

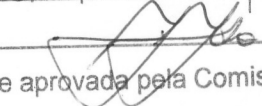


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Gustavo Turqueto Duarte

**CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO CONTROLE DO
GENOMA MITOCONDRIAL EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA
CALLIPHORIDAE (INSECTA: DIPTERA) E
PERSPECTIVAS FILOGENÉTICAS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Gustavo Turqueto Duarte

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal e
Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Campinas, SP, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D85a	<p>Duarte, Gustavo Turqueto Caracterização da região controle do genoma mitocondrial em espécies da família Calliphoridae (Insecta: Diptera) e perspectivas filogenéticas / Gustavo Turqueto Duarte. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. DNA mitocondrial. 2. Região controle. 3. Evolução molecular. 4. Reconstrução filogenética. 5. Diptera. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
-------------	---

Título em inglês: Characterization of the control region of the mitochondrial genome in species of family Calliphoridae (Insecta: Diptera) and phylogenetic perspectives.

Palavras-chave em inglês: Mitochondrial DNA; Control region; Molecular evolution; Phylogenetic reconstruction; Diptera.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Mestre em Genética Animal e Evolução.

Banca examinadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Michel Georges Albert Vincentz, Sérgio Furtado dos Reis.


Data da defesa: 30/03/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 30 de março de 2007

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis


Assinatura

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Arias

Assinatura

*“The scientist does not study nature because it is useful to do so.
He studies it because he takes pleasure in it,
and he takes pleasure in it because it is beautiful.
If nature were not beautiful it would not be worth knowing,
and life would not be worth living.”*

Jules Henri Poincaré

Aos meus pais, Haydée e Sebastião, pelo apoio, exemplo,
incentivo, dedicação, e por toda uma vida.

Agradecimentos

Não poderia começar de outra forma senão agradecendo às pessoas que me acompanham desde os meus primeiros passos como pesquisador. Agradeço à Profa. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, minha orientadora e exemplo desde as primeiras aulas de BG-380, por servir como guia, por criticar e cobrar quando foi preciso, por ensinar a me defender, a argumentar. À Ana Carolina M. Junqueira, por também me acompanhar desde meus primeiros passos Laboratório de Genética Animal, quando ainda era difícil manter os braços dentro do fluxo, pelas inúmeras revisões de relatórios e sugestões em experimentos.

Agradeço ao Prof. André Victor Lucci Freitas, pelas sugestões (e bom humor!) na banca prévia. Ao Prof. Sérgio Furtado dos Reis, pela grande disposição e compreensão, e por participar da banca. Ao Prof. Michel Georges Albert Vincetz, por participar tanto da banca prévia como da defesa, e também pela compreensão e atenção, sendo um exemplo profissional.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha formação profissional, por me ajudarem não só a adquirir conhecimento mas, principalmente, a desenvolver senso crítico.

Agradecimentos ao pessoal do Lab... Alê, Ana Cláudia, Bárbara, Joan, Jaú, Lissiene, Mari Loira, Marco Antonio Palocci, Pri, Pedro, Salete e Tati, pelo companheirismo, cafés, conversas e risadas (principalmente às sextas, antes da BG). Em especial, agradeço à Aline e à Norma, que sempre me apoiaram; à Lu e Karina, pela incomensurável ajuda nas análises de resultados e dúvidas teóricas crônicas de última hora; à Rosângela (ou Rosa), por todo o trabalho técnico, experiência, “toques” e por me deixar surdo do ouvido direito!; ao Renato e Pablo, companheiros dentro e fora do laboratório; ao Tulio, pelas diversas conversas (relacionadas a trabalho ou não!), por ouvir meus devaneios que, sim, muitos fazem sentido!; à Mari Lyra, pelo bom humor contagiante, por ser minha personal-conselheira, desde o Lab até a Universitária, sobre todos os assuntos possíveis...

Agradeço ao pessoal da minha turma da bio! São vários amigos e vários nomes entrariam aqui, mas ainda não decorei todos! Em especial, obrigado André Minas, pelas diversas discussões sobre tudo o que é possível; Egito, Pedro, Zapa, Breno, Fred, Frango e

Buzatto, pelo convívio desde a época da Toca até uma festa qualquer de última hora, a qual sempre se fez valer a pena!; Amanda, Julia e Simone, meus ombros amigos em tempos de crise...

Agradeço ao pessoal de Jundiaí, Daniel, Ilana, Tais, Simone e Rubão. Em especial, obrigado Zé Du, pelas viagens, discussões sobre trabalho, artigos, ou simplesmente por passar horas ouvindo música e jogando qualquer coisa. São amigos de loooonga data, e assim espero que seja por muito mais tempo.

Agradeço à minha família, por sempre incentivar. Aos meus avós, tios e primos que sempre se interessaram pelo meu trabalho e acreditaram no meu potencial (e espero um dia poder corresponder à altura!). Ao meu irmão, Rafael, pela cumplicidade, e cuja determinação respeito e admiro. Agradeço ao meu pai, Sebastião, e minha mãe, Haydée, pelo apoio, dedicação, exemplo, colaboração, muita paciência, incentivo, entendendo, ou simplesmente compreendendo, o que se passava quando não me encontrava nos melhores dias.

Agradeço aos apoios financeiros concedidos pelo CNPq e FAPESP, que possibilitaram que este projeto fosse realizado.

ÍNDICE	PÁGINA
Resumo	1
Abstract	3
Introdução	
<i>A família Calliphoridae</i>	5
<i>O DNA mitocondrial animal</i>	9
<i>A Região Controle</i>	10
Objetivos	12
Materiais e Métodos	
1. <i>Amostras das espécies de Calliphoridae</i>	13
2. <i>Extração do DNA</i>	15
3. <i>Amplificações</i>	17
4. <i>Clonagem e seqüenciamento</i>	19
5. <i>Análise das seqüências</i>	19
6. <i>Análise filogenética</i>	20
Resultados	
1. <i>Acesso à região controle</i>	22
2. <i>Genes de tRNA</i>	22
3. <i>Organização estrutural e composição nucleotídica da RC</i>	24
3.1. <i>Domínio conservado da RC</i>	25
3.2. <i>Domínio variável da RC e identificação das duplicações de tRNA</i>	28
4. <i>Utilização do domínio conservado para inferência filogenética</i>	31
Discussão	
1. <i>Acesso à região controle</i>	34
2. <i>A caracterização da RC do DNAm</i>	34
2.1. <i>O domínio conservado da RC e sua relação com a replicação do DNAm</i>	35

<i>2.2. O domínio variável da RC</i>	36
<i>2.3. A região controle como hot spot para rearranjo mitocondrial</i>	36
<i>3. Perspectivas filogenéticas na família Calliphoridae utilizando a RC</i>	40
Conclusões	42
Anexo - “Characterization of the control region of the mitochondrial DNA in myiasis-causing flies (Diptera: Calliphoridae) and its role as a hot spot for the mitochondrial genome rearrangement”	
<i>Resumo</i>	43
<i>Manuscrito</i>	44
Referências Bibliográficas	85

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

PÁGINA

FIGURAS

Figura 1. Exemplificação de armadilha utilizada para captura de amostras.	14
Figura 2. Organização da RC e sítios de hibridação dos oligonucleotídeos	18
Figura 3. Estrutura secundária e alinhamento das seqüências de <i>tRNA^{Gln}</i> e <i>tRNA^{Ile}</i> .	23
Figura 4. Alinhamento das seqüências do domínio conservado da RC.	25
Figura 5. Diversidade nucleotídica (Pi) apresentada pelo domínio conservado da região controle obtida pelo método de <i>sliding window</i> .	26
Figura 6. Diferentes organizações da RC na família Calliphoridae, indicando as duplicações gênicas	29
Figura 7. Alinhamento das seqüências dos <i>tRNA^{Ile}</i> duplicados, evidenciando a presença das mesmas substituições nucleotídicas em ambas as cópias.	30
Figura 8. A. Árvore consenso inferida pela análise de Máxima Parcimônia B. Árvore inferida por NJ utilizando distância p.	33
Figura 9. A. Modelo de replicação assimétrica do DNAm. B. Envolvimento do <i>cluster</i> de tRNAs com a duplicação gênica,	39

TABELAS

Tabela 1. Dados sobre as amostras utilizadas no trabalho.	15
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região controle.	18
Tabela 3. Variação de extensão da região controle e sua composição nucleotídica em espécies da família Calliphoridae	24
Tabela 4. Caracterização das duplicações de tRNA e suas regiões flangeadoras no domínio variável da RC.	30
Tabela 5. Limites de divergência do domínio conservado entre clados-irmãos obtidos por distância p.	32

ABREVIACOES

<i>cox1</i>	Gene da subunidade I do citocromo oxidase c
<i>cox2</i>	Gene da subunidade II do citocromo oxidase c
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAmt	DNA mitocondrial
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
Gln	Glicina
Ile	Isoleucina
kb	Mil pares de base
Leu	Leucina
Met	Metionina
MP	Máxima Parcimônia
NJ	<i>Neighbor-Joining</i>
<i>nd4</i>	Gene da subunidade 4 da NADH desidrogenase
<i>nd4L</i>	Gene da subunidade 4L da NADH desidrogenase
pb	Pares de base
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PCR-RFLP</i>	<i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<i>RAPD</i>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RC	Região Controle
RI	Região Intergênica
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
srRNA	Subunidade 12S do rRNA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
tRNA	RNA transportador

Resumo

As espécies da família Calliphoridae, conhecidas como moscas varejeiras, apresentam ampla distribuição geográfica no Velho e Novo Mundo. Por serem causadores de miíases e vetores de doenças, muitas espécies possuem hábito sinantrópico, importância econômica, médico-sanitária e forense. Enquanto algumas espécies são pragas da pecuária e acarretam grande prejuízo econômico devido às infestações, outras são importantes para a entomologia forense, auxiliando na investigação de crimes e questões médico-legais. Neste contexto, os marcadores moleculares têm sido de grande valia para estudos genéticos relacionados à família Calliphoridae, sendo utilizados em estudos populacionais, evolutivos e biogeográficos, complementando análises ecológicas e sistemáticas. Dentre os marcadores moleculares, o DNA mitocondrial (DNAm) tem mostrado potencial para estudos evolutivos relacionados à família Calliphoridae, devido a várias características, tais como: possuir uma estrutura genética simples, geralmente não apresentando íntrons, DNA repetitivo, elementos transponíveis e pseudogenes; exibir uma forma de transmissão predominantemente linear (herança materna); grande número de cópias e, finalmente, por apresentar maior taxa de substituição nucleotídica, quando comparada ao DNA nuclear. Na maioria das espécies animais, o DNAm possui cerca de 16-20kb e apresenta 37 genes, dos quais 13 são codificadores de proteínas, 2 de subunidades ribossomais (rRNAs) e 22 de tRNAs. Neste genoma, a maior porção não codificadora é chamada região controle (RC), ou A+T em insetos, por ser rica nesses dois nucleotídeos. Evidências experimentais com insetos, crustáceos e vertebrados sugerem que essa região esteja relacionada à replicação e transcrição do genoma mitocondrial. Eventos de rearranjos gênicos envolvendo a região controle e os tRNAs adjacentes são relativamente frequentes em insetos. Recentemente uma duplicação do gene para tRNA de isoleucina (*tRNA^{Ile}*) foi descrita em três espécies do gênero *Chrysomya*, não sendo encontrada nas demais espécies de Calliphoridae estudadas até então, sugerindo que a duplicação poderia ter se originado num evento evolutivo anterior à diversificação desse gênero e que seria um marcador molecular eficiente para sua identificação. Dessa forma, com o intuito de caracterizar a região controle do DNAm na família Calliphoridae bem como a duplicação do *tRNA^{Ile}*, 15 espécies pertencentes a sete gêneros desta família foram analisadas. Nos calliforídeos estudados, a região controle apresentou-se dividida em dois domínios com características distintas: um conservado,

devido à presença de blocos de seqüência conservados além de estruturas conservadas em vários grupos de insetos, que podem estar relacionadas à replicação e transcrição do DNAm; e um domínio variável, tanto em tamanho quanto em seqüência. Enquanto o domínio conservado apresentou potencial para estudos filogenéticos, o domínio variável apresentou características interessantes para estudos com estrutura de populações. A caracterização da RC de califorídeos também permitiu a identificação da duplicação do *tRNA^{Ile}* em outras duas espécies de *Chrysomya*, além de uma espécie do gênero *Calliphora*. Um segundo tipo de duplicação, envolvendo os *tRNA^{Ile}* e *tRNA^{Gln}*, foi identificada na espécie do gênero *Phormia*. Os dados sugerem que o domínio variável da região controle possa atuar como um “hot spot” para eventos de rearranjo. Para a avaliação do potencial para estudos filogenéticos do domínio conservado, foram analisadas as seqüências desse domínio da região controle de 26 indivíduos pertencentes a 18 espécies de califorídeos. Os resultados dão suporte à monofilia das três subfamílias estudadas (Chrysomyinae, Luciliinae e Calliphorinae) corroborando estudos morfológicos e moleculares realizados previamente em Calliphoridae. Além disso, o domínio conservado da região controle mostrou-se um marcador eficiente para a identificação de espécies de califorídeos, mesmo quando espécies semelhantes morfológicamente foram comparadas. Os resultados obtidos indicam um potencial dessa região do genoma mitocondrial tanto para estudo com *taxa* com divergência recente como para o diagnóstico de espécies de importância forense.

Abstract

The species of family Calliphoridae, known as blowflies, present wide geographic distribution throughout Old and New World and many have synantropic habit, being of economic, medical, sanitary and forensic importance for causing myiasis and for being vectors of diseases. While some species are parasites of livestock and causes great economic prejudices, others are important for forensic entomology, helping in legal investigations. Molecular markers are providing valuable results on genetic-evolutive studies related to the family Calliphoridae, been used in population structure, evolutive and biogeographic studies, complementing ecological and systematic analyses. Among the molecular markers, the mitochondrial DNA have shown a great potential for evolutive studies related to family Calliphoridae, being many the features that make it a rich source of genotypic characters: simple genetic structure, which usually lacks introns, transposable elements and pseudogenes; its predominantly maternal inheritance; high copy number and its higher rate of nucleotide substitution compared to nuclear DNA. In most animal species, mtDNA is a circular, double-stranded 16-20 kb molecule that generally contains 37 genes, being 13 protein-coding genes, two genes for subunits of ribosomal RNA (rRNA) and 22 transfer RNA (tRNA) genes. Within this genome, the major non-coding region is known as control region, or A+T region in insects for being rich in these nucleotides. Experimental evidences with insects, crustaceans and vertebrates suggest that this region is related to the replication and transcription of the mitochondrial genome. Rearrangements events involving the control region and its flanking tRNAs may be frequent in insects. In recent works, an isoleucine tRNA gene (*tRNA^{Ile}*) duplication was reported for three *Chrysomya* species, not been identified in the other calliphorids species studied so far, suggesting that the duplication may have occurred before the diversification of this genus and that it would be an efficient marker for its identification. Therefore, intending to characterize the control region of mitochondrial DNA in family Calliphoridae just as the *tRNA^{Ile}* duplication, 15 species belonging to seven genera of this family were analyzed. In the studied calliphorids, two domains were recognized in the control region: a conserved domain with conserved sequence blocks and conserved structures also identified in other insect groups, which relates the control region to the replication and transcription of mitochondrial DNA; and a variable domain that varies markedly in sequence and length. Whereas the conserved

domain has shown a potential for phylogenetic studies, the variable domain has interesting features for population studies. The characterization of the control region in various calliphorids species also showed the presence of the duplication of the *tRNA^{Ile}* in two other species of *Chrysomya* and in a species of genus *Calliphora*. A different duplication, involving the *tRNA^{Ile}* and *tRNA^{Gln}*, was identified in the species of genus *Phormia*. The present data suggests that the variable domain of the control region may act as a hot spot for rearrangement events. For evaluating the potential of the conserved domain for phylogenetic studies, sequences of this domain were analyzed for 26 specimens belonging to 18 calliphorid species. The results supports the monophyly of the three subfamilies studied (Chrysomyinae, Luciliinae and Calliphorinae), corroborating previous morphologic and molecular studies. Moreover, the conserved domain of control region showed to be useful for calliphorids species identification, even when morphologic similar species were compared. The data reveals a potential of this region of the mitochondrial genome for studies with recent diverged taxa and also for the diagnosis of species with forensic importance.

Introdução

A família Calliphoridae

Os insetos compreendem 75% das espécies animais descritas, com aproximadamente 900.000 espécies, sendo encontrados nos mais diversos ecossistemas, demonstrando a grande capacidade de adaptação ecológica desse grupo (Behura, 2006). Dentre os insetos, as espécies da ordem Diptera estão entre as maiores radiações de organismos eucariotos terrestres (Wiegmann *et al.*, 2003). Os dípteros são comumente conhecidos por "moscas verdadeiras", com aproximadamente 120.000 espécies descritas, abrangendo os mosquitos, as moscas das frutas, varejeiras e domésticas, por exemplo. Diptera se divide em duas subordens: Nematocera, que inclui geralmente insetos pequenos, delicados e com antenas longas, como os mosquitos; e Brachycera, que é formada por moscas mais robustas, compactas e com antenas curtas. Esta subordem é representada por cerca de 120 famílias e mais de 75.000 espécies descritas (Maddison and Schulz, 1996-2006; Wiegmann *et al.*, 2003). Uma das subdivisões de Brachycera, Calyptratae, é um dos maiores grupos conhecidos e se destaca por sua grande diversidade (Yeates and Wiegmann, 1999). Neste grupo, as moscas da família Calliphoridae, que compreendem mais de 1.000 espécies (Rognes, 1997) conhecidas popularmente como varejeiras, apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todo o planeta, sendo que muitas possuem hábito sinantrópico e uma importância econômica, médico-sanitária e forense por serem causadoras de miíases e vetores de patógenos (Baumgartner and Greenberg, 1984). Miíases (do grego *myia*: mosca) foram definidas por Zumpt (1965) como infestações em vertebrados vivos causadas por larvas de dípteros que, pelo menos durante certo período, alimentam-se de tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de suas substâncias corporais líquidas ou do alimento por ele ingerido. As miíases primárias são infestações de larvas em hospedeiros vivos, enquanto miíases secundárias são causadas em tecidos necrosados e em decomposição.

Segundo Zumpt (1965) e Hall and Wall (1995), as moscas causadoras de miíases podem ser divididas de acordo com o hábito de vida: (1) espécies saprófagas, que atuam em material orgânico em decomposição e carcaças de animais mas podem porventura invadir infestações já existentes; (2) espécies facultativas, as quais normalmente adotam um hábito

ectoparasita, sendo capazes de iniciar miíases, mas que podem ocasionalmente atuar como saprófagas; (3) parasitas obrigatórios, que necessariamente se alimentam de tecidos vivos do hospedeiro, iniciando infestações. Apesar da origem evolutiva do hábito de causar miíase em Calliphoridae permanecer incerto (Zumpt, 1965; Stevens and Wallman, 2006), essa divisão funcional pode refletir a evolução progressiva do parasitismo na família. Espécies saprófagas, que podem ocasionalmente causar miíases em animais feridos ou clinicamente pré-dispostos, podem ter sido os ancestrais do hábito de parasitismo. Estas, então, deram origem aos ectoparasitas facultativos, que atuam preferencialmente como agentes causadores de miíases, mas que podem atuar como saprófagos. Finalmente, deste estado intermediário, os parasitas obrigatórios se desenvolveram (Zumpt, 1965; Hall and Wall, 1995; Stevens, 2003).

Dentre os prejuízos econômicos causados pelas espécies causadoras de miíases primárias, são relevantes os causados à pecuária, através de abortos, redução na produção de leite, perda de peso e fertilidade, além da baixa qualidade da carne e do couro. A espécie *Cochliomyia hominivorax*, conhecida como mosca da bicheira, é o principal agente causador de miíases primárias no Novo Mundo (Infante Vargas and Azeredo-Espin, 1995; Hall and Wall, 1995; Otranto and Stevens, 2002). Outras espécies de califorídeos, como *Lucilia cuprina* e *Chrysomya bezziana*, são pragas na Oceania e no Velho Mundo, respectivamente (Hall and Wall, 1995; Otranto and Stevens, 2002).

Igualmente relacionadas à importância econômica da família Calliphoridae, estão as técnicas utilizadas para seu controle. Um dos principais métodos é a aplicação de inseticidas (Hall and Wall, 1995; Carvalho *et al.*, 2006), no entanto, seu uso indiscriminado e contínuo podem levar à seleção de indivíduos resistentes (Ceccatti, 2004; Carvalho *et al.*, 2006). Outra técnica eficientemente aplicada para o controle de *Co. hominivorax*, e não menos dispendiosa, foi a utilização de insetos estéreis (*sterile insect technique*, ou *SIT*), que propiciou a erradicação dessa espécie da América do Norte e Líbia, além de grande parte da América Central (Wyss, 2000; Kouba, 2004).

Um grupo relevante em Calliphoridae é formado pelo gênero *Chrysomya*, cujas espécies encontravam-se distribuídas originalmente nas regiões tropicais e subtropicais do Velho Mundo, onde apresentam grande abundância e importância econômica (Baumgartner and Greenberg, 1984). Em meados da década de 1970, quatro espécies foram introduzidas

no Novo Mundo: *C. rufifacies*, *C. putoria*, *C. albiceps* e *C. megacephala*, sendo estas três últimas coletadas na região Sul e Sudeste do Brasil (Imbiriba *et al.*, 1977; Guimarães *et al.*, 1978 e 1979; Jirón, 1979). Ainda não é certo o que causou a introdução de *C. putoria* e *C. albiceps* no Brasil, sendo o motivo mais provável sua vinda junto com os navios de refugiados angolanos, que traziam consigo animais domésticos (Laurence, 1986). A espécie *C. rufifacies*, por outro lado, foi introduzida nas Américas pela Costa Rica (Jirón, 1979). Quanto a *C. megacephala*, sabe-se que é proveniente da Ásia e Austrália, sendo também uma espécie introduzida na África (Prins, 1979).

As espécies do gênero *Chrysomya* apresentam grande capacidade de dispersão autônoma, o que possibilitou que, 4 anos após sua introdução no Novo Mundo, *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria* e *C. rufifacies* se tornassem espécies amplamente distribuídas neste continente (Baumgartner and Greenberg, 1984). Aliada à sua capacidade de dispersão, o potencial de adaptação a novos ambientes deste gênero causa alterações ecológicas na fauna nativa devido à competição por substratos para alimentação e reprodução. No Peru, por exemplo, entre 1980 e 1981, a população de *Co. macellaria* sofreu grande supressão, diminuindo de 89% para 0,19% das espécies mais coletadas em determinadas regiões, com o aumento das populações de *C. putoria* e *C. albiceps* (Baumgartner and Greenberg, 1984). Em Goiânia e Campinas, um declínio similar foi observado na população nativa de *Co. macellaria* após a introdução de *C. putoria* (Guimarães *et al.*, 1979). Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, as espécies *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria* são atualmente as mais abundantes na decomposição de material orgânico (De Souza and Linhares, 1997; Vianna *et al.*, 2004).

A família Calliphoridae apresenta, ainda, relevância para a entomologia forense, que tem sido uma área de pesquisa de grande importância para auxiliar na investigação de crimes e questões médico-legais. Os califorídeos estão entre as primeiras espécies a colonizar um cadáver, auxiliando principalmente na estimativa do intervalo pós-morte, além da inferência de movimentação do corpo, de acordo com o padrão de colonização, e a causa da morte, através da entomotoxicologia (revisão em Amendt *et al.*, 2004). Dessa forma, a identificação dos espécimes trata-se de um pré-requisito crucial para a estimativa do tempo decorrido após a morte (Harvey *et al.*, 2003; Amendt *et al.*, 2004). Em regiões temperadas, espécies dos gêneros *Calliphora*, *Protophormia* e *Lucilia* são algumas das

primeiras a ocuparem corpos, sendo o gênero *Calliphora* considerado de grande importância pela ampla distribuição de *Ca. vicina* e *Ca. vomitoria* no norte da Europa (Ames and Turner, 2003). No Brasil, se destacam as espécies de *Chrysomya*, *Cochliomyia*, *Lucilia* e *Hemilucilia* (Oliveira-Costa, 2003).

Dessa forma, os estudos genético-evolutivos e populacionais relacionados à família Calliphoridae, são importantes para a caracterização da variabilidade genética intra e interespecífica, contribuindo tanto para o esclarecimento de mecanismos de seleção à resistência a inseticidas (Carvalho *et al.*, 2006) e programas de controle e erradicação de espécies (Infante Vargas and Azeredo-Espin, 1995; Hall *et al.*, 2001; Lyra *et al.*, 2005), como para o diagnóstico espécie-específico (Wells and Sperling, 1999; Harvey *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Ames *et al.*, 2006). Diversas técnicas são empregadas para a caracterização da variabilidade genética envolvendo espécies de califorídeos, como *PCR-RFLP* [*polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism* (Infante Vargas and Azeredo-Espin, 1995; Litjens *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2003; Lyra *et al.*, 2005)], *RAPD* [*random amplified polymorphic DNA* (Stevens and Wall, 1997; Infante-Malachias *et al.*, 1999)], microssatélites (Torres *et al.*, 2004), além dos estudos filogenéticos (Wells and Sperling, 1999; Hall *et al.*, 2001; Otranto and Stevens, 2002; Stevens *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2003; Stevens, 2003; Chen *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2004; Wallman *et al.*, 2005; Ames *et al.*, 2006) e caracterização de genomas mitocondriais completos (Lessinger *et al.*, 2000; Junqueira *et al.*, 2004). Entretanto, conflitos taxonômicos ainda persistem para a identificação de algumas espécies de califorídeos, devido a similaridades morfológicas e ecológicas, sendo que a identificação pode ainda ser prejudicada por polimorfismos intra-específicos, cuja frequência varia de espécie para espécie (Tantawi and Greenberg, 1993). Neste cenário, a análise de marcadores moleculares tem se mostrado uma abordagem de investigação de grande valia, com capacidade para resolver questões envolvendo ecologia, eventos de introdução, variabilidade genética, relações entre espécies e distribuição biogeográfica de membros de determinados *taxa* (Flook *et al.*, 1999). Para a sistemática de insetos, os marcadores moleculares que tem sido mais utilizados compreendem regiões do DNA mitocondrial (DNAm) e do “cluster” de genes ribossomais nucleares (Caterino *et al.*, 2000).

O DNA mitocondrial animal

Encontradas na maioria das células eucarióticas, as mitocôndrias estão diretamente ligadas ao metabolismo, apoptose e envelhecimento celular. Essas organelas subcelulares possuem seu próprio genoma, tipicamente uma molécula circular nos metazoários, sendo exceções algumas classes de cnidários, como Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa (revisão em Boore, 1999). Na maioria das espécies animais, o DNAm possui cerca de 16-20kb, e apresenta 37 genes, dos quais 13 são codificadores de proteínas, 2 de subunidades ribossomais (rRNAs) e 22 de tRNAs, além de uma região não codificadora (revisão em Boore, 1999). O produto desses genes, junto com RNAs e proteínas importadas do citoplasma, garantem à mitocôndria sistemas próprios para replicação do seu DNA, transcrição, processamento de RNA mensageiro e tradução de proteínas (Boore, 1999). Para algumas espécies, a transcrição dos genes é feita a partir de uma única fita do DNAm, enquanto para outras os genes encontram-se distribuídos em ambas as fitas da molécula de DNA (Boore, 1999). É possível que a transcrição ocorra de forma policistrônica, ou seja, os genes são transcritos em seqüência, ocorrendo processamento após o término da transcrição em RNAs mensageiros específicos (Ojala *et al.*, 1981; Boore, 1999). De acordo com esta teoria, os tRNAs sinalizariam a clivagem, “pontuando” o processamento do RNA policistrônico através de suas estruturas secundárias (Ojala *et al.*, 1981).

O genoma mitocondrial animal tem se mostrado um excelente marcador molecular para estudos evolutivos, sendo várias as características que o tornam uma fonte abundante de caracteres genotípicos, tais como: possuir uma estrutura genética simples, geralmente não apresentando íntrons, DNA repetitivo, elementos transponíveis ou pseudogenes; exibir herança predominantemente materna; e, finalmente, por apresentar maior taxa de substituição nucleotídica quando comparada ao DNA nuclear (Avice *et al.*, 1987; Moore, 1995). Além disso, o seu grande número de cópias facilita a amplificação e o acesso à informação genética de amostras para análise forense, espécimes de museu e de coleções entomológicas, nas quais os danos oxidativos e hidrolíticos decorrentes do método de preservação, ou que ocorrem naturalmente com o tempo, degradam o DNA, reduzindo a recuperação de seqüências a algumas centenas de pares de base (Pääbo, 1989; Junqueira *et al.*, 2002; Parson *et al.*, 2004). Dessa forma, o DNAm é amplamente aplicado em estudos genético-evolutivos, tais como estruturação de populações e filogeográficos (Stevens and

Wall, 1997; Hall *et al.*, 2001; Schultheis *et al.*, 2002; Diniz *et al.*, 2005; Froufe *et al.*, 2005), identificação de espécies (Litjens *et al.*, 2001; Wells and Sperling, 2001; Herbert *et al.*, 2003a; Schroeder *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004), e estudos filogenéticos (Moore, 1995; Flook *et al.*, 1999; Caterino *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2001; Froufe *et al.*, 2005; Gongora *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006), nos mais diversos grupos animais.

A Região Controle

A maior porção não codificadora do genoma mitocondrial animal é chamada de região controle (RC), uma vez que evidências apontam sua relação com a transcrição e replicação do DNAm em vertebrados (Shadel and Clayton, 1997), crustáceos (Carrodegas and Vallejo, 1997) e insetos (Goddard and Wolstenholme, 1980; Zhang and Hewitt, 1997, Inohira *et al.*, 1997, Saito *et al.*, 2005). Neste último grupo, a RC também é conhecida como região A+T, devido à alta ocorrência dos nucleotídeos adenina e timina (Zhang and Hewitt, 1997). Nos invertebrados, a posição relativa da RC apresenta uma grande diversidade, muitas vezes devido a rearranjos dos tRNAs que a flanqueiam, sugerindo que esses eventos podem ser frequentes nos genomas mitocondriais de insetos (revisão em Zhang and Hewitt, 1997; Boore, 1999).

Segundo Zhang and Hewitt (1997), a RC apresenta dois padrões de organização entre os insetos. Para moscas-das-frutas (Zhang and Hewitt, 1997) e moscas varejeiras (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000; Junqueira *et al.*, 2004; Lessinger *et al.*, 2004), por exemplo, a RC possui dois domínios distintos: um conservado, devido à presença de blocos de seqüência conservados; e um domínio variável, tanto em tamanho quanto em seqüência. Já para borboletas, mariposas, louva-a-deus, mosquitos e gafanhotos, por exemplo, a RC não pode ser dividida em domínios, apesar de apresentar seqüências conservadas ao longo de sua extensão (Zhang and Hewitt, 1997; Schultheis *et al.*, 2002; Vila and Björklund, 2004).

A variação de tamanho é uma característica dessa região do genoma mitocondrial, sendo observada desde espécies filogeneticamente próximas, como no gênero *Drosophila*, no qual foram identificadas regiões controle que variam de 930 pb em *D. guanche* a 4601 pb em *D. melanogaster* (Lewis *et al.*, 1994; Brehm *et al.*, 2001), como entre indivíduos de

mesma espécie, como reportado para *Co. hominivorax* (Lyra *et al.*, 2005). Tal variação também é responsável por grande parte das diferenças de tamanho entre genomas mitocondriais completos em espécies animais (Boore, 1999; Oliveira, 2006). Essa variação ocorre tanto por eventos de inserção e deleção como também por repetições em tandem (Simon *et al.*, 1994; Zhang and Hewitt, 1997; Lessinger and Azeredo-Espin, 2000). Entretanto, apesar dessa variação de tamanho, estruturas conservadas identificadas tanto na RC de Diptera, como também de Thysanoptera, Plecoptera e Lepidoptera, são indícios da sua relação com a replicação e transcrição do genoma mitocondrial (Lewis *et al.*, 1994; Zhang and Hewitt, 1997; Lessinger and Azeredo-Espin, 2000; Shao and Barker, 2003; Schultheis *et al.*, 2002; Lessinger *et al.*, 2004; Vila and Björklund, 2004; Saito *et al.*, 2005).

No entanto, as dificuldades técnico-metodológicas para a amplificação e seqüenciamento da RC são um empecilho para o seu estudo, o que a deixou numa posição desfavorável por um longo período. Um exemplo disso é a ausência de seqüências desta região em um número significativo de genomas mitocondriais completamente seqüenciados de insetos (Oliveira, 2006). No entanto, trabalhos recentemente publicados trouxeram novamente à tona o potencial dessa região para estudos populacionais e filogenéticos (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000; Brehm *et al.*, 2001; Schultheis *et al.*, 2002; Mardulyn *et al.*, 2003; Lessinger *et al.*, 2004; Vila and Björklund, 2004; Lyra *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006). Neste sentido, a caracterização da RC na família Calliphoridae e otimização dos métodos para seu acesso podem contribuir não só como um marcador molecular para a entomologia forense e estudos populacionais, como também para a compreensão da evolução do genoma mitocondrial.

Objetivos

A caracterização molecular e análise da região controle em espécies de moscas causadoras de miíases da família Calliphoridae foram realizadas com os seguintes objetivos:

- Padronização da amplificação da região controle do DNAm^t para a família Calliphoridae;
- Construção de oligonucleotídeos para facilitar o acesso à região controle de califorídeos e também de espécies próximas;
- Caracterização estrutural da região controle na família Calliphoridae através da comparação das seqüências de diferentes espécies e da identificação de domínios conservados e variáveis;
- Caracterização da duplicação do *tRNA^{Ile}*, verificação de sua ocorrência e distribuição em diferentes espécies desta família;
- Avaliação do potencial da região controle para estudos filogenéticos envolvendo a família Calliphoridae.

Materiais e Métodos

1. Amostras das espécies de Calliphoridae

As amostras utilizadas neste trabalho encontram-se listadas na Tabela 1. Indivíduos adultos de *Chloroprocta idioidea* foram coletados em Abril/2004 em Mogi Guaçu, SP; indivíduos de *Hemilucilia semidiaphana* foram coletados em Abril/2002 em São João da Boa Vista, SP; as amostras de ambas espécies foram preservadas congeladas a -70°C . Ambas as coletas foram feitas por A.C.M. Junqueira e A.M.L Azeredo-Espin. As espécies foram identificadas por Arício X. Linhares, que também concedeu amostras de *Hemilucilia segmentaria* coletadas em Abril/2001 no estado de São Paulo, as quais foram mantidas congeladas a -20°C . Indivíduos secos de *C. rufifacies* do Texas, EUA, coletados em Junho/1993, são provenientes da coleção entomológica de Bernard Greenberg, University of Illinois, Chicago. Indivíduos de diferentes espécies foram concedidos preservados em álcool absoluto por colaboradores: *C. bezziana* de Kluang, Malásia, concedidos por Rod Mahon (CSIRO, Canberra, Austrália), coletadas em Setembro/2003; *C. megacephala*, *C. rufifacies* e *Ca. dubia* de Perth, Austrália, concedidos por Michelle L. Harvey, University of Western Australia, coletados em Dezembro/2003; *Ca. vomitoria* de Londres, Inglaterra, concedidos por Carole Ames, Dept. of Forensic Science, King's College London, coletados em Abril/2004; *L. sericata* do sul da França, concedidos por Bernard Chauvet, Institut de Recherche Criminelle de La Gendarmerie Nationale, coletados em Abril/2004; *L. eximia* e *H. flavifacies* de Pelotas, RS, concedidos por Élvia E. S. Vianna, Universidade Católica de Pelotas, coletados em Junho/1994; e *P. regina* da Califórnia e Virginia Ocidental, EUA, concedidos por Jeffrey D. Wells, University of West Virginia, coletados em Junho/1997 e Abril/2004, respectivamente.

As amostras coletadas por A.C.M. Junqueira e A.M.L Azeredo-Espin foram obtidas com armadilhas montadas de forma similar à descrita por Linhares (1981) e Junqueira (2002), consistindo de um recipiente preto içado a 50cm do chão com orifícios na base, que serviam para entrada das moscas atraídas por uma isca dentro do recipiente, e um saco plástico transparente preso à parte superior do recipiente, ao qual as moscas que entraram no recipiente recorriam em busca de saída, ficando presas (Figura 1). Como isca utilizou-se peixe e fígado bovino em decomposição, deixado à temperatura ambiente por 24h antes de seu uso.



Figura 1. Exemplificação de armadilha utilizada para captura de amostras. Imagem concedida por A.C.M. Junqueira.

Tabela 1. Dados sobre as amostras utilizadas no trabalho.

Espécie	Localidade	Coleta	Preservação	Responsável
<i>Calliphora dubia</i>	Perth, Austrália	Dez/2003	A.A.	Michelle L. Harvey
<i>Calliphora vomitoria</i>	Londres, Inglaterra	Abr/2004	A.A.	Carole Ames
	Bruxelas, Bélgica	Jun/2004	A.A.	Tom Boonen
<i>Chloroprocta idioidea</i>	Mogi Guaçu, SP	Abr/2004	A.C.	A.C.M. Junqueira e
				A.M.L. Azeredo-Espin
<i>Chrysomya albiceps</i>	Alexandria, Egito	Fev/1989	A.S.	Bernard Greenberg
	Goiânia, GO	Out/2001	P.A.	A.M.L. Azeredo-Espin e A.C.M. Junqueira
<i>Chrysomya bezziana</i>	Kluang, Malásia	Set/2003	A.A.	Rod Mahon
<i>Chrysomya megacephala</i>	Perth, Austrália	Dec/2003	A.A.	Michelle L. Harvey
<i>Chrysomya rufifacies</i>	Texas, EUA	Jun/1993	A.S.	Bernard Greenberg
	Perth, Austrália	Dez/2003	A.A.	Michelle L. Harvey
<i>Hemilucilia flavifacies</i>	Pelotas, RS	Jun/1994	A.A.	Élvia E. S. Vianna
<i>Hemilucilia segmentaria</i>	Estado de SP	Abr/2001	A.A.	A. X. Linhares
				A.C.M. Junqueira e A.M.L. Azeredo-Espin
<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	S. J. Boa Vista, SP	Abr/2002	A.C.	A.C.M. Junqueira e A.M.L. Azeredo-Espin
				A.C.M. Junqueira e A.M.L. Azeredo-Espin
<i>Lucilia eximia</i>	Mogi Guaçu, SP	Abr/2004	A.C.	A.C.M. Junqueira e A.M.L. Azeredo-Espin
	Pelotas, RS	Jun/1994	A.A.	Élvia E. S. Vianna
<i>Lucilia sericata</i>	Sul da França	Out/2004	A.A.	Bernard Chauvet
<i>Phormia regina</i>	Illinois, EUA	Nov/1979	A.S.	Bernard Greenberg
	Califórnia, EUA	Jul/1997	A.A.	Jeffrey D. Wells
	Virgínia Oc., EUA	Jul/1997	A.A.	Jeffrey D. Wells
<i>Protophormia terranovae</i>	Sul da França	Out/2004	A.A.	Bernard Chauvet

Nota. A.A. adulto preservado em álcool absoluto; A.C. adulto congelado a -70°C; A.S. adulto seco; P.A. pupa preservada em álcool absoluto; P.C. pupa congelada a -70°C.

2. Extração do DNA

As amostras frescas e congeladas tiveram seu DNA extraído utilizando o método de Fenol/Clorofórmio, de acordo com o protocolo descrito por Infante Vargas e Azeredo-Espin (1995). Cada indivíduo foi colocado em tubo eppendorf contendo 300µL de tampão de homogeneização (Tris-Cl 10mM, NaCl 60mM, Sacarose 300mM, EDTA 10mM, pH 7,5) e macerado. Em seguida, 300µL de solução de lise foram adicionados (Tris-Cl

300mM, SDS 40mM, EDTA 20mM, 0,7% do volume de DEPC, pH 9,0); os tubos foram misturados em vortex e incubados em gelo por 15 min. Foram adicionados, então, 600µL de fenol pH 7,6 e as amostras foram misturadas em vortex e incubadas em gelo por 3 min sendo, em seguida, centrifugadas a 5500 rpm por 10 min. A fase superior foi recuperada e transferida para um tubo novo. A esse sobrenadante foram adicionados 250µL de fenol e 250µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram misturadas, incubadas em gelo por 3 min, e centrifugadas por 5 min a 5000 rpm. A fase superior foi novamente removida e transferida para um novo tubo, sendo adicionados 500µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após misturá-las e incubar em gelo por 3 min, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo, sendo o DNA precipitado pela adição de 25µL de acetato de sódio 3M e 1mL de etanol absoluto a -20°C. O conteúdo foi misturado por inversão e incubado a -20°C por 2 horas. Em seguida, foram centrifugados a 12000 rpm por 30 min, sendo o sobrenadante descartado. O “pellet” foi ressuscitado em 300µL de 1xTE (10mM Tris-Cl pH 7,4, 0,1mM EDTA pH 8,0) e precipitado novamente a -70°C com 16µL de acetato de sódio 3M e 900µL de etanol absoluto a -20°C. Após a centrifugação final a 12000 rpm por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuscitado em 100-200µL de 1xTE, sendo as amostras armazenadas a -20°C.

O DNA total das amostras secas e conservadas em álcool foi extraído com DNAzol[®], como descrito por Junqueira *et al.* (2002). Cada indivíduo foi colocado e macerado em tubo eppendorf contendo 500µL de DNAzol. Em seguida foram adicionados outros 500µL de DNAzol e os tubos foram misturados por inversão. O homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 13000 rpm e, em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 500µL de etanol absoluto a -20°C, incubação à temperatura ambiente por 5 min e centrifugação a 13000 rpm por 3 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 95%, sendo os tubos agitados por inversão e centrifugados a 13000 rpm por 2 min. Esta última etapa foi repetida e finalmente o “pellet” foi ressuscitado em 50µL 1xTE após a evaporação à temperatura ambiente do etanol dos tubos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3. Amplificações

Para a amplificação específica da RC, foi utilizada a estratégia do *Nested PCR*, exemplificada na Figura 2, visando a recuperação dessa região do DNAm_t através dos *amplicons* A e B. Uma primeira reação foi feita com os oligonucleotídeos universais C1-N-1560 e SR-J-14612, descritos na compilação feita por Simon *et al.* (1994), que hibridam respectivamente nos genes para a subunidade I da citocromo oxidase (*coxI*) e para a subunidade 12S do rRNA (*srRNA*). Esta amplificação abrange tanto a RC como o *cluster* de tRNAs que a precede. Para a obtenção do *amplicon* A, os produtos dessa primeira amplificação foram diluídos 1:50 e utilizados como molde para o *nested PCR*, sendo feita uma segunda reação com os oligonucleotídeos TM-N-193, que hibrida no gene *tRNA^{Met}*, e CmegAR (Lessinger *et al.*, 2004), que hibrida no final do domínio conservado, recuperando os *tRNA^{Gln}*, *tRNA^{Ile}* e quase todo o domínio conservado da RC. Finalmente, para a obtenção do *amplicon* B, tendo como molde os produtos da primeira amplificação diluídos 1:50, foram utilizados os oligonucleotídeos CmegA (Lessinger *et al.*, 2004) e SR-J-14941 (Oliveira *et al.*, 2006), que hibridam no fim do domínio conservado da RC e no início do *srRNA*, respectivamente, recuperando, assim, o final do domínio conservado e todo o domínio variável. A reação inicial consistiu de uma desnaturação a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, hibridação a 40°C por 1 min e extensão a 60°C por 2 min, finalizando a reação com uma extensão prolongada a 60°C por 10 min. As reações de *nested PCR* foram conduzidas de forma idêntica, exceto pela temperatura de hibridação de 45°C.

O *amplicon* A de *Ch. idioidea* não pôde ser obtido com o oligonucleotídeo CmegAR. Dessa forma, para amplificar essa região, um novo oligonucleotídeo foi desenhado (CR-B-VII) com base nas seqüências já obtidas do *amplicon* B. Para *Ca. dubia*, o grande tamanho de seu domínio variável requereu uma nova combinação de oligonucleotídeos para sua recuperação. Dessa forma, o oligonucleotídeo *Cadu* foi desenhado baseado nas seqüências parciais obtidas do *amplicon* B dessa espécie, sendo usado em combinação com o CR-B-VII-R, que se trata da seqüência complementar reversa do oligonucleotídeo CR-B-VII. A Tabela 2 lista os oligonucleotídeos utilizados para as reações de amplificação.

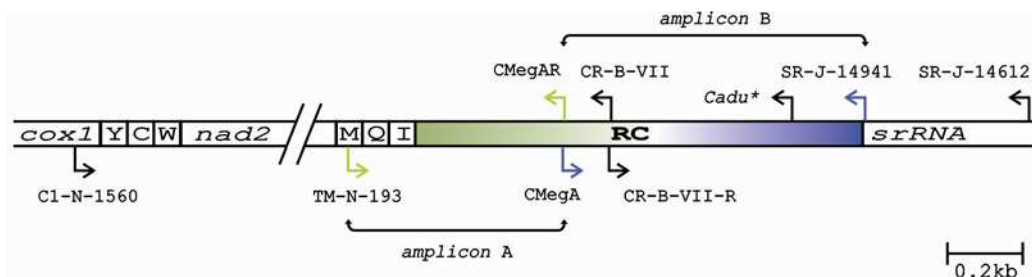


Figura 2. Organização da RC e sítios de hibridação dos oligonucleotídeos. O gene *nad2* está representado parcialmente. Em verde está representado o domínio conservado; em azul, o domínio variável. Os tRNAs estão representados por Y (*tRNA^{Tyr}*), C (*tRNA^{Cys}*), W (*tRNA^{Trp}*), M (*tRNA^{Met}*), Q (*tRNA^{Gln}*) and I (*tRNA^{Ile}*). O *amplicon A* inclui a seqüência parcial do *tRNA^{Met}*, seqüências completas do *tRNA^{Gln}* e *tRNA^{Ile}*, e seqüência parcial do domínio conservado. O *amplicon B* abrange todo o domínio variável e aproximadamente 200pb do domínio conservado. CR-B-VII foi utilizado para *Ch. idioidea* e *Ca. dubia*, enquanto CR-B-VII-R foi combinado com o oligonucleotídeo *Cadu* exclusivamente para *Ca. dubia*.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região controle.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Referência	Sítio de hibridação
C1-N-1560	5'– TGTTCTACTATTCCGGCTCA –3'	Simon <i>et al.</i> (1994)	<i>cox1</i>
SR-J-14612	5'– AGGGTATCTAATCCTAGTTT –3'	Simon <i>et al.</i> (1994)	<i>srRNA</i>
TM-N-193	5'– TGGGGTATGAACCCAGTAGC –3'	Simon <i>et al.</i> (1994)	<i>tRNA^{Met}</i>
CR-B-VII	5'– TTTTATATTGAAGCGTCG –3'	Este trabalho	RC
CR-B-VII-R	5'– TTGCACGGTTCAATATAA –3'	Este trabalho	RC
CMegAR	5'– AATCCAGTTAAGAATATCAT –3'	Lessinger <i>et al.</i> (2004)	RC
CMegA	5'– ATGATATTCTTAACTGGATT –3'	Lessinger <i>et al.</i> (2004)	RC
Cadu	5' – TTGGTAAATCCTACTGT –3'	Este trabalho	RC
SR-J-14941	5' – AGCCAAAATAAACTTTA –3'	Oliveira <i>et al.</i> (2006)	<i>srRNA</i>

Em todas as reações de amplificação foram utilizadas as seguintes concentrações finais de reagentes, para um volume final de 15µL: 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,25 U de enzima *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 500 nM de cada oligonucleotídeo, 200 µM de cada dNTP, e cerca de 100 ng de amostras de DNA. As reações foram conduzidas em termocicladores MiniCycler e PTC-100 (MJ Research). Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 1,0 %, e visualizados através de coloração com brometo de etídeo e luz ultravioleta ($\lambda = 300\text{nm}$).

4. Clonagem e seqüenciamento

Os produtos de PCR da RC foram clonados com o vetor pCR2.1[®]-TOPO[®] dos kits TOPO[®] – TA Cloning e TA Cloning (Invitrogen). Para purificação destes produtos, foi feita diálise por 20 min com filtros Millipore de 0,05µm e TE pH 7,4 (Tris-Cl 1M pH 7,4; EDTA 0,5M e H₂O milli Q), como o descrito por Lessinger and Azeredo-Espin (2000). Em seguida foi feita a reação de ligação dos produtos com o vetor de acordo com as recomendações do fabricante: para cada ligação, foram utilizados 3µL de produto de amplificação, 2µL do plasmídeo pCR2.1, 1µL de tampão, 1µL de DNA ligase e 3µL de água, para um volume final de 10µL. As reações foram incubadas a 14°C por 16h e, em seguida, foi feita transformação química com tampão KCM/PEG (KCl 1M, CaCl₂.2H₂O 0,3M, MgCl₂ 2M e 10% PEG 6000) conduzida com células competentes de *E. coli* TOP10, adaptada do protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Os plasmídeos foram digeridos com a enzima *EcoRI* para verificação da ligação e seleção dos clones recombinantes. As amostras da RC eficientemente clonadas foram submetidas à reação de seqüenciamento, utilizando o “kit” “Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems) que consiste em 2µL de ABI-PRISM Big Dye terminator sequencing v3.0, 2µL de tampão de seqüenciamento, 3,2pmol de oligonucleotídeo (M13D ou M13R), 400ng de plasmídeos contendo o inserto e água para 10µL de reação, sendo os produtos da reação purificados com isopropanol/etanol conforme recomendações do fabricante (Applied Biosystems). Essas amostras foram seqüenciadas automaticamente em seqüenciador Perkin Elmer-ABI Prism 377.

5. Análise das seqüências

Os cromatogramas obtidos pelo seqüenciamento automático foram analisados inicialmente no programa Chromas 2.21 (Technelysium Pty Ltd), que permite a visualização e edição das seqüências. Os alinhamentos múltiplos foram feitos com o algoritmo do ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) incluído no programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), com a penalidade para abertura de *gaps* reduzida para 12 devido às diferenças em tamanho das seqüências, sendo feitos ajustes manuais quando necessário. Com este programa também foram feitas as análises de composição e substituições nucleotídicas. Juntamente com as seqüências obtidas neste trabalho, foram utilizadas as seguintes

seqüências completas de RC de califorídeos depositadas no GenBank para os alinhamentos e análises: *C. albiceps* (AY220131), *C. megacephala* (AF151386), *C. putoria* (AF352790), *Co. hominivorax* (AF151382) e *Co. macellaria* (AF151384).

A inferência da estrutura secundária dos genes para tRNA foi conduzida com o programa tRNA-Scan-SE v. 1.21, (Lowe and Eddy, 1997). A estimativa da diversidade nucleotídica no domínio conservado foi feita com o programa DnaSP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003), pelo método de *sliding window*, no qual um segmento de DNA (*window*) é movido pela seqüência em passos, sendo os parâmetros calculados em cada janela. Dessa forma, foram utilizados sete sítios tanto para o tamanho da janela de comparação como para cada passo, desconsiderando os *gaps* para se obter uma melhor visualização. A inferência de possíveis estruturas secundárias presentes nas seqüências foi investigada com o Mfold web server version 3.1, utilizando os parâmetros padrões (Zuker, 2003). Para evidenciar a presença de elementos repetidos nas seqüências, o aplicativo Dotlet (Junier and Pagni, 2000), que se vale do alinhamento diagonal de duas seqüências, foi utilizado.

A determinação de blocos de seqüência conservados foi feita a partir do alinhamento das 15 seqüências completas do domínio conservado de espécies de califorídeos, tendo como base o critério utilizado por Lessinger and Azeredo-Espin (2000):

1. um bloco deveria ter no mínimo 15 sítios;
2. o início de um bloco era marcado pela presença de similaridade por pelo menos 4 sítios em ao menos 13 das 15 espécies estudadas;
3. o fim do bloco era considerado após quatro sítios variáveis consecutivos em mais de duas espécies.

6. Análise filogenética

Para as inferências filogenéticas foram utilizadas as seqüências do domínio conservado da RC obtidas a partir do seqüenciamento do *amplicon* A, sendo a sua região de maior variabilidade, localizada entre os blocos III e IV, excluída das análises. Dois métodos de reconstrução filogenética foram utilizados: a Máxima Parcimônia (MP) e o *Neighbor-Joining* (NJ). Seqüências de domínio conservado de *Ca. vicina* (AY894834) e *Ca. vomitoria* (AY894833) disponíveis no GenBank também foram utilizadas. Como grupo

externo, foi utilizada a espécie *Dermatobia hominis* (NC_006378), pertencente à família Oestridae, mesma superfamília de Calliphoridae (Oestroidea).

A máxima parcimônia e o *neighbor-joining* empregam abordagens distintas para a inferência filogenética, sendo dois métodos tradicionalmente utilizados para a reconstrução de relações evolutivas entre seqüências (Holder and Lewis, 2003). A MP busca encontrar a árvore que é compatível com o menor número de substituições entre as espécies, sendo eficiente principalmente quando se trata da análise de seqüências próximas (Holder and Lewis, 2003). A análise de MP foi conduzida com o programa PAUP* 4.0b10 (Swafford, 2002), utilizando os seguintes critérios: busca heurística com 500 réplicas de adição aleatória de táxon, *tree bisection-reconnection* *branch-swapping*, *gaps* foram desconsiderados, e todos os caracteres foram igualmente pesados. O suporte para cada ramo foi verificado através de 1000 réplicas de *bootstrap*. Uma árvore consenso foi computada uma vez que mais de uma árvore igualmente parcimoniosa foi obtida. O programa TreeView 1.6.6 (Page, 1996) foi utilizado para visualização e edição das árvores.

O algoritmo do NJ, por sua vez, permite uma análise filogenética rápida, também apresentando eficácia na análise de *taxa* com divergência recente (Holder and Lewis, 2003). Neste método, os dados dos alinhamentos são convertidos numa matriz de distância, que representa a divergência entre os *taxa* baseada no número de mudanças observadas. A análise por NJ foi conduzida no programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), sendo estimada por distância p, *gaps* foram desconsiderados entre os pares de seqüência analisados, e 1000 réplicas de *bootstrap* foram realizadas para a obtenção de suporte dos ramos.

Resultados

1. Acesso à região controle

A otimização da amplificação da região controle do DNAm_t requereu vários testes com diferentes concentrações de reagentes e ciclos de temperaturas. Por possuir grande quantidade de nucleotídeos A e T, não é possível utilizar temperatura de hibridação elevada (acima de 60°C), devido à perda de estabilidade do DNA (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000; Lessinger *et al.*, 2004). Isso diminui também a especificidade dos oligonucleotídeos, que acabam por hibridar em regiões inespecíficas. A solução foi encontrada no *nested PCR*: a primeira reação de amplificação garante o aumento do número de fragmentos de DNA que contém a região-alvo, permitindo que a segunda reação de amplificação recupere com maior eficiência a região desejada (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000).

A combinação de oligonucleotídeos TM-N-193 e CmegAR, utilizada para a amplificação do *amplicon* A, e CmegA e SR-J-14941, utilizada para a obtenção do *amplicon* B, mostrou-se eficiente para todas as espécies de califorídeos estudadas. A única exceção foi *Ch. idioidea*, para a qual foi necessária uma nova combinação de oligonucleotídeos para a obtenção eficiente do domínio conservado da RC. Baseado nas seqüências recuperadas do *amplicon* B das outras espécies de califorídeos, o oligonucleotídeo CR-B-VII foi desenhado, estando seu sítio de hibridação localizado no final do domínio conservado da RC. Esse oligonucleotídeo, em combinação com TM-N-193, recupera uma seqüência que sobrepõe em aproximadamente 130 pb com o *amplicon* B, permitindo, dessa forma, a obtenção completa da RC das espécies da família Calliphoridae (Figura 2).

2. Genes de tRNA

A comparação das seqüências completas dos tRNAs que precedem a RC (Figura 2), que incluem 66 pb do *tRNA^{Ile}* e 69 pb do *tRNA^{Gln}*, além da seqüência parcial do *tRNA^{Met}* (19 pb), indicaram que esta região é altamente conservada nas espécies de califorídeos analisadas. Apesar da ocorrência de regiões intergênicas (RI) e sobreposições variar entre as espécies, dois padrões para as sobreposições foram identificados: entre os genes para *tRNA^{Met}* (fita +) e *tRNA^{Gln}* (fita -) elas envolvem 1 sítio, enquanto entre *tRNA^{Gln}* e *tRNA^{Ile}*

(fita +) envolvem 3 sítios. Entretanto, nenhum padrão de seqüência foi observado entre as RIs, as quais variam de 2 a 16 pb.

A análise comparativa das seqüências completas dos $tRNA^{Gln}$ e $tRNA^{Ile}$ de *Co. hominivorax* com as dos califórídeos estudados revelaram substituições em seis espécies: *C. rufifacies*, *C. megacephala*, *Ch. idioidea*, *H. flavifacies*, *H. segmentaria* e *L. eximia*. Dez transições foram identificadas em seis sítios, como mostra a Figura 3. Três sítios, um no *DHU loop* de cada tRNA e um no *T ψ C loop* do $tRNA^{Gln}$, dividem sete dessas transições além de uma deleção, sugerindo que essas regiões dos tRNAs podem ser mais susceptíveis a eventos de substituição. Dentre as espécies que tiveram mais de uma seqüência analisada para essa região, somente *L. eximia* apresentou variação intraespecífica, estando localizada no *DHU loop* do $tRNA^{Gln}$.

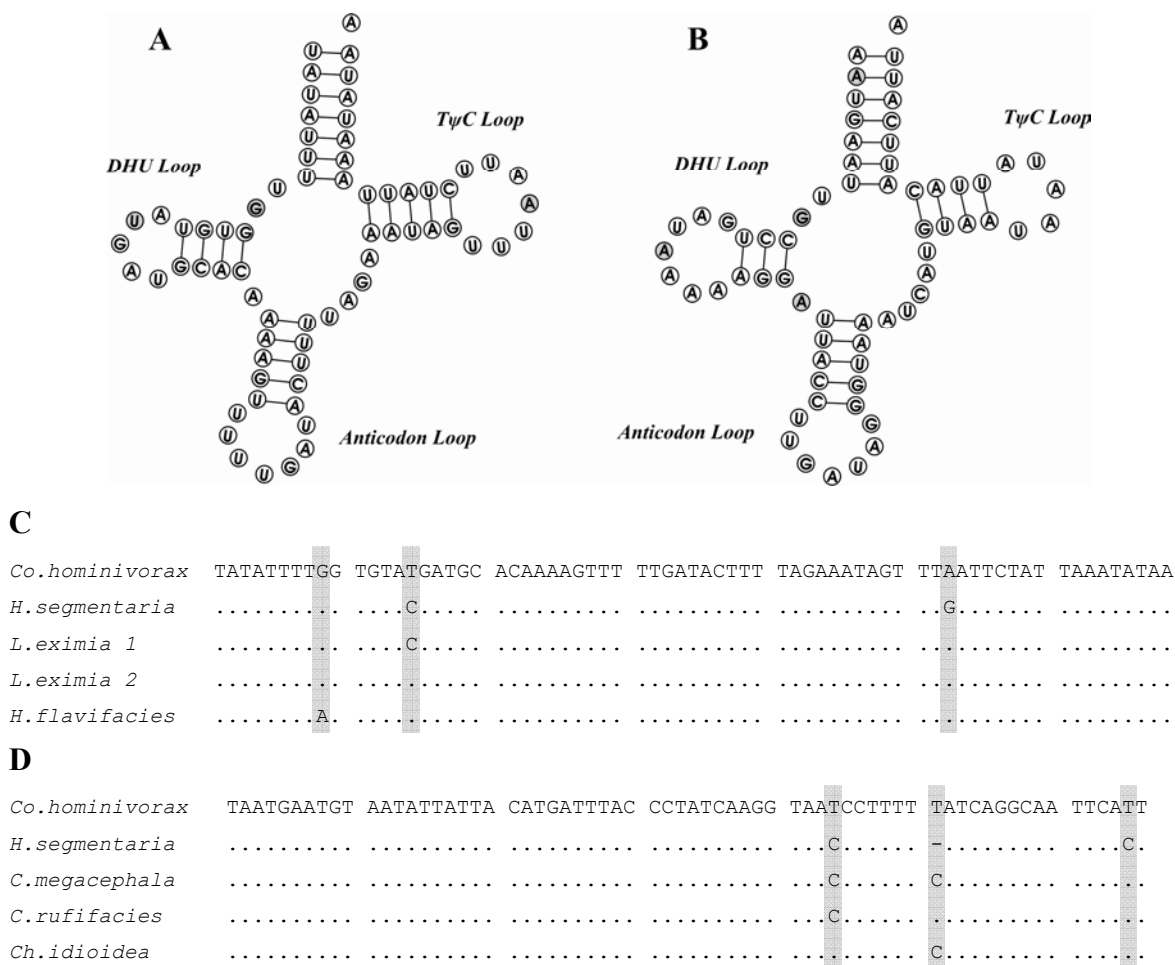


Figura 3. Estrutura secundária do $tRNA^{Gln}$ (A) e $tRNA^{Ile}$ (B) de *Co. hominivorax* e alinhamento das seqüências de $tRNA^{Gln}$ (C) e $tRNA^{Ile}$ (D). Em destaque em cinza estão os sítios que apresentaram substituição em diferentes espécies. *L. eximia* 1 e 2 representam os indivíduos de Pelotas e Mogi Guaçu, respectivamente.

3. Organização estrutural e composição da RC

Na família Calliphoridae, a RC apresenta-se flanqueada pelos genes *srRNA* e *tRNA^{Ile}* (Figura 2), variando em extensão de 854 pb em *C. megacephala* a 1905 pb em *Ca. dubia*, como mostra a Tabela 3. A composição nucleotídica apresentou alto conteúdo de A e T, variando de 86,0% em *Ch. idioidea* a 91,6% em *Co. hominivorax* (Tabela 3). O alinhamento e análise das seqüências obtidas evidenciaram a presença de dois domínios na região controle, como o descrito por Lessinger *et al.* (2004) e Junqueira *et al.* (2004). Um domínio conservado se encontra adjacente ao *tRNA^{Ile}*, e apresenta blocos de seqüência conservados entre as espécies da família Calliphoridae, bem como estruturas conservadas descritas para diversos grupos de insetos. Por sua vez, adjacente ao *srRNA*, encontra-se um domínio variável, tanto em tamanho quanto em seqüência.

Tabela 3. Variação de extensão da região controle e sua composição nucleotídica em espécies da família Calliphoridae. *C. rufifacies* 1 e 2 correspondem às espécies da Austrália e dos EUA, respectivamente.

Espécie	RC (pb)	Domínio		A+T (%)
		Conservado (pb)	Variável (pb)	
<i>C. bezziana</i>	855	574	281	90,5
<i>C. megacephala</i>	854	576	278	90,8
<i>C. putoria</i>	888	582	306	90,4
<i>C. rufifacies</i> 1	988	562	426	90,4
<i>C. rufifacies</i> 2	1026	556	470	88,6
<i>C. albiceps</i>	1008	542	466	91,3
<i>L. sericata</i>	1103	565	538	90,3
<i>P. regina</i>	869	570	229	90,9
<i>Co. hominivorax</i>	1158	619	539	91,6
<i>H. semidiaphana</i>	1171	612	559	86,9
<i>H. flavifascies</i>	1180	615	565	86,6
<i>Co. macellaria</i>	1206	617	589	87,1
<i>L. eximia</i>	1247	568	679	91,0
<i>Ch. idioidea</i>	1234	666	568	86,0
<i>Ca. vomitoria</i>	1303	595	708	90,8
<i>Ca. dubia</i>	1905	600	1305	90,7

3.1. Domínio conservado da RC

Apesar do domínio conservado apresentar uma variação em tamanho de 542 pb em *C. albiceps* a 666 pb em *Ch. idioidea* (Tabela 3), oito blocos de seqüência conservados (BSCs) puderam ser identificados (Figura 4), representando 369 sítios. A estimativa da diversidade nucleotídica para o alinhamento das seqüências do domínio conservado (Figura 5) mostrou suporte ao critério utilizado para designar os BSCs. Este domínio apresentou uma diversidade nucleotídica variando de zero (que representa 100% de identidade entre os sítios de todas as seqüências) a 0,54, com um média de 0,17308. Como era esperado, os BSCs coincidem com as regiões de menor diversidade, apresentando valores entre zero e 0,3.

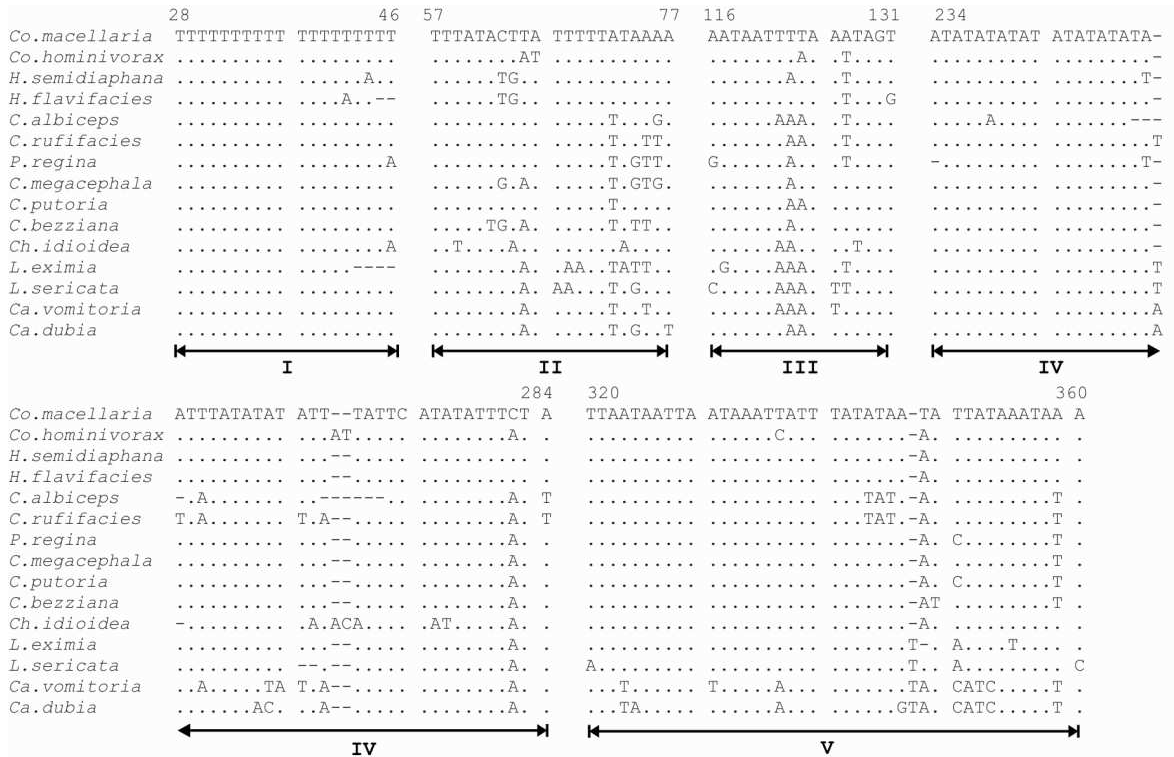


Figura 4. Alinhamento das seqüências do domínio conservado da RC de 15 espécies de califórídeos. Pontos indicam identidade dos nucleotídeos com a seqüência de *Co. macellaria*; letras indicam substituições e hífen representam *gaps*. Os BSC I a BSC VIII estão indicados abaixo das seqüências alinhadas. Os sítios de hibridação dos oligonucleotídeos CMegA/CMegAR e CR-B-VII/CR-B-VII-R estão indicados acima de suas respectivas seqüências. As linhas pontilhadas delimitam a seqüência da possível estrutura secundária inferida para a RC com o programa Mfold.

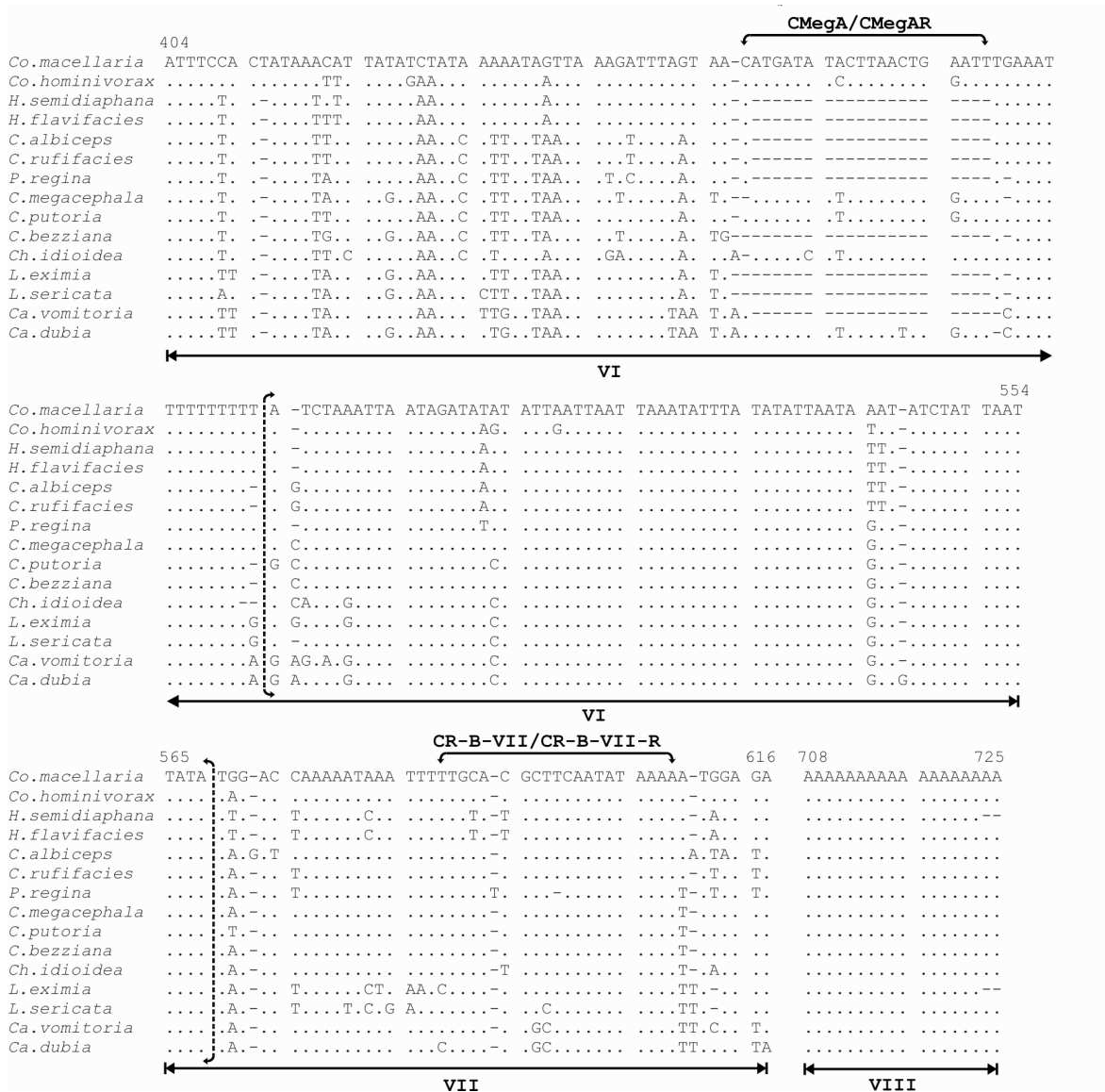


Figura 4. Continuação.

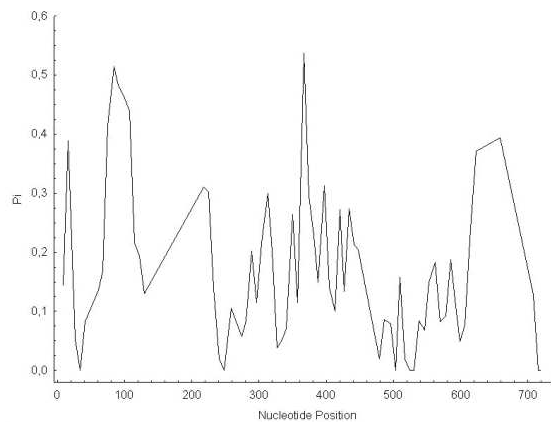


Figura 5. Diversidade nucleotídica (Pi) calculada a cada 7 pb ao longo do domínio conservado da região controle, obtida pelo método de *sliding window* (janelas com tamanho de 7 pb).

O BSC I envolve um poli-T, também reportado adjacente ao *tRNA^{Leu}* em *Drosophila spp.*, Orthoptera e Plecoptera (Clary and Wolstenholme, 1987; Zhang *et al.*, 1995; Schultheis *et al.*, 2002). Esta estrutura apresentou variação de tamanho de 15 pb em *L. eximia* a 23 pb em *Co. hominivorax*. Os BSCs II e III foram os menores blocos recuperados, com 21 pb e 16 pb respectivamente, e precedem a região de maior variabilidade do domínio conservado, localizada entre os BSCs III e IV. Esta região variável apresentou 28 pb em *C. albiceps* e 98 pb em *Ch. idioidea*, dificultando seu alinhamento e a inferência de sítios homólogos, motivo pelo qual foi excluída da análise filogenética feita com este domínio. Os BSCs IV e V apresentaram repetições em tandem de [TA(A)]_n, que também já foram reportadas entre o poli-T e a possível estrutura secundária conservada em insetos formada pela RC, descrita para Lepidoptera (Taylor *et al.*, 1993), Orthoptera e Coleoptera (Zhang and Hewitt, 1997) e Plecoptera (Schultheis *et al.*, 2002). Da mesma forma que o poli-T, as repetições em tandem apresentam variação inter e intraespecífica, como ocorre em *C. rufifacies*, cujos indivíduos analisados apresentaram 8, 9 e 10 repetições

O BSC VI foi o maior bloco recuperado, com 151 pb, abrigando os sítios de hibridação dos oligonucleotídeos CmegA/CmegAR. Envolvendo o final do BSC VI e início do BSC VII encontra-se a seqüência que possibilita a formação de uma estrutura secundária similar à descrita para outros grupos de insetos, que pode estar envolvida com a replicação do DNAm. O BSC VII abriga os sítios utilizados para a construção dos oligonucleotídeos CR-B-VII e CR-B-VII-R. Entre os BSCs VII e VIII uma outra região de maior variabilidade do domínio conservado mostrou-se presente. O BSC VIII, por sua vez, apresentou um poli-A, com variação de tamanho de 16 pb em *H. semidiaphana* e *L. eximia* a 26 pb em *C. rufifacies*.

3.2. Domínio variável da RC e identificação das duplicações de tRNA

Uma característica marcante do domínio variável da RC é sua hipervariabilidade, em tamanho e sequência, se estendendo de 229 pb em *P. regina* a 1305 pb em *Ca. dubia* (Tabela 3). Entretanto, foi possível identificar uma estrutura conservada nas 15 espécies analisadas de califorídeos: um motivo de 19 pb sempre precedido por sequências de 4 a 7 Gs (Figura 6). Estas “ilhas de G” encontram-se adjacentes ao motivo conservado identificado, como em *C. bezziana*, ou distantes alguns pares de base, como em *P. regina*, que apresenta 41 pb entre o motivo conservado e a ilha de G. Outras ilhas de G, não associadas ao motivo de 19 pb, podem ocorrer ao longo do domínio variável, com seu número e localização diferindo entre as espécies, como representado na Figura 6.

O domínio variável de *Ca. dubia* apresentou um fragmento triplicado, explicando sua maior extensão (1305 pb) quando comparada às outras espécies analisadas (Figura 6). O primeiro e o segundo fragmento apresentaram 262 pb e 261 pb, com 93,5% de identidade entre si, enquanto o terceiro fragmento possui 227 pb, com 90,7% e 92,0% de similaridade com os dois primeiros, respectivamente. As diferenças de tamanho podem ter sido causadas pelo acúmulo de deleções ou inserções nas sequências. O domínio variável de *Ca. vomitoria* também apresentou fragmentos repetidos, com 104 pb e 103 pb (Figura 6) e 83,7% de similaridade entre si. Curiosamente, os fragmentos repetidos são similares entre as espécies: a primeira cópia do fragmento repetido de *Ca. vomitoria* apresenta 73,7% de similaridade com a primeira cópia do fragmento repetido em *Ca. dubia*, sugerindo que se trata de uma região conservada no domínio variável no gênero *Calliphora*.

Outra peculiaridade do domínio variável envolveu as espécies *P. regina*, *Ca. dubia* e as espécies estudadas do gênero *Chrysomya*. Em *Ca. dubia* e nas cinco espécies examinadas de *Chrysomya*, o domínio variável encontra-se interrompido por uma duplicação do *tRNA^{Ile}*, enquanto em *P. regina* a duplicação inclui também o *tRNA^{Gln}* (Figura 6). As duplicações, no entanto, não interrompem o motivo conservado de 19 pb, encontrado em todas as espécies.

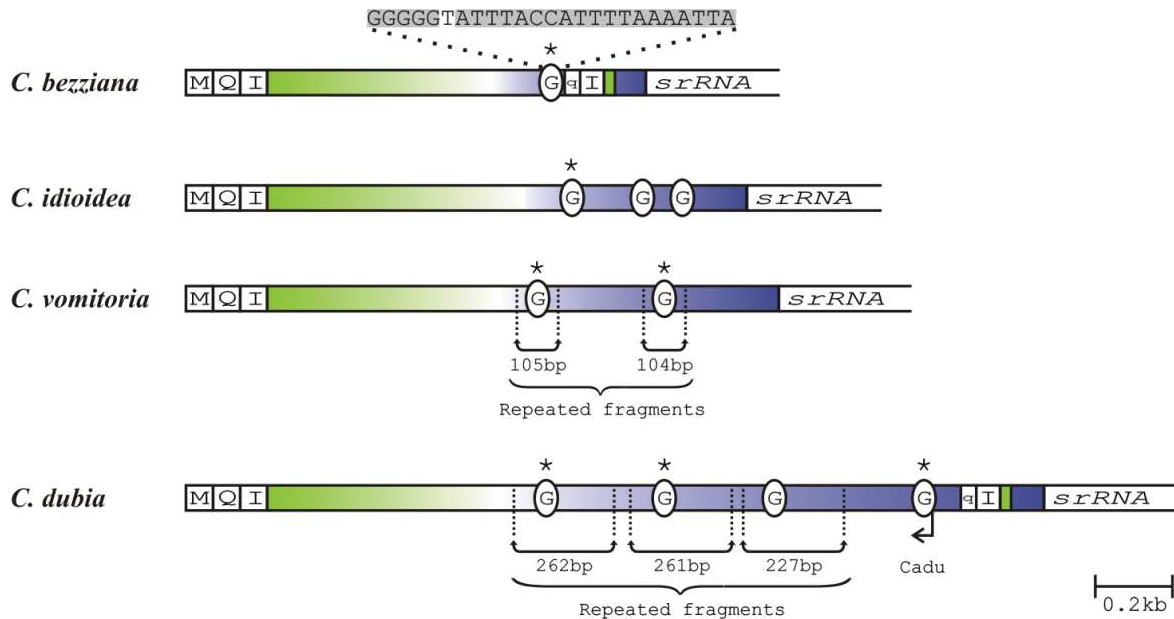


Figura 6. Exemplos de diferentes organizações da RC na família Calliphoridae, indicando as duplicações gênicas. As elipses contendo um G e marcadas com um asterisco indicam a presença do elemento conservado composto pelo motivo de 19 pb, associado a ilhas-G, encontrado no domínio variável. A seqüência do motivo de 19 pb está indicada somente para *C. bezziana*, permanecendo o mesmo para todas as outras espécies analisadas. Elipses contendo o G, mas sem o asterisco, indicam ilhas de G identificadas ao longo da RC. Os fragmentos repetidos identificados em *Ca. vomitoria* e *Ca. dubia* estão representados com seus respectivos tamanhos.

Nas espécies de *Chrysomya* (representadas na Figura 6 por *C. bezziana*) e em *Ca. dubia*, a duplicação do $tRNA^{Ile}$ inclui também as seqüências parciais das regiões flangeadoras deste gene, que correspondem ao $tRNA^{Gln}$ e o domínio conservado da RC (Tabela 4). A região duplicada em *P. regina*, por sua vez, abrange as regiões flangeadoras dos $tRNA^{Gln}$ e $tRNA^{Ile}$, que são o $tRNA^{Met}$ e domínio conservado da RC, respectivamente. Os genes duplicados mostraram-se idênticos às suas cópias “originais” em todas as espécies. *Chrysomya megacephala* e *C. rufifacies*, que apresentaram diferenças nas seqüências de seus $tRNA^{Ile}$ comparadas à *Co. hominivorax*, compartilham as mesmas substituições em seus genes duplicados, como mostra a Figura 7. A única exceção foi identificada em um indivíduo de *P. regina* (amostra da Califórnia-EUA), para o qual somente o *amplicon* B foi seqüenciado. Este indivíduo apresentou uma substituição $C \rightarrow T$ no $tRNA^{Ile}$ duplicado quando comparado à cópia “original” do outro indivíduo desta espécie (Virgínia Ocidental-

EUA). Sequências conservadas como as observadas para os tRNAs duplicados não foram observadas nas regiões flangeadoras dos fragmentos repetidos, as quais aparentam estar degeneradas, sendo observadas diferenças mesmo entre indivíduos de mesma espécie (como por exemplo *C. megacephala* e *P. regina*).

Tabela 4. Caracterização das duplicações de tRNA e suas regiões flangeadoras no domínio variável da RC.

Espécie	Duplicação (pb)						Total
	<i>tRNA^{Met}</i>	RI ou Sobrep. <i>tRNA^{Met}/tRNA^{Gln}</i>	<i>tRNA^{Gln}</i>	RI ou Sobrep. <i>tRNA^{Gln}/tRNA^{Ile}</i>	<i>tRNA^{Ile}</i>	DC	
<i>C. albiceps</i>	-	-	31	+2	66	15	114
<i>C. bezziana</i>	-	-	24	+4	66	15	108
<i>C. megacephala</i>	-	-	31	+4	66	15	116
<i>C. putoria</i>	-	-	19	0	66	15	100
<i>C. rufifacies</i>	-	-	31	-3	66	21	109
<i>P. regina</i>	16	+4	69	+7	66	12	174
<i>Ca. dubia</i>	-	-	29	-3	66	21	113

Nota. (+) indica Região Intergênica (RI) e (-) indica sobreposição (Sobrep.); DC indica o domínio conservado.

<i>Co. hominivorax</i>	TAATGAATGT	AATATTATTA	CATGATTTAC	CCTATCAAGG	TAATCCTTTT	TATCAGGCAA	TTCATT
<i>Ca. dubia</i> I1
<i>Ca. dubia</i> I2
<i>C. albiceps</i> I1
<i>C. albiceps</i> I2
<i>C. bezziana</i> I1
<i>C. bezziana</i> I2
<i>C. megacephala</i> I1C.....	C.....
<i>C. megacephala</i> I2C.....	C.....
<i>C. rufifacies</i> I1C.....
<i>C. rufifacies</i> I2C.....
<i>P. regina</i> 1 I1
<i>P. regina</i> 1 I2
<i>P. regina</i> 2 I2T.....

Figura 7. Alinhamento das seqüências dos *tRNA^{Ile}* duplicados, evidenciando a presença das mesmas substituições nucleotídicas em ambas as cópias. “I1” refere-se à cópia do *cluster* de tRNAs, enquanto “I2” representa a duplicação. *P. regina* 1 e 2 representam os indivíduos da Virgínia Ocidental e Califórnia, respectivamente.

4. Utilização do domínio conservado para inferências filogenéticas

A Figura 8 apresenta as árvores filogenéticas inferidas utilizando a seqüência do domínio conservado recuperada pelo *amplicon* A de 26 espécies de califorídeos, incluindo as seqüências obtidas no GenBank. A análise de divergência nucleotídica feita por distância p indicou uma divergência média de 18,9% entre as espécies, indicando uma alta taxa de substituição da RC.

As análises por MP e NJ resultaram em árvores com topologias similares. Ambos os métodos agruparam os gêneros considerados de mesma subfamília: Chrysomyinae (formada pelos gêneros *Chrysomya*, *Cochliomyia*, *Chloroprocta*, *Phormia*, *Protophormia* e *Hemilucilia*), e Calliphorinae (representada pelo gênero *Calliphora*), esta última apresentando alto suporte pelo valor de *bootstrap* (98,6% e 99% para MP e NJ, respectivamente). A subfamília Luciliinae, formada pelas espécies do gênero *Lucilia*, apresentou-se parafilética na reconstrução por MP, apesar da separação das espécies desse gênero apresentar baixo valor de *bootstrap*. Ambos os métodos indicam alto suporte ao clado formado pelos gêneros *Phormia* + *Protophormia* e ao clado formado pelos gêneros neotropicais *Cochliomyia*, *Hemilucilia* e *Chloroprocta*. No entanto, as relações entre esses gêneros não puderam ser definidas pela análise de MP e, pela análise de NJ, os clados formados apresentam baixo suporte pelo valor de *bootstrap*. A RC, contudo, apresentou potencial para o agrupamento de indivíduos de mesma espécie e espécies consideradas morfologicamente próximas, mas não foi suficiente para resolver as relações entre gêneros. Enquanto a divergência observada entre os indivíduos de mesma espécie variou de 0 a 0,60%, como é o caso dos indivíduos analisados de *C. albiceps*, a divergência entre espécies de gêneros diferentes muitas vezes mostrou-se menor do que entre espécies do mesmo gênero, como observado entre *Cochliomyia* e *Hemilucilia* (Tabela 5).

Tabela 5. Limites de divergência do domínio conservado entre clados-irmãos obtidos por distância p.

Varição		Mínimo	Máximo
Intraespecífica	<i>Chrysomya albiceps</i>	0,0	0,006
	<i>Chrysomya rufifacies</i>	0,003	0,008
	<i>Calliphora vomitoria</i>	0,003	0,016
Intra-gêneros	<i>Chrysomya</i>	0,068	0,169
	<i>Calliphora</i>	0,104	0,193
	<i>Hemilucilia</i>	0,051	0,167
Inter-gêneros	<i>Cochliomyia</i> x <i>Hemilucilia</i>	0,139	0,162
	<i>Phormia</i> x <i>Chrysomya</i>	0,147	0,178
	<i>Protophormia</i> x <i>Chrysomya</i>	0,151	0,185
	<i>Lucilia</i> x <i>Calliphora</i>	0,207	0,239
Inter-subfamílias	Chrysomyinae x Calliphorinae	0,196	0,306
	Chrysomyinae x Luciliinae	0,177	0,310
	Luciliinae x Calliphorinae	0,202	0,215

Nota. A variação intraespecífica está representada para espécies com mais de dois indivíduos analisados, e a intra-gêneros foi obtida para gêneros com mais de duas espécies amostradas.

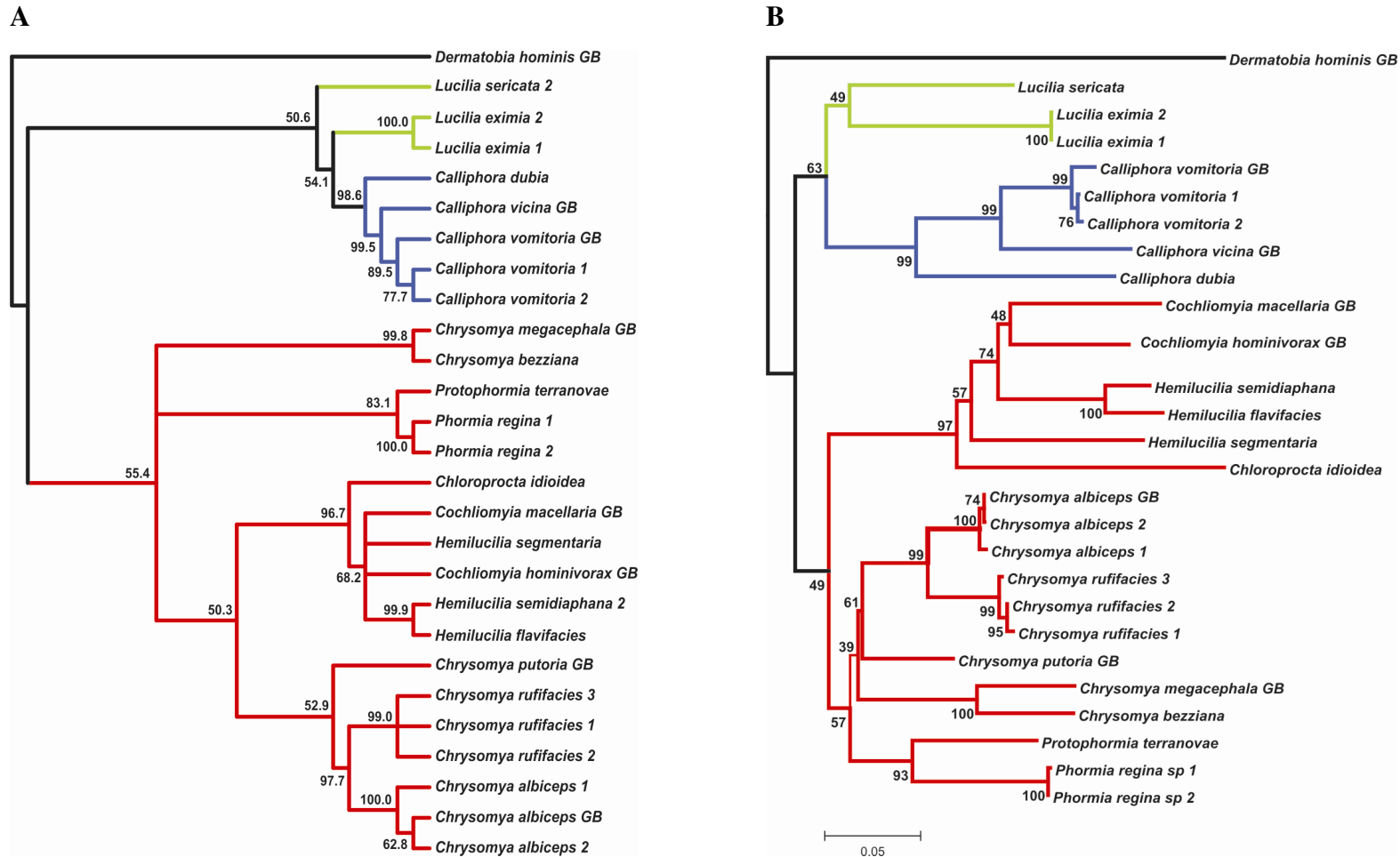


Figura 8. A. Árvore consenso inferida pela análise de Máxima Parcimônia **B.** Árvore inferida por NJ utilizando distância p. Números nos ramos indicam o valores de *bootstrap* com 1000 réplicas. Os números à frente das espécies indicam indivíduos diferentes. Os ramos em vermelho denotam as espécies da subfamília Chrysomyinae, em azul Calliphorinae e em verde Luciliinae, segundo definido por dados morfológicos (Rognes, 1997).

Discussão

1. Acesso à região controle

Dificuldades técnico-metodológicas para a amplificação e seqüenciamento da RC se mostraram um empecilho para o seu estudo por um longo tempo. A grande composição de nucleotídeos A+T, por exemplo, pode interferir na amplificação, clonagem e seqüenciamento dessa região devido às propriedades termoestáveis da molécula (Junqueira, 2002). De fato, a utilização de temperaturas acima de 60°C para a amplificação mostrou-se inviável. O *nested PCR* possibilitou, dessa forma, a condução das reações de amplificação sob temperaturas menores, permitindo a recuperação de fragmentos específicos da RC. Neste contexto, a padronização da amplificação da RC, aliada à construção de novos oligonucleotídeos para o seu acesso, como realizado por Lessinger *et al.* (2004) e Oliveira *et al.* (2006), é uma importante contribuição para estudos futuros relacionados à família Calliphoridae, possibilitando caracterizar sua estruturação e evolução em novas espécies.

2. A caracterização da RC do DNAm

Como descrito em estudos prévios feitos com espécies da família Calliphoridae (Lessinger and Azereido-Espin, 2000; Junqueira *et al.*, 2004; Lessinger *et al.*, 2004), a RC neste grupo apresentou-se dividida em dois domínios, possuindo um evidente viés para o conteúdo nucleotídico de A+T, sendo isso também uma característica geral do genoma mitocondrial de insetos (Zhang and Hewitt, 1997; Mardulyn *et al.*, 2003; Shao and Barker, 2003; Vila and Björklund, 2004; Covacin *et al.*, 2006). Tal composição nucleotídica, evidenciada na Tabela 3, pode estar envolvida com processos dependentes de energia durante a replicação e transcrição do genoma mitocondrial (Clary and Wolstenholme, 1985), proporcionando uma maior eficiência nesses dois eventos. Dessa forma, apesar de se tratar de uma região não-codificadora, as substituições na RC podem não ser aleatórias, uma vez que pode existir pressão de mutação para A+T, a qual pode inclusive atuar em todo genoma mitocondrial de insetos (Jermini *et al.*, 1994).

2.1. O domínio conservado da RC e sua relação com a replicação do DNAm_t

A caracterização do domínio conservado da RC levou à identificação de oito blocos de seqüência conservados na família Calliphoridae (Figura 4), apresentando entre eles porções mais variáveis. Estruturas conservadas descritas para Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera e Plecoptera, (Clary and Wolstenholme, 1987; Taylor *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Zhang and Hewitt, 1997; Brehm *et al.*, 2001; Schultheis *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2005; Oliveira, 2006) também foram identificadas, indicando que devem representar regiões conservadas em Insecta. É importante ressaltar que, apesar da divergência das seqüências primárias entre esses grupos, são os elementos estruturais que se mostram conservados e, dentre essas estruturas, algumas relacionam a RC à transcrição e replicação do genoma mitocondrial, as quais também puderam ser identificadas na RC de Calliphoridae.

Em estudo com *Drosophila spp.* Clary and Wolstenholme (1987) haviam sugerido que o poli-T adjacente ao *tRNA^{lle}* poderia participar da regulação da transcrição do DNAm_t, baseado na sua estrutura e localização. Reforçando essa hipótese, uma estrutura semelhante também foi identificada em Orthoptera e Plecoptera (Zhang *et al.*, 1995; Schultheis *et al.*, 2002). Lewis *et al.* (1994), em trabalho realizado com *D. melanogaster*, também sugeriram o envolvimento de um outro poli-T presente nessa espécie na replicação da outra fita do DNAm_t. Em estudo com espécies de *Drosophila*, Saito *et al.* (2005) mapearam precisamente a origem de replicação de ambas as fitas DNAm_t adjacente a esses poli-Ts, confirmando o envolvimento dessas estruturas com atividades funcionais no genoma mitocondrial. A caracterização da RC na família Calliphoridae indica a mesma estrutura da RC, estando os poli-Ts presentes nos BSCs I e VIII. Dessa forma os dados sugerem que a RC também esteja relacionada com a replicação do DNAm_t em Calliphoridae, estando suas origens de replicação possivelmente nos limites do domínio conservado.

Um segundo elemento conservado que remete a RC às atividades funcionais do genoma mitocondrial são as possíveis estruturas secundárias cujas seqüências estão delimitadas na Figura 3. Estruturas similares foram identificadas em Orthoptera, Hymenoptera, Plecoptera, Phthiraptera bem como em outros grupos de Diptera (Clary and Wolstenholme, 1987; Zhang *et al.*, 1995; Schultheis, 2002; Lessinger *et al.*, 2004; Covacin *et al.*, 2006; Oliveira, 2006). No entanto, apesar de sua relação com a replicação em

Drosophila spp. ter sido questionada, ela pode ser funcional em grupos que não possuem ambos os poli-Ts associados à replicação do DNAm (Saito *et al.*, 2005).

2.2. O domínio variável da RC

Diferentemente do observado para a outra porção da RC, o domínio variável apresentou acentuadas diferenças de tamanho, sendo responsável não só pela variação encontrada na RC, mas do genoma mitocondrial como um todo. Apesar dessa hipervariabilidade, um elemento conservado pôde ser identificado (Figura 6). As ilhas de G descritas também já foram reportadas para espécies de *Drosophila* e da família Muscidae, a qual pertence à mesma superfamília que Calliphoridae (Brehm *et al.*, 2001; Oliveira, 2006). Apesar de não terem sido associadas a motivos conservados nestes estudos, é possível que as ilhas de G sejam uma característica da RC de dípteros.

A variação de tamanho e seqüência apresentada por este domínio da RC inviabiliza a sua utilização para estudos filogenéticos, uma vez que o alinhamento das seqüências é comprometido e se restringe a espécies próximas (Brehm *et al.*, 2001). No entanto, esta porção da RC possui potencial para identificação de espécies (Litjens *et al.*, 2001) e para estudos populacionais (Lyra *et al.*, 2005).

2.3. A região controle como hot spot para rearranjo mitocondrial

Dentro do domínio variável da RC, uma duplicação do *tRNA^{Ile}*, que havia sido reportada para as espécies *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria* (Junqueira *et al.*, 2004; Lessinger *et al.*, 2004), também foi identificada em outras duas espécies desse gênero – *C. rufifacies* e *C. bezziana* – além de uma espécie de um gênero distinto, *Ca. dubia*. Um segundo tipo de duplicação foi identificado em *P. regina*, envolvendo não só o *tRNA^{Ile}* mas também o *tRNA^{Gln}* (Figura 5). O fato de somente os tRNAs duplicados serem idênticos às suas cópias “originais”, apresentando as mesmas substituições, sugere que um mecanismo que leve à homogeneização das cópias, como evolução em concerto, esteja atuando somente nos tRNAs duplicados, mas não em suas regiões flangeadoras, explicando a degeneração observada nestas seqüências. Quanto à substituição observada no *tRNA^{Ile}* de *P. regina* da Califórnia, esta pode ter ocorrido num evento recente, o que não teria

possibilitado a homogeneização, considerando que a cópia “original” não possui essa substituição.

De acordo com filogenias baseadas em caracteres morfológicos e moleculares (Rognes, 1997; Wells and Sperling, 2001; Wallman *et al.*, 2005), além dos resultados obtidos neste trabalho (Figura 6), o gênero *Chrysomya* e *Calliphora* pertencem a duas subfamílias distintas: Chrysomyinae e Calliphorinae, respectivamente. A subfamília Chrysomyinae também é formada pelos gêneros *Chloroprocta*, *Cochliomyia*, *Hemilucilia* e *Phormia*. No entanto, destes gêneros, somente em *P. regina* foi identificada duplicação do *tRNA^{Ile}*, que ainda assim apresenta características diferentes das descritas para o gênero *Chrysomya* e para a espécie *Ca. dubia*, por incluir o gene para *tRNA^{Gln}*. De acordo com estes dados, é possível que essas duplicações tenham ocorrido em três eventos independentes: (1) antes da diversificação do gênero *Chrysomya*, (2) na espécie *P. regina* e (3) na espécie *Ca. dubia*. Dessa forma, é possível que o domínio variável da RC atue como um *hot spot* para rearranjo do genoma mitocondrial. Reforçando esta hipótese, em estudo recente com três espécies da família Muscidae (*Stomoxys calcitrans*, *Musca domestica* e *Haematobia irritans*), a qual pertence à mesma superfamília de Calliphoridae, a Oestroidea, uma duplicação similar envolvendo o *tRNA^{Ile}* foi identificada somente na espécie *S. calcitrans* (Oliveira, 2006).

A região localizada entre os genes duplicados e o gene *srRNA* (Figura 6) havia sido designada como região intergênica, devido à ausência de similaridade dessa região nas três espécies de *Chrysomya* estudadas com seqüências disponíveis no GenBank (Junqueira *et al.*, 2004; Lessinger *et al.*, 2004). No entanto, a comparação desta região com o final das seqüências obtidas do domínio variável de 15 espécies de califorídeos, sugerem que essa porção trata-se de uma continuação do domínio variável da RC.

O arranjo gênico observado nessas espécies (uma duplicação inserida no domínio variável) não pode ser explicado pelos modelos de rearranjo mitocondrial mais recorrentes: (1) duplicação em tandem seguida de perda aleatória de uma das cópias, que pode produzir duas cópias de uma região, mas que serão necessariamente adjacentes (Moritz *et al.*, 1987); (2) recombinação homóloga, que não altera o arranjo original dos genes (Tsukamoto and Ikeda, 1998; Rokas *et al.*, 2003); (3) recombinação intramolecular, a qual não resulta em duplicação gênica (Lunt and Hyman, 1997). Os dados sugerem novas evidências para

recombinação ilegítima entre moléculas de DNAm (Shao *et al.*, 2005). Este modelo baseia-se na presença de dois genomas mitocondriais, em que um fragmento dupla-fita de uma das moléculas desliga-se de sua molécula original e se insere na outra, produzindo um novo arranjo gênico contendo seqüências duplicadas e separadas. Uma vez que a duplicação em *P. regina*, *Ca. dubia* e nas espécies de *Chrysomya* ocorrem numa mesma região do genoma, o local de inserção do fragmento excisado poderia ser uma região de maior susceptibilidade (*hot spot*) do genoma mitocondrial para rearranjos, neste caso, o domínio variável da RC.

O fato do fragmento duplicado sempre envolver o *cluster* de tRNAs formado por $tRNA^{Met}$, $tRNA^{Gln}$ e $tRNA^{Ile}$, que precede a RC, pode estar relacionado com a origem de replicação da fita *major* (fita que codifica a maior parte dos genes mitocondriais, segundo definição de Simon *et al.*, 1994), como também proposto para a duplicação observada em *Stomoxys calcitrans* (Oliveira, 2006). Segundo Saito *et al.* (2005), a origem de replicação dessa fita do DNAm está localizada na RC, adjacente ao $tRNA^{Ile}$ e a um poli-T. Esta organização também é observada em Calliphoridae e, dessa forma, a RC também pode estar envolvida com a origem de replicação do genoma mitocondrial nesta família.

De acordo com o modelo de replicação assimétrica do DNAm, representado na Figura 9A, a síntese da fita *major* é iniciada quando 97% da síntese da fita *minor* está completa (Goddard and Wolstenholme, 1980). Esse arranjo deixa a fita *minor* – que serve de fita-molde para a replicação da *major* – na forma simples-fita por um longo período. Considerando que tRNAs são conhecidos por formarem estruturas secundárias (Macey *et al.*, 1997), se durante o período em que a fita *minor* encontra-se despareada, uma estrutura secundária é formada por algum dos genes tRNAs adjacentes à origem de replicação, a síntese da nova fita pode ser interrompida, sendo clivado o pequeno fragmento já replicado (Figura 9B). Dessa forma, os dois tipos de duplicação gênica observados nestas espécies de califórídeos podem ser explicados de acordo com a localização da estrutura secundária que se formaria enquanto a fita *minor* encontra-se despareada. Se uma estrutura secundária é formada pelo $tRNA^{Gln}$, o fragmento excisado conteria parte do domínio conservado da RC e do $tRNA^{Gln}$, e a seqüência completa do $tRNA^{Ile}$, como ocorre para *Ca. dubia* e *Chrysomya* spp. No entanto, se a estrutura secundária envolve o $tRNA^{Met}$, o fragmento replicado e excisado conteria o início da região controle, as seqüências completas dos $tRNA^{Gln}$ e

tRNA^{Ile}, além da seqüência parcial do *tRNA^{Met}*, como observado em *P. regina*. Em ambos os casos, o fragmento excisado poderia, então, ser inserido numa região susceptível a eventos de rearranjo genômico, neste caso, o domínio variável da região controle. No entanto, evidências bioquímicas devem ser levadas em consideração e futuramente investigadas para a confirmação deste modelo de duplicação.

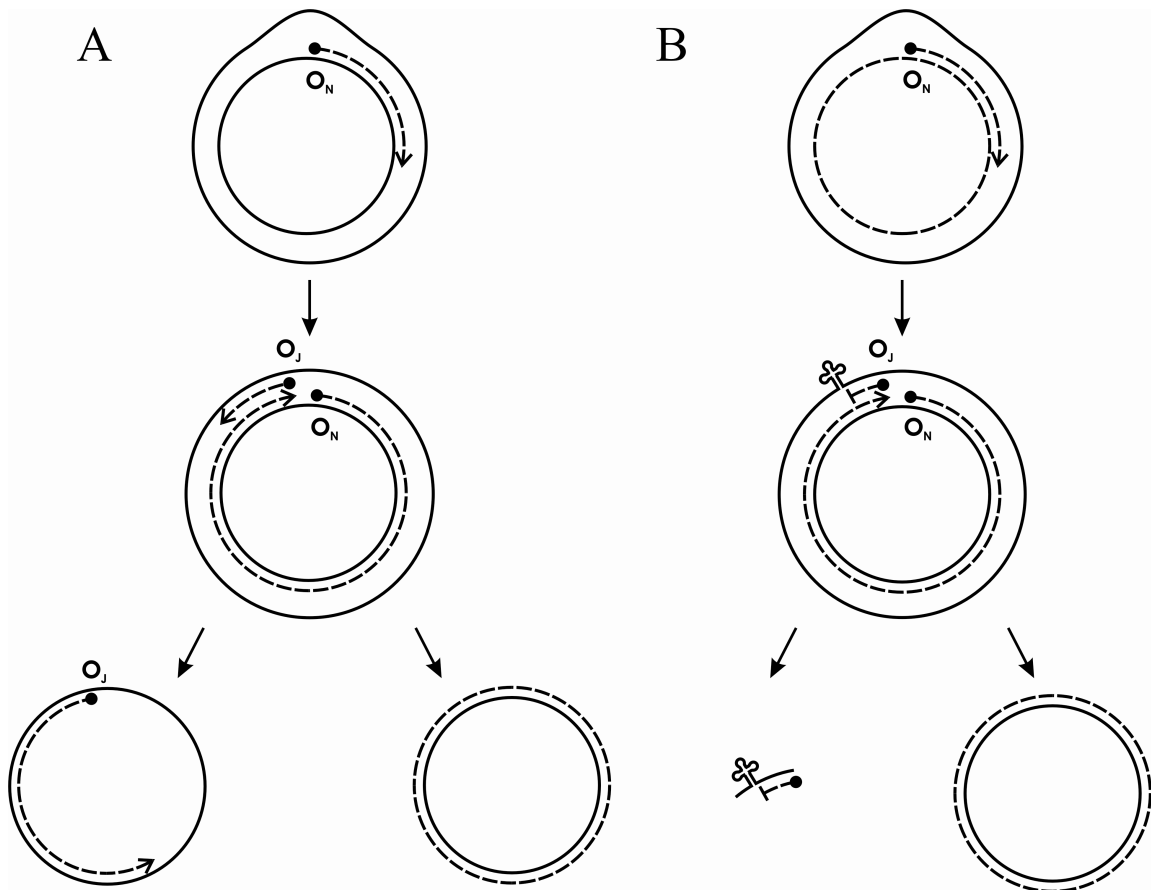


Figura 9. A. Modelo de replicação assimétrica do DNAmT, em que o início se dá pela fita *minor*, ocorrendo unidirecionalmente, sendo a síntese da fita *major* iniciada quando 97% da fita *minor* foi sintetizada, deixando a fita *minor* na forma simples-fita por um longo período (adaptado de Goddard and Wolstenholme, 1980). **B.** Envolvimento do *cluster* de tRNAs com a duplicação gênica, pela formação de uma estrutura secundária pela fita *minor* enquanto esta se encontra na forma simples-fita. Essa estrutura poderia interromper a replicação do DNAmT, e o fragmento replicado seria clivado, podendo ser inserido numa região de *hot spot*. O_N e O_J representam as origens de replicação das fitas *minor* e *major*, respectivamente; a linha pontilhada denota a nova fita sintetizada.

3. *Perspectivas filogenéticas na família Calliphoridae utilizando a RC*

Ambos os métodos utilizados para reconstrução filogenética agruparam os indivíduos de mesma espécie com alto suporte nos ramos, mostrando eficácia na distinção entre espécies. Espécies consideradas morfologicamente similares também puderam ser distinguidas: *C. albiceps* e *C. rufifacies*, as quais já foram consideradas como sendo uma única espécie, sendo diferenciadas por caracteres morfológicos pela presença de uma cerda pró-episternal nos adultos e espinhos nos tubérculos das larvas, sendo essas diferenças pequenas e passíveis de variações entre indivíduos (Wells and Sperling, 1999). A separação dos clados formados pelos gêneros *Phormia* + *Protophormia* e *Chrysomya* mostrou suporte moderado de *bootstrap* na MP. Os resultados obtidos, indicando esses dois clados como grupos-irmãos, corroboram a análise feita por Wells and Sperling (2001) com os genes *cox1*, *cox2* e *tRNA^{Leu}*.

As três subfamílias estudadas – Chrysomyinae, Luciliinae e Calliphorinae – mostraram-se monofiléticas, de acordo com estudos com caracteres morfológicos (Rognes, 1997) e moleculares (Stevens, 2003; Wallman *et al.*, 2005). As relações obtidas neste trabalho indicam Calliphorinae como grupo-irmão de Luciliinae. Estes dados confirmam os resultados obtidos em estudos realizados com marcador ribossomal nuclear 28S (Stevens, 2003) e com *cox1*, *cox2*, *nd4* e *nd4L* (Wallman *et al.*, 2005). No entanto, mostram-se divergentes dos resultados apresentados pelos dados morfológicos de Rognes (1997), os quais sugerem que Calliphorinae é o grupo irmão de Chrysomyinae. Dessa forma, de acordo com os caracteres moleculares, os critérios morfológicos utilizados para o estabelecimento da relação entre estas duas subfamílias de Calliphoridae deveriam ser revistos.

Com relação aos gêneros Neotropicais *Hemilucilia*, *Cochliomyia* e *Chloroprocta*, os dados sugerem que *Chloroprocta* é grupo-irmão do clado formado por *Cochliomyia* + *Hemilucilia*. Este trabalho foi o primeiro a utilizar caracteres moleculares de espécies dos gêneros *Hemilucilia* e *Chloroprocta*, mas dados combinados com caracteres morfológicos ainda são necessários para uma inferência mais concreta da relação entre esses gêneros neotropicais. Como exemplificado na Tabela 5, a variação observada entre espécies de mesmo gênero pode apresentar maior variação do que a observada entre espécies de gêneros distintos. Isto pode ser consequência da taxa de substituição acelerada desta região

do genoma mitocondrial e do viés apresentado para A+T (Tabela 3). Neste sentido, a inferência de relações evolutivas mais antigas pode ser prejudicada.

As divergências apresentadas pelas seqüências de RC na análise da Tabela 5 mostraram-se superiores das obtidas com outros marcadores mitocondriais. Enquanto Wells and Sperling (2001) obtiveram divergência média próxima de 3% entre as espécies *C. albiceps* e *C. rufifacies* utilizando seqüências completas de *cox2*, *tRNA^{Leu}* e *cox1*, para estas mesmas espécies, o valor obtido com o domínio conservado da RC foi 6,8%. Entre as espécies *Ca. vicina* e *Ca. vomitoria*, Ames *et al.* (2006) obtiveram uma divergência média de 4% utilizando 523 pb da região central de *cox1*, enquanto a RC por sua vez apresentou 9,4% de divergência; Harvey *et al.* (2003), analisando a região central e 3' de *cox1*, obtiveram uma divergência entre *L. sericata* e *Chrysomya* spp. entre 8,2% e 10,7%, enquanto a RC apresentou uma variação entre 17,7% e 22,0%. Enquanto essa característica mostra-se interessante para a identificação de espécies e estudo com *taxa* com divergência recente, a elevada taxa de substituição nucleotídica apresentada pela RC pode comprometer a análises efetuadas com *taxa* mais basais. Dessa forma, a combinação de dados entre marcadores moleculares com diferentes características de evolução pode ser uma alternativa interessante para resolver os problemas encontrados durante a reconstrução filogenética de Calliphoridae. Estudos recentes têm ressaltado importância de se utilizar informações filogenéticas provenientes de diferentes fontes, sendo enfatizada por estudos que apontam as limitações dos marcadores utilizados individualmente na reconstrução filogenética (Cao *et al.*, 1994; Baker and DeSalle, 1997; Baker *et al.*, 2001). Neste contexto, uma das perspectivas deste trabalho será a de avaliar a utilização de marcadores moleculares mais conservados – como genes ribossomais nucleares ou codificadores de proteínas nucleares – juntamente com marcadores que apresentam uma maior taxa de evolução, tais como o domínio conservado da RC, para elucidar questões que ainda persistem sobre a evolução das moscas causadoras de mífases.

Conclusões

- A padronização da amplificação e a construção de novos oligonucleotídeos para o acesso eficiente às informações genéticas da região controle do DNAm_t possibilitaram o seu seqüenciamento e caracterização, sendo uma importante contribuição para estudos sobre evolução e estrutura dessa região do genoma mitocondrial na família Calliphoridae e em outros insetos.
- A região controle mostrou ser um marcador molecular com características distintas, dependendo da região considerada: o domínio conservado apresentou potencial para estudos filogenéticos de *taxa* com divergência recente, bem como para a identificação espécie-específica; o domínio variável, por sua vez, pode ser adequado como marcador molecular para estudos de genética de populações e caracterização de polimorfismo.
- Elementos estruturais conservados, identificados na região controle das espécies estudadas de Calliphoridae, encontram-se presentes em diferentes grupos de Insecta, sugerindo a relação dessa região com a replicação do genoma mitocondrial.
- A análise das duplicações dos tRNAs, que foram identificadas em três gêneros da família Calliphoridae, apresentaram o mesmo padrão de ocorrência, e sugerem que o domínio variável da região controle possa atuar como *hot spot* para eventos de rearranjo mitocondrial.
- A análise filogenética conduzida com a RC dá suporte à formação de um clado contendo as espécies Neotropicais e também à monofilia das subfamílias Chrysomyinae, Calliphorinae e Luciliinae, apontando estas duas últimas como grupos-irmãos, corroborando análises prévias realizadas com outros marcadores moleculares.

Manuscrito Anexo – Duarte, GT, Junqueira ACM, and Azeredo-Espin, AML. “Characterization of the control region of the mitochondrial DNA in myiasis-causing flies (Diptera: Calliphoridae) and its role as a hot spot for the mitochondrial genome rearrangement”. Submetido para publicação.

Resumo

A família Calliphoridae é formada por moscas causadoras de miíases, incluindo espécies de importância econômica, forense e médica. Entretanto, conflitos taxonômicos ainda permeiam a identificação de algumas de suas espécies, principalmente durante os estágios larvais, e continuam representando um obstáculo para a entomologia forense e para programas de erradicação de espécies. Neste trabalho, seqüências completas da região controle do DNA mitocondrial de 15 espécies de califorídeos foram analisadas. A região controle apresentou um alto viés para adeninas e timinas, e uma variação de tamanho de 854pb até 2018pb, além de apresentar variações de seqüência e tamanho intraespecíficas. Dois domínios foram identificados na região controle: um conservado, com a presença de blocos de seqüência conservados e elementos também identificados em outros grupos de Insecta, que podem conter as origens de replicação de ambas as fitas do DNAm^t; e um domínio variável tanto em tamanho quanto em seqüência. Dentro do domínio variável, uma duplicação do gene *tRNA^{Ile}* previamente reportada para três espécies de *Chrysomya* também foram identificadas em outras duas espécies desse gênero, além de outras duas espécies de gêneros distintos. As similaridades de organização e estruturais sugerem convergência entre as espécies, com o domínio variável atuando como um *hot spot* para rearranjos e recombinações mitocondriais, eventos que talvez não sejam tão raros quanto imaginados para este grupo.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, região rica em A+T, ordem gênica, duplicação gênica, recombinação ilegítima, Insecta.

Characterization of the control region of mitochondrial DNA in myiasis-causing flies (Diptera: Calliphoridae) and its role as a hot spot for rearrangements in the mitochondrial genome

Research article

Gustavo Turqueto Duarte, Ana Carolina M. Junqueira and Ana Maria L. de Azeredo-Espin

Laboratório de Genética Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) and Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6010, 13083-875, Campinas, SP, Brazil.

*Correspondence to: G.T. Duarte. Phone: +55 19 3521-1141; Fax: +55 19 3521-1089

E-mail address: gtduarte@unicamp.br

Keywords: A+T-rich region, Gene duplication, Gene order, Illegitimate recombination, Insecta, Mitochondrial DNA.

Running head: Control region of mtDNA in myiasis-causing flies

Abbreviations: A, adenine; bp, base pairs; C, cytosine; CSB, conserved sequence blocks; CR, control region; G, guanine; IR, intergenic region; mtDNA, mitochondrial DNA; PCR, polymerase chain reaction; *srRNA*, small subunit of rRNA gene; T, thymine; tRNA, transfer RNA; Ts/Tv, transition/transversion ratio.

Abstract

The family Calliphoridae consists of myiasis-causing flies, including species of economic, forensic and medical importance. However, taxonomic controversies related to the identification of some calliphorid species, particularly in the larval stages, continue to be an obstacle for forensic entomology and species eradication programs. In this work, complete control region (CR) of mitochondrial DNA sequences from 15 calliphorid species were analyzed. The CR had a high content of A and T and varied in length from 854 bp to 2018 bp, and also showed intraspecific variations in sequence and length. Two major CR domains were identified: one was a conserved domain containing conserved sequence blocks and features identified in other groups of Insecta that may contain the origins of replication for both mitochondrial DNA strands, and the other was a domain of variable sequence and length. Within the variable domain, duplication of the *tRNA^{Ile}* gene previously reported for three *Chrysomya* species was identified in two more species of this genus and in two species from two other genera. The structural and organizational similarities observed here indicate convergence among species, with the variable domain acting as a hot spot for mitochondrial rearrangements and recombination, both of which may not be as rare as previously thought in this group.

1. Introduction

Metazoan mitochondrial DNA (mtDNA) has been used for evolutionary studies involving population structure and phylogeography (Stevens and Wall, 1997; Hall et al., 2001; Schultheis et al., 2002; Froufe et al., 2005), species identification (Litjens et al., 2001; Wells and Sperling, 2001; Schroeder et al., 2003; Harvey et al., 2003; Chen et al., 2004), and phylogenetics (Moore, 1995; Flook et al., 1999; Caterino et al., 2000; Baker et al., 2001; Froufe et al., 2005; Tang et al., 2006). The simple genetic structure of mtDNA, which lacks introns, its predominantly maternal inheritance and its higher rate of nucleotide substitution compared to nuclear DNA (Avisé et al., 1987; Moore, 1995) are some of the features that make mtDNA a valuable source of genotypic characters. The high copy number of mtDNA enhances access to genetic information through PCR amplification and is also a useful feature for forensic analyses and for studies with preserved specimens from museum and entomological collections since it minimizes the loss of DNA through fragmentation caused by the oxidative and hydrolytic damage that normally occurs after death (Pääbo, 1989; Junqueira et al., 2002; Parson et al., 2004). Although recombination in mitochondrial genomes was believed to be a rare event, there is evidence indicating that it may be more common than originally believed (Lunt and Hyman, 1997; Shao et al., 2005).

The typical animal mtDNA is a circular, double-stranded 16-20 kb molecule that generally contains 13 protein-coding genes, two genes for subunits of ribosomal RNA (rRNA) and 22 transfer RNA (tRNA) genes. The products of these genes, together with nuclear proteins and RNAs, provides the machinery for mitochondrial replication, transcription, mRNA processing and protein translation (Boore, 1999). The major non-coding region of mtDNA is known as the control region (CR). In insects, the presence of conserved sequence blocks (Zhang and Hewitt, 1997) and secondary structure (Inohira et

al., 1997), as well as data from ligation-mediated PCR (Saito et al., 2005) and electron microscopy (Goddard and Wolstenholme, 1980) studies indicate that the CR is related to the transcription and replication of the mitochondrial genome, as it is for vertebrates (Shadel and Clayton, 1997) and crustaceans (Carrodeguas and Vallejo, 1997).

According to Zhang and Hewitt (1997), the CR shows two patterns of organization among insects. In fruit flies (Zhang and Hewitt, 1997) and blowflies (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000; Junqueira et al., 2004; Lessinger et al., 2004), the CR has two distinct domains: a conserved domain with conserved sequence blocks (CSBs) that harbors the putative origin of replication, and a variable domain that varies markedly in sequence and length. Both of these domains may contain [A]_n[T]_n tandem repeats. In contrast, in butterflies, moths, stoneflies, grasshoppers, locusts and mosquitoes, the CR cannot be divided according to distinct domains, although it may contain tandem sequence repeats and conserved sequence blocks dispersed throughout its length (Zhang and Hewitt, 1997; Schultheis et al., 2002; Vila and Björklund, 2004).

The family Calliphoridae is well known for its economic, medical, sanitary and forensic importance (Baumgartner and Greenberg, 1984; Amendt et al., 2004; Azeredo-Espin and Lessinger, 2006). This family includes myiasis-causing flies (blowflies) that have a wide geographic distribution and synantropic habit. Myiases are infestations on living vertebrates caused by dipteran larvae that feed on the host's dead or living tissue, body substances or ingested food (Zumpt, 1965). Calliphorid flies are among the first insects to colonize corpses, and are therefore important for estimating the time of death in forensic science (Amendt et al., 2004). The economic significance of the Calliphoridae resides in the losses these flies cause in livestock production (Hall and Wall, 1995).

Despite their general importance to man, taxonomic controversies still surround the identification of some calliphorid species, particularly in the larval stage, mainly because of the lack of diagnostic morphological traits and the ecological similarities among species. This situation is complicated further by the occurrence of polymorphisms (Tantawi and Greenberg, 1993). Together, these factors represent an important obstacle in forensic entomology and species eradication programs (Figarola et al., 2001; Harvey et al., 2003; Lyra et al., 2005).

Technical difficulties in amplifying and sequencing the CR and the belief that its high substitution rate made this region unsuitable for evolutionary studies meant that the use of the CR as a molecular marker was neglected for a long time. However, in recent years, several reports have demonstrated the potential usefulness of the CR for populational and phylogenetic studies of closely-related taxa (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000; Brehm et al., 2001; Schultheis et al., 2002; Mardulyn et al., 2003; Vila and Björklund, 2004; Lyra et al., 2005; Tang et al., 2006).

In this work, we studied the two recognized domains of the CR in seven calliphorid genera and assessed the potential usefulness of this region as a molecular marker for evolutionary studies. A tRNA duplication previously reported for three *Chrysomya* species (Lessinger et al., 2004; Junqueira et al., 2004) was also identified in another two species of the same genus and in other two species from two different genera. The mitochondrial gene arrangement of these species could not be explained by current models, namely, (1) tandem duplication followed by random loss caused by deletion (Moritz et al., 1987), (2) homologous recombination (Tsukamoto and Ikeda, 1998; Rokas et al., 2003) and (3) intramolecular recombination (Lunt and Hyman, 1997). Our results provide new evidence for illegitimate inter-mtDNA recombination, initially described by Shao et al. (2005) and

also suggest that the variable domain of the CR may be a hot spot for rearrangements of the mtDNA genome.

In addition, we also studied the CSBs previously reported for calliphorid species (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000; Lessinger et al., 2004) and predicted conserved secondary structures in the CR that could be involved in the recognition and regulation of mtDNA transcription and replication. This report extends previous work on the CR of the Calliphoridae, and is the most comprehensive comparative study of myiasis-causing flies done so far.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Adult flies of *Chloroprocta idioidea* were collected in Mogi Guaçu and specimens of *Hemilucilia semidiaphana* were collected in São João da Boa Vista (both in São Paulo State, Brazil) and stored at -70°C. Ethanol-preserved adults of *Chrysomya bezziana*, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies*, *Calliphora dubia*, *Calliphora vomitoria*, *Hemilucilia flaviascies*, *Hemilucilia segmentaria*, *Lucilia eximia*, *Lucilia sericata* and *Phormia regina* were provided by various collaborators. Table 1 lists the sampling locations, collection dates, preservation methods and GenBank accession numbers.

Table 1. Sampling localities, fixation methods and amplified fragments in the calliphorid species studied.

Species	Locality	Collection date	Preservation	Accession number	Reference
<i>Chrysomya albiceps</i> ^g	Brazil (Rio de Janeiro)	-	-	<u>AY220131</u>	Lessinger et al. (2004)
<i>Chrysomya bezziana</i> ^{ab}	Malaysia (Kluang)	Sep 2003	Alcohol	<u>EF423877</u>	This work
<i>Chrysomya bezziana</i> ^b	Malaysia (Kluang)	Sep 2003	Alcohol	<u>EF423876</u>	This work
<i>Chrysomya megacephala</i> ^b	Australia (Perth)	Dec 2003	Alcohol	<u>EF423880</u>	This work
<i>Chrysomya megacephala</i> ^g	Brazil (São Paulo)	-	Frozen -70°C	<u>AF151386</u>	Lessinger and Azeredo-Espin (2000)
<i>Chrysomya putoria</i> ^g	Brazil (São Paulo)	-	Fresh	<u>AF352790</u>	Junqueira et al. (2004)
<i>Chrysomya rufifacies</i> ^{ab}	Australia (Perth)	Dec 2003	Alcohol	<u>EF423881</u>	This work
<i>Chrysomya rufifacies</i> ^a	Australia (Perth)	Dec 2003	Alcohol	<u>EF423884</u>	This work
<i>Chrysomya rufifacies</i> ^{ab}	USA (Texas)	Jun 1993	Dried	<u>EF423882</u>	This work
<i>Chrysomya rufifacies</i> ^b	Australia (Perth)	Dec 2003	Alcohol	<u>EF423883</u>	This work
<i>Calliphora dubia</i> ^{ab}	Australia (Perth)	Dec 2003	Alcohol	<u>EF423878</u>	This work
<i>Calliphora vomitoria</i> ^{ab}	England (London)	Apr 2004	Alcohol	<u>EF423885</u>	This work
<i>Chloroprocta idioidea</i> ^{ab}	Brazil (São Paulo)	Apr 2004	Fresh	<u>EF423879</u>	This work
<i>Cochliomyia hominivorax</i> ^g	Brazil (Minas Gerais)	-	Frozen -70°C	<u>AF151382</u>	Lessinger and Azeredo-Espin (2000)
<i>Cochliomyia macellaria</i> ^g	Brazil (Amazonas)	-	Frozen -70°C	<u>AF151384</u>	Lessinger and Azeredo-Espin (2000)
<i>Hemilucilia flavifacies</i> ^{ab}	Brazil (R. Grande do Sul)	Jun 1994	Alcohol	<u>EF423886</u>	This work
<i>Hemilucilia segmentaria</i> ^a	Brazil (São Paulo)	Apr 2001	Frozen -20°C	<u>EF423887</u>	This work

<i>Hemilucilia semidiaphana</i> ^{ab}	Brazil (São Paulo)	Apr 2002	Fresh	<u>EF423888</u>	This work
<i>Lucilia eximia</i> ^{ab}	Brazil (R. Grande do Sul)	Jun 1994	Alcohol	<u>EF423889</u>	This work
<i>Lucilia sericata</i> ^{ab}	France (South)	Apr 2004	Alcohol	<u>EF423890</u>	This work
<i>Phormia regina</i> ^{ab}	USA (West Virginia)	Apr 2004	Alcohol	<u>EF423892</u>	This work
<i>Phormia regina</i> ^b	USA (California)	Jul 1997	Alcohol	<u>EF423891</u>	This work

Note. ^a Amplicon A sequenced

^b Amplicon B sequenced

^g GenBank sample

- No data available (GenBank sequence)

2.2. DNA Extraction and PCR Amplification

DNA from fresh and frozen flies was extracted using the phenol/chloroform method, as described by Infante Vargas and Azeredo-Espin (1995). Total DNA was extracted from dried/pinned or alcohol-preserved specimens using DNAzol[®] (Invitrogen) since this reagent was the most efficient method for recovering DNA from preserved specimens, as described by Junqueira et al. (2002).

The CR was amplified using the nested PCR strategy with two sets of primers in two distinct reactions for amplicons A and B, as shown on Figure 1. An initial reaction was done with the primers C1-N-1560 and SR-J-14612 (Simon et al., 1994). The products of this amplification were used as templates for the nested PCR in which the second reaction was done with the primers TM-N-193 (Simon et al., 1994) and CMegAR (Lessinger et al., 2004) to obtain amplicon A, or with the primers CMegA (Lessinger et al., 2004) and SR-J-14941 (Oliveira et al., 2006) to obtain amplicon B. The initial reaction consisted of denaturation at 94°C for 3 min and followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 40°C for 1 min and extension at 60°C for 2 min. The reaction was terminated by a final elongation at 60°C for 10 min. The nested PCR reactions were done identically, except that the annealing temperature was 45°C.

Amplicon A of *Ch. idioidea* could not be obtained with the primer CMegAR. A new primer (CR-B-VII) to amplify this region was designed based on the sequences obtained from amplicon B. This primer, combined with TM-N-193, recovered a sequence that overlapped with amplicon B by 130 bp, thus allowing complete determination of the CR sequence. A similar approach was also used for *Ca. dubia*. The large size of the variable domain of *Ca. dubia* meant that a new primer combination was necessary to recover its

complete sequence. A primer designated Cadu was therefore designed based on the recovered partial sequence of amplicon B of *Ca. dubia* (see Figure 3B for primer location) and used with CR-B-VII-R, which is the reverse complement of CR-B-VII shifted 2 bp upstream. Table 2 lists the primers used in this work.

The final reagent concentrations for all reactions were: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, 500 nM of each primer, 200 μM of each dNTP, and ~100 ng of DNA. The amplicons were separated by electrophoresis on 1.0% agarose gels using TAE 1X buffer (40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA) and the products visualized under UV light in the presence of ethidium bromide.

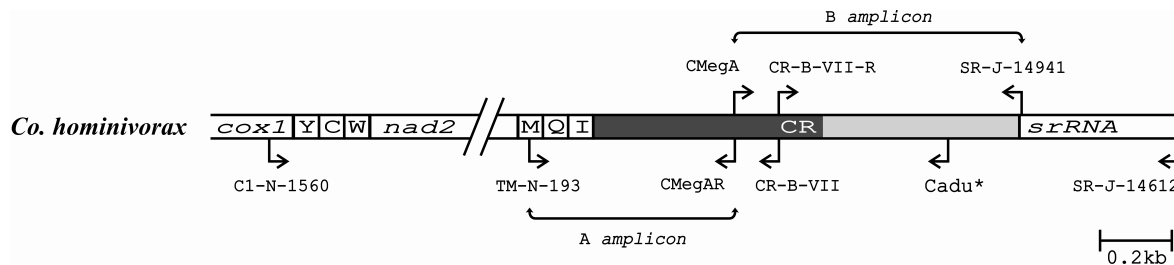


Figure 1. General organization of the CR and primer annealing sites for PCR amplification. The *nad2* gene is partially represented. The dark and light colored boxes represent the conserved and variable domains, respectively. tRNAs are denoted as Y (*tRNA^{Tyr}*), C (*tRNA^{Cys}*), W (*tRNA^{Trp}*), M (*tRNA^{Met}*), Q (*tRNA^{Gln}*) and I (*tRNA^{Ile}*). Amplicon A includes the partial sequence of *tRNA^{Met}*, complete sequences of *tRNA^{Gln}* and *tRNA^{Ile}*, and partial sequence of the conserved domain, whereas amplicon B comprises the entire variable domain and approximately 200 bp of the conserved domain. CR-B-VII was used for *Ch. idioidea* and *Ca. dubia* while CR-B-VII-R was combined with Cadu exclusively for *Ca. dubia*. This later primer was designed exclusively for *Ca. dubia* and is marked with an asterisk indicating the position relative to the end of the CR.

Table 2. Primers used for PCR amplification of the control region.

Primer	Sequence	Source	Annealing region
C1-N-1560	5'– TGTTCCCTACTATTCCGGCTCA –3'	Simon et al. (1994)	<i>cox1</i>
SR-J-14612	5'– AGGGTATCTAATCCTAGTTT –3'	Simon et al. (1994)	<i>srRNA</i>
TM-N-193	5'– TGGGGTATGAACCCAGTAGC –3'	Simon et al. (1994)	<i>tRNA^{Met}</i>
CR-B-VII	5'– TTTTATATTGAAGCGTCG –3'	This work	CR conserved domain
CR-B-VII-R	5'– TTGCACGGTTCAATATAA –3'	This work	CR conserved domain
CMegAR	5'– AATCCAGTTAAGAATATCAT –3'	Lessinger et al. (2004)	CR conserved domain
CMegA	5'– ATGATATTCTTAACTGGATT –3'	Lessinger et al. (2004)	CR conserved domain
Cadu	5' – TTGGTAAATCCTACTGT –3'	This work	CR variable domain
SR-J-14941	5' – AGCCAAAATAAACTTTA –3'	Oliveira et al. (2006)	<i>srRNA</i>

2.3. Cloning and Sequencing

The PCR products were purified by dialysis using 0.05 µm Millipore filters and TE buffer (Tris-HCl 1 M, pH 7.4, EDTA 0.5 M). The products were ligated into a pCR2.1[®]-TOPO[®] vector (Invitrogen TOPO[®] – TA Cloning kit), according to the manufacturer's instructions, followed by chemical transformation in *E. coli* TOP10 competent cells (Sambrook et al., 1989). Positive clones were sequenced automatically on a Perkin Elmer-ABI Prism 377 sequencer using a Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (ABI Prism[™], Perkin Elmer), according to the manufacturer's instructions. The sequences were confirmed by sequencing at least three clones of each specimen.

2.4. Sequence Analysis

The chromatograms were analyzed and edited with the software Chromas 2.21 (Technelysium Pty Ltd). Multiple alignments were done using the ClustalW algorithm (Thompson et al., 1994) on MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) with gap penalties reduced to 12 because of differences in sequence length. Manual adjustments were done when necessary. Inferences about the secondary structure of the tRNAs were made using tRNA-ScanSE v. 1.21 (Lowe and Eddy, 1997). The nucleotide diversity across the conserved domain in the aligned sequences was computed by the sliding window method with DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003), using seven sites for the window length and step size, without gaps in the length of the windows for better visualization. A putative stem-loop structure of the A+T-rich region and its folding energy were inferred with the Mfold web server version 3.1 using default parameters (Zuker, 2003). Repeats in the CR sequences were inferred with the Dotlet web server (Junier and Pagni, 2000).

CSBs were assigned based on the alignment of the 15 complete conserved domain sequences of calliphorid species, according to the following criteria based on Lessinger and Azeredo-Espin (2000): (1) a CSB should contain at least 15 sites, (2) the start of a CSB was assigned based on the presence of similarity for at least four sites in 13 of the 15 species studied and (3) the end of a CSB was considered after four variable consecutive sites in more than two species.

3. Results and Discussion

3.1. Structural organization of the CR

The CR of mtDNA in the Calliphoridae was flanked by *srRNA* and *tRNA^{Ile}* genes (Figure 1) and varied in length (excluding the CMegA/CMegAR primer position) from 854 bp in *C. megacephala* to 1905 bp in *Ca. dubia* (Table 3). The nucleotide composition showed a high content of A and T that varied from 86.0% in *Ch. idioidea* to 91.6% in *Co. hominivorax* (Table 3). A high A+T content in the CR has been widely described for insects (Zhang and Hewitt, 1997; Lessinger and Azeredo-Espin, 2000; Lessinger et al., 2000; Mardulyn et al., 2003; Shao and Barker, 2003; Junqueira et al., 2004; Vila and Björklund., 2004; Covacin et al., 2006) and may be related to a role in energy-dependent processes during replication of the mitochondrial genome (Clary and Wolstenholme, 1985). Hence, although the CR is a non-coding region, nucleotide substitutions may not occur randomly, a conclusion supported by the suggestion of directional mutation pressure for the A+T composition in insect mtDNA (Jermini et al., 1994).

Duplications or tandem repeats are associated with replication errors caused by replication slippage and are therefore related to variations in CR length (Zhang and Hewitt, 1997), as also observed in the calliphorid species analyzed here.

Table 3. Variation in the length of the control region in calliphorid species. There was a clear bias towards a high content of A+T, as commonly described in insects. *C. rufifacies* 1 and 2 correspond species from Australia and the USA, respectively.

Species	CR (bp)	Domain A (bp)	Domain B (bp)	A+T (%)
<i>C. bezziana</i>	855	574	281	90.5
<i>C. megacephala</i>	854	576	278	90.8
<i>C. putoria</i>	888	582	306	90.4
<i>C. rufifacies</i> 1	988	562	426	90.4
<i>C. rufifacies</i> 2	1026	556	470	88.6
<i>C. albiceps</i>	1008	542	466	91.3
<i>L. sericata</i>	1103	565	538	90.3
<i>P. regina</i>	869	570	229	90.9
<i>Co. hominivorax</i>	1158	619	539	91.6
<i>H. semidiaphana</i>	1171	612	559	86.9
<i>H. flavifascies</i>	1180	615	565	86.6
<i>Co. macellaria</i>	1206	617	589	87.1
<i>L. eximia</i>	1247	568	679	91.0
<i>Ch. idioidea</i>	1234	666	568	86.0
<i>Ca. vomitoria</i>	1303	595	708	90.8
<i>Ca. dubia</i>	1905	600	1305	90.7

3.1.1. Conserved domain of the CR

The conserved domain varied in length from 542 bp in *C. albiceps* to 666 bp in *Ch. idioidea* (Table 3), with A ↔ T substitutions accounting for 63.4% of the total substitutions; transversions predominated over transitions ($Ts/Tv = 0.2839$), which corroborated the high content of these two nucleotides in the CR.

Despite this size variation, alignment of domain A of the CR revealed the presence of eight CSBs (Figure 2) that corresponded to 370 sites. The criteria used to assemble the

CSBs were supported by the estimate of nucleotide diversity (data not shown). The conserved domain had a mean nucleotide diversity of 0.17308 (range: 0 - 0.53741) and, as expected, the CSBs coincided with regions of lower diversity.

CSB I spanned a T-stretch, also present upstream of *tRNA^{Ile}* in *Drosophila* spp., Orthoptera and Plecoptera (Clary and Wolstenholme, 1987; Zhang et al., 1995; Brehm et al., 2001; Schultheis et al., 2002). This structure may participate in the regulation of transcription through protein-DNA interactions (Clary and Wolstenholme, 1987), and its conservation among different groups is evidence for such a functional role (Lewis et al., 1994; Zhang et al., 1995; Schultheis et al., 2002). Indeed, the origin of replication for the major coding strand in mitochondria was mapped downstream of this T-stretch in *Drosophila* spp. indicating that it may also participate in such regulation (Saito et al., 2005). This motif varied in size from 15 bp in *L. eximia* and *Co. macellaria* to 23 bp in *Co. hominivorax*, in addition to intraspecific size variation.

CSB II and III were the shortest blocks (21 bp and 17 bp respectively) and preceded the most variable region of the conserved domain that was located between CSBs III and IV; this variable region ranged in length from 28 bp in *C. albiceps* to 98 bp in *Ch. idioidea*, which made its alignment difficult. CSB IV and V contained a purine-pyrimidine [TA(A)]_n tandem repeat that has also been reported between the T-stretch and the conserved secondary structure in Lepidoptera (Taylor et al., 1993), Orthoptera and Coleoptera (Zhang and Hewitt, 1997) and Plecoptera (Schultheis et al., 2002). Like the A and T stretches, tandem repeats also showed inter- and intraspecific variation, e.g. *C. rufifacies*, the samples of which showed 8, 9 and 10 purine-pyrimidine repeats in CSB IV.

CSB VI was the largest block, with 152 bp. This block contained the annealing sites for the primers CMegA/CMegAR. A conserved stem-loop structure that has been

associated with the origin of replication for the major strand of mtDNA in Diptera, Orthoptera, Hymenoptera, Plecoptera and Phthiraptera (Clary and Wolstenholme, 1987; Zhang et al., 1995; Schultheis et al., 2002; Lessinger et al., 2004; Covacin et al., 2006) was also inferred for the Calliphoridae and was located at the end of CSB VI and beginning of CSB VII. However, sequence variations meant that this stem-loop structure extended beyond these two CSBs. The structure of the putative stem-loop has been found to be conserved among all of these insect groups, and although its function as the recognition site for mtDNA primase in *Drosophila* spp. has been questioned, it may be related to the replication of the mtDNA in species which lack the T-strech (Saito et al., 2005). This finding agrees with the proposal that structural elements in the CR, rather than just the primary sequences, are conserved among insects (Zhang and Hewitt, 1997; Schultheis et al., 2002). Additional functional evidence for the stem-loop structure was the occurrence of compensatory mutations, also identified in *C. albiceps* and *C. putoria* (Lessinger et al., 2004).

CSB VII contains the sites used to design the primers CR-B-VII and CR-B-VII-R. An additional region of marked variation in sequence and length was located between the last two blocks, CSB VII and CSB VIII. CSB VIII was an A-stretch that ranged in size from 16 bp in *H. semidiaphana* and *L. eximia* to 26 bp in *C. rufifacies*, and marked the end of the conserved domain. The T-stretch in the complementary strand has also been suggested to have a role in the replication of the minor coding strand of mtDNA (Lewis et al., 1994; Saito et al., 2005).

	28	46	57	77	116	131	234
<i>Co.macellaria</i>	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTATACCTA	TTTTTATAAAA	AATAAATTTA	AATAGT	ATATATATAT ATATATATA-
<i>Co.hominivorax</i>ATA	.T...T-
<i>H.semidiaphana</i>ATGA	.T...T-
<i>H.flavifacies</i>A--TGT...GT-
<i>C.albiceps</i>T...G	AAA	.T...A...---
<i>C.rufifacies</i>T...TT	AA	.T...T
<i>P.regina</i>AT.GTT	G...A	.T...T-
<i>C.megacephala</i>G.AT.GTGAT-
<i>C.putoria</i>T...	AAT-
<i>C.bezziana</i>TG.AT.TTAT-
<i>Ch.idioidea</i>AT...AA...A	AA	.T...T-
<i>L.eximia</i>---A	AA.TATT	G...AAA	.T...T
<i>L.sericata</i>A	AA...T.G	C...AAA	TT...T
<i>Ca.vomitorea</i>AT.T	AAA	T...A
<i>Ca.dubia</i>AT.G.T	AAAA

I
II
III
IV

		284	320	360
<i>Co.macellaria</i>	ATTTATATAT	ATT--TATC	ATATATTTCT A	TTAATAATTA ATAAATTATT TATATAA-TA TTATAAATAA A
<i>Co.hominivorax</i>ATAC...-A
<i>H.semidiaphana</i>-A
<i>H.flavifacies</i>-A
<i>C.albiceps</i>A	TTAT.-A
<i>C.rufifacies</i>	T.A.....	T.A--A TTAT.-A
<i>P.regina</i>A-A C
<i>C.megacephala</i>A-A C
<i>C.putoria</i>A-A C
<i>C.bezziana</i>A-AT
<i>Ch.idioidea</i>	A.ACAATA
<i>L.eximia</i>AT- A
<i>L.sericata</i>A	A.....T. A
<i>Ca.vomitorea</i>	A.TA	T.A--T. A
<i>Ca.dubia</i>	ACATA. CATC

IV
V

	404	CMegA/CMegAR						
<i>Co.macellaria</i>	ATTTCCA	CTATAAACAT	TATATCTATA	AAAATAGTTA	AAGATTTAGT	AA-CATGATA	TACTTAAC TG	AATTTGAAAT
<i>Co.hominivorax</i>TTGAAAC	G.....
<i>H.semidiaphana</i>TT.TAAA
<i>H.flavifacies</i>TTTTAAA
<i>C.albiceps</i>TTTAA.C	TT.TAAT.A
<i>C.rufifacies</i>TTTAA.C	TT.TAAT.A
<i>P.regina</i>TTAAA.C	TT.TAAT.CA
<i>C.megacephala</i>TTAG.AA.C	TT.TAATA	G.....
<i>C.putoria</i>TTTAA.C	TT.TAAA	G.....
<i>C.bezziana</i>TTGAA.C	TT.TATA	TG.....
<i>Ch.idioidea</i>TTT.CAA.C	T.AG.AAC
<i>L.eximia</i>TTTAG.AA	TT.TAAAT
<i>L.sericata</i>ATAG.AA	CTT.TAAAT
<i>Ca.vomitorea</i>TTTAAA	TTG.TAATAA	T.AC
<i>Ca.dubia</i>TTTAG.AA	TG.TAATAA	T.AT

VI

					554
<i>Co.macellaria</i>	TTTTTTTTTT	A	-TCTAAATTA	ATAGATATAT	ATTAATTAAT TAAATATTTA TATATTAATA AAT-ATCTAT TAAT
<i>Co.hominivorax</i>AGG
<i>H.semidiaphana</i>AG
<i>H.flavifacies</i>ATT
<i>C.albiceps</i>GTT
<i>C.rufifacies</i>GTT
<i>P.regina</i>TG
<i>C.megacephala</i>CG
<i>C.putoria</i>CG
<i>C.bezziana</i>CG
<i>Ch.idioidea</i>CAG
<i>L.eximia</i>GG
<i>L.sericata</i>GG
<i>Ca.vomitorea</i>AGG
<i>Ca.dubia</i>AGG

VI

	565	CR-B-VII/CR-B-VII-R				616	708	725
<i>Co.macellaria</i>	TATA	TTGG-AC	CAAAAATAAA	TTTTTGCA-C	GCTTCAATAT	AAAAA-TGGA	GA	AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
<i>Co.hominivorax</i>A
<i>H.semidiaphana</i>TTCTT
<i>H.flavifacies</i>TTCTT
<i>C.albiceps</i>AGTATAT
<i>C.rufifacies</i>ATTT
<i>P.regina</i>ATTT
<i>C.megacephala</i>AT
<i>C.putoria</i>TT
<i>C.bezziana</i>AT
<i>Ch.idioidea</i>ATA
<i>L.eximia</i>ATCT	AA.CTT
<i>L.sericata</i>ATT.C.G	ACTT
<i>Ca.vomitorea</i>AGCTTC
<i>Ca.dubia</i>AGCTTTA

VII
VIII

Figure 2. Alignment of the conserved domain sequences. Dots indicate nucleotide identities with the sequence of *Co. macellaria*; letters indicate substitutions and dashes represent gaps. *C. rufifacies* 1 and 2 represent species from Australia and the USA, respectively. CSB I to CSB VIII are denoted below the sequences. The annealing sites for the primers CMegA/CMegAR and CR-B-VII/CR-B-VII-R are indicated above their respective sequences. The dashed brackets delimit the sequence of the putative stem-loop structure inferred with Mfold and associated with the origin of replication for the L-strand of mtDNA.

Despite the inter-individual variation in length within the same species, a relationship between the CR and replication and transcription is still plausible because of the conserved features reported here and for insect groups such as Thysanoptera, Plecoptera and Lepidoptera (Shao and Barker, 2003; Schultheis et al., 2002; Vila and Björklund, 2004).

Short tandem repeats, A/T-stretches and the regions of high variability between CSBs III and IV and CSBs VII and VIII are the main features responsible for variation in the length of the conserved domain. However, although the alignment of some regions of this domain was not trivial, the presence of conserved and variable sequences in the same marker may provide an interesting starting point for studying the relationship of recently diverged taxa and for population genetics.

3.1.2. Variable domain of the CR

A remarkable characteristic of this domain was its marked variation in sequence and length, with the latter ranging from 229 bp in *P. regina* to 1305 bp in *Ca. dubia* (Table 3).

This region was the main portion responsible not only for the variation in CR length among species but also for the mitochondrial genome in general. Large repeated fragments were the main cause of this variability, along with tandem repeats and nucleotide indels. Since the origin of replication of the minor coding strand in *Drosophila* maps near a T-strech (Saito et al., 2005) that is also present in the Calliphoridae and marks the end of the conserved domain, the tandem repeats seen in the variable domain can be explained by slipped-strand mispairing (Moritz et al., 1987) during replication of this strand. In addition, the variable domains may also act as a hot spot for gene rearrangements, resulting in changes in length, as discussed in section 3.3.

An interesting feature of this hypervariable region was a conserved 19 bp motif that was always preceded by stretches of 4-7 Gs adjacent to the motif (e.g. *C. bezziana*) or only a few base pairs away, e.g. 41 bp in *P. regina*. This pattern was present in all of the calliphorid species analyzed and will be referred to here as the conserved element of the variable domain (Figure 3A). Additional “G islands” may be located some distance from the conserved motif, with their number and location varying among species (Figure 3B). These G islands have also been described for *Drosophila* species and have been associated with the termination of mtDNA replication (Brehm et al., 2001) but not with conserved motifs. The location of the conserved element (motif plus G island) varied among species (Figure 3).

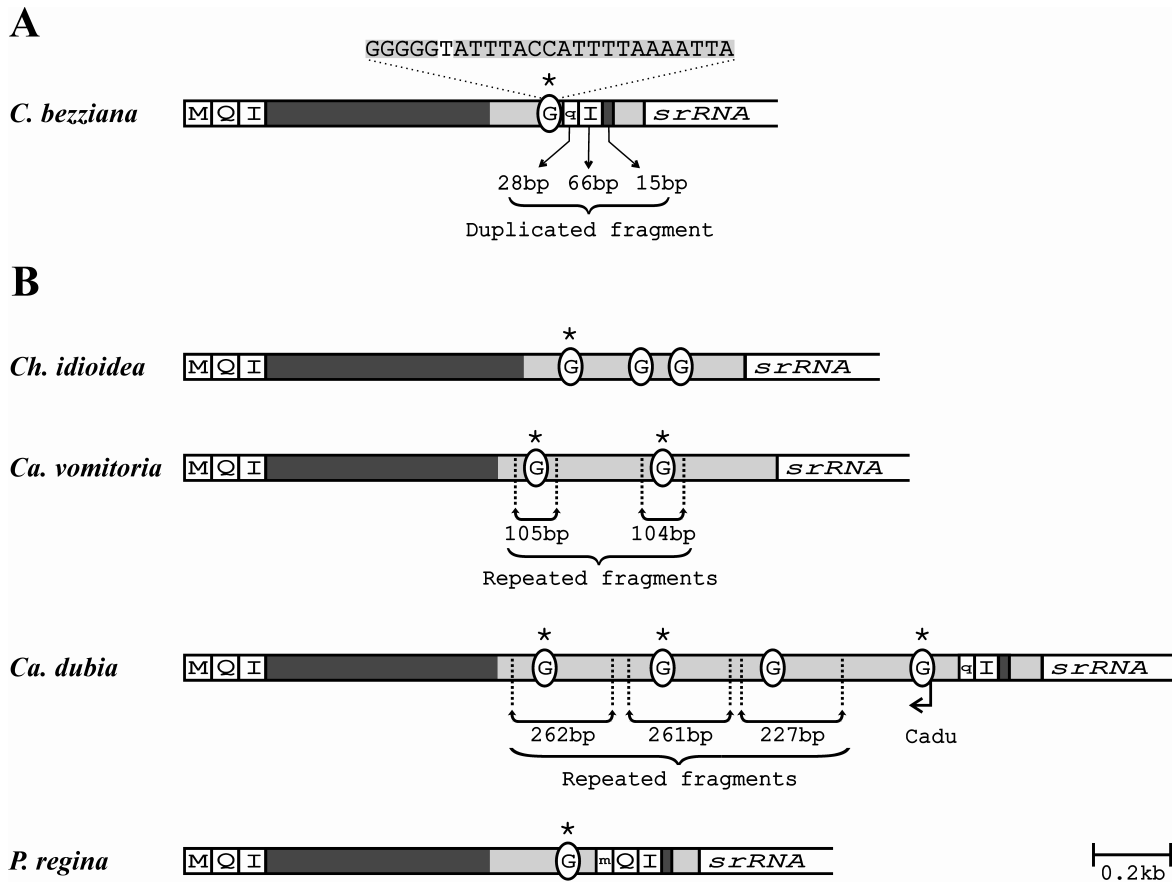


Figure 3. A. *Chrysomya*-like organization of the CR showing gene duplication. The ellipse with a G and an asterisk indicates a conserved element of the variable domain represented above. **B.** Variations in CR organization showing tRNA duplication in *Ca. dubia* and *P. regina* and the repeated fragments in *Calliphora*. The ellipse with a G but no asterisk indicates G islands unassociated with the conserved motif. The position of the primer Cadu that was used exclusively for *Ca. dubia* is also shown.

The variable domain of *Ca. dubia* had three fragments of 262 bp, 261 bp and 227 bp, which explained its greater length (Figure 3B). The first and second fragments shared 93.5% similarity, while the third fragment was 90.7% and 92.0% similar to the first and second one, respectively. Such differences between fragments may be caused by the accumulation of random deletions after the duplication. Interestingly, the variable domain

of *Ca. vomitoria* also had a repeated fragment of 104 bp and 103 bp (Figure 3B) that shared 83.7% similarity. This fragment also showed high similarity with the repeated fragments of *Ca. dubia*, e.g., the first copy of the repeated fragment of *Ca. vomitoria* was 73.7% similar to the first copy of the repeated fragment of *Ca. dubia*, suggesting that this is a conserved region of the variable domain in the genus *Calliphora*. The conserved element of the variable domain of Calliphoridae is present in these repeated fragments, except in the last repeated fragment in *Ca. dubia*, which although presents the G island, lacks the motif that could be degenerated (Figure 3B).

Another peculiarity of the variable domain involved the species *P. regina*, *Ca. dubia* and *Chrysomya* species. In *Ca. dubia* and in the five species of *Chrysomya* examined, the variable domain was interrupted by a duplication of *tRNA^{Ile}*, while in *P. regina* the duplication also included the *tRNA^{Gln}* gene (see section 3.3 for a detailed explanation and Figure 3). Interestingly, the duplication did not interrupt the conserved element of the variable domain in any species since it was located just after the conserved motif.

Although conserved regions were identified in this domain, the marked interspecific variation in size and sequence did not allow a confident alignment because of the lack of homology between nucleotide sites and therefore limited the usefulness of this domain for phylogenetic studies. Such variation has also been reported for *Drosophila* species and restricted the alignment to closely related species (Brehm et al., 2001). Nevertheless, the variable size of the domain and the presence of sequence polymorphisms could be useful for species identification and as potential markers for populational studies. Indeed, PCR-RFLP analysis of this region has been used to identify screwworm species (Litjens et al., 2001), and a recent study with *Co. hominivorax* populations indicated that polymorphism in

the length of the CR and *srRNA* region was a useful molecular marker for screening intraspecific variation (Lyra et al., 2005).

3.2. *tRNA* genes

Comparison of the sequences flanking the CR, including those for *tRNA^{Ile}* (66 bp), *tRNA^{Gln}* (69 bp) and *tRNA^{Met}* (19 bp), revealed that this region was highly conserved among the blowflies analyzed. Although the occurrence of intergenic regions and overlaps varied among species, two patterns of overlapping sequences were identified among the *tRNA* genes: *tRNA^{Met}* (+ strand) overlapped *tRNA^{Gln}* (- strand) by 1 bp and the latter gene overlapped *tRNA^{Ile}* (+ strand) by 3 bp (see supplementary materials for comparison of the tRNA cluster organization). In contrast, no patterns were observed among the intergenic regions, which varied in size and nucleotide composition, although they did have a high content of A+T.

Comparison of the *tRNA^{Ile}* and *tRNA^{Gln}* genes of blowflies with those of *Co. hominivorax* revealed substitutions in six calliphorid species: *C. rufifacies*, *C. megacephala*, *Ch. idioidea*, *H. flavifascies*, *H. segmentaria* and *L. eximia*. Ten transitions were identified at six sites, none of which occurred in the tRNA anticodon loop (see supplementary material for illustrations). Interestingly, three sites – one in the DHU loop of each tRNA and one in the T ψ C loop of *tRNA^{Gln}* – shared seven of these transitions and one deletion, suggesting that these tRNA regions may be more susceptible to substitution events. Intraspecific variation was observed at one of these sites: *L. eximia* from Rio Grande do Sul had a substitution in the DHU loop of the *tRNA^{Gln}* gene (also seen in *H. segmentaria*) whereas *L. eximia* from Mogi Guaçu had a sequence identical to that of *Co.*

hominivorax. *Hemilucilia segmentaria* also had a A → G substitution in the acceptor stem of its *tRNA^{Ile}* that resulted in wobble G-U pairing.

3.3. tRNA gene duplication and the CR as a hot spot for gene rearrangement

Duplication of the *tRNA^{Ile}* (Figure 3A) has previously been reported for three *Chrysomya* species: *C. megacephala*, *C. putoria* and *C. albiceps* (Junqueira et al., 2004; Lessinger et al., 2004). In this work, *tRNA^{Ile}* gene duplication was also found in *C. bezziana*, *C. rufifacies* and *Ca. dubia*. A larger duplication involving the *tRNA^{Ile}* and *tRNA^{Gln}* genes was also found in *P. regina* (Figure 3B).

In *Chrysomya* species and *Ca. dubia*, the entire duplication occurred immediately after the conserved element of the variable domain and included partial sequences of the regions flanking the *tRNA^{Ile}* gene that corresponded to the *tRNA^{Gln}* gene and the conserved domain of the CR (Table 4). The duplicated fragment in *P. regina* showed the same pattern, occurring after the conserved element and embracing the regions flanking the *tRNA^{Gln}* and *tRNA^{Ile}* genes that corresponded to the *tRNA^{Met}* gene and the conserved domain of the CR, respectively. The duplicated tRNA genes were identical to their “original” copies in all of the species. *Chrysomya megacephala* and *C. rufifacies*, in which the original *tRNA^{Ile}* differed from that of *Co. hominivorax*, also had the same substitutions in their duplicated genes (see supplementary material for illustration). The only exception was *P. regina* from California, for which only amplicon B was sequenced; this species had a single C → T substitution in its duplicated *tRNA^{Ile}* gene compared to the “original” copy of the sample from West Virginia. Since amplicon A was not recovered from the *P. regina* sample from California, its “original” *tRNA^{Ile}* sequence remains unknown. Conserved sequences such as those seen in duplicated tRNAs were not seen on the bound regions of the duplicated

fragments, which seem to be degenerated, being observed differences even among individuals of the same species (e.g. *C. megacephala* and *P. regina*).

Molecular and morphological phylogenies (Rognes, 1997; Wells and Sperling, 2001; Harvey et al., 2003) indicate that the genera *Chrysomya* and *Calliphora* belong to the subfamilies Chrysomyinae and Calliphorinae, respectively. The subfamily Chrysomyinae also contains the genera *Chloroprocta*, *Cochliomyia*, *Hemilucilia* and *Phormia*. However, of these genera, duplicated tRNAs were identified only in *Phormia*. This finding suggests that gene duplication and genomic rearrangement occurred separately on three occasions: in *Ca. dubia*, in *P. regina* and also before the divergence of *Chrysomya*. Since the duplicated tRNAs were identical to their original copies, a mechanism for maintaining the homogeneity of the two copies, such as concerted evolution, may be active in both copies of the genes but not in the regions flanking the duplicated fragment; such a mechanism could explain the degeneration observed. Concerning the substitution identified in the duplicated *tRNA^{Ile}* of *P. regina* from California, such mutation may have occurred in a recent event so that homogenization may not have occurred yet if considering that the original copy does not possess such substitution.

Table 4. Characterization of the tRNA duplications and their flanking regions in the variable domain of the control region.

Species	Duplication					Domain A	Total
	tRNA ^{Met}	IR or Overlap tRNA ^{Met} /tRNA ^{Gln}	tRNA ^{Gln}	IR or Overlap tRNA ^{Gln} /tRNA ^{Ile}	tRNA ^{Ile}		
<i>C. albiceps</i>	-	-	31	+2	66	15	114
<i>C. bezziana</i>	-	-	24	+4	66	15	108
<i>C. megacephala</i>	-	-	31	+4	66	15	116
<i>C. putoria</i>	-	-	19	0	66	15	100
<i>C. rufifacies</i>	-	-	31	-3	66	21	109
<i>P. regina</i>	16	+4	69	+7	66	12	174
<i>Ca. dubia</i>	-	-	29	-3	66	21	113

Note. (+) indicates Intergenic Region (IR) and (-) indicates overlapping.

The region between the duplicated genes and the *srRNA* gene, referred to as the *Chrysomya* intergenic region based on the analysis of three *Chrysomya* species (Junqueira et al., 2004; Lessinger et al., 2004), was rich in A+T. However, comparison with the final region of the variable domain in the 15 calliphorid species studied here suggested that this region beyond the duplication was a continuation of the variable domain.

The gene arrangement observed here (a gene duplication inserted in the variable domain) was not explained by the current models for mitochondrial rearrangements, namely, tandem duplication followed by random loss caused by deletion, that may produce two adjacent copies of a region but these copies will be necessarily adjacent (Moritz et al., 1987); homologous recombination, which does not modify the original gene arrangement (Tsukamoto and Ikeda, 1998; Rokas et al., 2003); or intramolecular recombination, which does not result in gene duplication (Lunt and Hyman, 1997). Our results provide additional evidence for the illegitimate inter-mtDNA model (Shao et al., 2005). This model is based on the presence of two mitochondrial genomes in which a double-strand fragment from one mtDNA molecule is inserted into the second mtDNA molecule by end-joining repair to produce a new genomic arrangement containing duplicated and separated sections. Since the gene duplication in *P. regina*, *Ca. dubia* and the *Chrysomya* species occurred at the same genomic location, the variable domain of the CR appears to be a hot spot for gene rearrangements. The finding that the duplicated fragments always involved the tRNA cluster formed by *tRNA^{Met}*, *tRNA^{Gln}* and *tRNA^{Ile}* probably reflects the observation that in all of the calliphorid species studied, and in *Drosophila* species (Saito et al., 2005), the origin of replication for the major strand in the CR was located upstream of the *tRNA^{Ile}* gene, immediately adjacent to a T-strech. Transfer RNAs are structures known to form stem-and-loop (Macey et al., 1997). According to the asymmetric replication model exemplified on

Figure 4A, the synthesis of the major coding strand begins after 97% of the minor coding strand has been synthesized, as occurs in *Drosophila* (Goddard and Wolstenholme, 1980). This arrangement leaves the minor strand, i.e., the template for major strand synthesis, single-stranded for a lengthy period. If, during this period, a stem-and-loop structure is formed by any of the tRNA genes, the synthesis of the new strand may be interrupted and the short fragment is cleaved (Figure 4B), giving rise to a fragment that could be inserted in a hot spot region. Thus, for example, in a stem-and-loop formed by $tRNA^{Gln}$, the excised fragment contains part of the conserved domain and $tRNA^{Gln}$ sequences and the complete sequence of $tRNA^{Ile}$, as occurs in *Ca. dubia* and *Chrysomya* spp. However, for a stem-and-loop formed by $tRNA^{Met}$, the fragment contains the beginning of the CR, the complete sequences of $tRNA^{Ile}$ and $tRNA^{Gln}$, and a partial $tRNA^{Met}$ sequence, as seen in *P. regina*.

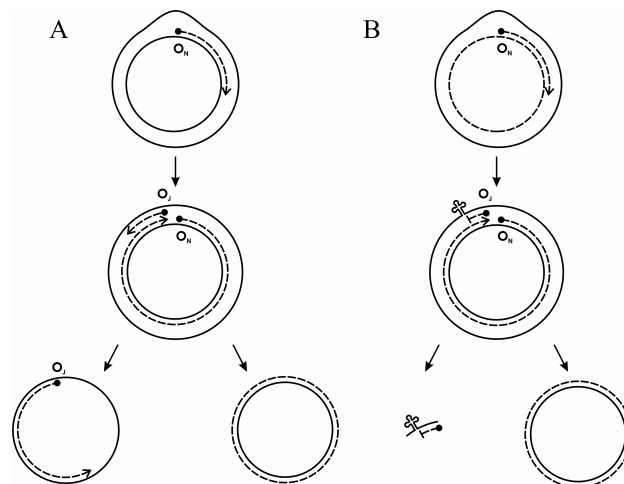


Figure 4. **A.** Asymmetric replication model of mtDNA, in which the synthesis of the minor coding strand proceeds unidirectionally, and the synthesis of the major coding strand begins after 97% of the minor coding strand has been synthesized, leaving the minor strand in single-stranded form for a lengthy period (adapted from Goddard and Wolstenholme, 1980). **B.** Involvement of the tRNA cluster with gene duplication, by the formation of a

stem-and-loop while the minor coding strand is in single-stranded form. This structure could interrupt the replication of the mtDNA, and the fragment already replicated could be cleaved and inserted in a hot spot region. O_N and O_J denotes the minor and major coding strands origins of replication, respectively, and dashed lines represent the newly synthesized strands.

4. Conclusions

The presence of CSBs in the conserved domain of calliphorid species and of putative conserved structures, such as the stem-and-loop and T-stretches in both mtDNA strands, in Diptera, Lepidoptera, Orthoptera and Plecoptera reinforce the hypothesis that the CR is involved in the transcription and replication of the mitochondrial genome. As in *Drosophila* spp., the origin of mtDNA replication in the Calliphoridae is probably located in T-stretches within the conserved domain, which suggests that such an organization is a conserved feature in Brachycera. The relationship between this CR domain and mtDNA replication is reinforced by: (1) the presence of tandem replications in the variable domain that may have originated from slipped-strand mispairing during replication of the minor coding strand, and (2) the presence of duplicated fragments in *Chrysomya* spp., *Ca. dubia* and *P. regina* that are copies of the tRNA cluster flanking the CR and the beginning of the conserved domain; such fragments could have been synthesized during replication of the major coding strand. In addition, the presence of CSBs in the conserved domain and the high A+T content suggest that substitutions in the CR may not occur randomly even though this is a non-coding region. An interesting and potentially useful feature for the phylogenetic analysis of recently diverged taxa and for identifying calliphorid species was the occurrence of variable regions interspersed between CSBs.

Although the variable domain varied markedly in length, some conserved features were identified. The occurrence of duplicated tRNAs in the same region of the genome in five species of *Chrysomya* and in *Phormia regina* and *Calliphora dubia*, and the presence of large tandem duplications suggest that the variable domain may be a hot spot for evolutionary changes in organization. In addition, according to molecular and morphological phylogenies (Rognes, 1997; Wells and Sperling, 2001; Harvey et al., 2003) along with the two kinds of duplication with the same pattern identified, the duplication may be indicative of convergence. The finding that only duplicated genes were conserved and remained identical to the original genes whereas the regions flanking the duplicated fragment were degenerated suggests that the duplicated copies may be under concerted evolution.

The hypervariability in the length and content of the variable domain precludes its use in phylogenetic analyses, although this region is a potentially useful marker for studying population structure. In future work, it would be interesting to determine whether the replicated fragments that show high similarity in the two *Calliphora* species examined here also occur in other *Calliphora* species since this could provide insights into the origin and evolution of the CR. Finally, additional characterization of the conserved regions in the CR could be useful for designing primers similar to CR-B-VII and CR-B-VII-R that would improve access to this region of mtDNA in calliphorids and other dipterans.

Acknowledgements

The authors thanks Rosângela A. Rodrigues for technical assistance; Arício X. Linhares for taxonomic identifications of collected specimens and for providing specimens of *H. segmentaria*; Bernard Greenberg for providing specimens of *C. rufifacies* from USA; Michelle L. Harvey for the specimens of *C. megacephala*, *C. rufifacies* and *Ca. dubia* from Australia; Carole Ames for the specimens of *Ca. vomitoria* from England; Rod Mahon for the specimens of *C. bezziana* from Malaysia; Bernard Chauvet for the specimens of *L. sericata* from France; Élvia E. S. Vianna for the specimens of *L. eximia* and *H. flavifacies* from R. Grande do Sul, Brazil; and Jeffrey D. Wells for the *P. regina* specimens from USA. This work was supported by CNPq (grant no. 133982/2005-0 to G.T.D. and grant no. 480818/2004-5) and FAPESP (grant no. 03/05444-2 to A.C.M.J. and grant no. 05/57680-7 to A.M.L.A.E).

References

- Amendt J, Krettek R, and Zehner R. (2004) Forensic entomology. *Naturwissenschaften* 91:51-65.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, and Saunders NC. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.
- Azeredo-Espin AML, and Lessinger AC. (2006) Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genetica* 126:111-131.

- Baker RH, Wilkinson GS, and DeSalle, R. (2001) Phylogenetic utility of different types of molecular data used to infer evolutionary relationships among stalked-eyes flies (Diopsidae). *Syst. Biol.* 50:87-105.
- Baumgartner DL, and Greenberg B. (1984) The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *J. Med. Entomol.* 21:105-113.
- Boore JL. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:1767-1780.
- Brehm A, Harris DJ, Hernández M, Cabrera VM, Larruga JM, Pinto FM, and González AM. (2001) Structure and evolution of the mitochondrial DNA complete control region in the *Drosophila subobscura* subgroup. *Insect Mol. Biol.* 10:573-578.
- Carrodeguas JA, and Vallejo CG. (1997) Mitochondrial transcription initiation in the crustacean *Artemia franciscana*. *Eur. J. Biochem.* 250:514-523.
- Caterino MS, Cho S, and Sperling FAH. (2000) The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.* 45:1-54.
- Chen W-Y, Hung T-H, and Shiao S-F. (2004) Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *J. Med. Entomol.* 41:47-57.
- Clary DO, and Wolstenholme DR. (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22:252-271.
- Clary DO, and Wolstenholme DR. (1987) *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequences in the A + T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small RNA. *J. Mol. Evol.* 25:116-125.

- Covacin C, Shao R, Cameron S, and Barker SC. (2006) Extraordinary number of gene rearrangements in the mitochondrial genomes of lice (Phthiraptera: Insecta). *Insect Mol. Biol.* 15:63-68.
- Figarola JL, Skoka SR, Berkebile DR, and Foster JE. (2001). Identification of screwworms, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae), with a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (MAb-ELISA). *Vet. Parasitol.* 102:341-354.
- Flook PK, Klee S, and Rowell CHF. (1999) Combined molecular phylogenetic analysis of Ortoptera (Arthropoda, Insecta) and implications for their higher systematics. *Syst. Biol.* 48:233-253.
- Froufe E, Knizhin I, and Weiss S. (2005) Phylogenetic analysis of the genus *Thymallus* (grayling) based on mtDNA control region and ATPase 6 genes, with inferences on control region constraints and broad-scale Eurasian phylogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34:406-117.
- Goddard JM, and Wolstenholme DR. (1980) Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from the genus *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 25:741-757.
- Hall M, and Wall R. (1995) Myiasis of human and domestic-animals. *Adv. Parasitol.* 35:257-334.
- Hall MJR, Edge W, Testa, JM, Adams ZJO, and Ready PD. (2001) Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, occurs as two geographical races. *Med. Vet. Entomol.* 15:393-402.

- Harvey ML, Mansell MW, Villet MH, and Dadour R. (2003) Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Med. Vet. Entomol.* 17:363-369.
- Infante Vargas ME, and Azeredo-Espin AML. (1995) Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochem. Genet.* 33:237-256.
- Inohira K, Hara T, and Matsuura ET. (1997) Nucleotide sequence divergence in the A+T-rich region of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*. *Mol. Biol. Evol.* 14:814-822.
- Jermiin LS, Graur D, Lowe RM, and Crozier RH. (1994) Analysis of directional mutation pressure and nucleotide content in mitochondrial cytochrome b genes. *J. Mol. Evol.* 39:190-173.
- Junier T, and Pagni M. (2000) Dotlet: diagonal plotting in a Web browser. *Bioinfo. Appl. Note* 16:178-179.
- Junqueira ACM, Lessinger AC, and Azeredo-Espin AML. (2002) Methods for recovery of mtDNA sequence from museum specimens of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 16:39-45.
- Junqueira ACM, Lessinger AC, Torres TT, da Silva FR, Vettore AL, Arruda P, and Azeredo-Espin AML. (2004). The mitochondrial genome of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphoridae). *Gene* 339:7-15.
- Kumar S, Tamura K, and Nei M. (2004) *MEGA 3*: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5:150-163.

- Lessinger AC, and Azeredo-Espin AML. (2000) Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 14:1-10.
- Lessinger AC, Junqueira ACM, Lemos TA, Kemper EL, da Silva FR, Vettore AL, Arruda P, and Azeredo-Espin AML. (2000) The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Mol. Biol.* 9:521-529.
- Lessinger AC, Junqueira ACM, Conte FF, and Azeredo-Espin AML. (2004) Analysis of a conserved duplicated tRNA gene in the mitochondrial genome of blowflies. *Gene* 339:1-6.
- Lewis DL, Farr CL, Farquhar AL, and Kaguni LS. (1994) Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 11:523-538.
- Litjens P, Lessinger AC, and Azeredo-Espin, AML. (2001) Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Med Vet. Entomol.* 15:183-188.
- Lowe TM, and Eddy SR. (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 25:955-964.
- Lunt DH, and Hymann BC. (1997) Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* 387:247.
- Lyra ML, Fresia P, Gama S, Cristina J, Klaczko LB, Azeredo-Espin AML. (2005) Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *J. Med. Entomol.* 42:589-595.

- Macey JR, Larson A, Ananjeva NB, Fang Z, and Papenfuss TJ. (1997) Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.* 14:91-104.
- Mardulyn P, Termonia A, and Milinkovitch MC. (2003) Structure and evolution of the mitochondrial control region of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae): a hierarchical analysis of nucleotide sequence variation. *J. Mol. Evol.* 56:38-45.
- Moore WS. (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49:718-726.
- Moritz C, Dowling TE, and Brown WM. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292.
- Oliveira MT, da Rosa AC, Azeredo-Espin AML, and Lessinger AC. (2006) Improving access to the control region and tRNA gene clusters of dipteran mitochondrial DNA. *J. Med. Entomol.* 43:636-639.
- Pääbo S, Higgs RG, and Wilson AC. (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 264:9709-9712.
- Parson W, Brandstätter A, Alonso A, et al. (23 co-authors). (2004) The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organization, results and perspectives. *Forensic Sci. Int.* 139:215-226.
- Rognes K. (1997) The Calliphoridae (blowflies) (Diptera: Oestroidea) are not a monophyletic group. *Cladistics* 13:27-68.
- Rokas A, Ladoukakis E, and Zouros E. (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol. Evol.* 18:411-417.

- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messegyer X, and Rozas R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Saito S, Tamura K, and Aotsuka T. (2005) Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics* 171:1685-1705.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. (1989) Preparation and transformation of competent *E. coli*. In: Sambrook, J. Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America. pp.1.82-1.84.
- Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, and Pueschel K. (2003) Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Sci. Int.* 132:76-81.
- Schultheis AS, Weigt LA, and Hendricks AC. (2002) Arrangement and structural conservation on the mitochondrial control region of two species of Plecoptera: utility of tandem repeat-containing regions in studies of population genetics and evolutionary history. *Insect Mol. Biol.* 11:605-610.
- Shadel GS, and Clayton DA. (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66:409-435.
- Shao R, and Barker, SC. (2003) The highly rearranged mitochondrial genome of the plague thrips, *Thrips imaginis* (Insecta: Thysanoptera): convergence of two novel gene boundaries and an extraordinary arrangement of rRNA genes. *Mol. Biol. Evol.* 20:362-370.
- Shao R, Mitani H, Barker SC, Takahashi M, Fukunaga M. (2005) Novel mitochondrial gene content and gene arrangement indicate illegitimate inter-mtDNA

- recombination in the chigger mite, *Leptotrobidium pallidum*. J. Mol Evol. 60:764-773.
- Simon C, Frati F, Bechenbach A, Crespi B, Liu H, and Flook P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87:651-701.
- Stevens J, and Wall R. (1997) Genetic variation in populations of blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. Biochem. Syst. Ecol. 25:81-97.
- Tang Q, Liu H, Mayden R, and Xiong B. (2006) Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). Mol. Phylogenet. Evol. 39:347-357.
- Tantawi TI, and Greenberg B. (1993) *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae): contribution to an ongoing taxonomic problem. J. Med. Entomol. 30:646-648.
- Taylor MFJ, McKechnie SW, Pierce N, and Kreitman, M. (1993) The lepidopteran control region: structure and evolution. Mol. Biol. Evol. 10:1259-1272.
- Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.
- Tsukamoto Y, and Ikeda H. (1998) Double-strand break repair mediated by DNA end-joining. Genes Cells 3:135-144.

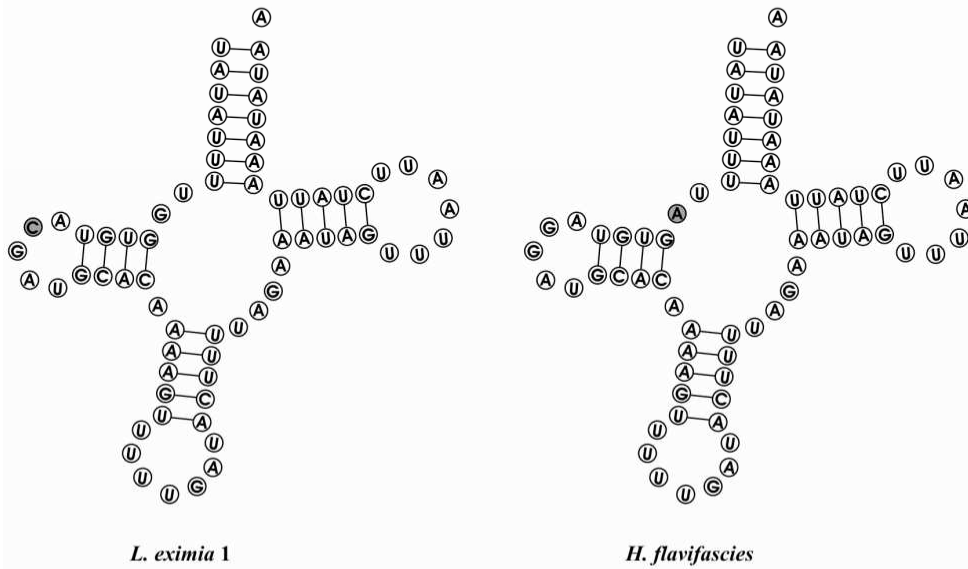
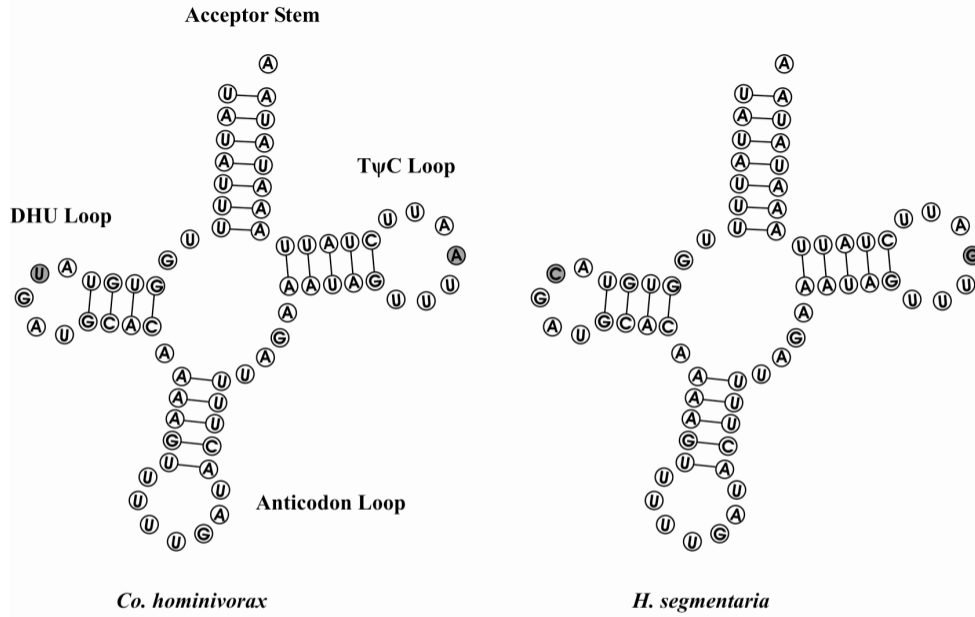
- Vila M, and Björklund M. (2004) The utility of the neglected mitochondrial control region for evolutionary studies in Lepidoptera (Insecta). *J. Mol. Evol.* 58:280-290.
- Wells JD, Sperling FAH. (2001) DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci. Int.* 120:110-115.
- Zhang D-X, and Hewitt GM. (1997) Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem. Syst. Ecol.* 25:99-120.
- Zhang D-X, Szymura JM, and Hewitt GM. (1995) Evolution, and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 40:382-391.
- Zucker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31:3406-3415.
- Zumpt F. (1965). *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. Butterworths, London.

Supplementary Table 1. Organization of tRNA gene clusters in calliphorid flies.

Species	<i>tRNA^{Met}/tRNA^{Gln}</i>	Size (bp)	<i>tRNA^{Gln}/tRNA^{Ile}</i>	Size (bp)
<i>Chrysomya albiceps</i>	Overlap	1	IR	2
<i>Chrysomya bezziana</i>	IR	7	IR	4
<i>Chrysomya megacephala</i>	IR	8	IR	4
<i>Chrysomya putoria</i>	IR	5	-	-
<i>Chrysomya rufifacies</i>	Overlap	1	Overlap	3
<i>Calliphora dubia</i>	IR	8	Overlap	3
<i>Calliphora vomitoria</i>	IR	9	Overlap	3
<i>Chloroprocta idioidea</i>	Overlap	1	Overlap	3
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	IR	16	IR	13
<i>Hemilucilia flavifascies</i>	Overlap	1	Overlap	3
<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	Overlap	1	Overlap	3
<i>Lucilia eximia</i>	IR	7	Overlap	3
<i>Lucilia sericata</i>	IR	5	Overlap	3
<i>Phormia regina</i>	IR	4	IR	7

Note. (IR) indicates intergenic region.

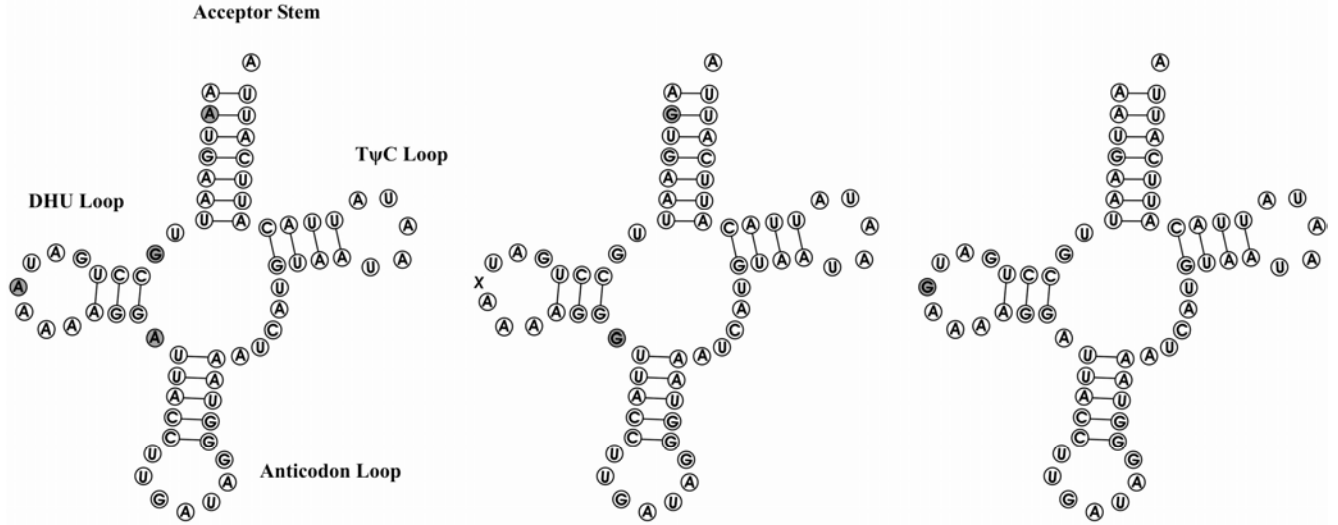
A



<i>Co. hominivorax</i>	TATATTTTGG	TGTA	TGATGC	ACAAAAGTTT	TTGATAC	TTT	TAGAAATAGT	TTAATTCTAT	TAAATATAA
<i>H. segmentaria</i>C.....G.....
<i>L. eximia 1</i>C.....
<i>L. eximia 2</i>
<i>H. flavifascies</i>A.....
<i>P. regina 1 - Gln 1</i>
<i>P. regina 1 - Gln 2</i>

Supplementary Figure 1. Alignments and variations in the secondary structures of *tRNA^{Gln}* (Panel A) and *tRNA^{Gln}* (Panel B) in calliphorid flies. For species that possess gene duplication, the gene copy from the tRNA cluster is denoted as 1, and the duplicated copy as 2. The species *Cochliomyia hominivorax* was used as a model for the comparisons. The shaded sites indicate the position of mutations in other calliphorid species. Note the occurrence of substitutions at the same site in different species, indicating that these sites may be more susceptible to mutation. Also notice in species with duplicated genes the presence of substitution at the same site in both tRNAs copies, suggesting concerted evolution. Species followed by a number designates different specimens. The X in the *Hemilucilia segmentaria tRNA^{Gln}* structure in panel B represents a deletion.

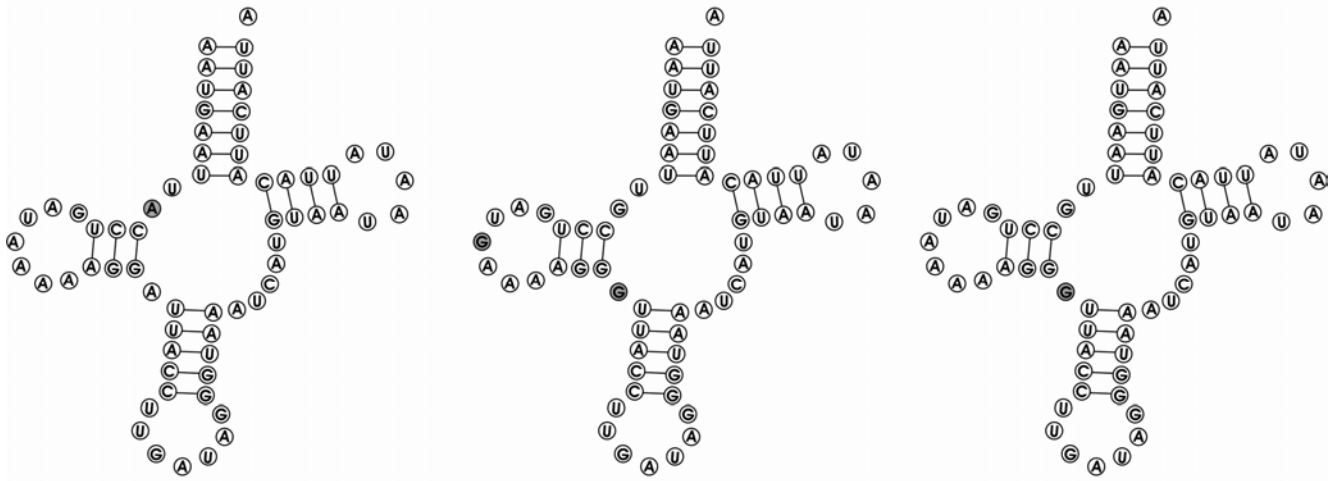
B



Co. hominivorax

H. segmentaria

Ch. idioidea



P. regina

C. megacephala

C. rufifacies

<i>Co. hominivorax</i> - Ile	TAATGAATGT	AATATTATTA	CATGATTTAC	CCTATCAAGG	TAATCCTTTT	TATCAGGCAA	TTCATT
<i>Ca. dubia</i> - Ile 1
<i>Ca. dubia</i> - Ile 2
<i>C. albiceps</i> - Ile 1
<i>C. albiceps</i> - Ile 2
<i>C. bezziana</i> - Ile 1
<i>C. bezziana</i> - Ile 2
<i>C. megacephala</i> - Ile 1	C	C
<i>C. megacephala</i> - Ile 2	C	C
<i>C. rufifacies</i> - Ile 1	C
<i>C. rufifacies</i> - Ile 2	C
<i>P. regina</i> 1 - Ile 1
<i>P. regina</i> 1 - Ile 2
<i>P. regina</i> 2 - Ile 2	T
<i>H. segmentaria</i>	C	C
<i>Ch. idioidea</i>	C

Referências Bibliográficas

- Amendt J, Krettek R, and Zehner R. (2004) Forensic entomology. *Naturwissenschaften* 91:51-65.
- Ames C, and Turner B. (2003) Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. *Med. Vet. Entomol.* 17:178-186.
- Ames C, Turner B, and Daniel B. (2006). The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species – *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*. *For. Sci. Int.* 164:179-182.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, and Saunders NC. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.
- Azeredo-Espin AML, and Lessinger AC. (2006) Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genetica* 126:111-131.
- Baker RH, and DeSalle R. (1997) Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. *Syst. Biol.* 46:654-673.
- Baker RH, Wilkinson GS, and DeSalle, R. (2001) Phylogenetic utility of different types of molecular data used to infer evolutionary relationships among stalked-eyes flies (Diopsidae). *Syst. Biol.* 50:87-105.
- Baumgartner DL, and Greenberg B. (1984) The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *J. Med. Entomol.* 21:105-113.
- Behura SK. (2006) Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Mol. Ecol.* 15:3087-3113.
- Boore JL. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:1767-1780.
- Brehm A, Harris DJ, Hernández M, Cabrera VM, Larruga JM, Pinto FM, and González AM. (2001) Structure and evolution of the mitochondrial DNA complete control region in the *Drosophila subobscura* subgroup. *Insect Mol. Biol.* 10:573-578.
- Cao Y, Adachi J, Janke A, Paabo S, Hasegawa M. (1994) Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: instability of a tree based on a single gene. *J. Mol. Evol.* 39: 519-527.

- Carrodeguas JA, and Vallejo CG. (1997) Mitochondrial transcription initiation in the crustacean *Artemia franciscana*. *Eur. J. Biochem.* 250:514-523.
- Carvalho RA, Torres TT, and Azeredo-Espin AML. (2006). A survey of mutations in the *Cochliomyia hominivoraxi* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and the molecular identification of mutant alleles. *Vet. Parasitol.* 140:344-351.
- Caterino MS, Cho S, and Sperling FAH. (2000) The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.* 45:1-54.
- Ceccatti JS. (2004) Resisting insects: shifting strategies in chemical control. *Endeavour* 28:14-19.
- Chen W-Y, Hung T-H, and Shiao S-F. (2004) Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *J. Med. Entomol.* 41:47-57.
- Clary DO, and Wolstenholme DR. (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22:252-271.
- Clary DO, and Wolstenholme DR. (1987) *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequences in the A + T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small RNA. *J. Mol. Evol.* 25:116-125.
- Covacin C, Shao R, Cameron S, and Barker SC. (2006) Extraordinary number of gene rearrangements in the mitochondrial genomes of lice (Phthiraptera: Insecta). *Insect Mol. Biol.* 15:63-68.
- Danforth BN, Fang J, and Sipes S. (2006) Analysis of family-level relationships in bees (Hymenoptera: Apiformes) using 28S and two previously unexplored nuclear genes: CAD and RNA polymerase II. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39:358-372.
- De Souza AM, and Linhares AX. (1997) Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Med.Vet. Entomol.* 11:8-12.
- Diniz FM, Maclean N, Ogawa M, Cintra IHA, and Bentzen P. (2005) The hypervariable domain of the mitochondrial control region in Atlantic spiny lobsters and its

- potential as a marker for investigating phylogeographic structure. *Mar. Biotechnol.* 7:462-473.
- Flook PK, Klee S, and Rowell CHF. (1999) Combined molecular phylogenetic analysis of Orthoptera (Arthropoda, Insecta) and implications for their higher systematics. *Syst. Biol.* 48:233-253.
- Froufe E, Knizhin I, and Weiss S. (2005) Phylogenetic analysis of the genus *Thymallus* (grayling) based on mtDNA control region and ATPase 6 genes, with inferences on control region constraints and broad-scale Eurasian phylogeography. *Mol. Phylogenet. and Evol.* 34:406-117.
- Goddard JM, and Wolstenholme DR. (1980) Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from the genus *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 25:741-757.
- Gongora J, Morales S, Bernal JE, and Moran C. (2006) Phylogenetic divisions among Collorad peccaries (*Pecari tajacu*) detected using mitochondrial and nuclear sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 41:1-11.
- Guimarães JH, Prado AP, and Linhares AX. (1978) Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol* 22:53-60.
- Guimarães JH, Prado AP, and Buralli GM. (1979) Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineu-Desvoidy in Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol*, 23:245-255.
- Hall M, and Wall R. (1995) Myiasis of human and domestic-animals. *Adv. Parasitol.* 35:257-334.
- Hall MJR, Edge W, Testa, JM, Adams ZJO, and Ready PD. (2001) Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, occurs as two geographical races. *Med. Vet. Entomol.* 15:393-402.
- Harvey ML, Mansell MW, Villet MH, and Dadour R. (2003) Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Med. Vet. Entomol.* 17:363-369.
- Herbert PDN, Cywinska A, Ball SL, and deWaard JR. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270:313-321.

- Holder M, and Lewis OP. (2003) Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nat Rev Genet* 4:275-284.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, *et al.* (119 co-authors). (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298:129-149.
- Imbiriba AS, Izutami DT, Milhoretto IT, and Luz E. (1977) Introdução de *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical. *Arq. Biol. Tecnol.*, 20:35-39.
- Infante-Malachias ME, Yotoko KSC, and Azeredo-Espin AML. (1999) Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil and Northern Argentina. *Genome* 42:772-779.
- Infante Vargas ME, and Azeredo-Espin AML. (1995) Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochem. Genet.* 33:237-256.
- Inohira K, Hara T, and Matsuura ET. (1997) Nucleotide sequence divergence in the A+T-rich region of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*. *Mol. Biol. Evol.* 14:814-822.
- Jermiin LS, Graur D, Lowe RM, and Crozier RH. (1994) Analysis of directional mutation pressure and nucleotide content in mitochondrial cytochrome b genes. *J. Mol. Evol* 39:190-173.
- Jirón, L. F. (1979). Sobre moscas califóridas de Costa Rica (Diptera: Cyclorrhapha). *Brenesia*, 16:221-222.
- Junier T, and Pagni M. (2000) Dotlet: diagonal plotting in a Web browser. *Bioinfo. Appl. Note* 16:178-179.
- Junqueira ACM. (2002) Utilização do aDNA para estudos genético-evolutivos relacionados a introdução e dispersão de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Junqueira ACM, Lessinger AC, and Azeredo-Espin AML. (2002) Methods for recovery of mtDNA sequence from museum specimens of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 16:39-45.

- Junqueira ACM, Lessinger AC, Torres TT, da Silva FR, Vettore AL, Arruda P, and Azeredo-Espin AML. (2004). The mitochondrial genome of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphoridae). *Gene* 339:7-15.
- Kouba V. (2004) History of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) eradication in the Eastern Hemisphere. *Historia Medicinae Veterinariae* 29:43-53.
- Kumar S, Tamura K, and Nei M. (2004) *MEGA 3* Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5:150-163.
- Laurence BR. (1986) Old World blowflies in the New World. *Parasitology Today* 2: 77-79.
- Lessinger AC, and Azeredo-Espin AML. (2000) Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 14:1-10.
- Lessinger AC, Junqueira ACM, Lemos TA, Kemper EL, da Silva FR, Vettore AL, Arruda P, and Azeredo-Espin AML. (2000) The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Mol. Biol.* 9:521-529.
- Lessinger AC, Junqueira ACM, Conte FF, and Azeredo-Espin AML. (2004) Analysis of a conserved duplicated tRNA gene in the mitochondrial genome of blowflies. *Gene* 339:1-6.
- Lewis DL, Farr CL, Farquhar AL, and Kaguni LS. (1994) Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 11:523-538.
- Linhares AX. (1981) Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Ent.* 25:189-215.
- Litjens P, Lessinger AC, and Azeredo-Espin, AML. (2001) Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Med Vet. Entomol.* 15:183-188.
- Lowe TM, and Eddy SR. (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25:955-964.
- Lunt DH, and Hymann BC. (1997) Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* 387:247.

- Lyra ML, Fresia P, Gama S, Cristina J, Klaczko LB, Azeredo-Espin AML. (2005) Analysis of Mitochondrial DNA Variability and Genetic Structure in Populations of New World Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *J. Med. Entomol.* 42:589-595.
- Macey JR, Larson A, Ananjeva NB, Fang Z, and Papenfuss TJ. (1997) Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.* 14:91-104.
- Maddison, D. R. and K.-S. Schulz (eds.) 1996-2006. The Tree of Life Web Project. Internet address: <http://tolweb.org>
- Mardulyn P, Termonia A, and Milinkovitch MC. (2003) Structure and evolution of the mitochondrial control region of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae): a hierarchical analysis of nucleotide sequence variation. *J. Mol. Evol.* 56:38-45.
- Moore WS. (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49:718-726.
- Moritz C, Dowling TE, and Brown WM. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292.
- Moritz C, and Cicero, D. (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *PloS Biol* 2:e354.
- Ojala D, Montoya J, and Attardi G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290:470-474.
- Oliveira MT. (2006) Estrutura e evolução do genoma mitocondrial na família Muscidae (Diptera: Calyptratae). Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Oliveira MT, da Rosa AC, Azeredo-Espin AML, and Lessinger AC. (2006) Improving access to the control region and tRNA gene clusters of Dipteran mitochondrial DNA. *J. Med. Entomol.* 43:636-639.
- Oliveira-Costa, J. (2003). Padrão de Sucessão no Brasil. *In: Oliveira-Costa, J., Entomologia Forense – Quando os insetos são vestígios. Primeira edição. Millennium Editora Ltda, Brasil. Pp. 125-135.*
- Otranto D, and Stevens JR. (2002) Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int. J. Parasitol.* 32:1345-1360.

- Pääbo S, Higgs RG, and Wilson AC. (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 264:9709-9712.
- Page, R. D. M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.
- Parson W, Brandstätter A, Alonso A, et al. (23 co-authors). (2004) The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organization, results and perspectives. *Forensic Sci. Int.* 139:215-226.
- Prins AJ. (1979) Discovery of the oriental latrine fly *Chrysomya megacephala* (Fabricius) along the south-western coast South Africa. *So. Afr. Mus. Ann.* 78: 39-47.
- Rognes K. (1997) The Calliphoridae (blowflies) (Diptera: Oestroidea) are not a monophyletic group. *Cladistics* 13:27-68.
- Rokas A, Ladoukakis E, and Zouros E. (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol. Evol.* 18:411-417.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messegyer X, and Rozas R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Saito S, Tamura K, and Aotsuka T. (2005) Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics* 171:1685-1705.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. (1989) Preparation and Transformation of Competent *E. coli*. In: Sambrook, J. Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America. Pp.1.82-1.84.
- Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, and Püeschel K. (2003) Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Sci. Int.* 132:76-81.
- Schultheis AS, Weigt LA, and Hendricks AC. (2002) Arrangement and structural conservation on the mitochondrial control region of two species of Plecoptera: utility of tandem repeat-containing regions in studies of population genetics and evolutionary history. *Insect Mol. Biol.* 11:605-610.
- Shadel GS, and Clayton DA. (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66:409-435.

- Shao R, and Barker, SC. (2003) The highly rearranged mitochondrial genome of the plague thrips, *Thrips imaginis* (Insecta: Thysanoptera): convergence of two novel gene boundaries and an extraordinary arrangement of rRNA genes. *Mol. Biol. Evol.* 20:362-370.
- Shao R, Mitani H, Barker SC, Takahashi M, Fukunaga M. (2005) Novel Mitochondrial gene content and gene arrangement indicate illegitimate inter-mtDNA recombination in the chigger mite, *Leptotrobium pallidum*. *J. Mol Evol.* 60:764-773.
- Simon C, Frati F, Bechenbach A, Crespi B, Liu H, and Flook P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87:651-701.
- Stevens J, and Wall R. (1997) Genetic variation in populations of blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random Amplified Polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. *Biochem. Syst. and Ecol.* 25:81-97.
- Stevens JR, Wall R, and Wells JD. (2002) Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Mol. Biol.* 11:141-148.
- Stevens JR. (2003) The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). *Int. J. Parasitol.* 33:1105-1113.
- Stevens JR, Wallman JF, Otranto D, Wall R, and Pape T. (2006) The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part II): biological and life-history studies. *Trends Parasitol.* 22:181-188.
- Swafford DL, 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tang Q, Liu H, Mayden R, and Xiong B. (2006) Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39:347-357.

- Tantawi TI, and Greenberg B. (1993) *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae): Contribution to an ongoing taxonomic problem. J. Med. Entomol. 30:646-648.
- Taylor MFJ, McKechnie SW, Pierce N, and Kreitman, M. (1993) The lepidopteran control region: structure and evolution. Mol. Biol. Evol. 10:1259-1272.
- Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.
- Torres TT, Brondani RVP, Garcia E, and Azeredo-Espin AML. (2004) Isolation and characterization of microsatellite markers in the new-world screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Mol. Ecol. Notes 4:182-184.
- Tsukamoto Y, and Ikeda H. (1998) Double-strand break repair mediated by DNA end-joining. Genes Cells 3:135-144.
- Vianna EES, Costa PRP, Fernandes AL, and Ribeiro PB. (2004) Abundância e flutuação populacional das espécies de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre 94:231-234.
- Vila M, and Björklund M. (2004) The utility of the neglected mitochondrial control region for evolutionary studies in Lepidoptera (Insecta). J. Mol. Evol. 58:280-290.
- Wallman JF, Leys R, and Hogendoorn K. (2005) Molecular systematics of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. Inv. Syst. 19:1-15.
- Wells JD, and Sperling FAH. (1999) Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomol. 36:222-226.
- Wells JD, Sperling FAH. (2001) DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). Forensic Sci. Int. 120:110-115.
- Wells JD, Lunt N, and Villet MH. (2004) Recent African derivation of *Chrysomya putoria* from *C. chloropyga* and mitochondrial DNA paraphyly of cytochrome oxidase subunit one in blowflies of forensic importance. Med. Vet. Entomol. 18:445-448.
- Wiegmann BM, Yeates DK, Thorne JL, and Kishino H. (2003) Time flies, a new molecular time-scale for brachyceran fly evolution without a clock. Syst. Biol. 52:745-756.

- Wyss JH. 2000. Screwworm Eradication in the Americas. *Ann. NY Acad. Sci.* 791:241-247.
- Yeates DK, and Wiegmann BM. (1999) Congruence and controversy: toward a higher-level phylogeny of Diptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44:397-428.
- Zhang D-X, Szymura JM, and Hewitt GM. (1995) Evolution, and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 40:382-391.
- Zhang D-X, and Hewitt GM. (1997) Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem. Syst. Ecol.* 25: 99-120.
- Zucker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31:3406-3415.
- Zumpt F. (1965). *Myiasis in Man and Animals in the Old World.* Butterworths, London.

DECLARAÇÃO

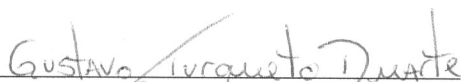
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de mestrado intitulada Caracterização da região controle do genoma mitocondrial em espécies da família Calliphoridae (Insecta: Diptera) e perspectivas filogenéticas:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

(X) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº 16/2003).

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos


Gustavo Turquetto Duarte - Aluno


Ana Maria Lima de Azeredo-Espin - Orientadora

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Nome:
Função: