CTACTTTTAGGTAAGGGTTC
L.vannamei	AAAAAAAA-----
P.hawaienses	-----
D.melanogaster	GTATCATCTAAGTAATTCGTTGTTTATTCTTCTTTTCCGTTTCTATCAACAATG

Anexo 8. Alinhamento de seqüências nucleotídicas do gene da glutamato piruvato desidrogenase das espécies *Drosophila melanogaster* (GenBank NM_167367.1); *Sogatella furcifera* (GenBank: KJ000066.1); *Culex quinquefasciatus* (GenBank XM_001867852.1).(*) Indica as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os primers.

C. quinquefasc.	TCCGCCGATCCGCTAGTGTTTTCCGCGAACGG-----TACCAGC-----AACAGCCG
S. furcifera	-----AAAACGCGCAGCCGATTG-----TGGCGTT-----AAAGAGTA
D. melanogaster	TGGAACAAGCGGCGATTTCATTCAACCGTTAGACGTCCGCCGTTCCCTTTTCAACCAGCCA
	* * * * *
C. quinquefasc.	CAGCATGT--CGACCCGCT---GCG-TCACGGTGGACAACATCAACCCGGCGATCAAGCT
S. furcifera	AAGAACTCTACGAGCCAC---GTG-TCACACTCGACAACATAAATCCGGCGATCGTGAA
D. melanogaster	CAAAATGCCGTCGTCGTCGAAAGCGCTCACACTGGATAACATAAATCCCAACTTTATTGC
	* * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	GATGGAGTACGCGGTCCGCGGACCGCTCGTTCATCCGGGCCGGCGTTCATCGAGAAGGAACT
S. furcifera	AATGGACTATGTAGTGCAGGGGAGGTCCCTTATGCGAGCCGGAGCTATT <u>CAGAAGGAACT</u>
D. melanogaster	CATGGAATATGCCGTTCCGCGTCTCTGGTGATTCGTGCTGGGGAAAT <u>CAGAAGGAACT</u>
	***** * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	<u>GGAGCAGGGCGCCAAGAAACCCTTCACGGAAGTGATCCGCGCCAACATCGGGGACTGCCA</u>
S. furcifera	<u>GGATCAGGGCGTCGTGAAGCCTTTCAGGAAGTGATTCGGGCCAGTATCGGAGATTGTCA</u>
D. melanogaster	<u>GGAAAAGGGTGTCAAGAAGCCATTTCGACCAGTGATCCGTGCCAACATCGGTGATTGCCA</u>
	*** * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	CGCCATGGGCCAGCAACCGATCACATTCCCTCCGGCAGGTTCTCGGCCTGGTGTCTACCC
S. furcifera	GGCTATGGGACAGCAACCGATCACGTTTCTGCGACAGGTCTTGGGACTGATCACGTATCA
D. melanogaster	TGCGATGGGCCAGCAGCCCTTGACCTTCCCTGCGACAGCTGTTGGCGCTGACCTTCGAGAC
	** * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	GCCCTCTTTGACG-ACAAATCAATCCCGGAGGACGCGAAGCAACGCGCGGGACATCC
S. furcifera	ACCGCTTTTCAACG-ACCCTACCATCCAGAAAGATGCCAAAGAACGAGCCCGCATCATCC
D. melanogaster	ACGTCTGCTGGATTACCCGATTATCCC-GAGGACGTCAAGAAGCGCGCCTGTGCCATTT
	* ** * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	TGAAGGGCTGCAAGGGCGGTTTCGGTTGGGTCTGACACCGACTCGAACGGTATCGAGGTGA
S. furcifera	TATCGGATTGCGTGGGCAACTCTGTGGGTTCCTACACCGATTTCGAGCGGAATCGAAATCA
D. melanogaster	TGAACGGCTGCCAGGGTCAATCGGTGGGCTCGTACACCGACTCCGCCGGTCTGGAGGTGG
	* * * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	TTCCGCGAGCATGTGGCCCAGTACATCCAGGACCGTGACGGCGGAATCCCGTCCGATCCGG
argpt3	TTCCGAAACAGTTGCTCAGTACATTTCAGAAATCGGGACGGTGAATTCATCCGATCCGA
D. melanogaster	TGCGTCGCCAGGTGCTCAGTACATCGAGAAAAGGGATGGCGGCATCGCCTCCAATTGGC
	* ** * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	CCAACATTATCTGTTCGGCGGGTGCCTCCGGTGGCATTAAAGTGTGATGTCTACTGCTGC
S. furcifera	GCAATATAATCATGTTCGGCCGGGCAACCGGTGCAATCAAGTCGTAATGTCCCTATTTTC
D. melanogaster	AGGACATCTATCTAACCGCGGTTGCCTCTCCCGCATCAAGAGCATTCTCTCCATGATCA
	* ** * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	GGTGTCCCATCGACGGAAAGAAGCCCGGCGTGATGATCCCCATCCCGCAGTATCCGCTGT
S. furcifera	GGTGTACGATCGATGGCAAGCTGCCGGGAGTTATGATCCCAATCCGCAATATCCAATGT
D. melanogaster	ACGCCGAGGTGGGATGCAAGGCGCCTGGTGTTCATGGTGCCCATTCGCGAGTACCCACTGT
	* * * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	ATTCGGCGACGATCGCCGAGTTTGAGATGGAACAGTGCGGCTACTATCTGGACGAGGCCA
S. furcifera	ATTCGGCGACTATTTCCGAGTTGGAGATGGCGCAGGTTTGCTACCACTTGGACGAAGATC
D. melanogaster	ACTCGGCCACCATCTCCGAATACGGCATGACCAAGGTGGATTACTATCTGGAGGAGGAGA
	* * * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	ACAAGTGGGGACTGGACATTACCGAGCTGAAGCGATCGCTGGCGGAGGCCAAGACGAAGT
S. furcifera	GCGGATGGGGCTTGGACATTCCAGGTTTGAAAGCTTCGGTGAACGAGGCCAAGGAGACAT
D. melanogaster	CCGTTTGGAGCCTGGACAGGAAGGAGCTGCAACGGTCTACGATGAGGCCAAGAAGGTCT
	* * * * * * * * * * * * * * * * *
C. quinquefasc.	GCGCCCCGCGGATACTGGTTCGTCATCAACCCGGGCAACCCGACCGGCCAGGTCTGTCCA
S. furcifera	GTGTACCTAGGATATTGGTAGTTATCAATCCGGGTAATCCGACCGGGCAGGTTCTGTCCG

D.melanogaster	GCAATCCGCGTGCCCTGGTCGTGATCAATCCGGGCAATCCCACCGGACAGGTA * ** * **** * ***** ***** ** * * ***** ***** ** *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	AGGAGAACATTCAGGAAATCATCAAATTCGCACACCAGGAAAGCTCGTCCTGTTCCGG GGGAAAACATCGAAAGTATCATTAGGTTTGCTTATAATGAAGATCTGGTGATCTCGCTG GCGAGAACATCGAGGAGATCATTAAGTTCGCACACGATAACAGGTGCTGGTGGTCGCCG ** ***** * ***** * ** * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	ACGAGGTCTACCAGGACAACGTGTACGAGAAGGGCTCCCAGTTCCACTCGTTCAAGAAG ACGATGTGTACCAGAACAACCTGCACGACTAGAGTTTCGATGTTCCGGTTCGTTCAAGAAG ATGAGGTGTACCAGGACAATGTCTACGACAAGAAGTCCAAGTTCGGTTCGTTCAAGAAG * ** * * ***** ***** * ***** ** ** ***** ***** *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	TCCTCATGGAGATGGGCGCCCCGTACAACACGATGGAAGTGTGCAGTTCATGTCCTGCT TGATGTATGGAGATGGGAGCTCCTTACAACCGAATGGAAGTGTGCAGTTCATGTCCTGCT TGGCCTACGAAATGGGCGACCCCTATCGTAACTCGAAATGGTCAGTTCCTGTCACCT * ** ***** * ** * * * ***** ** * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	CCAAAGGTACATGGGCGAGTGCAGGAATCCGCGCGGATACGCCGAAATCGTCAACCTCT CGAAGGTTTACATGGGTGAATGCAGTTCGAGGAGGATATGTGAGGTTGTGAATATGT CGAAGGCTATCTGGGCGAGTGCAGCATTCCGCGCGGTTACATGGAGGTTCTCAATCTTG * ** * * * * ***** ** ***** ** * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	GCCCGACGTGAAAGCCATGCTCCTCAAGTGCATCTCGGCCAGCTCTGCCCCACCACAA GCCCGAACGTTAAAGCCATGCTTCTGAAGAGCATTTCCGGCTTGGTATGTCGGTCCACCA ATCCCAAGGTCAAGGCCATGCTGACCAAGTCGATAACGCCGCGCTTTCAGCACCACCG ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	TTGGCCAGGCTGTATGGACGTGGTGGTGCATCCGCCCGCAAGGGTGAACCTTCGTACG TCGACAAGCCTGCATGGATGTTATGGTGAATCCACCGAAACCGGGGCAACCTTCGTACG CTGGCCAGGTGGCCGTGAGTGCCTGGTCAATCCACCGCAGCCCGGAGAGCCATCATAAG ** * * * * ** * * ***** ** * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	AGCTGTTTCATGAAGGAGAAGACGGCCGTGCTGGAGTCGCTGAAGGTGCGCGCCGAAATGG AGTTGTTTCATAAAGGAGAAGACGCCGTTCTGACTTCGTTGAAAGAGCGTGCCAAATTGG ATCTGTACAAGAAGGAGCGCATGGCATTCTGGCCGCTCTAAAGAACGGGCCGAGCTCG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	TCGCCGAGACGTTCAACTCGATCGAGGGCTTCTCGTGCAATCCGGTGCAGGGCAGGATGT TGGCCGATGCGTTCAACTCGTTGAGGGCTTCTCGTGCAATCCGGTCCAGGGTGCATGT TCCACAAGGCACTGAACAGCTTCAAGGCTACAAGGTTAACCCCGTACAGGGCGCCATGT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	ACGCCTTTCCACAGATCCGGCTGCCGGCGAAGGCGATCGAGGCGCCAAGAAGCCGGCC ATGCGTTTTCCACGTATTCAACTGCCGGAGAAGGCAATTCAGGCGCGAGGAAGCCGGCC ACGTCTTTCCACAGATCGAGATCCCGCCAAAGGCGATCGAGGCGCCAAGGCCAAGGGCA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	AGGCGCCGACGTTTTTCTATGCATTCAGCTGTTGGAGCAGACCCGGCATCTGCATCGTCC AGTCCCAGCGTTTTTCTACGTGTACCAACTGTTGGAACAAACGGGTATCTGCCTGCTAC TGGCCCCGATGTTTTCTACGATTTGAGCTGCTCGAGACGAGCGGCAATTGCATGTTT * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	CCGGTCCGGCTTTGGGCGAGCGCCGGGCACGTACCCTCCGACCACGATCCTGCCCC CAGGATCCGGATTCGGTCAGAAGGATGGAACCTATCACATCCGATCGACCATTCTGCCAC CTGGCAGTGGATTTGGTCAGAAGCCCGGCACGTGGCATTTCGAAGCAGCATCCTCCCGC * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	AGCCGGCCAAGCTGAAGGAGATGCTCGGCAAGTTCGGCTCGTTCCACGAAAAGTTCTTGC AGCCGGAAAAACTCAAACATATGTTGGACGTGTTACGGTTGTACCATGAAAATTTCTTAC AAACGGACAAGCTGAAGCTGATGATGGAAGAAGTCCGTTGTTCCACGCGGAGTTCATGA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc. S.furcifera D.melanogaster	AAGAGTACAAGTA-AATGGTCGTGTTTTTTTTCTTGGAAAACACTTT-TTGAATTTAA GGCAGTACCAGTG-ATGGGCTGAATTATTCTTTATTTA-----TTT-ATAAGCACCAC AGAAGTACAAGTAGATCAGTGCCTTCCCGCTCCTCGATCCTGTTAGTGTCAA ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

C.quinquefasc.  CTTTTGTTAGGCGAAAAGCAAACACACAAACACACACGCGGTATTATC-----CGATTG
S.furcifera     -----AAAGATAAGTACTGAGCTAAGTG-ATAGGCGTTGTT-----CAAATT
D.melanogaster  TCCTC--CGGCTTAGGATTAAAAATTTAAATTACCCTAATTGTTTTTTTTTTTCCTCTT
                *      ** * * * * * * * * * *
C.quinquefasc.  TAGTGAAAGAAGA-AGATGATTAAAAACGAGAT-TTTGGAATAAGAGAGGACTGCTGATA
S.furcifera     TGTGTAAGGATATAAATATTTGAAAATAAAAA-GCCATAGTTAGA----ACTGGTGTTA
D.melanogaster  TGTTACTGTGTCATAGCTGAATGCTTCTAAGCTCTTCTTTATATGCATATATAGATATAT
                * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinquefasc.  AAATCACACTCACACACACATATTTAGCATATCCCGCTTTGAAGCTTCAAACGACGATAT
S.furcifera     GATCAAT-----
D.melanogaster  ATGAGAAATATATAAAAACATTTTTAAACCCTATGATTTGTGAACCCAACCCGCGCAGG
                *
C.quinquefasc.  CGTATTTGCCAAGGTAGTAGAAGCAATT--TAATTGCATGTTTTTACCACGCTAGGTTT-
S.furcifera     -----
D.melanogaster  TTTTATCGCCACGATAACGTTTCCAGTTAGCAATTAACCCACTTAACCATGTAGTCTTTG

C.quinquefasc.  -----
S.furcifera     -----
D.melanogaster  ATTCTTAATTGAACGAAAACCTCTGGCGGAGATTTGACAATAATTTTTGTTAGAACCAA

```

Anexo 9. Alinhamento de seqüências nucleotídicas do gene da leucino amino peptidase das espécies *Drosophila melanogaster* (GenBank); *Parhyale hawaienses* (Sequence ID: contig24985); (GenBank XM_001844320.1).(*) Indica as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os primers.

C.quinque.	-----
D.melanogaster	AAAAAATTGCAAGTCAAATTTGGCAGCAAATAAAAATAAAAATAAAACGTCGGCACTTTTG
P.hawaienses	-----
C.quinque.	-----
D.melanogaster	GCAAATTTTTGTCAAATTTCTGAAGCAGGCACTTCATGCGTTTGTCTGCTCTGCGTCCAGG
P.hawaienses	-----
C.quinque.	-----ATGAGTAAGCTGAGCTACC
D.melanogaster	CAATACGCAACCATCTCGCTCGCACCTACAGCAGCGCCCGCTTCAAAAAGATG-GCCACG
P.hawaienses	-----ATGTGCATTAAA-GACACA * * * *
C.quinque.	GGCGCGA-----GCTGGTCCCTAGTGACCCGGCCAGGCCCGGTTCTGATC
D.melanogaster	GACGTAAAGTTTAAACGAGTCGCTAGGCTGCAGTGATCCGCAGACACATCCGGTCTGATC
P.hawaienses	AAGGTGCAAGTGAGCACCACCTTGCATCATGTGATCCTCATAAGAATCCTGTTCTATTT * ** * **** ** ** * ** *
C.quinque.	GTTGGCCAGACGGGTCATCTGAAGGAGCTTCCGTTTCGAGCGGGTTTCGCTGCAAGCTGGAG
D.melanogaster	ATCGGCCAGCTGCGCCATCTAAACCTACTGAAGTTCAGTCATCTGGAGACCAAACCTCAGT
P.hawaienses	ATTGGCCAACCTCTGCATCTTCAGTCGCTTAGCTATGCTGATGTGTCTGCTAAATTGGGA * ***** **** * ** * * ** *
C.quinque.	CCCCGTGTGAGCTCGGAAATCTTCGAACAGGCCAAATCGGTGCTGCATCCGGCGCCGACC
D.melanogaster	CCGCGCGTCAACGAGGAGACCTTCTGAATGCCGTCGCTTGTCTGCATCCCGAGCCACC
P.hawaienses	AATCGTGTCCCTGAGAGTGTATGGATGAGTGCGGTGAAGGGCTGCAGCCAAGCCCTACG ** ** * * * * ***** ** ** *
C.quinque.	GATAGCTGCTCGCTGTACCTGGACCTGGCCAAGCTGGCGGTTCTGCCGACCAAGGCGTCC
D.melanogaster	GATAAGGTATCCCTCTATCTCGATGTGGCCACCGTGGCTGCCCTGCCATTGAAGGCATCC
P.hawaienses	GACTGTGTGCTACTGTACCTGAACCTTTGTTCTGTTGCTGCTCTGCCTACTAAAGTGTCT ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinque.	CGGCACAACCTCGGAGTCACGCGGACACGCACCTGACCAAGTTGGTGCAGACGCACACTTCG
D.melanogaster	CGACACAATACGGCATCCCGGGCTCATGCCATCACTCGTCTGGTAAAGAACCATGTGCTG
P.hawaienses	CGCCACAACCTCTTCTCCAGAGCTCATCATCTCACAAAATTTGTGCGCTCACATACAGTT ** ***** * ** * * * * * * * * * * **
C.quinque.	GGGGTTAGCGAATCGATTGTGGT---TGTGTGCGACAAGGAGAACCTGTTTGTCTCCGGA
D.melanogaster	AACGTTTCCGAGGAGAGCGTGGTGTCTCGTCTGCGAACGAGAGAATCTATTCGCCAGCGCC
P.hawaienses	GCTGCTGATGAAGAGTACATTGTGCTGGTGTGTGAACGTAGTGACGTATACGCTTCTGTG * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinque.	TGTGCCGTGGCCAGACCTTTCCGCTGTACAGTCGCAAACTAGTAA-----GGCGGAA
D.melanogaster	TGTGCGGTGGTTCGCGCTTTTCCACTCTATTCCCGCAAACGGGCAATCTGCTGGCCTCA
P.hawaienses	TGCGCTGTGGCCCGTGCATATTCTTTATACTCTCGCAAGTCGAGCGTT-----GTCAAC ** ** ***** * * * * * * * * ***** * * *
C.quinque.	AAT-----GGCGTAACCTTCGG-----CGGAATCG-----GTTGCC
D.melanogaster	AGTCAGCCAAAAGCTAAATCTTGATGTGGAGATGGAACGCAAATTCAGGACGCAACGTA
P.hawaienses	AGT-----GACCATAA-----GCAGC-----TT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinque.	GTTGATGTGGAATTCCTGTTGACCGG---GGATGACTGTGTAACGAAGGAG-----
D.melanogaster	GTCAATGTTGAGTTTGTGCTAATCAACAAGGATGGCTGCATTGAGAGCGAGCCTTTGACA
P.hawaienses	GTTACCATTGAGATTCTACTTGTGG---AAGTGACTTGACTGAGCTCTCTCT----- ** * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinque.	---GACGTTTTGG--TGCTCGAGAGTG-CCGCTAAGGGGATAAGACTGGCAGCCAAAATA
D.melanogaster	GACGACGAGCTAAATTGCTGAATGAGACCACGGGCAATTCGAATGACTGCTCGATT

P.hawaienses	--CAGGATGTTGCTGTGCTTGTATGCTG-CTATTTATGGCATCCGTTTAGCTGCGTGCATT * *** * * * * * * * * * * *
C.quinque.	GTGGACGCGCCTTGACGCGAGATGAACGTGTCCGGTTCCTGAAGGAAATTGATGCGGTG
D.melanogaster	GTAGATATGCCCTGCAACGAAATGAACGTGGACCATTTCATCCAGGAAGTTGAGGATGTG
P.hawaienses	GTGGACACGCTGCCCTCGAGATGACCACAACGGCATTTTTGCAGGAGATAGAACAGTT ** * *** * *** **** * ** * **** * ** **
C.quinque.	GCCAAAGAGCTGAAGTTGACGCCGAAGGTAATTTCGTGGAGAAGAGCTCAAGCAGCAAGGT
D.melanogaster	GGCAGGGAGCTGTGCATTACGCCAAAAGTAATCCGTGGCGAGGAGCTGCTGGAGCAAGGA
P.hawaienses	GGCAAAAAGTTGAATATAACTCCGTTTCGTGATCAAAGGAGAAGATTTGAAGAAGAGAGGG * ** ** ** * ** ** ** ** ** * * ** ** **
C.quinque.	TTTGGAGGGATTTACGGCGTGGGAAAGGCATCGGATGATCCTCCGGCTTTGGCAGTTCTG
D.melanogaster	TTTGGCGCATTTACGGCGTGGGCAAAGCTGCGGCTGTGCCGCTGCCCTAGTTGTGCTC
P.hawaienses	TTCCGTTGGCATATGGGGCGTTGGCAAGGCTGCTGAGTGCCCTCCAGCTCTGGCCGTGCTC ** ** ** ** * ***** ** ** ** * * ** ** ** * * ** **
C.quinque.	TCGTACGAACCGGAAGGTGCTACCGAAACCGTCGCTTGGGTTGGCAAGGGAATCGTGTAC
D.melanogaster	TCCCATGAGCCAAAGGGCGCCAGGAGACTATCGCTCTGGTCGGCAAGGGCATTCTCTAC
P.hawaienses	TCCACACACCTCCTGGTGTACACAGAGCATTGCTTGGGTTGGCAAGGGCATTGTATAT ** * * * ** ** * * * *** *** ***** ** ** **
C.quinque.	GACACCGGTGGCCTTAGCATCAAGGTAAGACTGCCATGCCAGGGATGAAGCGTGACTGC
D.melanogaster	GACACCGGTGGCCTCAGCATCAAGGCCAAGACCGGCATGCCCGCATGAAGCGGATTGC
P.hawaienses	GACACTGGCGCCTCAGTATGAAGACCAAGACTTCCATGCCTGGCATGAAACGAGATTGT ***** ** ***** ** ** ** ***** ***** ** ***** ** ** **
C.quinque.	GGTGGTGCGGCCGCAATTTTGGGCGCCTTCTACGCTGCGGTCAAGTGCGGCTTCAAGCAG
D.melanogaster	GGCGGAGCGGCGCGGATTTCTCGGAACCTTTTACGCGGCTGTCCAGTGTGGATTTAGGGAT
P.hawaienses	GGCGGAGCTGCTGGTATTTTGGGAGCGTTTTATGTGCGCGTGTCCGGCTGGCTTTGATCAA ** ** ** ** ** * ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** **
C.quinque.	AATCTGCACGCCGTGTTCTGTCTGGCGGAGAACTCCGTTGGACCGAACGCAACCCGTCCG
D.melanogaster	AACTTGCATGCCGTCTTCTGTCTGGCGGAGAACTCTGTGCGACCAAATGCCACTCGCCCC
PLAP7	AACCTTCACGCCATCTTTTGCCTCGCTGAAAATGCTGTGGCTGCCAATGCCACCAAGCCT ** * ** ** ** * ** ** ** ** * ** * ** ** ** ** **
C.quinque.	GACGACATTCATCGGCTGTACTCGGGCCAAACCGTGAGATCAACAACCCGATGCCGAG
D.melanogaster	GATGACATTCACACCCTTTACTCGGGCCGCACAGTGGAGATCAATAACACCGGATGCCGAG
P.hawaienses	GACGACATCCATCTCATGTACTCCGGCCGAGCGTTGAAATCAACAACACCGGATGCAGAA ** ***** * * ***** ***** * ** ** ***** ***** ***** **
C.quinque.	GGTCGGTTGGTGTGCTGTCGGATGGAGTTTGTACGCCGATCGCAACCTTAAAGCCAGCATC
D.melanogaster	GGTCGCTTGGTGTGCTCGCCGATGGCGTTTGTACGCCAACAAGGATCTGAAGGCCAACATT
P.hawaienses	GGCAGACTTGTATTGGGTGACGGCGTTCGTATTGCTGCCAAGGACCTCAAGTGTGAGACT ** * * ** * * ** ** ** * ** * ** ** *
C.quinque.	ATTCTGGATATGGCTACGCTCACTGGCGCGCAAGGCATTGCAACGGGCAAGTACCACGGC
D.melanogaster	ATTCTCGACATGGCCACATTGACTGGAGCACAGGGCGTTGCAACAGGCAAAATATCATGGT
P.hawaienses	GTCCCTGGACATGGCAACCCCTCACTGGAGCTCAGTCGACTGCCACTGGCAAGTATCACGCT * ** ** ** ***** ** * ***** ** ** ***** ** ** *
C.quinque.	GCTATTCTGACCAACAGCGAGCAGTGGGAGCAAAGGCGTTGATCGTCCGGTCAAGGAGACA
D.melanogaster	GCCATATTGACAAACTCGGAGACATGGGAGGCAAAGTTCGTTGCAGGCTGGACGCAAATCT
P.hawaienses	GCTGTGGTGAGCAACAATGAGGAGCTGGAGCAGTGCACCGTGAAGGCAGGCAGAGCGTCT ** * ** ** ** ** ***** * ** * ** * *
C.quinque.	GCGGACCTGCTTTCACCGGTTCCGTAAGTACTGCCCGGAGTTGCACTTTTTCGAGTTTAAATCG
D.melanogaster	GGCGATTTATTGGCACCCATAATTTATTGCCCGAATTGCATTTCTCGGAATTCGCTTCG
P.hawaienses	GGGGAGCTGGCTCATCCTTTGCCCTACTGTCCAGAACTTCATTTCCCGGAGTTTGTCTCT * ** * * ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** **
C.quinque.	GCAGTTGCGGACATGAAGAATTCGGTTATGGATCGCGGAAACGCACAGGTCAGCTGCGCC
D.melanogaster	GCCATTGCTGATATGAAAACTCGGTGGCGGATCGTCAGAACGCCAATCCTCCTGCGCC
P.hawaienses	GTTGTAGCTGACATGAAAAATTCGTTTTCGGATCGCAACAATGCGACCTCGTCATGTGCT * * ** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ** ** **

C.quinque.	GGACTGTTTCATTGGGGCTCATCTGGGATTTCGATTACGAAGGTGCCTGGATGCATGTGGAC
D.melanogaster	GGCCTTTTCATTGCCGCCCATCTTGGCTTCGATTATCCCGGCATCTGGATGCACGTTCGAT
P.hawaienses	GGGCTCTTCATCGCTGCCAGCTCGGTTTTGACTTCTCGGGCCTGTGGGTCCACATCGAT
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinque.	ATGGCCTCGCCGGTACACAACGGAGAACGCGCCACCGGATATGGAGTTGCGTTGCTGTTG
D.melanogaster	ATGGCCACGCCCGTTTCATTGTGGGGAGCGTGCCACTGGATACGGCGTTGCCCTGTGTTG
P.hawaienses	ATGGCGGCTCCGGTGTACCTAGGAGAAAAGAGGTACCGGTTATGGTGCAGGACTGCTGCCA
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinque.	GGACTGTTTGGCGAGCACAGTGGCGCTGATTTGTTGAAGCACGTGGCC-----G
D.melanogaster	ACCCTCTTCGGCGGGCACACTGACTCCAAGCTGCTTCAATCCATCGCCTCCACAGACGAG
P.hawaienses	TGCCTTTTCGGTGAACACAGTCAGAGCAAGTTGCTTTCGTTCCCTCTCCAC-----T
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinque.	AAGCTGCTGCCG-----CTGGAGGAACGGTCAAAGAACCGCAGCATAAGAAAGCCCGCGT
D.melanogaster	GAGCCGCCCTCGAAGCGCTGGTGCCGCGATTAACCTCAGCCTGCCTTTTACTGTGCCACGT
P.hawaienses	GCTCTGCCCTCAGC-CTCTGCTACCAATAACAACGGAGC-CACCCAGAACGATCTCATGC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinque.	A---AATTGAGC--ACGTTTTAAGTATCTACGAAAT--AATCACAATTGTGTTTCAAGTA
D.melanogaster	GCCTGACTGGATTAACATTTCCATCATTTTCTTTGCCCAATTGCAATCCGGCATCAGAAG
P.hawaienses	A---GTATGAGCAGCCATCCTCTAAGAAAACCTAGGCTAGAATGA-----
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
C.quinque.	TCTTTTTCGATTTGTATGCATCTTTTGAAAAAATAAAAATATAAATTACTGCCAGAC---
D.melanogaster	TCAATTT-GTGTAGCCGACAGGCATTAATAAATCAATATTATTAGAAATACAAGAAGTA
P.hawaienses	-----

Anexo 10. Alinhamento de seqüências nucleotídicas da superoxide dismutase citoplasmática das espécies *E. sinensis* (GenBank FJ617306); *F. chinensis* (GenBank GQ168792); *M. rosenbergii* (GenBank DQ073104); *P. monodon* (GenBank AY726542) e *Parhyale hawaienses* (Sequence ID: isotig06477).(*) Indica as bases conservadas. As regiões em destaque mostram os locais de onde foram retirados os primers.

<i>F. chinensis</i>	GGAGAACGTGAATGAGCGTTATGAGAATGCTCGTAAGAATGCAGGTCATTGATATAGGAC
<i>P. monodon</i>	-----CTGCAGGAATTC-----GGCACGAGGCTTGCGCGTCACAC
<i>M. rosenbergii</i>	-----ATTCCCTCGCCGACTTCCACCTTCTGTGACAGAAAG
<i>E. sinensis</i>	-----
<i>P. hawaienses</i>	-----GGAATTTTCACTGTTCCCTTTACCAGACTGTGAAGTTTTGTTACTTTG
<i>F. chinensis</i>	GTCCTCCCTCGAATAAGTAA-----AATCATGGCTGAGGCAAA---GGAAGCTTACATCT
<i>P. monodon</i>	G-TCCTCCCCGAATAAGTAA-----AATCATGGCTGAGGCAAA---GGAAGCTTACATCT
<i>M. rosenbergii</i>	A-----CCACGAACAAG-----CATGGCTGA---CAA---GGATGCATACATCA
<i>E. sinensis</i>	----ACGCGGGGACAACCTGC-----CAGCATGGCGGATGCGAA---AGAAGCGTATATTA
<i>P. hawaienses</i>	CCTATCAAGTAAACTACACATTCCTCACCATGTCCAATGAAATAAGGATGCCTATATTTG
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>F. chinensis</i>	CCATCCTGGAGAAGAAGTTAGCTGAGCTGACTGGCATTGAGGTGGATCAGATCAAGAAGA
<i>P. monodon</i>	CCATCCTGGAGAAGAAGTTAGCTGAGCTGACTGGAATTGAGGTGGATCAGATCAAGAAGA
<i>M. rosenbergii</i>	GTGCCTTGGAGCAGAAATTGGCCGAACTGTCTGGCACTGAAGTAGATCAGGTTAAAAAGA
<i>E. sinensis</i>	GCATTCTGGAAAAAACTGGCGGAACTGACCGGCATTGAAGTGGATCAGATTAATAAAAAA
<i>P. hawaienses</i>	CTGCTCTTGAGCGTAAATTAGCTGAGCTCTCCGGCATTGAAGTTGACCAAAATCCGGAAAA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>F. chinensis</i>	ATCAGTTTCGAAATGCAGCGGATGAGGCTGTGCGCCATCCGTGAGATGGCTTCATATGTAG
<i>P. monodon</i>	ATCAGTTTCGAAATGCAGCAGATGAGGCTGTGCGCCATCCGTGAGATGGCTTCATATGTAG
<i>M. rosenbergii</i>	ATCAGCTTGCAAAATGCAGCTGATGAGGCTCGTGTGATCGGCGAGATGGCCGCTTATGTTG
<i>E. sinensis</i>	ACCAGCTGGCGAACGCGCGGATGAAGCGCGTGTGATTTCGTGAAATGGCGAGCTATGTTG
<i>P. hawaienses</i>	ATCAGCTTGCTAATGCTGCAGATGAGGCTCGCAGCATCCAGTTGATGGCAGATTATGTTG
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>F. chinensis</i>	AGGGGATTGTTGTACAGCAGGCTGGT---GTTGCTGAGGCTGGTACAGTCAGTCCTCAGA
<i>P. monodon</i>	AGGGGATTGTTGTACAGCAGGCTGGT---GTTGCTGAGGCTGGTACAGTCAGTCCTCAGA
<i>M. rosenbergii</i>	CCAGCATCACCGTTCAGCGAGCCGCT---GAAGCCCAAGTAGGACTTGTGAGCCCCCAGA
<i>E. sinensis</i>	AAGGCATTGTGGTGCAGCAGGCGGGC---GTGGCGCAGGCGGGCCTGGTGAGCCCCCAGA
<i>P. hawaienses</i>	CTGGCATCACAGTCCAGCAGGTGGCCAGGCTGCTCAGCCAACAGTTCTCAACCCCTCAGA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>F. chinensis</i>	TTGCACAGATGTTTGCCCATATCAATGCTGAATTGGGTGAGGAACGAGGTACTCATGCTT
<i>P. monodon</i>	TTGCACAGATGTTTGCCCATATCAATGCTGAATTGGGTGAGGAACGAGGTGCTCATGCTT
<i>M. rosenbergii</i>	TTGCTGACATTTACTCCTATATCAATGCTGAACTGAGCGAGGCCGTGGTGTGCTCATGTTT
<i>E. sinensis</i>	TTGCGGCGATGTTTAGCCATATTAACGCGGAACTGGGCGAAGCGCTGGCGCGCATGCGC
<i>P. hawaienses</i>	TCAATTCATCTTTGACCACATCAAGCAGAGCTGGGGGAGAGCAAGGAGAGCAGCCCT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>F. chinensis</i>	TGCCACCTCTCAAGTATGATTTCAATGCCCTCGAACCCACATCTCCGGCATGATCATGG
<i>P. monodon</i>	TGCCGCTCTCAAGTATGATTTAATGCCCTTGAACCCACATCTCCGGCATGATCATGG
<i>M. rosenbergii</i>	TTCTCCCCTGAAGTACGACTACGATGCATTGGAGCCTCACATTTCTGGTACCATCATGG
<i>E. sinensis</i>	TGCCCGCTGAAATATGATTATGATGCGCTGGAACCCCATATTTAGCGGCATGATTATGG
<i>P. hawaienses</i>	TGCCACCCCTTAAATATGATTACAAGGGGCTGGAGCCCATATCTTGGCCTCATTTATGG
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>F. chinensis</i>	AGATCCACCACACAAAGCATCACAGGGCTACATTAACAACCTAATTGCTGCTACAAAGA
<i>P. monodon</i>	AGATCCACCACACAAAGCATCACAGGGCTACATTAACAACCTAATTGCTGCTACAAAGA
<i>M. rosenbergii</i>	AAATCCATCACACCAAGCATCACCAAGCATATATCAACAACCTTAAAGCAGCAACAGATA
<i>E. sinensis</i>	AAATTCATCATACCAACATCATCAGGCTATATTAACAACCTGATTCGGCGCACCAAAA
<i>P. hawaienses</i>	AGATCCACCACACCAAGCATCATCAGGGCTACATCAACAACCTCAAGGCTGCTGCGGCCA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>F. chinensis</i>	AGTTGGTGGAGGCAGAGGCAGCCAATGATGTGAATGCAATGAATGCCCTTCTACCTGCTA
<i>P. monodon</i>	AGTTGGTGGAGGCAGAGGCTGCCAATGATGTGAATGCAATGAATGCCCTTCTACAGCTA
<i>M. rosenbergii</i>	AGTTGATAGAGGCCGAACAAAACAATGATGTAAATGCCATGAATGCGTTGTTACTGCCA

E.sinensis AACTGGTGGGAGCGGAAGCGGCGAACGATGTGGGCGCGATGAACGCGCTGCTGCCGGCGA
 P.hawaienses AGCTCAACGACGCCAGGCCAAGAACGACGTGCGCGCTGCAACGCTCTGTTCCCTGCC
 * * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** *

F.Chinensis TCAAGTTCAATGGAGGTGGCCACTTGAACCACACCATTTTCTGGACCAACATGGCTCCCG
 P.monodon TCAAGTTCAATGGAGGTGGCCACTTGAACCATAACCATCTTCTGGACCAACATGGCTCCTG
 M.rosenbergi TCAAGTTCAACGAGGTGGTTCACCTGAACCACACCATCTTCTGGACCAACATGAGCCCAA
 E.sinensis TTAAAAAATTTAACGGCGGCCATCTGAACCATAACCATTTTTTGGACCAACATGGCGCCGG
 P.hawaienses TCAAAATTCATGGTGGAGGTCACCTGAACCACACCATCTTTTGGACCAACATGGCGCCCA
 * ** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** *

F.Chinensis ATGCT-----GTTGGTGGAGCTGAAGGTGCAATTGCACAAGCCATTGATGATAGCT
 P.monodon ATGCT-----GTTGGTGGAGCCAGAAGGAGCAGTTGCACAAGCCATTGATGATAGCT
 M.rosenbergi ATGGA-----GTTGGAGAACCAAGTGGTTCAGTTGCTGATGCCATTAATGCTGAAT
 E.sinensis ATGCG-----GGCGGCAACCGAGCGGCGCGGTGGCGGATGCGATTAACGAAAGCT
 P.hawaienses ATGCTTCAAGCTCCGCCCTGAGCCACGGGGATCTCCTCAGTGCCATTGTTGCCAAGT
 *** * ** ** * * ** ** * ** ** *

F.Chinensis TTGGATCATTCCAGTCCTTTAAGGACAAATTTTCTGCTGCCAGCGTTGGAGTGAAAGGCT
 P.monodon TTGGATCATTCCAGTCCTTTAAGGACAAATTTTCTGCTGCCAGCGTTGGAGTGAAAGGCT
 M.rosenbergi TTGGTTCATTCCAGGCATTTAAGGATAAGTTTTTCTGCTGCTAGCGTGGGCGTGAAAGGCT
 E.sinensis TTGGCAGCTTTCCAGAGCTTTAAGATAAATTTAGCGCGGCGAGCGTGGGCGTGAAAGGCA
 P.hawaienses TCGGGTCTATCAGAACTTCCAGAGCGAATTCAGCGCAGCGAGTGTGCCCGTCAAGGGCT
 * ** * ** ** * ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** *

F.Chinensis CAGGCTGGGGATGGCTCGGCTATTGCCCAATCACAACAAGCTTGAGATCGCCACTTGCC
 P.monodon CAGGCTGGGGATGGCTCGGCTATTGCGCCAATAACAACAAGCTTGAGATCGCCACTTGCC
 M.rosenbergi CAGGTTGGGGCTGGCTTGGCTACTGTCTTAAGAACGACAAAGTTGCCGTTGCCACTTGCC
 E.sinensis GCGGCTGGGGCTGGATTGGCTATTGCCCGAAAAACGATAAACTGGCGATTGCGACTTGCC
 P.hawaienses CCGGCTGGGGCTGGCTCGGCTACTGCCCAAGAAGAATGAGCTCGCCATCGCCACTTGCC
 * * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** *

F.Chinensis AGAACCAGGATCCCTTGCAGATCACTCATGGTCTGGTTCATTGCTCGGCCTTGATGTCT
 P.monodon AGAACCAGGATCCCTTGCAGATCACTCATGGCTGGTTCATTGCTCGGTCTTGATGTCT
 M.rosenbergi AAAACCAGGATCCCTTTCAGCTTACACATGGATTGGTACCCTACTTGGACTGGACGTAT
 E.sinensis AGAACCAGGATCCGCTGCAGCTGACCCATGGCTGGTGGCGCTGCTGGGCTGGATGTGT
 P.hawaienses AGAACCAGGATCCCTTGCAGCTCACCCACGGCTGGTACCCCTGCTTGGACTGGACGTGT
 * ** ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** *

F.Chinensis GGGAGCATGCTTACTACCTTTCAGTACAAGAACCCTCCGTGCAGATTACGTGAAGGCCTTCT
 P.monodon GGGAGCATGCTTACTACCTTTCAGTACAAGAACCCTCCGTGCAGATTACGTGAAGGCCTTCT
 M.rosenbergi GGGAAATGCCTACTATCTGCAGTACAAGAACCCTTAGGGCTGACTATGTCAAAGCTTCT
 E.sinensis GGGAAATGCCTATATCTGCAGCTAAAAACCCTGCGTGCAGATTATGTGAAAGCGTTTT
 P.hawaienses GGGAAACGCTTACTACCTTTCAGTACAAGAACCCTGCGTGCAGATTACGTGAAGGCCTTCT
 *** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** *

F.Chinensis TCAATGTCATCAACTGGCCGAATGTGAACGAGCGTTATGAAAAAGC---CTGTAAGGATG
 P.monodon TCAATGTCATCAACTGGCCGAATGTGAACGAGCGTTATGAGAAAGC---TTGTAAGGATG
 M.rosenbergi TTAATGTCATCGACTGGTCTAATGTAAACGAGCGGTACGAAAACGC---TCGCAAGGCTG
 E.sinensis TTAACGTGATTAACGGAGCAACGTGAACGAACGTTATGAAAACGCGCGTCTGTAAGCGG
 P.hawaienses TCAATGTCATCAACTGGGAGAACGTTGCGTACGTTACGCTAAGGC---CCGCGCTGATG
 * ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** *

F.Chinensis CAGGTCATTGATTTTCTCGGTG-A-----
 P.monodon CAGGTCATTGACTCCTCGGGG-C-AACCAAAGAACAGTGTC--ACAAGTCGTTCTCCACC
 M.rosenbergi CTGGACATTGACTCCCCTGACTGAACAACACCTTGTAACCAAGGGCCTTTCTCACC
 E.sinensis CCGGCCATTGACTCGCACGGTC-CCCCACCCACCGGCCCGCTCTAGCCTCCACTTGCT
 P.hawaienses CCGGCCATTGAAGTGGAGCTTCTGCTCTTGGAGCTCACCTC--CCACGCTTGACC-CT
 * ** ** ** *

F.Chinensis -----
 P.monodon TGTAACCTCAGAAGC-----TGACTAGCTGTTGTGATAATGCACCTAAGCTGTCTTCAA-GA
 M.rosenbergi TGTAAGTCGTTACCATTGGCGACCTAGTGATATTGGAATATTCCAACCTGAATATAA-AA
 E.sinensis AATGCCTTG--GCCAGTGTCTGTACATAGCTTGTACTTTTTTGTGTGTGTGTGTTGA
 P.hawaienses CATCCCTTCCAAATA---TTGAACATCTTACATGACGCCTCTTTGTGTGGCCTTTCAAGA

F.chinensis	-----
P.monodon	TGGT--TTCATTGG-GTGCCCTCTAAAAAAAATTATTTTTCATTCAAGACCACAGAAG
M.rosenbergi	GGTA--CTCATTGTGCTATACCCGATAAAAAGTTGTTTTTTTTT----ATTTC-----
E.sinensis	AGGT-TCTGTANCCTCCTCTTTTGTATTGACTGAAGGTAGTTTGTGTTTTGTTTTCG
P.hawaienses	CATTAGTTTATTTGCGCTTTGCTTCACAGTACTATGTTATTAAGCCGTTTCAGTTTACGCT

Anexo 11. Salinidades obtidas para cada bioensaio após a preparação das soluções salinas com sal de mar artificial.

Salinidade esperada	Bioensaio I	Bioensaio II	Bioensaio III
9	-	9,2	9,3
12	12,7	12,3	12,7
15	15,8	15,6	15,2
18	18,2	18	18,5
21	21,4	21,5	21,8
24	24,3	24,2	24,4
27	-	27,7	27,5
30	-	30,1	30,3
32	-		32,5