

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

**BC/8687**  
**IB/80147**

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

*1987*

Ana Maria Lima de Azeredo - Espin

**ANÁLISE CARIOTÍPICA, MORFOMÉTRICA E DE COMPATIBILIDADE SEXUAL, EM LINHAGENS  
BRASILEIRAS DE Cochliomyia hominivorax, (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas para a obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.  
Área: Genética Animal

**ORIENTADOR: Crodowaldo Pavan**



**Campinas  
Estado de São Paulo - Brasil  
1987**

Classif.	T
	A22Aa
	Bc/ 8687
	JB/239

1B/ 80147  
Bc/ 8887

Ao Neto e Marina,

essenciais para minha vida,  
mostrando-me continuamente  
o valor das emoções.

Aos meus pais,

início da trajetória,  
ensinando-me a enfrentar os  
desafios da vida.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Crodowaldo Pavan, fundamental para minha formação científica, iniciando-me profissionalmente. De quem nestes anos recebi estímulo, apoio, compreensão, não só de um grande idealista mas principalmente de um grande amigo.

Ao Prof. Dr. William José da Silva, pelo interesse, estímulo durante a convivência sempre agradável no Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP e pelas valiosas sugestões oferecidas durante leitura da tese.

Ao Prof. Dr. Ademir Petenate, do Departamento de Estatística do IMECC, pela sua inestimável dedicação e colaboração na realização das análises estatísticas realizadas nesta tese.

Ao Prof. Dr. Angelo Pires do Prado, pelas sugestões e discussões significativas sobre a análise morfométrica efetuadas e pela leitura da tese.

Ao Prof. Dr. André Luiz Paranhos Perondini, pelo estímulo e pelas importantes sugestões apresentadas durante a leitura minuciosa da tese.

Ao Prof. Dr. Alejo Mesa Larvambebere, pela leitura da tese e pelos comentários e sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Walter Pinto Júnior pela leitura da tese e sugestões apresentadas. Agradeço também a gentileza e espírito de colaboração com que durante este trabalho atendeu as minhas solicitações de empréstimos de quinacrina mostarda, utilizadas nas preparações cromossômicas pela técnica de banda Q.

Ao colega e Prof. Dr. Octavio Henrique Pavan, cujo apoio e amizade foram muito importantes em vários momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega Gerson Augusto Ribeiro Silveira, cuja criatividade e dedicação profissional foram essenciais para otimizar a criação de Cochliomyia hominivorax no laboratório. Pelo grande auxílio na coleta desta espécie no campo, e principalmente pelo incentivo e amizade que foram essenciais em momentos decisivos do desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega Newton Goulart Madeira pelo incentivo e auxílio na coleta de material no campo.

A Marta, Francisco e Eduardo, que sempre tentaram compreender as abnegações da irmã, pelas críticas positivas e estímulos que sempre foram muito importantes na minha vida.

Ao Neto, companheiro de todas as etapas deste trabalho c  
dedicação e apoio foram determinantes para a realização desta tese.

A Rosangela Aparecida Rodriguez, técnica do nosso labora  
rio, pela sua dedicação paciente, e valioso auxílio nas preparaç  
das lâminas e microfotograficas da tese.

A Maria Salete do Couto, pelo cuidado zeloso na manuten  
da criação de C. hominivorax que foram essenciais para a execução d  
te trabalho.

Ao Mario Constantino Filho pelo auxílio nas coletas de ma  
terial no campo.

A Nair Lydia Salmi pelo auxílio na datilografia do man  
crito e pela sua prestatividade durante a execução desta tese,  
criação de C. hominivorax.

A Maria Tereza de Paula, pelo carinho dedicaçãoe auxílio  
confeccão das fotomicrografias finais deste trabalho.

A Marcia T.A. Camargo, Renata S. Barbosa Maia e Luzia Gc  
çalves de Aguiar, pela disposição e prestatividade com que compreend  
ram as árduas solicitações durante a etapa de datilografia da Tese  
pelo trabalho de impressão.

Ao José Roberto da Silva e Hélio Antônio pelo capricho dedicação com que realizaram as cópias xerográficas da tese e servi de encardenação.

Ao Wanderlei Fahré, pela eficiência com que, a partir d rascunhos, realizou os esquemas e desenhos deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Genética e Evolução, que p la convivencia diária sempre propiciaram apoio as dificuldades enfre tadas.

Aos amigos que direta ou indiretamente contribuíram pa realização deste trabalho.

A Universidade Estadual de Campinas, local onde foi real zado o trabalho.

A Dra. Evani Viegas-Pequignot do Commissariat à l'Énerg Atomique, Laboratoire de Mutagenese, Département de Protection de Par France, pelo estímulo, interesse e sugestões metodológicas com relaç às preparações cromossômicas efetuadas neste trabalho.

Agradeço as entidades responsáveis pelo suporte financei para a realização deste trabalho, sem o qual a pesquisa não poder ser realizada: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPQ, PIG), à FINEP e FINEP.



O sentido da vida.  
está no momento!  
O santo não é santo,  
senão no momento,  
o gênio cria,  
no momento,  
o poeta canta,  
no momento,  
o homem é bom ou mau,  
no momento,  
abafando a multidão  
de horas descoloridas,  
que não fazem biografia!

Almiro Pinto de Azeredo, 1966

# I N D I C E

Páginas

I-	INTRODUÇÃO.....	1
	1. Dados Cariotípicos .....	1
	2. Banda Q .....	11
	2.1. Métodos de bandamento Q .....	12
	3. Análise Morfométrica .....	24
II-	OBJETIVOS .....	35
III-	MATERIAL E MÉTODOS .....	37
	1. Material .....	37
	2. Métodos .....	38
	2.1. Obtenção de <i>Cochliomyia hominivorax</i> .....	38
	3. Métodos de criação no Laboratório .....	38
	3.1. Criação de larvas de <i>C. hominivorax</i> .....	39
	3.2. Manutenção de adultos das diferentes linhagens de <i>C. hominivorax</i> .....	40
	3.3. Obtenção de ovos de <i>C. hominivorax</i> .....	41
	3.4. Cruzamento entre as diferentes linhagens de <i>C. hominivorax</i> .....	42
	4. Preparações citológicas .....	44
	4.1. Análise morfométrica dos cromossomos .....	46
	4.2. Método de bandamento Q .....	46
	5. Análise morfométrica .....	48

IV-	RESULTADOS .....	55
	1. Cariótipo das diferentes linhagens de	
	<i>C. hominivorax</i> .....	55
	2. Cariótipos dos híbridos F1 resultantes dos cruza-	
	mentos entre as diferentes linhagens de	
	<i>C. hominivorax</i> .....	61
	3. Banda Q .....	64
	3.1. Padrão de bandamento Q das diferentes linha-	
	gens de <i>C. hominivorax</i> .....	64
	3.2. Padrão de banda Q dos híbridos dos cruzamen-	
	tos entre as linhagens .....	69
	3.3. Padrão de banda Q de <i>Cochliomyia macellaria</i> .	73
	4. Cruzamento entre as diferentes linhagens .....	74
	5. Análise morfométrica .....	78
	5.1. Análise das variáveis originais .....	79
	5.2. Análise discriminante das variáveis	
	originais .....	82
	5.3. Análise das relações .....	84
	5.3.1. Análise de variância .....	84
	5.3.2. Análise discriminante .....	86
V-	ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS .....	90
VI-	DISCUSSÃO .....	100
VII-	CONCLUSÕES .....	113

VIII-	SUMARIO .....	118
IX-	SUMMARY .....	121
X-	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	124

# I - INTRODUÇÃO

## 1.1. Dados Cariotípicos

A ordem Diptera constitui-se num exemplo de grande grupo taxonômico caracterizado por um pequeno número de cromossomos (WHITE, 1973). O número diplóide ( $2n$ ) de cromossomos nesta ordem de insetos, varia de 4 a 12, prevalecendo os de número 6 a 8. A família Calliphoridae é caracterizada por apresentar um número de cromossomos uniforme, isto é,  $2n = 12$ , embora sejam relativamente comuns, variações no tamanho e forma dos cromossomos, tanto intra quanto interespecificamente (BOYES, 1961; BOYES & van BRINK, 1965; BOYES & SHEWELL, 1975).

As principais características comumente utilizadas na descrição e comparação dos cromossomos metafásicos em células de indivíduos de diferentes espécies, ou de indivíduos da mesma espécie são: a. o número de cromossomos; b. a porcentagem que cada par de homólogos representa em relação ao comprimento total dos cromossomos do cariótipo; c. o número, tamanho e posição das constricções secundária e de satélites; d. as diferenças de comprimento entre genomas diferentes; e. a posição, o número e a distribuição de segmentos heterocromáticos condensados ou corados diferencialmente (BOYES & van BRINK, 1965; JACKSON, 1971).

Embora em um cromossomo o mais importante seja seu conteúdo gênico que não é detectado por este tipo de análise, as características cariotípicas têm demonstrado ser de grande valia com base de comparações a nível inter e intraespecíficos (STEBBINS, 1950 WHITE, 1973).

Vinte e nove espécies de Calliphoridae foram analisadas citologicamente por STEVENS, 1908; METZ, 1916; BOYES, 1961 ULLERICH, 1963. Todas as espécies apresentaram seis pares de cromossomos.

A primeira descrição de um cariótipo de *Cochliomyia hominivorax* foi publicada por KAUFMAN & WAASSERMAN (1957) sob a denominação de *Callitroga hominivorax*. Para a preparação cromossômica foi utilizado gânglio nervoso de larvas criadas no laboratório, originalmente coletadas no Texas. Este trabalho teve como finalidade básica, verificar o efeito da radiação (raios X) nos cromossomos desta espécie, técnica utilizada por outros autores como base de método de esterilização de insetos. Estes autores, baseados na análise cariotípica, elaboraram um idiograma, constituído por cinco pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais, homomórfico na fêmea heteromórfico no macho. Mais tarde, BOYES (1961), utilizando-se de larvas de *C. hominivorax*, derivadas da linhagem do Texas anteriormente analisadas por KAUFMAN & WASSERMAN, descreveu um cariótipo diferente. BOYES confeccionou um idiograma para esta linhagem, no qual comprimento dos cromossomos foi expresso em porcentagens relativas a

comprimento total do complemento (% TCL). Nele indicou características relacionadas à localização da constrição secundária, no braço longo do cromossomo II, e no tamanho relativo dos autossomos II e III, e seja, o par II descrito por KAUFMAN & WASSERMAN corresponde, em comprimento e posição do centrômetro, ao par III analisado por BOYES. Além disso, o cromossomo X primeiramente descrito, possui um comprimento que se aproxima ao do menor par de autossomos. No cariótipo analisado por BOYES, o X apresenta aproximadamente a metade do comprimento do descrito anteriormente.

Fotomicrografias de cromossomos metafásicos de *C. hominivorax* derivados presumivelmente, também do Texas, foram publicados por LACHANCE et alii (1964), e estas também apresentaram diferenças cariotípicas com relação as já anteriormente descritas. O sistema de numeração cromossômica empregado por LACHANCE et alii (1964), baseou-se no idiograma e terminologia de BOYES (1961). As diferenças encontradas envolviam os cromossomos sexuais, que são menores que os das linhagens desta espécie descritas antes de 1964.

Mais recentemente, análises cariotípicas mais detalhadas de *C. hominivorax*, foram conduzidas por RICHARDSON et alii (1980, 1982a, 1983b, 1984), McINNIS (1981, 1983a) e McINNIS et alii (1983b) em linhagens coletadas em várias regiões dos Estados Unidos, México e por AZEREDO-ESPIN (1982), em linhagens brasileiras.

Através de medidas do complemento cromossômico, comprimento relativo e relação de braços de várias amostras desta es

pécie, RICHARDSON et alii (1980), identificaram 10 cariótipos diferentes, designando-os por letras de A a J, cinco dos quais foram coletadas no Sul dos Estados Unidos em 1978 (A, B, D, F e J). Os outros tipos foram encontrados exclusivamente no México. Estes autores empregaram o termo "gamodema", para descrever cada uma das várias populações analisadas. O termo gamodema, é definido como "um grupo composto de indivíduos, os quais estão situados espacial e temporalmente, tal forma que, somente dentro dos limites de seu sistema de reprodução, todos podem se intercruzar" (GILMOUR & HESOLP-HARRISON, 1954).

Além das diferenças métricas, acima mencionada um dos cromossomos, o de número 3, distingue-se dos demais, por apresentar bandas Q proeminentes em ambos os lados do centrômero.

A nomenclatura adotada por RICHARDSON et al (1980), para identificar os cromossomos, é diferente da utilizada por outros autores e nós a estamos utilizando para facilidade de comparação. Assim, o par sexual é considerado o número 1 ; o par 2 seria metacêntrico mais longo do genoma; o par número 3 se caracteriza por apresentar nítida banda pericentriomérica e os demais pares 4, 5 e 6 são enumerados pela posição do centrômero, independente do tamanho do cromossomo. Desta forma, o par nº 4 é o mais metacêntrico e o par nº 6 é mais acrocêntrico.

Com o objetivo de comparar o padrão cariotípico obtido para uma das linhagens (a 009 do Texas), analisada por RICHARDSON et alii (1982a), com as descritas anteriormente para a me-



ma linhagem foi necessário estabelecer uma uniformização na nomenclatura, assim o par 2 de RICHARDSON et alii corresponde ao 6 de KAUFMAN & WASSERMAN; o 3 ao 5, o 4 ao 3, o 5 ao 4, e o 6 ao 2, respectivamente.

Para os cariótipos descritos por BOYES e LACHAN et alii, o par 2 do tipo 009 corresponde ao VI, o 3 ao V, o 4 ao II, 5 ao IV e o 6 ao III, respectivamente. Através desta análise comparativa, estes autores não encontraram uma linhagem ou tipo semelhante descrito por KAUFMAN & WASSERMAN (1957), ou mesmo por BOYES (1961). No entanto, o cariótipo do tipo I, que ocorre no norte de Tamaulipas (México), é semelhante ao descrito para a linhagem analisada por L. CHANCE et alii (1964).

RICHARDSON et alii (1980, 1982b), descreveram grupos cuja distribuição geográfica são as seguintes: no oeste do Texas ocorriam os tipos (D, F, J); no Novo México (A, B, F); Arizona (A, B) e Califórnia (A, D). Os tipos A e B ocorriam juntos no sudoeste do Novo México e do Arizona e, em algumas míases observadas, encontraram ambos os tipos (A e B). Estes autores, encontraram dois tipos de Y e cada uma das duas linhagens (A e F) de *C. hominivorax* e consideram essa variação como polimorfismo, congregando assim as duas linhagens na mesma população, embora tenha evidenciado que ocorreu pouca simpatria entre elas.

Estudo citogenético semelhante efetuado em populações locais do México de *C. hominivorax* utilizando a mesma técnica pa

ra a análise cariotípica (Banda Q) e que será descrita no ítem 1.2 foi conduzido por McINNIS (1981) e McINNIS et alii (1983b).

Ao contrário da interpretação de RICHARDSON et alii (1980, 1982a), os resultados de McINNIS e colaboradores levaram estes últimos autores a concluir que as populações de *C. hominivorax* do México, analisadas, são cromossomicamente polimórficas e que estas variedades são características de uma unidade genética formada por populações capazes de se inter cruzar, e não devido a gamodemas, como preconizado pelo grupo de RICHARDSON et alii.

Um estudo sobre a biologia e citogenética de cinco espécies de moscas da família Calliphoridae, duas do gênero *Cochliomyia*; *C. hominivorax* e *C. macellaria* e três espécies saprófagas do gênero *Chrysomya*; *C. putoria*, *C. megacephala* e *C. albiceps*, foi conduzido por AZEREDO-ESPIN (1982) e AZEREDO-ESPIN & PAVAN (1984). Através desta análise, foi possível sugerir as prováveis origens das espécies de *Chrysomya* que foram recentemente introduzidas em nosso país, na década de setenta (IMBIRIBA et alii, 1977 e GUIMARXES et alii, 1978). Estas espécies atualmente apresentam uma ampla distribuição no território brasileiro (GUIMARXES et alii, 1980) e na América Central e do Norte (BAUMGARTNER & GREENBERG, 1984; LAURENCE, 1986). Em AZEREDO-ESPIN (1982), foram analisados três linhagens de *C. hominivorax* coletadas em duas localidades do Estado de São Paulo, Nova Odessa e Caraguatatuba. A análise cromossômica identificou três cariótipos distintos, sendo dois em Nova Odessa, ou seja, linhagens NOI e NOII e uma em Caraguatatuba, linhagem Ca-1. Os cariótipos diferiram na morfologia,

no comprimento relativo dos cromossomos, especialmente do cromossomo e no número e localização das constricções secundárias nos autossomos

Este foi o primeiro trabalho conduzido no Brasil sobre variabilidade cariotípica e de biologia utilizando esta espécie. Infelizmente, são poucos os estudos experimentais realizados em *C. hominivorax* no nosso país. Os existentes, relatam apenas a sua ocorrência em mitoses sobre bovinos, canídeos, suínos e humanos (ver revisão em AZEREDO-ESPIN, 1982).

Os dados de AZEREDO-ESPIN (1982), foram interpretados como se *C. hominivorax* representasse um possível complexo taxonômico onde se encontram algumas espécies crípticas, espécies definidas e formas cariotípicas polimórficas dentro de algumas destas espécies

As interpretações sobre a variabilidade cariotípica observada em *C. hominivorax* dadas por RICHARDSON et alii (1981, 1982a, 1982b), RICHARDSON e ELLISON (1984), são diferentes das de McINNIS (1981) e McINNIS et alii (1983) (veja nossa interpretação página 108 do item VI da Discussão). Como já mencionado, McINNIS (1983) descreveu a variabilidade encontrada nesta espécie como devendo a um "evidente polimorfismo cromossômico de uma única população inter-cruzante". Já RICHARDSON e colaboradores (1984) concluem que existem no México muitas populações simpátricas de *C. hominivorax* (gamodemas parcialmente ou completamente isolados. Essa interpretação foi baseada nas diferenças cariotípicas observadas, no não encontro de híbridos natureza, além de diferenças de genitália de machos de *C. hominivorax* de várias regiões do México e Estados Unidos.

Na opinião de LACHANCE et alii.(1982), no trabalho de RICHARDSON et alii (1982a), foram utilizados critérios quantitativos (especialmente comprimento e relação de braços cromossômicos) para descrever os diferentes tipos de cariótipos, mas não apresentaram dados numéricos e não descreveram detalhadamente os métodos utilizados para designar uma amostra pelos tipos cromossômicos encontrados de até J. Segundo LACHANCE et alii. (1982), neste trabalho não foram descritas as condições, os métodos e as áreas onde as amostras de *C. hominivorax* foram coletadas. Para este autor, numa população de insetos que apresenta uma ampla distribuição geográfica, como *C. hominivorax*, que ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina, parece provável a existência de populações reprodutivamente isoladas ou mecanismos que favoreçam o acasalamento não ao acaso. No entanto, este autor ressalta que, pelos trabalhos desenvolvidos até o momento com esta espécie, ainda não ficou demonstrada a presença de diferenças nível interespecífico ou de diferentes tipos de acasalamento. Em trabalho recente LACHANCE & WHITTEM (1986) efetuaram uma análise cariotípica usando células meióticas (espermatócitos) de diferentes linhagens de *C. hominivorax* do sul do México e da Ilha de Jamaica, assim como com alguns híbridos entre essas linhagens. Estes autores mantêm suas interpretações anteriores de que não encontraram qualquer evidência que indicasse a existência de isolamento reprodutivo entre as linhagens testadas. Suas conclusões baseiam-se no fato de que nos espermatócitos há perfeito emparelhamento dos cromossomos meióticos dos híbridos, quando esperavam encontrar polimorfismo devido à rearranjos se as linhagens cruzadas pertencessem à espécies diferentes.

Os resultados de MANGAN (1986), obtidos em experimentos de cruzamentos entre três linhagens mexicanas de *C. hominivora* permitem uma interpretação diferente. A análise de cruzamentos da linhagem CIH34 e outras duas recentemente estabelecidas no laboratório que foram coletadas respectivamente em Oaxaca e Michoacán apresentaram resultados interessantes. Estas linhagens estão sendo criadas em massa na fábrica localizada em Tuxtla Gutierrez para o programa de erradicação pela técnica de esterilização naquele país. Os resultados dos testes de cruzamentos interlinhagens, indicaram deficiências reprodutivas nos machos híbridos quando retrocruzados. A possível causa da esterilidade dos machos híbridos foi interpretada por MANGA (1986), como devido a fatores genéticos associados aos rearranjos cromossômicos, cuja ocorrência já foi evidenciada por vários autores.

Recentemente DEV et alii (1985), conseguiram individualizar os cromossomos politênicos de uma linhagem de *C. hominivorax* coletada em Aldama, a partir de células tricógenas de pupas desta espécie. Tentativas para estudar os cromossomos politênicos de *C. hominivorax* a partir de glândula salivar e células tróficas do ovário não forneceram bons resultados. Células tricógenas de pupas de espécies relacionadas de Calliphoridae, incluindo *Calliphora erythrocephala* (Meigen) e *Lucilia cuprina* (WEIDE MANN), tem demonstrado ter cromossomos politênicos analisáveis citologicamente (CHILDRESS, 1969; FOSTER et alii, 1976 e 1980, RIBBERT, 1967 e BEDO, 1982). Segundo DEV et alii. (1985), *C. hominivorax*, possui 5 cromossomos politênicos (1 braço), que correspondem aos 5 pares de autossomos. Os cromossomos

sexuais são representados por granulos irregulares de heterocromatina: condição que ocorre em *Drosophila nebulosa* bem como em outras espécies de insetos (ver PAVAN, 1946). A identificação dos cromossomos politênicos, abre novos caminhos para a investigação de variabilidade cariotípica existente em *C. hominivorax*. Em nosso laboratório, utilizando metodologia descrita no trabalho de DEV et alii (1985), já foi possível identificar os cromossomos politênicos de 2 linhagens de *C. hominivorax* (Ca-1 e Al-1). Embora sejam dados preliminares, foram identificadas possíveis bandas heterozigotas em um dos cromossomos politênicos além de pufes e outras regiões não emparelhadas. Estudos estão sendo conduzidos sobre o padrão de bandas, desenvolvimento de pufes bem como a escolha da melhor fase de desenvolvimento da pupa, para análise destes cromossomos.

## 1.2. Banda Q

A técnica de bandamento cromossômico, introduzida por CASPERSSON et alii (1968) tem demonstrado ser de grande importância para a identificação cariotípica dos mais diversos organismos. Foi inicialmente verificado que os cromossomos metafásicos de *Vicia faba*, *Trillium erectum*, hamster chinês e, posteriormente, cromossomos humanos, tratados com quinacrina mostarda, apresentavam uma diferenciação longitudinal representada por bandas transversais de fluorescência variável. Tais bandas cromossômicas, foram posteriormente denominadas banda Q, (de quinacrina).

CASPERSSON et alii fizeram esta importante descoberta partindo de uma hipótese segunda a qual os agentes alcoilantes ligam-se preferencialmente ao N de posição 7 da guanina. Desta forma, pensou-se que o grupo mostarda da quinacrina, por ser alcoilante, seria acumulado mais intensamente nas regiões cromossômicas com DNA mais rico em pares de bases G - C. Essa hipótese mostrou-se incorreta pois, dois anos depois, VOSA (1970) e outros, demonstraram a produção de bandas Q com o emprego de apenas quinacrina, mais especificamente, o diclorato de quinacrina, a atebrina (usado como antimalárico), que embora não se ligando à guanina também produzem bandas, como vários outros fluorocromos não-alcoilantes. Estes achados mostraram que a função da mostarda não era crítica para a especificidade da reação de coloração.

Por outro lado, ELLISON & BARR (1972) verificaram que grandes regiões fluorescentes em núcleos de *Samoaia leonensis* (uma mosca de fruta), incorporam apreciável quantidade de timidina tritiada e pouca de deoxicitidina tritiada, sendo que as demais partes dos cromossomos incorporavam ambos, timidina e deoxicitidina tritiada.

Atualmente, como será mencionado com mais detalhes adiante, existem grande número de indicações favorecendo a hipótese de que a fluorescência resultante do uso de vários corantes não depende simplesmente da distribuição de diferentes composições de bases do DNA ao longo do cromossomo. Tais bandas parecem, antes, refletir o estado de compactação de regiões dos cromossomos, resultante da associação do DNA com proteínas específicas nessas regiões.

Apesar de errados em suas interpretações básicas, o trabalho de CASPERSSON et alii (1968), abriu importante via de pesquisa que, sem dúvida, marcaram época nas investigações cariotípicas.

### 1.2.1. Métodos de Bandamento Q

Grande número de experimentos conduzidos por WEISBLUM & HASETH (1972), PACHMANN & RIGLER (1972), indicaram que a fluorescência empregando a quinacrina, aumenta na presença de DNA rico em A + T e diminui na presença de DNA rico em G + C. Desta forma, regiões cromossômicas que revelam forte fluorescência, podem conter DNA relativamente rico em A + T. Entretanto, esta evidência não é consistente com os resultados obtidos utilizando bandamento Q, nos cromosso-



mos de várias espécies que contém regiões com composição de bases conhecidas. Por exemplo, no camundongo *Mus musculus* a região centromérica que contém DNA satélite rico em A + T, é menos fluorescente que o restante dos braços dos cromossomos (ROWLEY & BODMER, 1971). Ao contrário, *Mus cervicolor*, uma espécie muito relacionada a *M. musculus*, embora contendo DNA satélite com pouco conteúdo de A + T, apresenta uma forte fluorescência na região centromérica (DEV et alii, 1973). De acordo com WEISBLUM (1973), a fraca fluorescência da região contendo DNA satélite neste camundongo, pode ter sido devido a um intercalamento de resíduos de guanina, diminuindo assim a fluorescência, mesmo na presença de uma alta proporção de adenina e timina. No entanto, HORZ & ALTENBURGER (1981), acham esta explicação improvável, isto porque, foi verificado que o DNA satélite de camundongo consiste somente de muitos pares A + T. De fato, atualmente existem evidências de que núcleos e cromossomos que fluorescem com a quinacrina, são muito influenciados por proteínas e por interações destas com o DNA. A heterocromatina centromérica de camundongo, fluoresce fortemente na interfase, e essa fluorescência diferencial é inibida por tratamento com tripsina, ou meio hipotônico (NATARAJAN & GROPP, 1972).

Para GATTI et alii (1976), áreas fortemente fluorescentes estão presentes somente em espécies de *Drosophila* que possuem DNAs satélites ricos em AT. Segundo estes autores, estas regiões diferem de outras em várias características estruturais, tais como, a conformação dos DNAs satélites ricos em AT (BRAM & TOUGARD, 1972) e/ou proteína cromossômica ligada a ele. GATTI et alii (1976) sugerem que as proteínas não histônicas estão envolvidas em muitos fenômenos de

fluorescência diferencial. De fato, essas proteínas podem ser especificamente ligadas a um número de DNAs satélites ricos em AT e diferencialmente inibem a ligação e/ou a fluorescência pela quinacrina e H 33258.

Em vários tipos de frações de DNA, que diferem na composição de bases, verifica-se níveis similares de fluorescência com a quinacrina, ainda que esta seja diferencial, em cromossomos intactos ou em frações de cromatina isoladas (GOTTESFELD et alii, 1974; BOSTOCK & CHRISTIE, 1974).

Os núcleos durante a passagem de telófase para a fase S, mostram redução no nível de fluorescência pela quinacrina, embora a quantidade de DNA permaneça constante (MOSER et alii, 1981). De acordo com SUMMER (1982), todos estes experimentos indicam que não é quantidade ou a qualidade do DNA que determinam o nível da fluorescência da quinacrina, mas sim como foi dito acima, o estado da cromatina como um todo, isto é, a associação do DNA com as proteínas.

Corroborando esta interpretação, HOLMQUIST (1975a), analisando o padrão de fluorescência dos cromossomos metafásicos de *Drosophila melanogaster*, *D. virilis* e *D. neohydei*, sugere que a riqueza em pares AT pode ser necessária mas, certamente, é um requerimento insuficiente para a fluorescência forte da cromatina pela quinacrina. Por outro lado, riqueza em pares GC pode ser um requerimento suficiente para a ausência de fluorescência pela quinacrina ou pelo corante Hoechst. Além disso, a eucromatina condensada é quase tão fluorescen-

te quanto a heterocromatina Q+ nestas espécies. Para HOLMQUIST (1975a), enquanto a condensação da cromatina tem pouco efeito na coloração pelo Hoechst, tal condensação parece ser "o fator mais importante responsável pela fluorescência forte da quinacrina".

Estudos bioquímicos mostram que as proteínas não-histônicas inibem a fluorescência da quinacrina (GOTTESFELD et alii, 1974; COMINGS et alii, 1975; SIMOLA et alii, 1975). Em *D. hydei* (GATTI et alii, 1976), algumas regiões heterocromáticas localizadas nos autossomos são completamente negativas quando coradas pela quinacrina. Áreas semelhantes estão presentes na heterocromatina centromérica de *D. neohydei* (HOLMQUIST, 1975a) e nas de *Bos taurus* (SCHNEDL, 1973, GROPP et alii, 1973). Uma vez que *D. hydei*, *D. neohydei* (HENNING et alii, 1970) e *B. taurus* (KURMIT et alii, 1973), contém DNAs satélites ricos em GC, estes resultados sugerem que este DNA deve estar localizado em áreas sem fluorocromos. Entretanto, *D. texana*, que também contém DNA satélite rico em GC, não tem áreas Q+ (PIMPINELLI et alii, 1976).

Para GATTI et alii (1976), o alto conteúdo de bases GC e de proteínas não-histônicas, são necessários para uma ausência completa de fluorescência em uma determinada região cromossômica. Entretanto, riqueza em bases AT parece ser uma condição necessária, embora não suficiente para a fluorescência com quinacrina.

Para SUMNER (1982), até o momento desconhece-se o modo de ligação da quinacrina no cromossomo, embora experimentos re-

centes indiquem que a fluorescência pode emanar principalmente de ligações coradas externamente, isto é, as proteínas da cromatina parecem ter uma influência importante para a fluorescência.

Corantes fluorescentes tem sido aplicados com sucesso em preparações citológicas de várias espécies de *Drosophila* para identificar e caracterizar a heterocromatina e ampliar o conhecimento de sua natureza e função biológica além de possibilitar a detecção de diferenças inter e intraespecíficas (VOSA, 1970; ZUFFARDI et alii, 1971; ELLISON & BARR, 1971a; ADKISSON et alii, 1971; FACCIO DOLFINI, 1974; HOLMQUIST, 1975a, 1975b; GATTI et alii, 1976).

Assim, VOSA (1970), verificou que várias regiões específicas dos cromossomos politênicos de *D. melanogaster*, fluorescem intensamente quando corados com quinacrina, outras regiões fluorescem menos. A mesma técnica empregada nos cromossomos metafásicos de gânglio nervoso, nesta espécie, mostram muitas regiões brilhantes, cada uma delas contida dentro de um segmento usualmente considerado heterocromático. No entanto, algumas regiões consideradas heterocromáticas não fluorescem com a mesma intensidade (VOSA, 1970).

ELLISON & BARR (1971a), analisaram o padrão de fluorescência dos cromossomos politênicos e mitóticos de duas espécies crípticas de *Drosophila*; *D. melanogaster* e *D. simulans*. Estas duas espécies não apresentam diferenças com relação aos cromossomos metafásicos, quando evidenciados por coloração convencional (PATTERSON & STONE, 1952). Porém, o padrão de fluorescência destes cromossomos,

nas duas espécies, é diferente (ELLISON & BARR, 1971a), isto é, exceto para o cromossomo IV, cada um dos cromossomos metafásicos de *D. melanogaster* difere do homólogo correspondente em *D. simulans*. Através da técnica de banda Q, foi possível revelar diferenças de fluorescência dentro de blocos de heterocromatina semelhantes, entre estas duas espécies relacionadas. Estas diferenças não podiam ser evidenciadas por técnicas convencionais de citogenética.

HOLMQUIST (1975a) analisou cromossomos metafásicos de *D. melanogaster*, *D. virilis* e *D. neohydei* através da coloração com quinacrina, Hoescht 33258 e Giemsa. Verificou-se que, ao contrário do que ocorre com os cromossomos de mamíferos, as bandas fortemente fluorescentes com quinacrina e Hoechst dos cromossomos daquelas espécies, são todas localizadas na heterocromatina centromérica. Embora essas três espécies de *Drosophila* sejam muito diferentes, podem ser facilmente separadas fenotipicamente, HOLMQUIST (1975b) afirma que o padrão de banda parece taxonomicamente ainda mais divergente que as características da morfologia externa. GATTI et alii, 1976, ampliaram e completaram os estudos realizados por HOLMQUIST (1975b), nas três espécies de *Drosophila* descritas acima, além de *D. texana*, *D. hydei* e *D. obscura*. Comparando o padrão de fluorescência dos cromossomos mitóticos de gânglio nervoso destas seis espécies, estes autores verificaram que tanto a quinacrina quanto o Hoechst, produzem uma diferenciação longitudinal da heterocromatina, enquanto a eucromatina fluoresce homogeneamente. Associando os resultados de fluorescência e descondensação, GATTI et alii (1976) identificaram 14 blocos de heterocromatina, sendo que de 4 a 7 tipos estão presentes simultaneamente em cada

ma das espécies. Verificaram, também, que espécies intimamente relacionadas (isto é, *D. melanogaster* e *D. simulans*; *D. virilis* e *D. texana*), mostram diferenças evidentes nos tipos de heterocromatina, sugerindo que dentro do gênero *Drosophila*, variações qualitativas da heterocromatina podem ter tido importante papel na especiação.

HALFER (1981), analisando cariótipos por fluorescência (bandamento Q) e por orceína acética de 16 estoques de laboratório de *D. melanogaster* e alguns híbridos, entre eles, verificou duas formas de variação intraespecífica da heterocromatina, envolvendo 3 tipos de cromossomos: 1- diferença no padrão de fluorescência do cromossomo Y. 2- da heterocromatina centromérica do par II; 3- diferenças no tamanho do segmento heterocromático do cromossomo X.

Estas variações foram melhor evidenciadas através da comparação dos cromossomos homólogos na F como também nos híbridos. Para HALFER (1981), estas diferenças qualitativas e quantitativas da heterocromatina dos cromossomos X, Y e II, demonstram claramente a existência de diferenças genéticas, citologicamente detectáveis nos cromossomos mitóticos, entre indivíduos de linhagens do tipo selvagem.

Corantes fluorescentes foram usados para a análise do cariótipo de duas espécies crípticas de mosquito *Anopheles*, *A. gambiae* e *A. arabiensis*. Os cromossomos mitóticos de *gambiae* e *arabiensis*,<sup>(a)</sup> que são indistinguíveis por coloração convencional (COLUZZI & SABATINI, 1967, 1968 e 1969), podem ser diferenciados pela coloração com *Loechst* 33258 e observados com fluorescência (GATTI et alii, 1977;

BONACCORSI et alii, 1980). Os autossomos destas 2 espécies fluorescem homogeneamente e de modo semelhante, enquanto que os cromossomos sexuais diferem na qualidade da heterocromatina e no padrão de bandas. Para BONACCORSI et alii, 1980, esta variabilidade indica a existência de um evidente polimorfismo com relação à heterocromatina dos cromossomos sexuais em *A. gambiæ* e *A. arabiensis*. Além disto, estas diferenças citoquímicas evidenciadas pela fluorescência constituem-se numa característica citotaxonômica adequada para a identificação de espécies (GATTI et alii, 1977 e BONACCORSI et alii, 1980). Dentre os Calliphoridae, BEDO (1980), analisou o padrão de bandamento, Q, C e H dos cromossomos mitóticos, em especial do cromossomo Y normal e translocado, de *Lucilia cuprina*, considerada a principal causadora de miases em carneiros na Austrália.

Este autor identificou uma banda Q fortemente fluorescente no braço curto do cromossomo Y estruturalmente normal, região esta que perde sua fluorescência em algumas translocações do Y com autossomos, provavelmente devido a um efeito de posição. Esta técnica demonstrou ser um excelente marcador para evidenciar rearranjos envolvendo este cromossomo, como também para analisar as relações de emparelhamento dos cromossomos sexuais na meiose.

Através de análises estatísticas das medidas obtidas do complemento cromossômico de várias amostras de *Cochliomyia hominivorax*, RICHARDSON et alii (1980, 1982a), identificaram 10 cariótipos diferentes, utilizando o corante quinacrina. Nestes cariótipos, além de diferenças morfológicas, já descritas anteriormente, apresen-

ta variabilidade na intensidade de fluorescência. Assim o autossomo 3 distingue-se dos demais, por apresentar intenso brilho (Banda Q) em ambos os lados do centrômero quando tratado com diclorato de quinacrina e observado em ultravioleta.

Ao analisar os cariótipos de larvas de *C. hominivorax* coletadas próximo de Aldama, em Tamaulipas (México), em míases de bovinos e carneiros, McINNIS (1981), verificou a ocorrência de uma variabilidade cromossômica significativa, utilizando a técnica de banda Q. Dos 6 pares de cromossomos desta espécie, os sexuais, e os pares 2, 5 e 6 foram identificados por este autor como apresentando polimorfismo. Os cromossomos sexuais X e Y apresentavam 5 e 4 variantes, respectivamente, isto é, o X podia ser de: a. comprimento médio, fluorescente, com 1 banda; b. comprimento médio, não fluorescente e 1 banda; c. comprimento longo, fluorescente e 1 banda; d. comprimento longo, fluorescente e 2 bandas; e. comprimento longo, não fluorescente e 1 banda.

O cromossomo Y apresentou-se em todos os casos não fluorescente e morfologicamente podia ser: a. comprimento médio e submetacêntrico; b. comprimento longo e submetacêntrico; c. comprimento curto e metacêntrico; d. comprimento curto e acrocêntrico.

Além disto, o cromossomo X é mais fluorescente em amostras de *C. hominivorax* coletadas no boi do que em carneiro. Com relação aos autossomos, o cromossomo 2 apresentou duas variantes, um sendo submetacêntrico e outro acrocêntrico, ambos não fluorescentes. O



par 5 tem duas variantes, embora ambos sejam submetacêntricos, um foi considerado longo e outro curto e ambos não fluorescentes. O par 6 também pode ser de dois tipos, um acrocêntrico longo e o outro curto, ambos não fluorescentes. O par 3 distingue-se dos demais por apresentar intenso brilho em ambos os lados do centrômero, quando corados pela quinacrina.

McINNIS et alii (1983b) analisaram e descreveram cariotipicamente, pela técnica de banda Q, amostras de *C. hominivorax* provenientes de Chiapas, sudoeste do México. Através do padrão de fluorescência e da morfologia cromossômica de *C. hominivorax* coletadas em boi e carneiro, estes autores verificaram que aqui também os cromossomos sexuais e os pares 2, 5 e 6 eram polimórficos. A maior parte das variações foi apresentada pelos cromossomos sexuais, oito tipos de X e 7 tipos de Y.

Com relação aos autossomos, foram descritos dois tipos de 2, três de 3, dois de 4, três de 5 e duas variantes do cromossomo 6. Os vários tipos de cromossomos X diferem no comprimento, relação e braços e padrão (intensidade e número) de bandas fluorescentes, sendo: 4 fluorescentes e com uma banda Q no braço longo; um fluorescente com 2 bandas no braço longo; e dois não fluorescentes com uma banda. Cinco destes cromossomos X foram encontrados em Aldama (Tamaulipas, México). Os tipos de cromossomos Y diferem no comprimento e na relação de braços, mas não apresentam bandas fluorescentes, sendo que 4 deles foram encontradas em Aldama (Tamaulipas, México). Os 2 tipos de cromossomo 2 diferem apenas no padrão de fluorescência, is-

to é, um tipo tem uma banda Q em ambos os lados do centrômero, enquanto o outro não apresenta fluorescência nesta região. As variações do par 3 foram: comprimento médio, submetacêntrico longo e submetacêntrico curto, ambos com uma evidente banda Q em ambos os lados do centrômero e um tipo submetacêntrico médio com banda -Q adjacente ao centrômero somente no braço longo. As diferenças observadas nos pares 4, 5 e 6 envolvem comprimento e posição do centrômero, sendo que nenhum apresentou padrão especial de fluorescência.

Bandamento cromossômico é uma importante ferramenta para analisar a distribuição da heterocromatina e evolução cromossômica (RANGANATH et alii, 1982). No gênero *Drosophila*, por exemplo, é sabido que as diferenças na heterocromatina são tão evidentes quanto as características de morfologia externa (HOLMQUIST, 1975; PEACOCK et alii, 1978).

Adição e/ou deleção da heterocromatina durante a evolução, tem sido descrita para uma grande variedade de organismos, como por exemplo, *Drosophila* (CLAYTON, 1969; WARD & HEED, 1970; PIMPINELLI et alii, 1976), gafanhoto (NAKIVEL, 1976), roedores (HATCH et alii, 1976) e YONENAGA, 1972 e 1979 e YONENAGA et alii 1975, *Ovis* (EVANS et alii, 1973 e muitos outros).

A variabilidade cariotípica do tipo encontrada em *C. hominivorax* é sem dúvida muito grande. As interpretações de alguns autores sobre o significado dessa variabilidade, são totalmente divergentes. Pelos dados e interpretações dos trabalhos acima citados, a

interpretação mais razoável é a de que a banda Q é o resultado da coloração, por alguns corantes fluorescentes, de regiões do cromossomo onde o DNA associado a proteínas específicas, apresentam certo grau de condensação, que lhe dá afinidade aos corantes.

### 1.3. Análise Morfométrica

Morfometria é a medida e análise da forma. A forma pode apresentar variações, e estas ocorrem nos mais variados materiais de estudo, desde orgânulos celulares, nervuras de asas de artrópodos, crânio de vertebrados, etc. (PIMENTEL, 1979).

Os primeiros biometristas reconheceram que os insetos são um grupo que oferece muitas vantagens para estudos de variação (KELLOGG & BELL 1904, ALPATOV, 1929). O exoesqueleto é facilmente medido e livre de distorções físicas sofridas pelo corpo de muitos outros animais que não o tem (DALY, 1985).

Métodos morfométricos são de grande valor quando utilizados em combinação com os conhecimentos biológicos dos animais em análise. Permitem sumarizar dados morfológicos numérica e graficamente, para exprimir e testar determinadas relações que se quer analisar e, com técnicas multivariadas, examinar relações em muitas dimensões.

A escolha das técnicas estatísticas, depende do objetivo da investigação (GOULD & JOHNSTON, 1972). Técnicas multivariadas são utilizadas para elucidar o padrão principal de variação na morfologia inter e intraespecífica.

De acordo com GOULD & JOHNSTON (1972), algumas distribuições são visualmente detectáveis, como por exemplo, o poli-

morfismo de bandas em certas espécies de caracóis mas, neste caso, também uma análise estatística pode ser requerida para um estudo da variação de frequência. No entanto, muitas distribuições envolvem variações sutis na forma do corpo que tornam difícil seu reconhecimento pela simples observação, havendo necessidade de quantificar para descobrir o padrão. Os métodos multivariados de análise canônica, componente principal, são amplamente aplicados em biologia, graças a uma quantidade de pacotes de programas estatísticos disponíveis.

Técnicas para analisar caracteres morfométricos em sistemática, tem sido descritos e discutidos em vários artigos de revisão (GOULD, & JOHNSTON 1972; NEFF & MARCUS, 1980; SOKAL, 1965 e 1983).

De acordo com BROWN (1979a), é através do padrão de variação dos caracteres nas populações, incluindo variação geográfica, que relações entre as populações podem ser estabelecidas. Muitos trabalhos têm analisado variação de caracteres simples sobre distâncias geográficas, por métodos univariados. Quando há necessidade de análise simultânea de grupos de caracteres, é conveniente utilizar-se técnicas multivariadas (SOKAL, 1965; GOULD & JOHNSTON, 1972; THORPE, 1976). Estas técnicas são empregadas especialmente para fatores da forma, porque refletem interações mais complexas, podendo somente ser estimadas de modo adequado através do emprego destes métodos que, ao mesmo tempo consideram a variação de muitos caracteres (ATCHLEY, 1971; ATCHLEY & HENSLEIGH, 1974). Além disso, como a adaptação das populações é multidimensional, a variação dentro e entre as taxa, pode

ser melhor estabelecida pela utilização de métodos multivariados, como a análise canônica. Este tipo de análise de variação intraespecífica é empregada, por exemplo, para descrever o padrão de variação de uma espécie, ou subdividir uma espécie variável em unidades subespecíficas, possibilitando um melhor entendimento das forças evolutivas que estão agindo sobre a espécie em questão (SOKAL, 1965).

A análise univariada de variância (ANOVA) pode ser utilizada para demonstrar a extensão da diversidade dentro de um grupo (ATCHLEY & CHENEY, 1974; POWELSON et alii, 1975). Esta diversidade pode então ser utilizada por técnicas multivariadas para caracterizar o taxon dentro do grupo. Análise canônica pode identificar a principal fonte de variação intergrupo indicando deste modo a proporção da variação total que é atribuída a cada fonte. Análise do componente principal produz informações sobre a natureza e amplitude da variação dentro dos grupos (BLACKITH & KEVAN, 1967; BLACKITH & REYMENT, 1971; RESS, 1969; ROSTRON, 1972; POWELSON et alii, 1975).

Caracteres qualitativos são usualmente favoráveis para descrever e delimitar taxa superiores de insetos. BROWN (1979a, b), entretanto, verificou que 9 a 15 medidas de asas de espécies em vários gêneros e famílias de Diptera caliptrados, foram suficientes para o estabelecimento de relações fenéticas. A asa reflete muito da história evolutiva do grupo em estudo, sendo a forma relativamente estável. De acordo com TERZIAN (1986), a asa é um importante caracter morfológico uma vez que sua variação tem um forte componente genético. Já o tamanho do corpo e de suas partes é muito influenciado também por

fatores ambientais.

GILBERT (1985a, b), utilizou-se de um fundamento morfológico para analisar diferentes espécies de dípteros pertencentes à família Syrphidae, comuns visitantes e sugadores de flores na região holoártica, sendo 14 espécies da subfamília Syrphinae e 17 da subfamília Eristalini. Através da análise por técnicas morfométricas multivariadas, GILBERT verificou que a principal fonte de variabilidade interespecífica dos sirfídeos, está no tamanho do corpo. Já a variabilidade intraespecífica envolve o comprimento da probóscide e tamanho labelar. Em trabalho anterior, GILBERT (1981) descreveu a dieta de sirfídeos e em seus recentes trabalhos GILBERT (1985a, b, c), verificou que para este grupo de insetos, o comportamento de alimentação está correlacionada à morfologia, isto é, os dados de morfometria multivariada e tipo de alimento estão associados. Assim, espécies com tamanho e forma semelhantes, alimentam-se do mesmo tipo de flores.

Na literatura, há muito tem-se reconhecido que diferenças morfométricas entre populações geográficas de uma espécie, podem revelar diferentes formas de adaptação ao ambiente que podem eventualmente levar à especiação. Os estudos iniciais destas variações, foram limitadas a poucos caracteres (ALPATOV, 1929; DOBZHANSKY, 1970) e até o advento dos computadores, muitos dos caracteres sutis, como já mencionados, não puderam ser analisados por técnicas apropriadas de covariação, tais como, análise de componente ou fator principal, para isolar e identificar padrão subjacente de morfogênese (BLACKITH, 1971).

De acordo com BRYANT (1979) poucos estudos modernos se preocupam em separar aspectos de variabilidade espacial da variabilidade temporal, ou as causas genéticas da indução ambiental do fenótipo, tipicamente presente em trabalhos das décadas de 30 e 40 (GOLDSCHMIDT, 1934; STALKER & CARSON, 1947, 1948 e 1949).

Um trabalho sobre o envolvimento dos componentes genéticos temporal e espacial, na variação morfométrica de diferentes linhagens de *Musca domestica*, foi conduzido por BRYANT (1979). Este estudo foi desenvolvido para tentar elucidar a dinâmica da adaptação a ambientes diferentes desta espécie. Foram efetuadas coletas de *M. domestica* em 59 localidades dos E.U.A., durante vários anos, para verificar a variação anual e determinar o componente sazonal dos caracteres morfométricos nesta espécie. Ao todo, foram quatorze caracteres utilizando 25 machos e 25 fêmeas de cada linhagem. Verificou-se que, das 59 localidades analisadas, *M. domestica* exibe uma heterogeneidade altamente significativa para todos os caracteres medidos. Estes resultados indicaram que, através da análise de variância, detecta-se um maior número de diferenças significativas entre localidades geograficamente separadas do que entre aquelas contíguas. Foi verificado também que há um gradiente norte-sul influenciando o tamanho das moscas, ou seja uma variação clinal. Através da análise estatística, BRYANT (1979) ressalta que o tamanho das moscas explica muito da variação encontrada em *M. domestica* entre as localidades, e que bastam poucos caracteres para diferenciar populações. Assim, apenas três caracteres representativos de tamanho e forma, foram selecionados, dentre os 14 analisados: comprimento da asa, da tibia e do "scutum".



Na literatura ainda são poucos os trabalhos sobre análise morfométrica de caracteres da morfologia envolvendo à família Calliphoridae. Estudos sobre genitália e morfologia das cerdas realizados por KURAHASHI, 1971 e NORRIS, 1959, evidenciaram que somente estes caracteres ou, um grupo limitado de caracteres, não fornecem bom entendimento das relações entre espécies dentro da família Calliphoridae.

Durante o programa de erradicação de *C. hominivorax* no sudoeste dos EUA, Dixon (1962) verificou a ocorrência de vinte tipos de variações nas nervuras da asa ocorrendo naturalmente em duas linhagens desta espécie coletadas e mantidas no laboratório na Flórida. As variações da asa envolviam o aparecimento de nervuras aberrantes em forma e disposição de esporas além de uma bifurcação da veia R4+5. Dixon (1962), sugere que a expressão desta variabilidade da asa observada nestas duas linhagens deve ter sido influenciada por fatores ambientais decorrentes da criação massal em condições de laboratório.

BROWN & SHIPP (1977), realizaram um estudo sobre análise morfométrica da asa, de representantes da Austrália da tribo Luciliini, para elucidar as relações fenéticas dentro desse grupo. Foram analisados 11 espécies, representantes da tribo Luciliini, utilizando-se técnicas estatísticas, como: análise da variância univariado (ANOVA), estatística de Wilks e distância de Mahalanobis (D2), como preconizado por SNEATH & SOKAL (1973). Foi verificado que os caracteres métricos da asa analisados são altamente correlacionados e a aná-

lize canônica separa as espécies por intermédio de diferenças de tamanho e da forma da asa. Assim, verificou-se que num nível de 95% de similaridade, existem pelo menos 3 grupos distintos incluídos em Hemipyrellia e 2 em Lucilia. Neste último gênero, foi mantido o "status" específico separado de cuprina e sericata. Desta forma, através desta análise, estes autores sugerem que a confusa situação taxonômica do grupo Lucillini poderia ser solucionada rejeitando-se Phaenicia como um gênero válido. Concluem que embora tenham usado um número limitado de caracteres, as variáveis da asa são compatíveis dentro das espécies, e podem ser utilizados para se estabelecer relações fenéticas entre espécies associadas.

Estudo semelhante, utilizando-se análise morfométrica de nervuras da asa, para verificar a afinidade fenética de 32 espécies de Sarcophagidae (Diptera), foi realizado por BROWN & SHIPP (1978). Os resultados obtidos foram comparados com a classificação taxonômica clássica efetuada anteriormente por ROBACK (1954) e LOPES (1954, 1958a, 1958b e 1959). Através desta análise, a subfamília Sarcophaginae parece constituir de um número reduzido de gêneros, ao lado de um grande complexo consistindo de espécies de Sarcophaga sensu lato.

Um estudo mais amplo, envolvendo um taxon representativo de espécies muito relacionadas de dípteros muscóides, a saber: Muscidae (*Musca domestica*, *Muscina stabulans*, *Stomoxys calcitrans* e *Musca vetustissima*); Sarcophagidae (*Parasarcophaga crassipalpis*, *Phytosarcophaga gastralis*); e Calliphoridae (*Chrysomya megacephala*, *C. ru-*

filices, *Lucilia cuprina*, *Calliphora stygia* e *C. angur*) foi conduzido por BROWN (1979b). Neste trabalho, foi feita uma análise estatística da morfometria do padrão de venação da asa, na tentativa de distinguir cada uma das 11 espécies como também, verificar o padrão e extensão da variação fenética dentro e entre famílias destes dípteros. Para os califorídeos, procurou-se também analisar a ocorrência de variação geográfica intraespecífica. A análise da variância univariada indicou que a variação entre as amostras para cada caráter, foi significativamente maior que a variação dentro de cada amostra, a um nível de 1%. Através da análise canônica, foi verificado que as três primeiras funções separam os grupos de califorídeos e sarcófagídeos do grupo dos muscídeos. As variáveis canônicas restantes não fornecem qualquer separação adicional entre as espécies. A forma foi semelhante, isto porque a asa dentre os dípteros muscídeos é morfologicamente semelhante. De acordo com BROWN, as variáveis mais importantes para diagnosticar as espécies foram referentes à asa. Através da relação entre as diferentes nervuras, BROWN conclui que a asa dos califorídeos é relativamente menor, mais larga que a asa de sarcófagídeos e muscídeos.

Embora muitos sejam os relatos na literatura utilizando-se análise discriminante para avaliar a variabilidade intra e interespecífica de vários dípteros, até o momento, análises quantitativas de caracteres de morfologia externa de adultos não tem sido realizadas em *C. hominivorax*.

Um estudo qualitativo, utilizando genitália de machos de quatro linhagens diferentes de *C. hominivorax* foi efetuado por

RICHARDSON et alii (1982). Estes autores encontraram diferenças entre estes tipos que envolviam: 1. Padrão das cerdas, tamanho e morfologia dos gonopódios; 2. Comprimento, largura e posição característica dos parâmeros; 3. Morfologia e posição dos epiphallii .

Entretanto, GAGNÉ & PETERSON (1982), analisando moscas acasaladas e não acasaladas, provenientes de uma mesma massa de ovos, verificaram, ao contrário de RICHARDSON et alii (1982a), que as diferenças na morfologia da genitália encontrada entre os machos de *C. hominivorax*, eram devidas à acasalamento ou não dos indivíduos analisados. Para GAGNÉ & PATERSON (1982), essas diferenças não podem ser utilizadas para separar populações de *C. hominivorax*, como preconizaram RICHARDSON et alii (1982a), embora seja um carácter muito utilizado entre os sistematas para distinguir e identificar espécies de insetos, WILEY (1978) acha que mudanças morfológicas na genitália não são requeridas para especiação. O importante é o isolamento reprodutivo. Uma revisão feita por DOBZHANSKY (1951) sobre genitália de insetos, levou-o a assumir que nos casos analisados não havia evidências de que isolamento mecânico seja utilizado como uma barreira contra a hibridização. De acordo com MAYR (1977) as mudanças estruturais na genitália são uma consequência, mais do que uma possível causa da especiação.

Um exemplo de variabilidade de genitália masculina de inseto, foi conduzido por LACHAISE et alii (1981) em *Drosophila teissleri*, um membro do subgrupo melanogaster Afrotropical, que é amplamente distribuída a partir do Guiné até a África do Sul. Nesta espécie, o arrançamento dos pentes da placa anal da genitália masculina

dispõem-se em forma de ferradura. Estes autores encontraram uma grande variabilidade na disposição destes pentes, ao analisarem 5 localidades na África (Guiné, Costa do Marfim, Camarões, Rodésia e Zaire). A disposição dos pentes na placa anal apresentava um gradiente, quando se analisou o eixo centro oeste - sul da África. A probabilidade de distinção entre as populações analisadas, baseada neste caracter, foi cerca de 95%. A variabilidade encontrada foi interpretada por estes autores como devido à ocorrência de um gradiente, com alguma sobreposição entre populações vizinhas. A variação geográfica é gradual e nos cruzamentos em laboratório não foi encontrado nenhum isolamento reprodutivo pré e pós-acasalamento entre as linhagens em todos os casos, com produção de híbridos férteis. Além disso, foi verificado que muitas das linhagens analisadas de *D. teissleri*, apresentaram polimorfismo para três inversões no cromossomo 2 e uma no cromossomo 3. Esses resultados indicam que as populações analisadas de *D. teissleri*, pertencem a uma mesma espécie biológica.

Recentemente, MANGAN (1985), utilizando larvas do 3º estágio de *C. hominivorax*, analisou a variação do número e morfologia dos espinhos do segmento torácico. As larvas foram obtidas a partir de míases de diferentes hospedeiros, em 23 localidades de regiões tropicais e subtropicais. As amostras usadas, embora analisadas recentemente provieram de coletas realizadas antes do programa de erradicação desta espécie no Sul dos Estados Unidos. As larvas analisadas por MANGAN estavam preservadas em álcool 70%, por pelo menos 27 anos, e foram preparadas e montadas em lâminas, usando-se técnicas convencionais de taxonomia e análise ao microscópio. Foi verificada a posi-

ção e tipo de espinhos no segmento torácico das larvas, e aplicou-se análises estatísticas univariada e multivariada. Esta última análise indicou que o tipo de ferida de onde provieram as larvas assim como espécie do hospedeiro, devem ser fatores determinantes da morfologia dos espinhos destas larvas. MANGAN (1985) efetuou uma análise discriminante adicional, para verificar se a morfologia dos espinhos poderia ser utilizada como método de classificação e determinação da proveniência das larvas de *C. hominivorax*, através da espécie de hospedeiro, ou tipo de ferida. Os resultados desta análise no entanto, indicaram que a morfologia dos espinhos não fornece qualquer dado sobre origem das larvas. MANGAN admite que este caráter pode ser utilizado em interpretações sistemáticas de *C. hominivorax*, da mesma forma que padrão de espinhos, cerdas dos insetos na fase adulta, que estão dentre os caracteres mais comuns utilizados em taxonomia.

A análise morfométrica de vários caracteres qualitativos da morfologia externa de adultos de diferentes linhagens de *C. hominivorax*, utilizando-se testes multivariados, é descrito pela primeira vez, no nosso trabalho.

## 11. OBJETIVOS

Em trabalhos anteriores, foi verificado que *Cochliomyia hominivorax*, uma importante praga de nossos rebanhos tem características biológicas que a tornam excelente material de pesquisa, seja sob o aspecto acadêmico, seja sob o aspecto de pesquisa aplicada.

A presente análise de diferentes amostras de *C. hominivorax* a nível cromossômico, morfométrico e de testes de cruzamentos entre linhagens representativas de grande parte de sua ampla área de distribuição, teve como finalidade obter informações que permitissem um melhor entendimento da biologia dessa espécie de mosca, nos seguintes aspectos:

1. Variabilidade cromossômica, através da análise de cromossomos metafásicos, utilizando coloração com Giemsa e técnica de bandamento Q, em nove amostras coletadas em diferentes regiões do Brasil.
2. Variabilidade quantitativa de 19 caracteres de morfologia externa de adultos provenientes das diferentes linhagens de *C. hominivorax* coletadas em várias regiões do Brasil.
3. A existência ou não de compatibilidade sexual entre indivíduos de linhagens cariotipicamente diferentes e provenientes de regiões diversas.

4. A fertilidade e viabilidade da F1 e F2 além dos descendentes de retrocruzamentos com ambas as linhagens parentais.
5. As possíveis correlações identificáveis entre a variabilidade cariotípica, a variabilidade morfométrica e a compatibilidade sexual.

Além disso, foi efetuada a comparação dos cariótipos de *Cochliomyia hominivorax* com *Cochliomyia macellaria*, principalmente com relação ao bandamento cromossômico.

Ao lado de sua importância acadêmica, esses dados são úteis para o estabelecimento de possíveis métodos de combate e controle dessas pragas. O atual uso intensivo de inseticidas químicos, além de caro é, até certo ponto, ineficiente, uma vez que embora frequentemente curativo, não impede a reinfestação e, em absoluto é preventivo. Deve-se ressaltar, também, que com frequência os insetos tornam-se geneticamente resistentes ao inseticida, inutilizando seu efeito. Deste modo, as análises propostas neste trabalho serão úteis para um melhor entendimento desta espécie, como também contribuirá para o planejamento de métodos alternativos de controle desta indesejável praga.



### III - MATERIAL E MÉTODOS

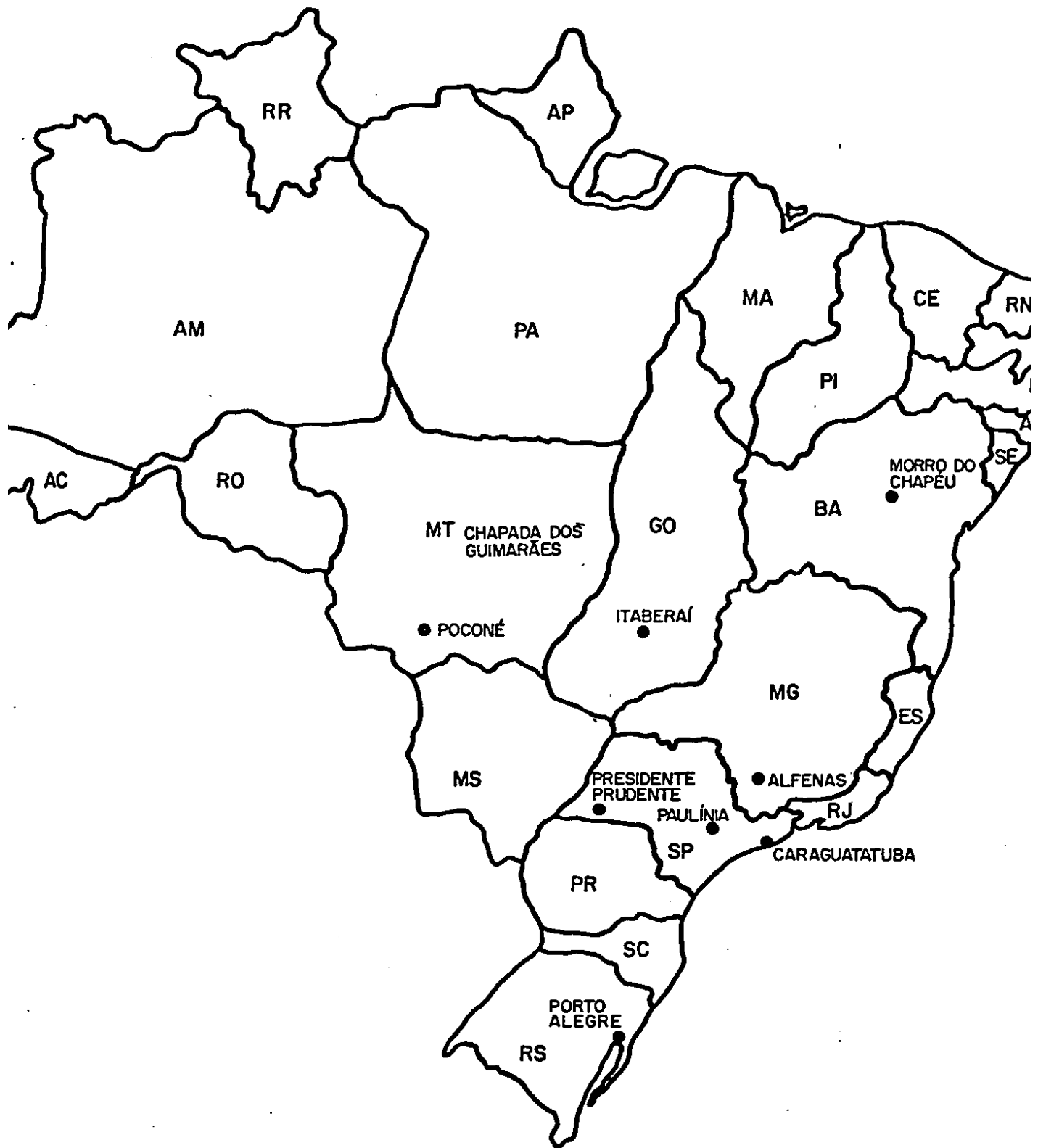
#### 1.1. MATERIAL

Neste trabalho foram utilizadas linhagens de *Cochliomyia hominivorax* coletadas em diferentes regiões e localidades do Brasil e que estão indicadas na Figura g, a saber:

- a. Caraguatatuba (linhagem Ca-1 e amostra Ca-2)-SP
- b. Paulínia (linhagem Pa-1)-SP
- c. Presidente Prudente (linhagem PP-1)-SP
- d. Alfenas-MG (linhagem Al-1),
- e. Itaberaí-GO (linhagem GO-1),
- f. Morro do Chapéu-BA (linhagem Ba-1),
- g. Porto Alegre-RS (linhagem RS-1),
- h. Chapada dos Guimarães e Poconé-MT (linhagens MT-1 e MT-2).

Para as preparações cromossômicas, células de gânglio nervoso de larvas do 3º estágio das diferentes linhagens de *C. hominivorax* descritas acima, foram analisadas.

**Figura g** - Localidades e respectivos Estados do Brasil onde foram coletadas as linhagens e amostras de *Cochliomyia hominivorax* analisadas cariotípica e morfométricamente.



## III.2. MÉTODOS

### 2.1. Obtenção de *Cochliomyia hominivorax*

Larvas dessa espécie foram obtidas em bois, porcos e cavalos com miíases expostas, em fazendas de criação de gado leiteiro e/ou de corte, como outros animais domésticos, como descrito no item III.1.

As larvas foram retiradas diretamente das lesões e em seguida colocadas em caixas de plástico, contendo serragem e sangue da própria ferida. Grupos de ovos encontrados com frequência nos bordos das feridas, coletados com auxílio de pinça são colocados em placas de Petri de 5 cm, em substrato de papel de filtro umedecido.

O material coletado foi transportado para o laboratório, como indicado nas Figuras (a) e (b) e manipulado como descrito a seguir.

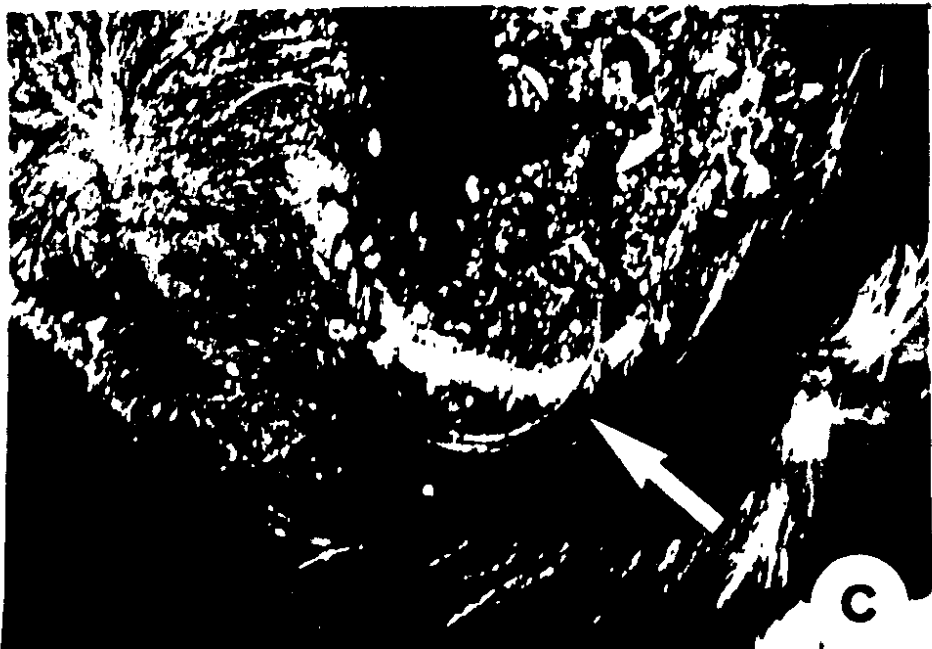
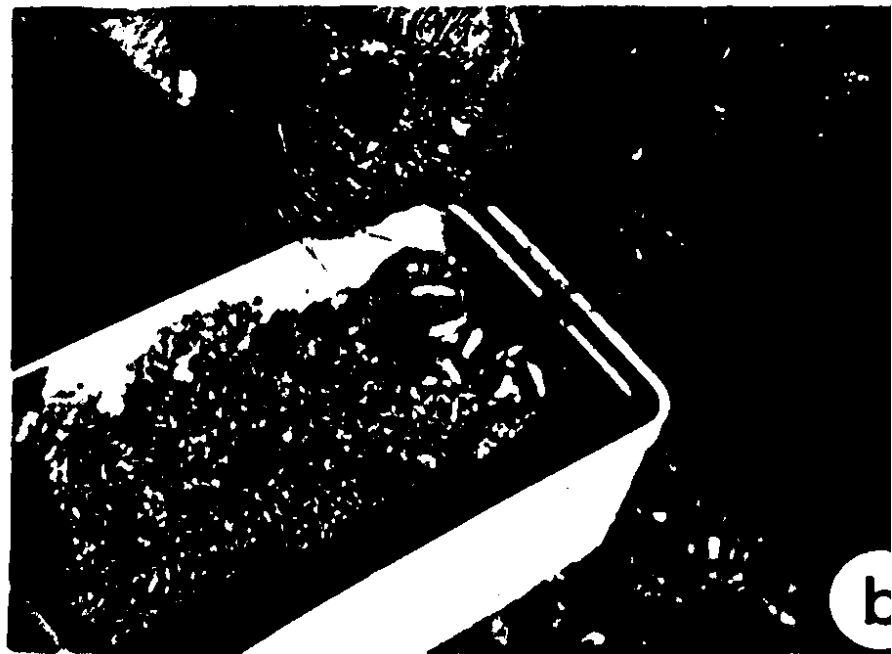
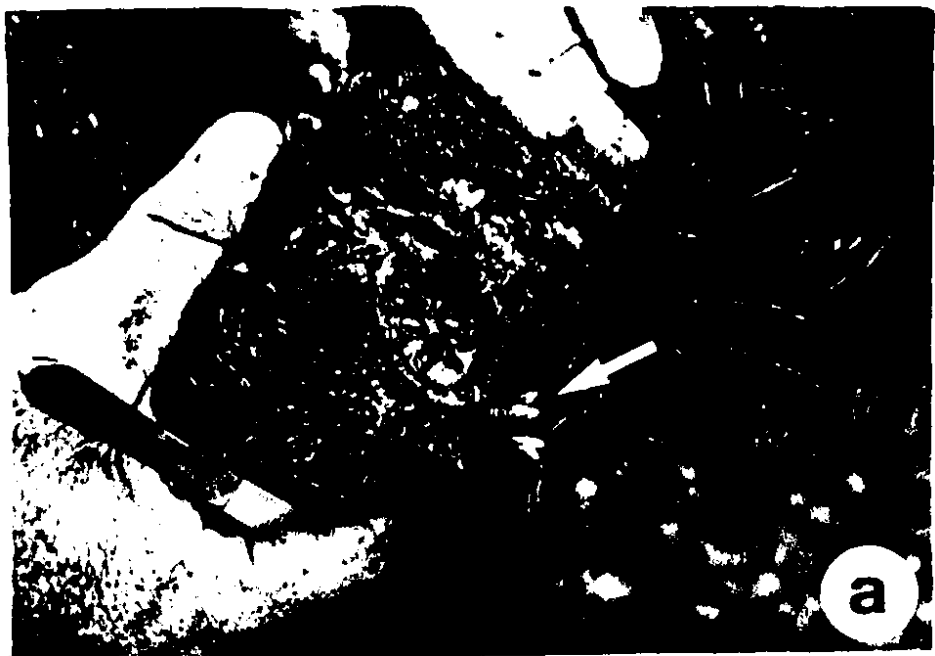
### III.3. MÉTODOS DE CRIAÇÃO NO LABORATÓRIO

Figura a - Mífase causada por *Cochliomyia hominivorax* na região dorsal do pescoço de um bezerro. A seta indica uma fêmea desta espécie.

Figura b - Detalhe da retirada das larvas de *C. hominivorax* de uma ferida, para posterior transporte para o laboratório.

Figura c - Detalhe de uma mífase na região da cabeça de um bezerro em que se observa nos bordos da ferida massas de ovos e no seu interior larvas de *C. hominivorax* em diferentes estágios.

Figura d - A mesma mífase da figura c, indicando a região da cabeça do bezerro em que ocorreu a lesão.



### 3.1. Método de criação de larvas de *C. hominivorax*

Para a manutenção das larvas de diferentes linhagens de *C. hominivorax* e obtenção de adultos para cruzamentos foram introduzidas modificações nos métodos já descritos (MELVIN & BUSHLAND 1936, 1940; GINGRICH et alii, 1971; BROWN & SNOW, 1978, 1979).

Utilizamos com sucesso o seguinte meio de cultura: 500 mg de carne (patinho) moída, 500 mililitros de sangue bovino com citrato e 200 ml de água.

A escolha da carne patinho, é porque outros tipos de carne apresentam dois inconvenientes, que são graves para a sobrevivência das larvas; o excesso de gordura e fibras colágenas. Larvas de *C. hominivorax*, em condições de laboratório, consomem apenas o tecido muscular e não ingerem gordura ou fibras existentes na carne e estas ficam acumuladas no meio de cultura usado pelas larvas. Essa gordura e as fibras ficam presas na peneira de limpeza das larvas causando transtornos que matam as mesmas. Para evitar esses inconvenientes tivemos que utilizar patinho moído, que é ~~uma~~ carne de primeira, com baixo teor de gordura e fibras colágenas, permitindo assim um desenvolvimento mais homogêneo das larvas, menor mortalidade e um consumo quase total do meio de cultura fornecido para as larvas.

Diariamente a dieta é substituída por uma nova e, para isso, o meio contendo as larvas é peneirado em água corrente de modo a retirar o meio velho deixando as larvas limpas. Cerca de 150 larvas são transferidas para uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro. Este procedimento deve ser repetido diariamente, durante sete a oito dias, período este que compreende o desenvolvimento larval.

### 3.2. Manutenção de Adultos das Diferentes linhagens de *C. hominivorax*.

Após 7 dias no meio de cultura as larvas deixam a placa de Petri, caem na serragem contida na caixa plástica, e aí transformam-se em pupas. Essa serragem com as pupas é transferida para caixas de plástico de 15 x 15 x 10 cm (mantidas na câmara de criação). Após a emergência dos adultos, estes são transferidos para as gaiolas de criação (34 x 50 x 26 cm).

A alimentação dos adultos consiste de uma mistura de leite em pó integral e açúcar em proporções iguais e aproximadamente 10% de levedura de cerveja seca. Em dias alternados, é colocada no interior da gaiola de criação, uma placa de vidro contendo fígado cru. A água é fornecida em frascos de vidro de 1/2 litro contendo em seu interior uma tira de gase, mais longa que o comprimento do vidro, na qual as moscas podem sugar.



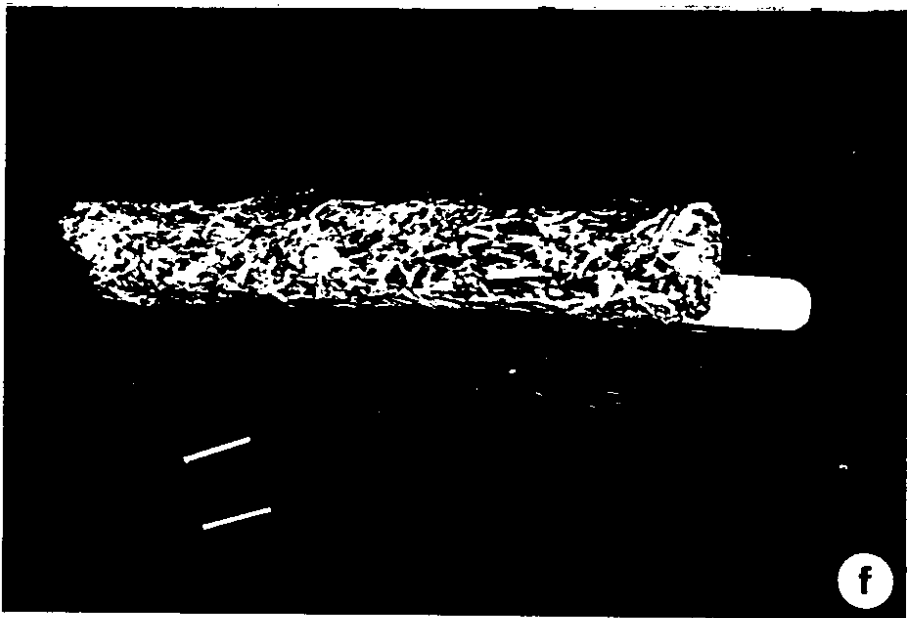
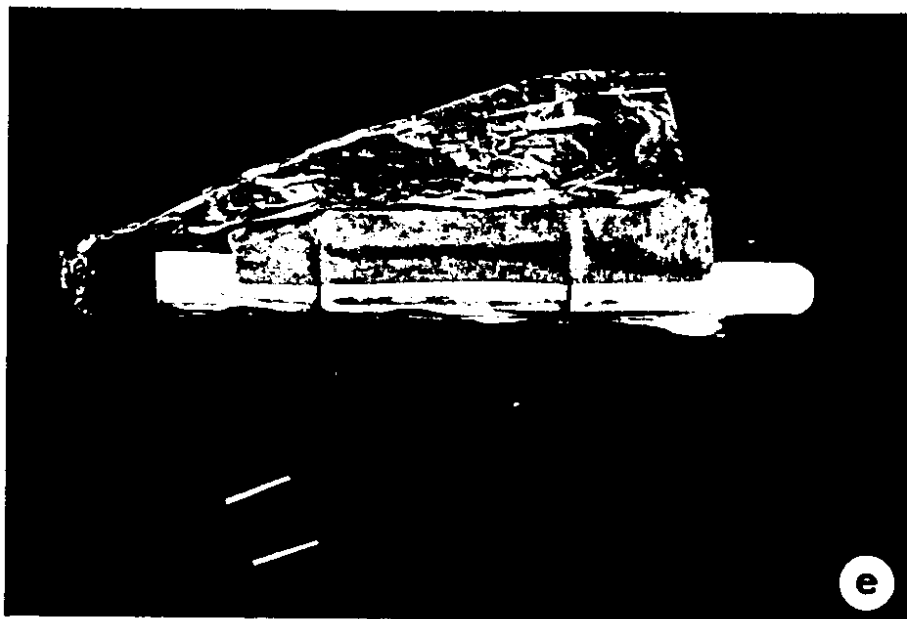
### 3.3. Obtenção de Ovos de *C. hominivorax*

Para as experiências de oviposição de fêmeas das diferentes linhagens de *C. hominivorax*, foram feitas modificações e adaptações em métodos anteriormente descritos na literatura (LAAKE, 1939; CRYSTAL, 1964, 1978; CRYSTAL et alii, 1975; FLETCHER et alii, 1973; GIBSON et alii, 1974; HIGHTOWER et alii, 1972; HOLT et alii, 1979). Deve-se ressaltar que as modificações para criação desta espécie em nosso laboratório foram imprescindíveis para a manutenção bem como para o aumento da criação das diferentes linhagens de *C. hominivorax* (Silveira G.A.R. e Azeredo-Espin, trabalho em preparação).

Na época da oviposição das fêmeas, (oito a nove dias após a emergência), é introduzida na galola uma placa de Petri, de 5 cm de diâmetro, contendo o meio de cultura já processado pelas larvas e que tem um odor característico que parece-nos ser estimulante para as fêmeas maduras. No interior da placa e em contato com a carne, foi colocada uma resistência de 10 W usada em aquecimento de aquário sob o comando de um termostato de avanço térmico regulável (Figuras e, f), que foi adaptado para fornecer uma temperatura média interna de 45 a 50 °C e externa à capa de papel de alumínio da ordem de 35 a 42 °C. (adaptação realizada por Silveira G.A.R.).

Esta resistência foi envolvida por papel de alumínio, para dissipar o calor e facilitar a retirada dos ovos, que

Figuras e, f - Aparelho (resistência de 10 W) adaptado para estimular a oviposição das fêmeas de *C. hominivorax* em condições de laboratório.



eram depositados em vários pontos do papel, como indicado na figura (f).

Os ovos são colocados em placas de Petri de 5 cm de diâmetro neste recipiente permanecem durante o primeiro estágio larval. Esta placa contendo larvas e meio é colocada em uma caixa de plástico (20 x 15 x 8 cm) que, mantendo a umidade relativa alta, favorece o desenvolvimento larval.

Com este método, é possível obter grande quantidade de ovos. Estes são removidos em quantidade desejada, colocados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo dieta de larva e mantidos a temperatura de  $25 \pm 1$  °C, durante todo o desenvolvimento larval.

Os ovos de cada linhagem e dos cruzamentos são obtidos em intervalos de dois dias, para a manutenção periódica das larvas e dos adultos para nossas experiências.

#### 3.4. Cruzamento entre as Diferentes Linhagens de *C. hominivorax*

Para verificar a viabilidade reprodutiva entre as 9 linhagens de *C. hominivorax* analisadas, foram conduzidos experimentos de cruzamento em condições de laboratório. Cerca de 300 pupas de cada linhagem, com quatro a cinco dias, foram individualizadas em tubos de ensaio, contendo em seu interior 4 cm de serragem, para evitar o seu ressecamento e assegurar a emer-

gência dos adultos. Os tubos de vidro foram tampados com algodão e mantidos na câmara de criação a  $25 \pm 1$  °C e 80% de UR.

Logo após a emergência, os adultos foram separados por sexo. Para cada experimento, foram utilizados 200 indivíduos por gaiola de criação de 30 x 30 x 15 cm, sendo 100 fêmeas de uma linhagem com 100 machos de outra e o mesmo procedimento no cruzamento recíproco. Duas outras gaiolas com igual número de machos e fêmeas da mesma linhagem serviram de controle. Para os testes de cruzamento foram utilizadas as gerações F2, F3, F4 e F5 das linhagens parentais.

A linhagem Ca-1 foi estabelecida como padrão e efetuou-se 16 tipos de cruzamento inter-linhagens, incluindo os recíprocos, a saber: a) Ca-1 x Pa-1; b) Ca-1 x RS-1; c) Ca-1 x Ba-1; d) Ca-1 x Al-1; e) Ca-1 x GO-1; f) Ca-1 x MT-1; g) Ca-1 x MT-2; h) Ca-1 x PP-1

Além destes cruzamentos, foi efetuado mais um, entre Ba-1 x Al-1, porque estas linhagens apresentaram diferenças nítidas entre os cromossomos sexuais, evidenciadas pela análise morfológica cromossômica e dos caracteres dos adultos e pela técnica de banda Q.

Todos estes experimentos foram repetidos no mínimo, 4 vezes, em épocas diferentes.

Na época da oviposição, o mesmo procedimento já descrito no ítem 3.3 de Material e Métodos, para obtenção dos ovos, foi efetuado. Uma vez obtidas posturas e verificadas a viabilidade dos ovos, estes eram transferidos para placas contendo meio de criação, aí permanecendo até completar o desenvolvimento larval.

Parte das larvas foram utilizadas para a análise do cariótipo, pelas técnicas já descritas anteriormente e, a outra parte foi empregada para dar continuidade às gerações dos híbridos.

Com os híbridos obtidos de cada cruzamento, foi efetuado o retrocruzamento com as linhagens parentais que lhe deram origem.

#### **4. Preparações Citológicas**

Cromossomos mitóticos de gânglio nervoso de larvas do 3º estágio de *C. hominivorax* foram obtidos utilizando-se uma pequena modificação do método original descrito por HALFER (1981) para *Drosophila melanogaster*.

Utilizou-se o seguinte procedimento : gânglio nervoso e discos imaginais de larva do início do terceiro estágio larval, foram dissecados diretamente em uma solução hipotônica

de citrato de sódio a 1% e transferidos para uma lâmina escavada, contendo a mesma solução. Foram testados vários tempos de incubação nesta solução, a saber: 10 minutos, como descrito por HALFER, 1981, e os tempos de 1 a 5 minutos. Os gânglios foram transferidos para o fixador contendo partes iguais de ácido acético e metanol (GATTI et alii, 1976) por 3 a 10 minutos. Em seguida, retirou-se a gota de fixador e uma pequena gota de ácido acético a 60% foi adicionada na preparação, causando, em poucos segundos, uma rápida desintegração do gânglio e a formação de uma suspensão celular. Gotas da suspensão celular, foram transferidas, por intermédio de uma micropipeta Pasteur, para uma lâmina limpa, anteriormente colocada em uma placa aquecida à cerca de 45 °C. Este método é simples e rápido, fornecendo figuras mitóticas com os cromossomos bem individualizados e distendidos.

Para a confecção do cariótipo e dos idiogramas das diferentes linhagens de *C. hominivorax*, as lâminas foram coradas com Giemsa a 4% por 20 minutos, lavadas e secas. Em seguida, as preparações foram submetidas à uma diafanização com xilol (MERCK), por 10 minutos, posteriormente secas a temperatura ambiente e em seguida montadas em Permount.

O número de larvas e de configurações mitóticas analisadas de cada uma das 9 linhagens, foi de pelo menos 85 configurações por linhagem. Este número foi variável, mas nunca menor do que 30 metáfases analisadas em lâminas diferentes de cada linhagem e de ambos os sexos. Este procedimento foi seguido também na análise das metáfases através de bandamento Q.

#### 4.1. Análise Morfométrica dos Cromossomos

As preparações fixadas e coradas com Giemsa foram utilizadas para medições dos cromossomos.

As lâminas foram analisadas e as metáfases mitóticas fotografadas com fotomicroscópios ZEISS e/ou LEITZ (DIALUX 20), utilizando-se a objetiva neofluor de imersão 100 x/1,30 Ph3. Utilizou-se filme AGFA PAN COPEX.

Os cromossomos das diferentes linhagens e dos cruzamentos foram medidos em 30 metáfases de lâminas diferentes, procurando-se para isso preparados onde todos os pares cromossômicos se encontravam bem individualizados. Os cálculos e a nomenclatura adotados foram as descritas em AZEREDO-ESPIN, 1982 e AZEREDO-ESPIN & PAVAN, 1983.

#### 4.2. Método de bandamento Q

Para o estudo do padrão de fluorescência, foi utilizada a quinacrina mostarda (SIGMA) de acordo com CASPERSON et alii (1968).



As lâminas contendo as preparações cromossômicas de gânglio nervoso foram hidratadas, passando por uma série decrescente de alcoóis: absoluto (PA), 70% e 50%, por 2 minutos, respectivamente e 20% por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão McIlvaine pH 4,5 a 37°C por 5 minutos. Para a coloração, utilizou-se quinacrina mostarda (SIGMA) em solução aquosa (0,5%), pH 4,8 a 37 °C, por duas horas. Preferimos utilizar este corante ao invés de diclorato de quinacrina, por termos obtido melhor resolução e evidenciamento das bandas Q. Além disso, com quinacrina mostarda, a fluorescência das bandas Q mantém-se por mais tempo quando submetida à análise pela luz ultra-violeta.

Após o período de incubação no corante, as lâminas passaram por 3 banhos em tampão McIlvaine na mesma temperatura (37 °C). As preparações foram montadas em tampão McIlvaine e as lamínulas foram seladas com esmalte de unha incolor para observação no fotomicroscópio LEITZ, modelo DIALUX 20, com sistema de epifluorescência acoplado com uma lâmpada de mercúrio HBO200.

As lâminas foram fotografadas com filme PLUS-X PAN, 125 ASA da KODAK e/ou TRI-X PAN, 400 ASA.

Com esta técnica foram utilizadas preparações cromossômicas de gânglio nervoso de larvas de 5 linhagens de *C. minimivorax*, Ca-1, RS-1, Ba-1, Al-1 e GO-1, e três tipos de cruzamentos, Ca-1 x RS-1, Ca-1 x Ba-1 e Ca-1 x Al-1, além dos

recíprocos.

O padrão da banda Q dos cromossomos metafásicos de glânglios nervosos da espécie saprófaga *Cochliomyia macellaria* linhagem de Campinas, foi também analisado utilizando-se esta técnica.

Esta análise foi conduzida para comparar os padrões de bandamento Q em duas espécies, que além de serem as principais dentro deste gênero, em importância médico-sanitária, foram durante muito tempo consideradas como mesma espécie, sendo a distinção entre elas somente estabelecida em 1933 por CUSHING & PATTON, que demonstraram poder diferenciá-las por seus hábitos alimentares.

## 5. Análise Morfométrica

Para esta análise, foram selecionados dezenove caracteres morfológicos externos de adultos com 24 horas pós-emergência de sete linhagens de *C. hominivorax*, para as quais foram também estabelecidos os padrões cariotípicos. Machos e fêmeas das diferentes linhagens foram medidos: 1. Porto Alegre-RS (linhagem RS-1); 2. Paulínia-SP (linhagem Pa-1); 3. Caraguatatuba-SP (linhagem Ca-1); 4. Presidente Prudente-SP (linhagem PP-1); 5. Caraguatatuba-SP (amostra Ca-2); 6. Morro do Chapéu-BA (linhagem Ba-1); 7. Alfenas-MG (linhagem Al-1)

As larvas foram coletadas em mífases expostas de bovinos, transportadas e mantidas no laboratório sendo as medidas obtidas em exemplares adultos F1, das larvas coletadas. Optou-se pela F1 de laboratório para assegurar que as variáveis disponibilidade de alimento e "stress" devido ao manuseio, retirada da ferida e condições do transporte das larvas do local de coleta do campo para o laboratório, não interferissem no peso e tamanho final dos adultos.

As moscas a serem medidas foram individualmente separadas na fase de pupa em tubos de ensaio tampados com algodão. Após a emergência os adultos, foram selecionados ao acaso, 25 fêmeas e 25 machos de cada linhagem, mortos com éter sulfúrico e montados em alfinetes entomológico<sup>s</sup> e medidos <sup>no</sup> em microscópio estereoscópico.

Apenas a asa esquerda foi utilizada para medidas. Esta era retirada pela base com auxílio de pinça e montada entre lâmina e lamínula em solução de Hoyer. Os caracteres de asa analisados consistiram de uma série de sete medidas lineares, que estão indicadas na figura (g) e tabela 9, a saber:

- 1- Comprimento entre a nervura R-m à R 4+5
- 2- Comprimento entre a nervura M3 + Cul à R1
- 3- Comprimento entre a nervura R-m à M3

- 4- Distância entre a nervura M3 + CuA, aM<sub>1+2</sub>
- 5- Distância entre a nervura R-m à bm-cu
- 6- Comprimento entre a nervura M3 + 4 à subcostal
- 7- Distância entre a nervura H à M1 + 2

Os seguintes doze caracteres morfológicos do corpo foram selecionados:

- 8- Sutura torácica (ST), que se refere ao comprimento da sutura torácica esquerda entre a mesopleura e a pteropleura;
- 9- Espiráculo (E), comprimento do espiráculo pro-torácico esquerdo;
- 10- Largura externa do olho (OE);
- 11- Largura interna do olho composto (OI);
- 12- Vibrissa oral (VO), distância entre as bases da vibrissa;
- 13- Antena (A), comprimento do terceiro segmento antenal;
- 14- Scutellum (S), comprimento do escutelo ao longo da linha mediana;
- 15- Scutum (SCU), comprimento do scutum ao longo da linha mediana;
- 16- Metafemur (MF), comprimento do metafemur da perna esquerda;
- 17- Metatáfia (MT), comprimento da metatáfia esquerda;

- 18- Metatarso (M), comprimento do metatarso esquerdo;
- 19- Segmento abdominal (SA), comprimento do segundo segmento ao longo da linha média dorsal.

Os caracteres e suas escalas de medidas estão indicados na tabela 9. Todos os resultados subsequentes estão expressos em micrômetros, de acordo com BRYANT (1977).

Todas as medidas foram efetuadas com uma ocular milimetrada, em microscópio estereoscópico LEITZ, em objetivos 16x, 25x e 40x, dependendo do carácter a ser medido. Preliminarmente foi feita a análise de variância individual dos 50 exemplares de cada linhagem e de cada uma das 19 variáveis medidas.

Em seguida, aplicou-se o teste de Tukey (MILLER, 1981) para se localizar quais das sete linhagens estudadas diferem entre si com relação às 19 variáveis. Para se verificar a distância (D2) entre as linhagens ou entre os indivíduos no espaço multivariado, foi calculada a distância de Mahalanobis (JOHNSON & WICHERN, 1982).

Entre as regiões foi aplicada a análise discriminante (NIE et alii, 1975) no sentido de diagnosticar dentre as 19 variáveis, quais as que possuem maior poder de discriminação.

ELA 9 - Designações, abreviações e descrições dos caracteres morfométricos analisados.

---

---

Comprimento da asa* (CA)	Distância entre a intersecção da nervura r-m com M a extremidade
Largura da asa* (LA)	Distância entre a extremidade distal R e M + Cu
Distância 1* (D1)	Distância entre a nervura r-m e M
Distância 2* (D2)	Distância entre nervura M + Cu e M
Distância 3* (D3)	Distância entre a nervura r-m e célula bm
Largura da asa	Distância entre a nervura M e subcostal
Distância 4* (D4)	Distância entre a nervura H e M
Sutura Toráxica (ST)	Distância entre a mesopleura e a pteropleura
Espiráculo* (E)	Comprimento do espiráculo protorácico esquerdo
Distância externa entre os olhos (DE)	Distância orbital externa
Distância interna entre os olhos (DI)	Distância orbital interna
Vibrissa Oral (VO)	Distância entre as bases da vibrissa oral
Antena (A)	Comprimento do terceiro segmento antenal ou flagelo
Scutelum (SC)	Comprimento do escutelo ao longo da linha mediana
Scutum (SCT)	Comprimento do escutum ao longo da linha mediana
Metafêmur* (MF)	Comprimento do metafêmur
Metatíbia* (MT)	Comprimento da metatíbia
Metatarso* (MTT)	Comprimento do metatarso
Segundo Segmento Abdominal (SA)	Comprimento do segundo tergito abdominal

---

---

Os apêndices simétricos, as medidas foram feitas no lado esquerdo

27 unidades = 1mm  
43 unidades = 1mm  
7,28 unidades = 1mm

TABELA 9 - Designações, abreviações e descrições dos caracteres morfométricos analisados.

1. Comprimento da asa* (CA)	Distância entre a intersecção da nervura r-m com M a extremidade d
2. Largura da asa* (LA)	Distância entre a extremidade distal R e M + Cu
3. Distância 1* (D1)	Distância entre a nervura r-m e M
4. Distância 2* (D2)	Distância entre nervura M + Cu e M
5. Distância 3* (D3)	Distância entre a nervura r-m e célula bm
6. Largura da asa	Distância entre a nervura M e subcostal
7. Distância 4* (D4)	Distância entre a nervura H e M
8. Sutura Toráxica <sup>e</sup> (ST)	Distância entre a mesopleura e a pteropleura
9. Espiráculo* (E)	Comprimento do espiráculo protorácico esquerdo
10. Distância externa entre os olhos (OE)	Distância orbital externa
11. Distância interna entre os olhos (OI)	Distância orbital interna
12. Vibrissa Oral (VO)	Distância entre as bases da vibrissa oral
13. Antena (A)	Comprimento do terceiro segmento antenal ou flagelo
14. Scutelum (SC)	Comprimento do escutelo ao longo da linha mediana
15. Scutum (SCT)	Comprimento do escutum ao longo da linha mediana
16. Metafêmur* (MF)	Comprimento do metafêmur
17. Metatíbia* (MT)	Comprimento da metatíbia
18. Metatarso* (MTT)	Comprimento do metatarso
19. Segundo Segmento Abdominal (SA)	Comprimento do segundo tergito abdominal

\* Dos apêndices simétricos, as medidas foram feitas no lado esquerdo

1- 27 unidades = 1mm

2- 43 unidades = 1mm

3- 17,28 unidades = 1mm

minação entre as linhagens estudadas. Utilizou-se a técnica "step-wise" para a seleção de variáveis com maior poder de discriminação e o método de WILKS para controlar a seleção de variáveis.

Além da análise das médias de cada variável, foram estabelecidas 26 relações entre os diferentes caracteres, a saber:

1. Comprimento R-m à R 4+5 / M3 + Cu1 à R1 (R1)
2. Comprimento R-m à R 4+5 / R-m à M3 (R2)
3. Comprimento R-m à R 4+5 / M3 + Cu1 à M3 (R3)
4. Comprimento R-m à R 4+5/M3+4 à Rm à A1 + CuA2
5. Comprimento R-m à R 4+5 / M3+4 à subcostal (R5)
6. Comprimento R-m à R 4+5 / H à M1+2 (R6)
7. Comprimento R1 à M3 + Cu1/ R-m à M3 (R7)
8. Comprimento R1 à M3 + Cu1/ M3 + Cu1 à M3 (R8)
9. Comprimento R1 à M3 + Cu1/ R-m à A1 + CuA2 (R9)
10. Comprimento R1 à M3 + Cu1/ M3+4 à subcostal (R10)
11. Comprimento R1 à M3 + Cu1/ H à M1+2 (R11)
12. Comprimento R-m à M3 / M3 + Cu1 à M3 (R12)
13. Comprimento R-m à M3 / R-m à A1 + CuA2 (R13)
14. Comprimento R-m à M3 / M3+4 à subcostal (R14)
15. Comprimento R-m à M3 / H à M1+2 (R15)
16. Comprimento M3 + Cu1 à M3/ R-m à A1 + CuA2 (R16)
17. Comprimento M3 + Cu1 à M3/M3+4 à subcostal (R17)
18. Comprimento M3 + Cu1 à M3/ H à M 1+2 (R18)



19. Comprimento R-m à A1 + CuA2/H à M3+4 à subcostal (R19)
20. Comprimento R-m à A1 + CuA2/ H à M1+2 (R20)
21. Comprimento M3+4 à subcostal / H à M1+2 (R21)
22. Largura OE / Largura OI (R22)
23. Scutellum / Scutum (R23)
24. Metafemur / Metatibia (R24)
25. Metafemur (MF) / Metatarso (M) (R25)
26. Metatibia (MT) / Metatarso (M) (R26)

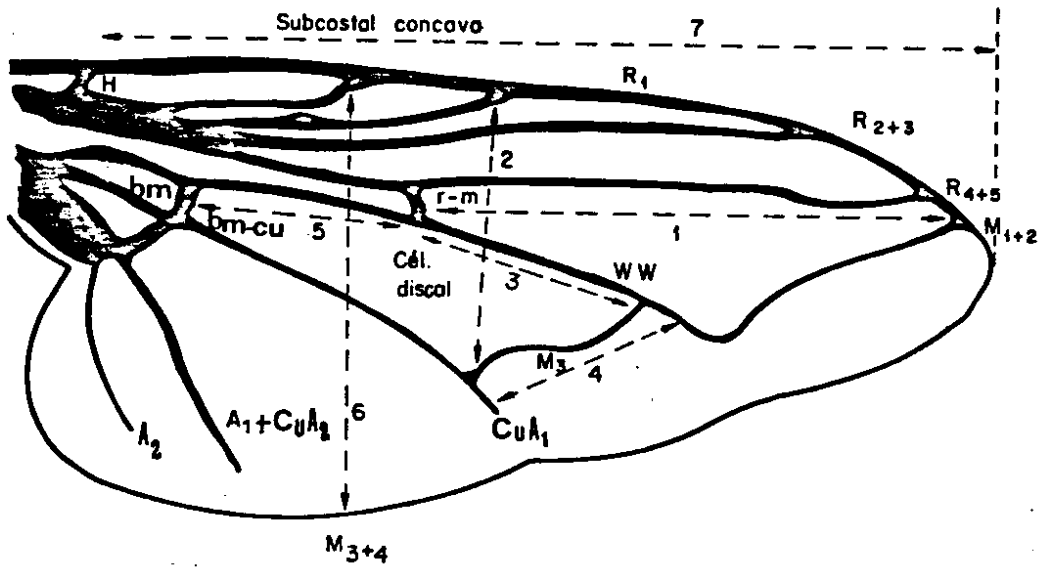
Para esta relação, foram aplicadas as mesmas técnicas utilizadas anteriormente, isto é, teste de F, análise de variância, teste de Tukey e análise discriminante. Estas técnicas foram igualmente realizadas em separado para cada sexo.

Para as análises estatísticas, foram utilizados os programas SPSS instalados no computador DEC-10 pertencente à Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e o software SAS instalado no computador do Instituto de Pesquisa de Energia Nuclear (IPEN) de São Paulo.

---

\* O teste de Tukey foi aplicado para se localizar quais as linhagens de *C. hominivorax* que diferem entre si com relação a cada um dos caracteres medidos e relações estabelecidas entre eles.

Figura h -- Representação da asa de um califorídeo, indicando as diferentes medidas entre as nervuras utilizadas para a análise morfométrica.



## IV - RESULTADOS

### IV.1. Cariótipo das diferentes linhagens de *Cochliomyia hominivorax*

*C. hominivorax* apresenta um complemento somático de  $2n = 12$  cromossomos, sendo cinco pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais, estes últimos homomórficos nas fêmeas (XX) e heteromórficos nos machos (XY), sendo o Y menor que o X.

Nas oito linhagens de *C. hominivorax*, onde o complemento cromossômico corado com Giemsa foi analisado, verificou-se uma variabilidade cariotípica com relação ao número e localização das constrições secundárias nos pares de autossomos 2, 3 e 6, além da morfologia e tamanho dos cromossomos X e principalmente do Y.

Como indicam as Figuras 1 e 1B, quando se comparan as várias linhagens, é possível diferenciar além dos três previamente descritos (Azeredo-Espin, 1982), para *Cochliomyia hominivorax*, seis cariótipos a saber: Ca-2, RS-1, Ba-1, MT-2 além dos A1-1 = PP-1 e GO-1 = MT-1 = Pa-1.

Em diferentes amostras de larvas de *C. hominivorax*, coletadas em Caraguatatuba, mais especificamente, nos meses de

**Figura 1A** - Cariótipo de macho das linhagens de *Cochlioomya hominivorax* de: a) Caraguatatuba (amostra de Ca-2); b) Paulínia (Pa-1); c) Presidente Prudente (PP-1); três localidades do Estado de São Paulo; d) Porto Alegre-RS (RS-1); e) Morro do Chapéu-BA (BA-1); f) Alfenas-MG (Al-1); g) Itaberaí-GO (GO-1); h) Chapada dos Guimarães-MT (MT-1); i) Poconé-MT (MT-2).

	x	y	2	3	4	5	6	
a	ii	.						Co-2
b	.	.						Pa-1
c	.	.						PP-1
d	i	.						RS-1
e	.	.						BA-1
f	.	.						AL-1
g	.	.						GO-1
h	.	.						MT-1
i	.	.						MT-2

10 4

Janeiro e fevereiro de 1985, identificou-se um cariótipo que, especialmente devido a diferença na morfologia do cromossomo X e presença de uma constrição secundária mediana no braço longo do par acrocêntrico 6, foi classificado como um novo cariótipo para esta localidade. A amostra contendo este complemento cromossômico foi denominada Ca-2, diferenciando-a de Ca-1, já descrita em Azeredo-Espin (1982).

Esta amostra Ca-2 difere de Ca-1, com relação aos cromossomos X, que embora apresentem relativamente o mesmo tamanho são morfologicamente bem diferentes. Como indicam as Figuras 3 e 4, o cariótipo da fêmea apresenta dois tipos de cromossomos X. Um deles é igual ao X de Ca-1, sendo que o outro X parece ser metacêntrico, com uma constrição secundária proximal no braço longo e neste mesmo braço apresenta um satélite. Nesta amostra o par 3 tem uma constrição secundária nem sempre visível subterminal no braço longo, como indica a Figura 4, como também a que observamos em Ca-1, no braço curto deste par. O fato de apresentar dois tipos morfologicamente distintos de cromossomos X, sugere que deve corresponder ao cariótipo de uma fêmea híbrida. Esta verificação pôde ser confirmada, quando foram analisadas lâminas de testículos de machos na fase de pupa desta amostra, onde o cromossomo Y, é como em Ca-1, também metacêntrico e menor que X. Esta confirmação foi necessária uma vez que, nesta espécie não é possível diferenciar as gônadas durante a fase larval, sendo necessário a dissecação de pupas para a análise da mitose nas espermatogônias e oogônias.

**Figura 2 - Cromossomos mitóticos de gânglio nervoso de larvas coradas com Giemsa da linhagem Ca-1 de Cochliomyia hominivorax (Caraguatatuba-SP) estabelecida como padrão: (2) metáfase de fêmea.**

**Figuras 3, 4 e 5 - Metáfases de cromossomos mitóticos da amostra de Ca-2 (3 e 4) metáfases de fêmeas, em que se observa os cromossomos X morfologicamente diferentes da fêmea híbrida. A seta no par 6 autossômico e no par 3 indicam a constrição secundária (CS) mediana no braço longo e no curto do par 2. (5) metáfase de macho em que se observa o cromossomo Y metacêntrico igual ao de Ca-1 bem como o X (ver figura 2).**

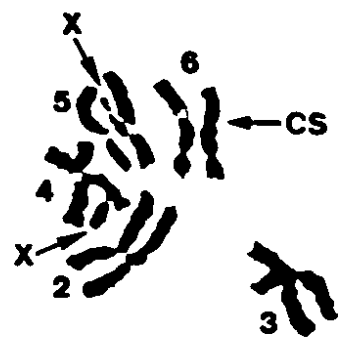
**Figuras 6, 7 e 8 - Cromossomos mitóticos corados com Giemsa da linhagem RS-1. (6) metáfase de macho em que se observa a constrição secundária (CS) mediana no par 3. Prometáfase da fêmea (7) onde as setas indicam as constrições secundárias (CS) subterminal to do par 2 e mediana no braço curto par 3 e no braço longo do par 6. (8) metáfase da fêmea.**

**A escala de 10 um é válida para todas as figuras.**





2



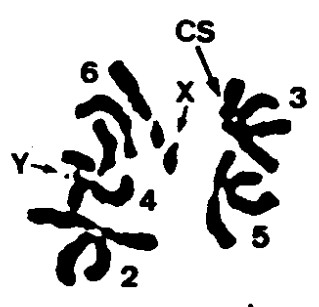
3



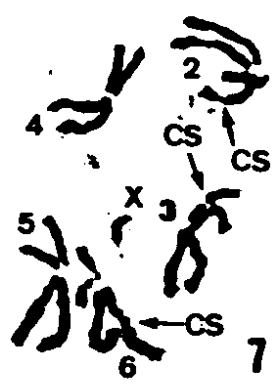
4



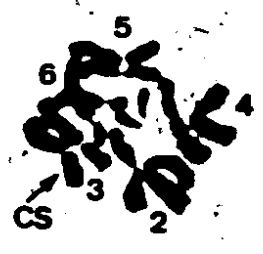
5



6



7



8

104

A partir da observação das diferenças cariotípicas existentes entre Ca-1 e Ca-2, foi efetuada a análise morfométrica dos caracteres dos adultos destas duas amostras. Foram também encontradas diferenças significativas entre essas duas amostras (ver páginas 82, 83 e 34 do ítem IV 5.1 de Resultados).

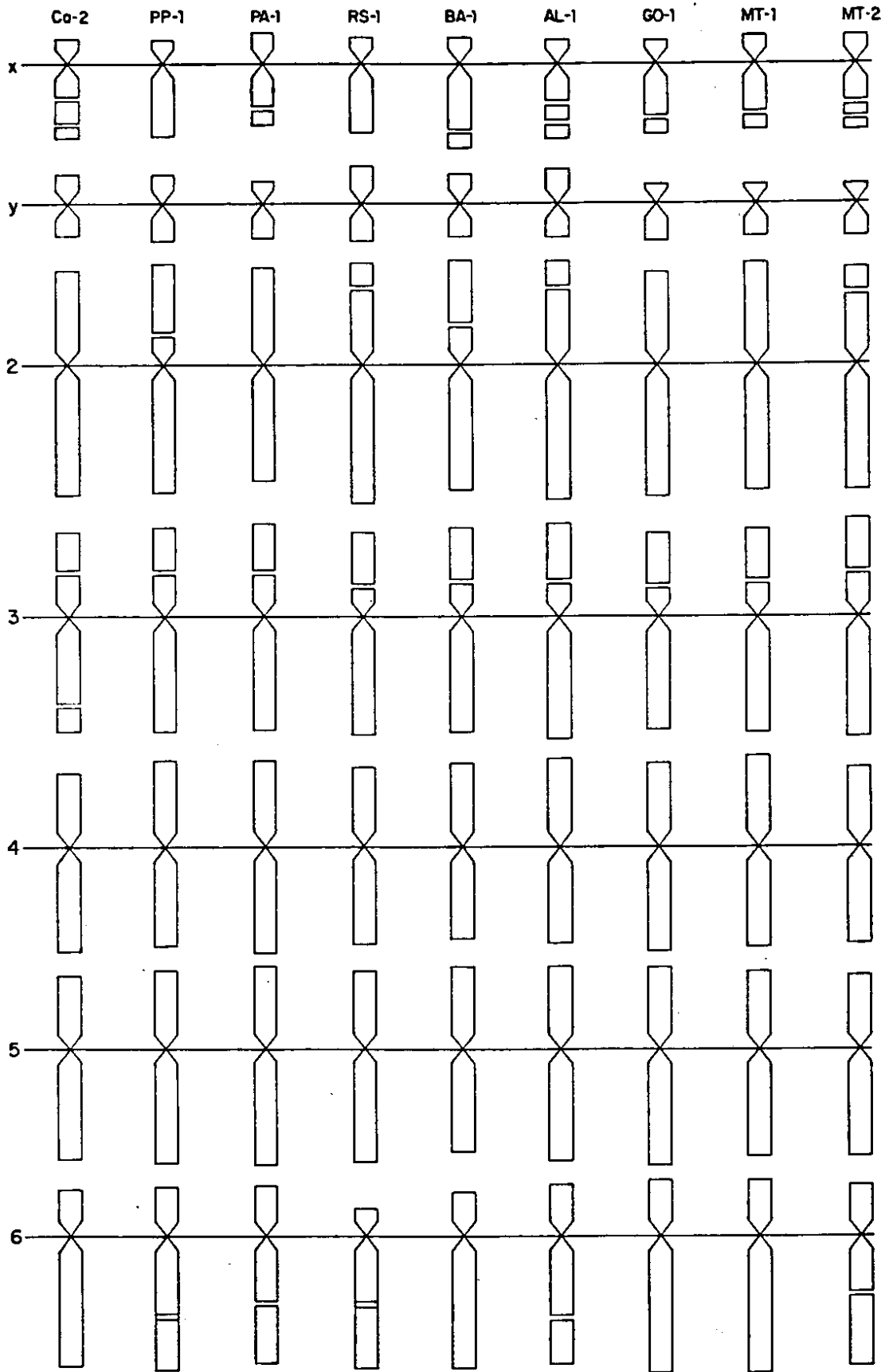
Provavelmente, o cariótipo observado na amostra Ca-2 deve corresponder a de um híbrido, pois como será descrito no ítem IV.2 de Resultados, os cromossomos X morfologicamente diferentes observados nesta linhagem, foram detectados em amostras de *C. hominivorax* coletada em Poconé, Mato Grosso (linhagem MT-2), que será descrita posteriormente (Figura 34). Além disto, o cariótipo do híbrido de fêmeas correspondente ao cruzamento entre macho Ca-1 x fêmea MT-2, apresenta os dois tipos de cromossomos X descritos para as linhagens parentais que lhe deram origem.

Deve-se ressaltar que, para linhagens brasileiras de *C. hominivorax*, esta foi a primeira vez que se observa a ocorrência de um cariótipo híbrido na natureza, aqui no Brasil.

A provável proveniência deste cariótipo parece ser da região do Mato Grosso do Sul. Esta interpretação baseia-se na análise cariotípica de amostras de *C. hominivorax* coletadas no Pantanal Matogrossense (Poconé), e nos experimentos de cruzamentos realizados entre esta linhagem e Ca-1, considerado padrão, como será descrita no ítem IV.2 de Resultados .

**Figura 1B - Idiogramas representativos dos cariótipos das linhagens e amostras de *Cochliomyia hominivorax* de: a) Caracuatatuba-SP (amostra Ca-2); Presidentes Prudente-SP (linhagem PP-1); Porto Alegre-RS (linhagem RS-1); Morro do Chapéu-BA. (linhagem BA-1); Alfenas-MG (linhagem Al-1); Itaberaí-GO (linhagem GO-1); Chapada dos Guimarães-MS (linhagem MT-1); Poconé-MT (linhagem MT-2).**

As constrictões secundárias observadas, estão indicadas por duas linhas paralelas e transversais no braço do cromossomo. O estrangulamento que coincide com o ponto de origem do eixo da abcissa representa a posição do centrômero.



Através destas análises e, considerando-se que no Brasil, o tráfico de bois de uma região para outra é uma prática muito frequente, a ocorrência deste híbrido, em condições naturais, pode ser explicada, embora sua frequência tenha sido baixa.

Na linhagem PA-1, o cromossomo 3 apresenta uma constrição secundária mediana no braço curto, semelhante a de Ca-2, e outra também mediana, no braço longo do par 6. Como indicado na Tabela 1, verifica-se que o comprimento relativo (CR) dos autossomos desta linhagem se assemelha ao de GO-1. O cromossomo X de Pa-1 contém um satélite e o braço longo possui duas constrições, uma mediana, outra subterminal (Figura 1B). além de ser maior que o Y, ou seja, CR do X = 6,37 e CR do Y = 2,71 Tabela 1. O Y é submetacêntrico, semelhante ao de GO-1 e MT-1 (Tabela 2), apresentando inclusive, aproximadamente o mesmo tamanho, isto é, CR de GO-1 = 2,61 e MT-1 = 2,75 (Tabela 1).

A linhagem RS-1 difere das demais, por apresentar uma constrição secundária na região subterminal do braço curto do par 2 outra na região próxima ao centrômero do braço curto do par 3, como também na região mediana do par 6. Estas constrições estão indicadas nas Figuras 1B, 6, 7 e 8. O cromossomo X é também acrocêntrico, com um satélite em uma das extremidades e o Y é metacêntrico, um pouco menor que o X, ou seja, Y = 4,80 e X = 6,34 (Tabela 1 e 2). As linhagens Al-1 = PP-1 e Ba-1, tem em comum uma constrição secundária mediana no braço curto do par 3. No entanto, no par 2, embora as três linhagens apresentem constrição no braço curto, sua localização é dife-

TABELA 1 - Comprimento relativo dos pares de cromossomos, expressos em percentagem do comprimento total do complemento (% CTC) das linhagens de *Cochliomyia hominivorax* (média e desvio padrão de 25 metafases de cada linhagem) de: Caraguatatuba (CA-1 e CA-2); Presidente Prudente (PP-1); Paulínia (PA-1); Porto Alegre (RS-1); Alfenas (AL-1); Morro do Chapéu (BA-1); Itaboraí (GO-1); Chapada dos Guimarães (MT-1); Poconé (MT-2)

Linhagens	Pares de Cromossomos (% CTC)						Média do CTC em um	Comprimento em um		
	X	Y	2	3	4	5		6	X	Y
CA-1	6,86 1,09	4,70 1,12	22,22 0,85	19,28 0,81	16,43 1,03	18,21 0,66	16,89 0,73	27,75 4,41	2,0 0,18	1,18 0,17
CA-2	7,01 0,56	4,63 1,01	21,23 0,94	18,94 0,75	16,56 1,01	19,51 0,89	16,75 0,76	28,25 3,32	2,15 1,01	1,07 0,83
PP-1	7,04 1,14	4,13 1,0	21,42 1,08	19,18 1,31	16,74 0,92	17,40 1,08	16,11 1,31	26,42 2,98	1,98 0,84	1,12 0,79
PA-1	6,37 0,92	2,71 0,14	20,24 1,18	18,93 1,18	17,48 1,42	18,07 0,90	16,16 1,19	29,38 4,18	1,59 0,18	0,68 0,1
RS-1	6,34 0,64	4,80 0,49	22,03 1,52	18,60 0,67	15,66 1,0	16,95 1,05	15,59 1,77	31,22 2,45	1,60 0,65	0,56 0,25
AL-1	7,49 1,30	4,6 0,66	22,62 1,96	20,14 1,36	16,26 2,12	17,90 1,06	15,78 1,18	32,01 3,21	2,21 0,76	0,48 0,38
BA-1	8,03 1,08	4,29 0,90	21,30 1,31	18,55 1,42	14,78 1,64	17,17 1,43	15,86 1,48	28,46 2,25	2,58 0,65	1,95 0,86
GO-1	6,03 0,94	2,61 0,52	20,80 1,75	18,36 1,18	16,77 1,30	18,10 0,62	17,28 1,42	29,31 2,38	1,77 0,33	0,77 0,19
MT-1	6,48 0,30	2,75 0,33	21,84 1,05	18,62 0,86	16,76 0,95	16,71 0,56	16,79 1,16	28,26 3,70	1,86 0,15	0,77 0,08
MT-2	8,10 0,92	3,20 0,99	21,11 2,26	19,80 1,48	15,99 0,69	16,38 1,08	16,64 1,32	37,32 4,82	2,56 0,75	1,5 0,89

TABELA 2 - Relação de braços dos pares de cromossomos (média e desvio padrão de 20 metáfases) das linhagens de *Cochliomyia hominivorax* de Caraguatatuba (CA-1 e CA-2); Presidente Prudente (PP-1); Paulínia (PA-1); Porto Alegre (RS-1); Alfenas - MG (AL-2); Morro do Chapéu (BA-1); Itaboraí (GO-1); Chapada dos Guimarães (MT-1) e Poconé (MT-2)

Linhagens de C. hominivorax	Pares de Cromossomos						
	X	Y	2	3	4	5	6
CA-1	3,05 0,44	1,70 0,15	1,39 0,12	1,39 0,09	1,46 0,18	1,51 0,24	3,0 0,72
* tipo de cromossomo	st	M	M	M	M	M	SM
CA-2	*1,40 0,5	1,80 0,09	1,28 0,56	1,25 0,11	1,37 0,23	1,48 0,36	3,2 0,65
tipo de cromossomo	M	M	M	M	M	M	M
PP-1	5,95 1,46	1,20 0,44	1,25 0,08	1,32 0,15	1,20 0,10	1,50 0,15	3,52 0,87
tipo de cromossomo	st	M	M	M	M	M	st
PA-1	4,20 0,44	2,83 0,74	1,23 0,08	1,26 0,10	1,27 0,20	1,42 0,22	2,96 0,23
tipo de cromossomo	st	SM	M	M	M	M	SM
RS-1	4,20 1,43	1,13 0,21	1,36 0,19	1,48 0,20	1,23 0,18	1,42 0,20	3,81 1,14
tipo de cromossomo	st	M	M	M	M	M	SM
AL-1	5,05 1,11	1,06 0,14	1,30 0,16	1,38 0,16	1,08 0,07	1,38 0,26	3,22 0,37
tipo de cromossomo	st	M	M	M	M	M	SM
BA-1	7,54 3,26	1,16 0,28	1,22 0,13	1,40 0,12	1,13 0,09	1,28 0,18	3,73 1,22
tipo de cromossomo	st	M	M	M	M	M	SM
GO-1	4,96 1,32	2,30 0,44	1,52 0,30	1,36 0,59	1,23 0,19	1,40 0,20	2,7 0,26
tipo de cromossomo	st	SM	M	M	M	M	SM
MT-1	5,4 0,48	3,20 0,97	1,30 0,11	1,45 0,20	1,13 0,11	1,44 0,07	3,16 0,46
tipo de cromossomo	st	M	M	M	M	M	SM
MT-2	3,47 0,66	2,80 1,10	1,32 0,08	1,30 0,18	1,28 0,21	1,49 0,14	2,88 0,64
tipo de cromossomo	st	SM	M	M	M	M	SM

\* De acordo com o sistema de LEVAN et alii (1964): M = metacêntrico; SM = submetacêntrico; ST = centrômero localizado na região subterminal, também denominado de acrocêntrico.

rente, ou seja, em PP-1 e Ba-1 esta é proximal e em AL-1 é subterminal. Além disto, Al-1 apresenta constricção mediana no braço longo do par 6, ausente em Ba-1 (Figuras, 9, 11, 13 e 14). Com relação ao X, embora nestas linhagens eles sejam acrocêntricos (centrômero na região subterminal), com um satélite na extremidade, e apresentem aproximadamente o mesmo tamanho, os de PP-1 e Ba-1 possuem apenas uma constricção secundária subterminal no braço longo, enquanto que em Al-1 observam-se em algumas preparações duas constricções muito próximas e, portanto, visíveis apenas quando o cromossomo X está bem distendido (Figura 12). O Y destas linhagens é metacêntrico e, como indica a Tabela 1 de CTC, é muito pequeno e proporcionalmente bem menor que o X, isto é, (X = 7,04 e Y = 4,13 para PP-1; X = 7,49 e Y = 4,29 para AL-1 e X = 8,03 e Y = 4,29 para Ba-1). Como será descrito no item 4.3 de Resultados, o Y de Al-1 e Ba-1 pode ser identificado pela técnica de bandamento Q, cujo padrão de fluorescência é diferente (Figura 54 e 58).

As linhagens de GO-1, MT-1 e Pa-1, são cariotipicamente muito semelhantes, apresentando constricção secundária proximal no par 3. Este é o único autossomo que, destas linhagens, apresenta constricção secundária visíveis na maioria das prometáfases a metáfases analisadas (Figura 17, 19 e 23). O cromossomo X é muito semelhante aos anteriormente descritos para as linhagens Ca-1 e RS-1, como indicam as Figuras 17, 19 e 23.

A diferença mais evidente de Pa-1, MT-1, GO-1 e MT-2 com relação às demais linhagens, se referem ao Y que, nestas linhagens, é submetacêntrico, sendo o braço curto muito pequeno, algumas vezes se assemelhando a um satélite, como indicado nas Figuras 17, 19, 21 e 23.



**Figuras 9, 10 e 11** - Cromossomos mitóticos de gânglio nervoso de larvas coradas com Giemsa, da linhagem Ba-1. (9) metáfase de fêmea, em que se observa as constrictões secundárias (CS) no braço curto do par 2 e 3. (10) prometáfase de macho em que se observa o cromossomo Y metacêntrico um pouco menor que o X. (11) metáfase de fêmea.

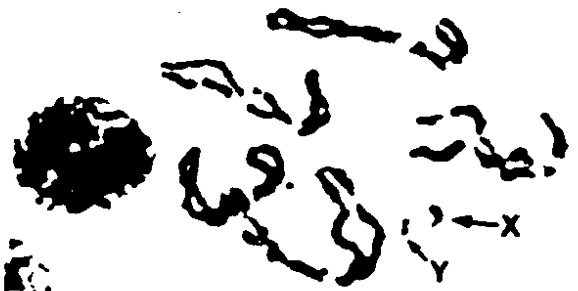
**Figuras 12, 13 e 14** - Metáfases de machos da linhagem Al-1 (Alfenas-MG). Na figura (12) a seta indica a constrictão secundária (CS) mediana no braço curto do par 3 autossômico. O cromossomo Y é metacêntrico. No cromossomo X, é possível observar, quando bem distendido, duas constrictões secundárias próximas no braço longo. (13) esta metáfase indica a constrictão secundária (CS) subterminal no braço curto do par 2 autossômico e outra mediana no par 6, é mais evidente na figura (14).

**Figuras 15 e 16** - Metáfases de fêmea e macho respectivamente da linhagem PP-1 (Presidente Prudente-SP), em que se observa a constrictão secundária (CS) proximal no braço curto do par 3. Os cromossomos X apresentam uma constrictão secundária subterminal no braço longo e o cromossomo Y é metacêntrico (16).

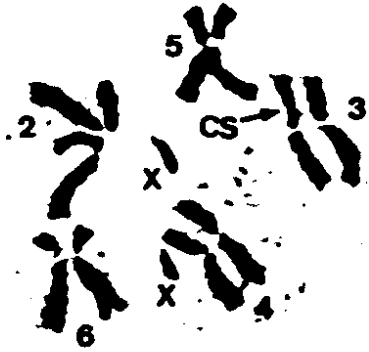
A escala de 10 um é válida para todas as figuras.



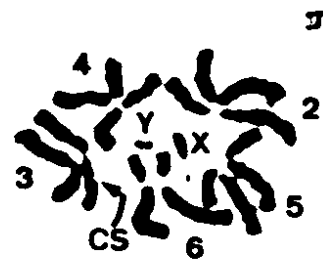
9



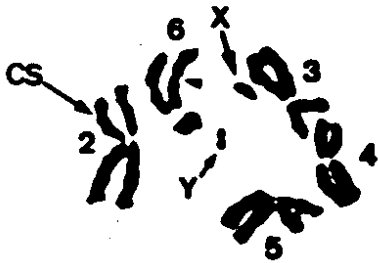
10



11



12



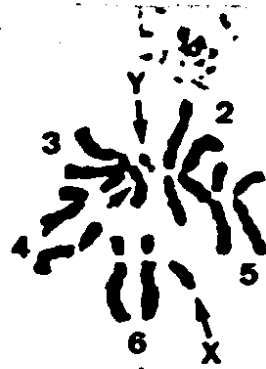
13



14



15



16

104

Deve-se ressaltar que também em Mato Grosso, em duas amostras de larvas coletadas na mesma época do ano, ou seja, fevereiro de 1986, mas, em regiões diferentes, isto é, Chapada dos Guimarães e Poconé, esta última no pantanal Matogrossense, foram encontrados dois tipos de cariótipos. Por este motivo, denominamos estas duas linhagens de MT-1 e MT-2, respectivamente, sendo que ambas estão sendo mantidas em condições de laboratório e se encontram na geração F7.

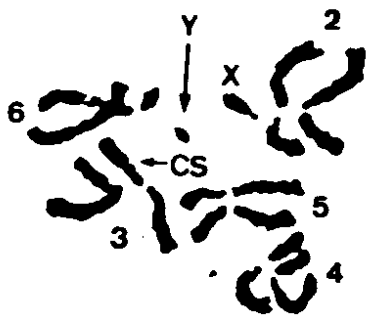
As Figuras 19, 20, 21 e 22, indicam que estas linhagens diferem quanto ao número e localização das constricções secundárias, nos autossomos e no X. Como já descrito acima, apenas o par 3, possui constricção em MT-1, enquanto que MT-2 apresenta uma na região subterminal do braço curto, no par 2, uma proximal no braço curto do par 3 e outra mediana no par 6, que estão representadas no idiograma (Figura 1B e nas Figuras 21 e 22). O cromossomo X de MT-2 é acrocêntrico, com um satélite na extremidade mas, difere de MT-1 por ser um pouco maior, ou seja, em MT-2 o comprimento relativo do X é de 8,16 e o MT-1 de 6,48, e, principalmente por apresentar duas constricções secundárias próximas no braço longo, de tal forma que, em algumas preparações estas parecem dividir este braço cromossômico simetricamente (Figuras 21 e 22).

**Figuras 17 e 18** - Cromossomos mitóticos de gânglios nervosos de larvas coradas com Giemsa da linhagem GO-1 (Itaberaí-GO) (17) metáfase de macho em que se observa a constrição secundária (CS) proximal no braço curto do par 3. A seta indica o cromossomo Y submetacêntrico desta linhagem. (18) metáfase de fêmea, em que se observa os cromossomos X acocêntricos com uma constrição secundária subterminal no braço longo.

**Figuras 19 e 20** - Cromossomos mitóticos da linhagem MT-1 (Chapada dos Guimarães-MS). Esta linhagem apresenta cariótipo muito semelhante ao da linhagem GO-1 sendo o Y também submetacêntrico e o par 3 apresenta constrição secundária na mesma região. Figura (19) metáfase de macho e (20) de fêmea.

**Figuras 21 e 22** - Cromossomos mitóticos da linhagem MT-2 (Poconé-MT). (21) metáfase de macho. O cromossomo Y é igual ao de MT-1, porém a linhagem MT-2 difere desta última por apresentar constrição secundária (CS) subterminal no braço curto do par 2 autossômico e outra mediana no braço longo do par 6. (22) metáfase de fêmea, em que se observa os cromossomos X morfologicamente diferentes, sendo um semelhante a MT-1 e outro, com duas constrições secundárias (CS) muito próximas no braço longo, semelhante a observada na amostra Ca-1 (figura 3 e 4).

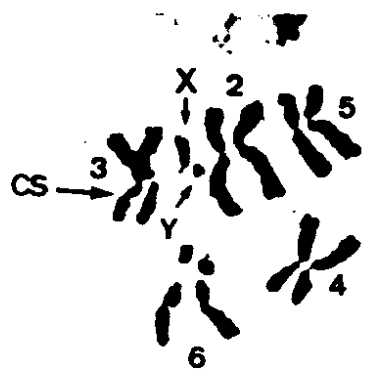
**Figuras 23 e 24** - Cromossomos mitóticos da linhagem Pa-1 (Paulínia-SP). (23) metáfase de macho, com o Y submetacêntrico semelhante a MT-1 e GO-1 e MT-2. Esta linhagem foi considerada cariotipicamente muito semelhante a MT-1, como indica a figura 24, que é metáfase de um macho. A escala de 10 um é válida para todas as figuras.



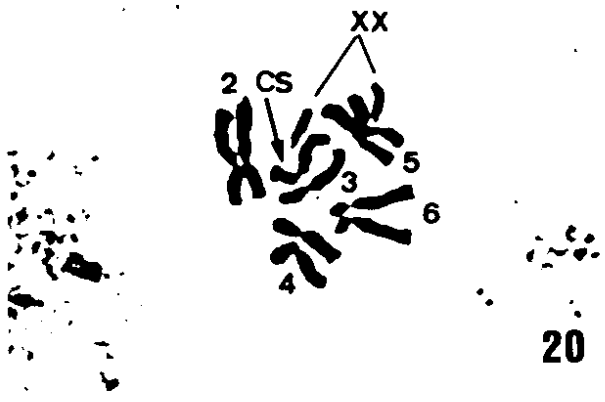
17



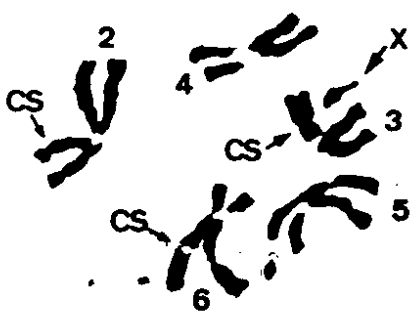
18



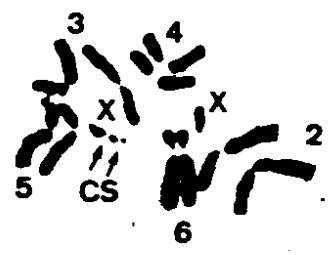
19



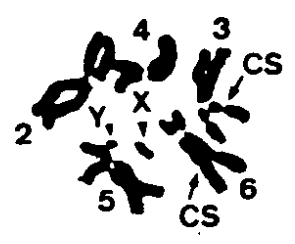
20



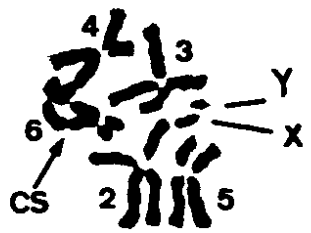
21



22



23



24

104

#### IV.2. Cariótipo dos híbridos F1 resultantes dos cruzamentos entre as diferentes linhagens de *Cochliomyia hominivorax*

Como será descrito no ítem 4.4, em todos os testes de cruzamento interlinhagens, foram obtidos híbridos férteis. Além disso, utilizamos a linhagem Ca-1 como padrão, por ser esta linhagem criada em massa no laboratório e ter se adaptado muito bem às condições experimentais.

Os cariótipos dos híbridos, quando corados com Giemsa, apresentaram as diferenças esperadas entre cromossomos homólogos de diferentes origens, isto é, com relação à localização das constricções secundárias e à morfologia dos cromossomos.

Os resultados das características cariotípicas derivadas dos cruzamentos realizados, serão descritos a seguir :

(a) Ca-1 x RS-1 162 metáfases mitóticas foram analisadas nas preparações cromossômicas de 64 larvas da F1 do cruzamento entre macho Ca-1 x fêmea RS-1, e de 70 dos recíprocos (fêmea de Ca-1 x macho RS-1). O par 3 apresenta uma constricção secundária, em ambos os homólogos, isto é, uma mediana no braço curto, que corresponde ao autossomo 3 descrito por Azeredo-Espin, 1982, para Ca-1. O braço curto do par 6 submetacêntrico de RS-1 é menor do que o de Ca-1 e é possível em algumas preparações observar esta diferença neste par cromossômico do híbrido, como indica a Figura 26. Neste par, o homólogo que cor-

responde ao de Rs-1 apresenta uma constrição secundária mediana no braço longo, sendo que o homólogo deste par proveniente de Ca-1, não apresenta constrição (Figura 25).

Os cromossomos sexuais só apresentam variação de tamanho nos híbridos, uma vez que morfologicamente, tanto o X como o Y, em ambas as linhagens, são muito semelhantes (Figuras 26 e 27 e Tabela 2). Tanto o X como o Y de RS-1 são um pouco maiores que os de Ca-1, como indica a Tabela 1. Desta forma, no híbrido do sexo masculino derivado de fêmea Ca-1 x macho RS-1, o cromossomo Y e o X são quase do mesmo tamanho (Figuras 1 e 27).

(b) Ca-1 x Al-1 De um total de 82 larvas da F1 e 183 figuras mitóticas de gânglio nervoso foram analisadas. Os resultados obtidos indicam que as diferenças entre estas duas linhagens são mantidas no híbrido, isto é as características dos cromossomos de cada parental estão presentes (Figuras 1 e 28). Neste caso, o híbrido apresenta uma constrição secundária mediana no par 3, que está presente em ambas as linhagens parentais (Figura 28). No par 6, os homólogos apresentam uma constrição secundária subterminal no braço longo (Figura 31). A diferença mais evidente é observada nos cromossomos sexuais. O híbrido proveniente deste cruzamento, quando é macho apresenta o Y do progenitor masculino que, no caso de macho Al-1 x fêmea Ca-1, é metacêntrico, mas bem menor que o Y de Ca-1. As fêmeas da F1, apresentam cromossomos Xs morfologicamente diferentes (Figuras 29 e 30), um apresentando duas constrições secundárias, uma mediana e outra subterminal, no braço longo do X, herdado de Al-1 e outro igual ao de Ca-1.

(c) Ca-1 x Ba-1 Foram analisadas 215 prometáfases e metáfases de mitose derivadas de um total de 43 larvas de fêmea Ca-1 x macho Ba-1 e 51 do recíproco. O par 3 tem a mesma constrição mediana no braço curto referida anteriormente para Ca-1 e Ba-1. Os homólogos do par 6 apresenta constrição secundária no braço longo, como em Ba-1 (Figura 39). No híbrido macho proveniente tanto de fêmea Ba-1 x macho Ca-1, como do recíproco, o comprimento do Y é aproximadamente igual ao do X (Figuras 40 e 42), embora o cromossomo Y de Ba-1, seja um pouco menor que o Y de Ca-1 (Tabela 1).

(d) Ca-1 x GO-1 - MT-1 e PP-1 Ambas as linhagens analisadas, GO-1 e MT-1, como já mencionado anteriormente (item 4.1 Resultados), apresentam o mesmo padrão cariotípico. Nos híbridos, somente no par 3 ocorre uma constrição secundária (Figura 36), que corresponde ao das 3 linhagens parentais. No cruzamento de macho de GO ou MT-1 x fêmea Ca-1, o Y do híbrido é submetacêntrico e bem pequeno, correspondendo, em tamanho, ao satélite do X de Ca-1, sendo portanto, facilmente diferenciado do híbrido do sexo masculino do recíproco, que apresenta o Y metacêntrico, herdado de Ca-1, como também um comprimento relativo semelhante ao cromossomo X de Go-1 e MT-1 (Tabela 1 e Figuras 37 e 38).

(e) Ca-1 x MT-2 De um total de 72 larvas da F1, 246 metáfases foram analisadas (sendo 115 fêmeas Ca-1 x machos MT-2 e 131 do recíproco). O cariótipo dos híbridos apresenta, no par 2 (de ambos os homólogos), as duas constrições secundárias já descritas em



**Figuras 25 a 42** - Cromossomos mitóticos de gânglios nervosos de larvas coradas com Giemsa, dos diferentes cruzamentos interlinhagens de *Cochliomyia hominivorax* (25,26) metáfases de macho e fêmea, respectivamente de macho Ca-1 x fêmea RS-1 em que se observa uma constrição mediana no braço curto do par 3. A seta da figura 25, indica a constrição secundária (CS) mediana no par 6, em apenas um dos homólogos, constrição igual a RS-1. Os cromossomos X de um híbrido fêmea (26). Figura (27) metáfase de híbrido do sexo masculino resultante do cruzamento recíproco, ou seja, macho RS-1 x fêmea Ca-1.

**Figuras 28 e 29** - Metáfase de híbridos entre fêmea Al-1 x macho Ca-1 (28) de macho. (29) de fêmea. As setas indicam a localização da constrição secundária (CS) no par 3, o Y metacêntrico e os X com duas constrições secundárias como em Al-1 e outro com apenas uma como em Ca-1.

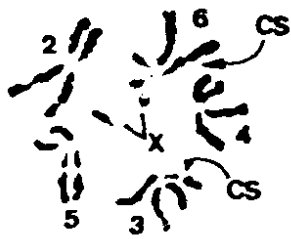
**Figuras 30 e 31** - Metáfases do cruzamento recíproco, isto é, macho Al-1 x fêmea Ca-1 (30) de fêmea, onde é possível observar os cromossomos X morfologicamente diferentes. (31) metáfase de macho. As setas indicam a constrição secundária (CS) no par 6, e o cromossomo Y metacêntrico.

**Figuras 32, 33, 34 e 35** - Metáfases de híbridos entre machos MT-2 x fêmeas Ca-1 (32) de macho (33) de fêmea em que se observa a localização das constrições secundárias (CS) nos autossomos e os cromossomos X morfologicamente diferentes muito semelhante ao do híbrido Ca-2. Figura 34 e 35, metáfases do cruzamento recíproco, fêmea MT-2 x macho Ca-1 (34) de fêmea. (35) de macho.

**Figuras 36, 37 e 38** - Metáfases de híbridos entre machos GO-1 x fêmea Ca-1. (36) de fêmea. (37) de macho. (38) metáfase do cruzamento recíproco de fêmea GO-1 x macho Ca-1. A diferença é com relação ao cromossomo Y que é metacêntrico em fêmea GO-1 e macho Ca-1. (37) é submetacêntrico no recíproco (38).

**Figuras 39 e 40** - Metáfases de híbridos entre fêmea Ba-1 x macho Ca-1 (39) de fêmea. (40) de macho. Na figurra (39) observa a constrição secundária (CS) no par 6.

**Figuras 41 e 42** - Metáfases do F1 do cruzamento recíproco (macho Ba-1 x fêmea Ca-1). A seta indica a localização da constrição secundária no par 3. A escala de 10 um é válida para todas as figuras.



25



26



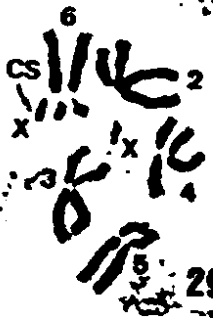
27



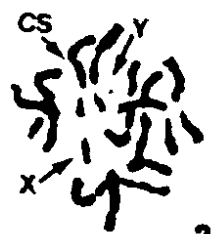
28



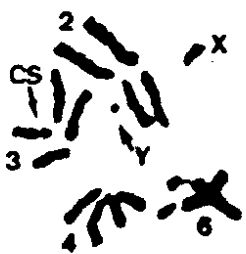
29



30



31



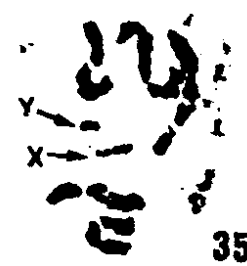
32



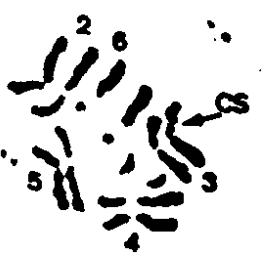
33



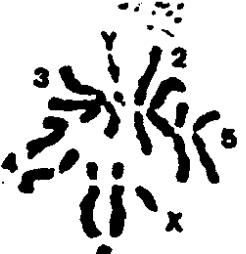
34



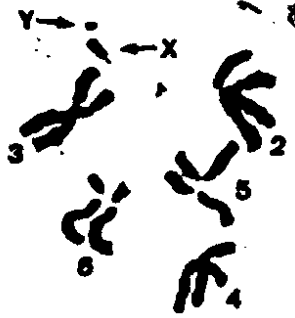
35



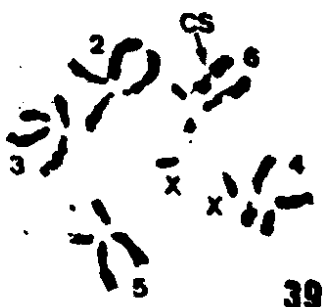
36



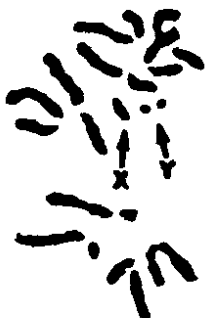
37



38



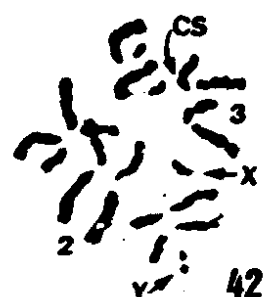
39



40



41



42

MT-2, uma subterminal no braço curto e proximal no longo (Figura 33). Em algumas metáforas, parece que estas constrictões ocorrem em ambos os homólogos do par 2. Também o par 3 apresenta a mesma constrictão já descrita, como também a do braço longo do par 6 (Figuras 32 e 33).

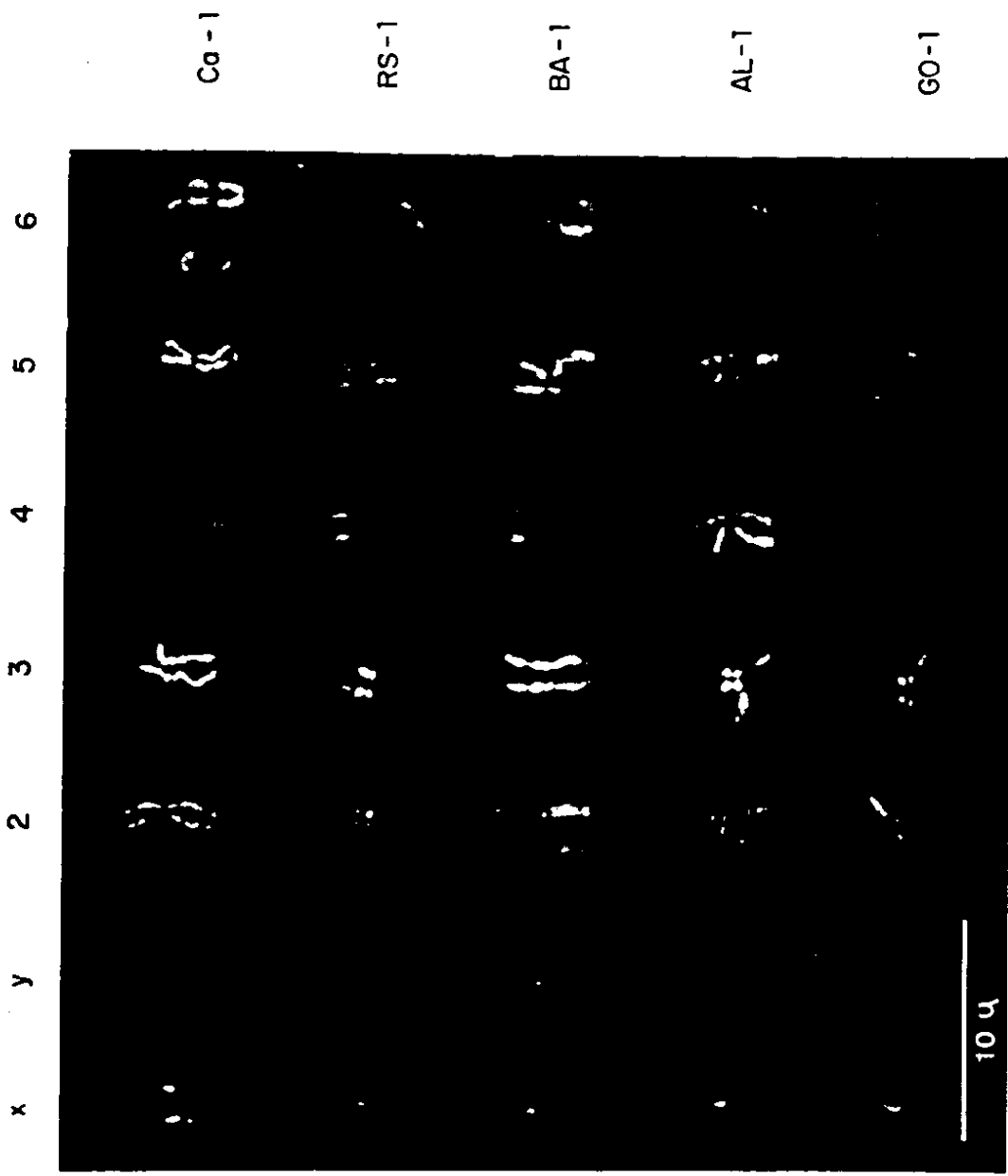
Deve-se ressaltar que, além destas diferenças os cromossomos Xs das fêmeas híbridas, foram muito semelhantes aos Xs do híbrido encontrado em Caraguatatuba amostra de Ca-1 (Figuras 4, 34 e 35). Assim, as fêmeas resultantes do cruzamento entre machos e fêmeas Caix, machos e fêmeas MT-2 como demonstrado nas Figuras 33 e 34, herdaram um X acrocêntrico com uma constrictão secundária no braço longo de Ca-1 e o outro X acrocêntrico mas com 2 constrictões neste braço de MT-2.

### IV.3. Banda Q

#### IV.3.1. Padrão de bandamento Q das diferentes linhagens de *C. hominivorax*

O emprego da técnica de banda Q em cinco linhagens de *C. hominivorax*, indicou padrões diferentes de bandamento em alguns pares de autossomos e cromossomos sexuais.

**Figura 43 - Cariótipo de macho das linhagens de *Cochliomyia hominivorax*, obtidos através do bandamento Q de: a) Caraguatatuba-SP (Ca-1); b) Porto Alegre-RS (RS-1); c) Morro do Chapéu-BA (Ba-1); d) Alfenas-MG (Al-1); e) Itaberaí-GO (GO-1).**



a

b

c

d

e

As linhagens cujas configurações mitóticas, foram analisados por esta metodologia, foram: Ca-1, RS-1, Ba-1, Al-1 e GO-1. Em todas as linhagens, esta técnica evidenciou como marcador o par 3 autossômico, que apresentou uma banda Q em ambos os lados do centrômero, muito forte, quando comparada aos demais pares (Figura 43).

No entanto, foram observadas variabilidade na ocorrência, intensidade e volume da banda Q (Figura 43).

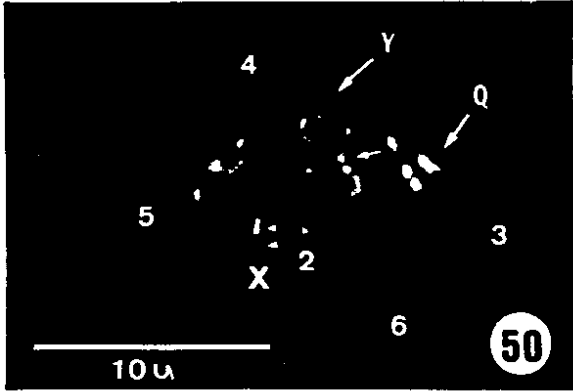
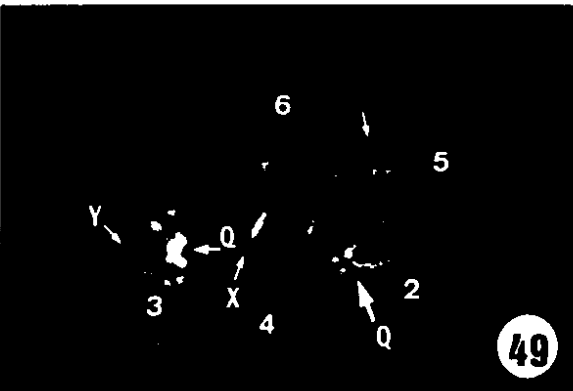
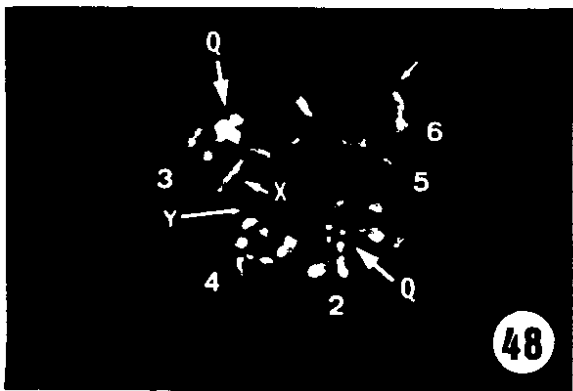
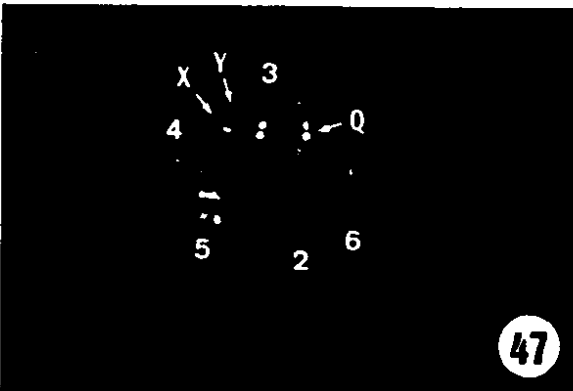
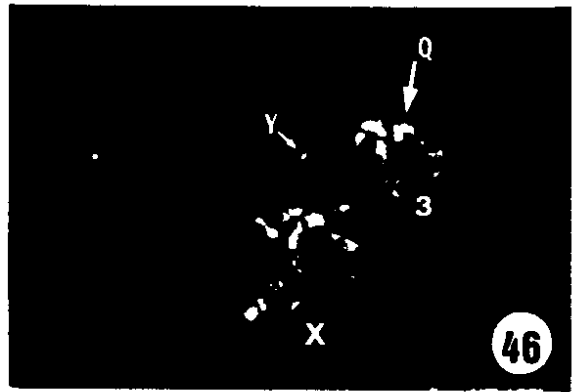
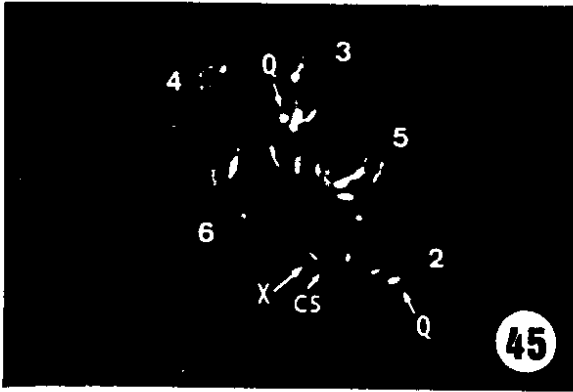
Assim, a linhagem Ca-1, apresentou no par 2 uma banda Q pericentromérica fraca, evidenciada em apenas um dos lados do centrômero (Figuras 45 e 47). Os demais pares de autossomos de Ca-1 não apresentam bandas bem definidas. O cromossomo X de Ca-1 é Q+ na região do satélite e na metade proximal do braço longo (Figura 45), apresentando neste braço uma constrição secundária subterminal, sendo a região terminal fracamente fluorescente. O cromossomo Y metacêntrico é Q+ em um dos braços (Figura 46).

A linhagem RS-1 apresenta no par 2 uma banda Q+ pericentromérica, em ambos os lados do centrômero, mais evidente do que aquela do par 2 de Ca-1. Além disso, a banda Q do par 3 é mais fluorescente quando comparada a Ca-1. É interessante notar em prometafases, que nas regiões onde se localizam as constrições secundárias nos cromossomos desta linhagem, isto é, na região subterminal do braço curto do par 2 e na região mediana do braço longo do par 6, como indicam as setas da Figura 48, há uma região fluorescente mais evidente do que no restante do cromossomo, não chegando a ser uma banda

Figuras 45, 46 e 47 - Cromossomos mitóticos de larvas coradas com quinacrina mostarda (método banda Q) da linhagem Ca-1 (45) prometáfase de fêmea em que se observa uma forte banda Q pericentromérica no par autossômico 3 e uma menos definida em apenas um dos lados do centrômero do par 2. A seta no cromossomo X indica a constrição secundária (CS), na região subterminal do braço longo. (46) prometáfase de macho. (47) metáfase de macho. As setas indicam a fluorescência em apenas um dos braços do cromossomo Y metacêntrico.

Figuras 48, 49 e 50 - Prometáfases da linhagem RS-1 de machos em que se observa banda Q pericentromérica mais volumosa que em Ca-1 no par 3. As setas indicam também a banda Q em ambos os lados do centrômero no par 2 e na região terminal mais fluorescente no par 6 após a constrição secundária (48). No cromossomo Y metacêntrico, o braço longo é mais fluorescente que o curto (50). As setas no X da figura 50 indicam que este cromossomo é mais fluorescente no braço curto até a posição mediana do braço longo, sendo fraca na porção terminal após a constrição secundária.

A escala de 10  $\mu$ m é válida para todas as figuras.





propriamente dita. O cromossomo X de RS-1 é muito semelhante ao de Ca-1, sendo Q+ na região do satélite até a metade proximal do braço longo, apresentando também uma constricção secundária neste braço, sendo Q- na região terminal, como indicado na Figura 50. O Y metacêntrico e Q+ no braço mais longo, sendo que em algumas prometáfases, pode-se evidenciar uma fluorescência discreta no braço curto (Figuras 48 e 50 semelhante ao observado em Ca-1).

Na linhagem Ba-1, além do par 3, o cromossomo apresenta uma banda Q+ na região pericentromérica que, embora menos evidente, é semelhante à banda observada em RS-1 (Figura 54). Os demais pares de cromossomos, inclusive o par 6, que possui uma constricção secundária na região mediana do braço longo, não apresentam banda Q+ (Figuras 52 e 53). Com relação ao X, o satélite é menos fluorescente quando comparado ao X de Ca-1 e RS-1. Apenas o braço longo até a constricção secundária é Q+, sendo a região terminal mais fraca (Figura 53). O cromossomo Y é também metacêntrico, mas difere de Ca-1 e RS-1 por ser muito pequeno em relação ao X e por apresentar o braço longo fortemente fluorescente, como indicado nas Figuras 52 e 54, sendo o braço curto Q- (Figura 54).

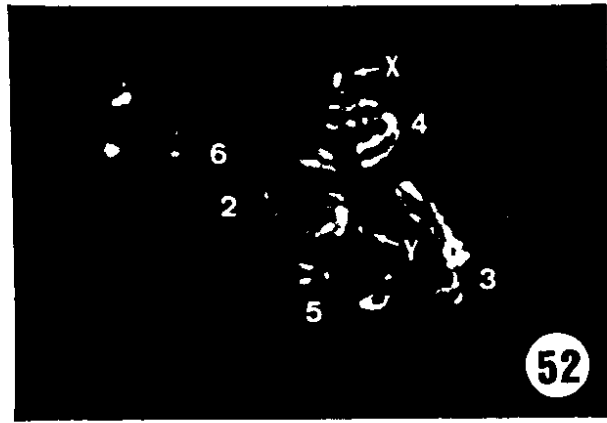
A linhagem Al-1, com relação ao padrão de fluorescência dos autossomos, é muito semelhante à Ba-1 (Figuras 54 e 55). No entanto, Al-1 difere de Ba-1 por apresentar, no par 2, uma constricção subterminal no braço curto que não ocorre, neste par, em Ba-1. As diferenças estão nos cromossomos sexuais, isto é, o X acrocêntrico, fluorescente na região do satélite até a parte mediana do braço longo

**Figuras 51, 52, 53 e 54 - Cromossomos mitóticos de gânglios nervosos de larvas da linhagem Ba-1 corados com quinacrina mostarda (técnica de banda Q). (51 e 54) metáfases de machos. Na figura 51 a seta indica o cromossomo Y metacêntrico, fluorescente em apenas um dos braços. Na figura (54) as setas indicam a banda Q em ambos os lados do centrômero do par 3 e uma mais fraca no par 2. (52) prometáfase de macho e fêmea (53). As setas indicam a constrição secundária (CS) do cromossomo X, cuja posição terminal do braço longo após a constrição é menos fluorescente.**

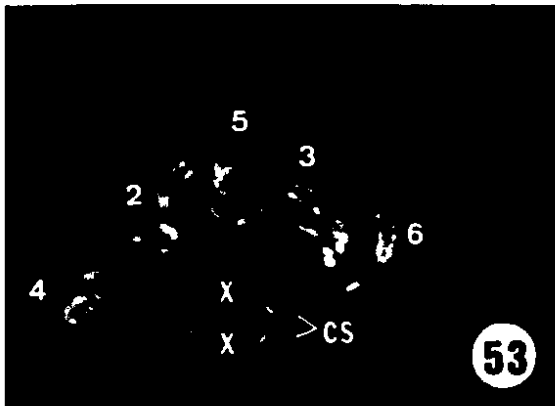
**Figuras 55, 56, 57 e 58 - Cromossomos mitóticos da linhagem de A1-1. (55 e 56) metáfases de fêmea. As setas indicam as bandas Q pericentroméricas em ambos os lados do centrômero dos pares autossômicos 2 e 3. Nesta linhagem a banda Q do par 2 é mais intensa e volumosa quando comparada aos das demais linhagens. O cromossomo X apresenta duas constrições secundárias (CS) no braço longo, mais visível na figura 57 como indicam as setas. (57 e 58) metáfases de machos, em que se observa o pequeno cromossomo Y metacêntrico e fracamente fluorescente. A escala de 10  $\mu$ m é válida para todas as figuras.**



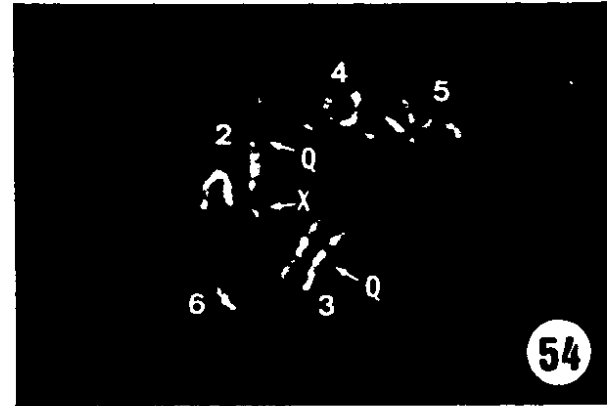
51



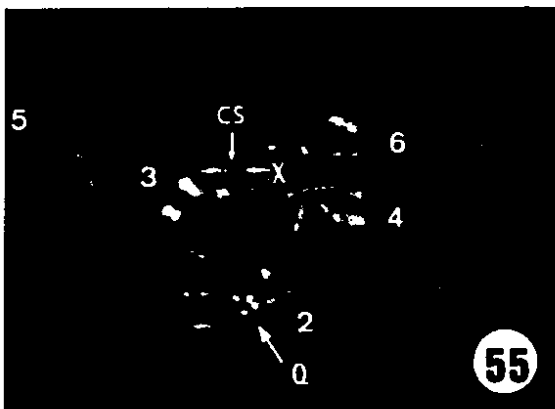
52



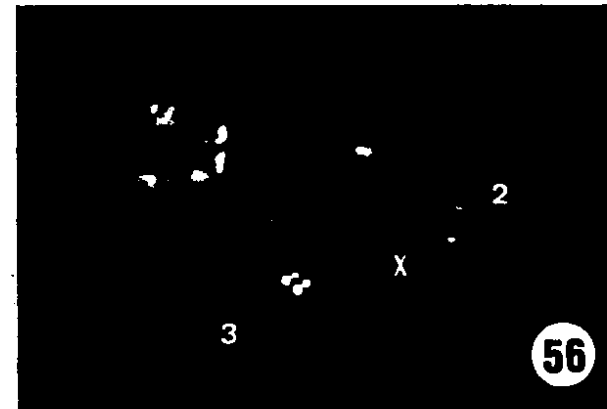
53



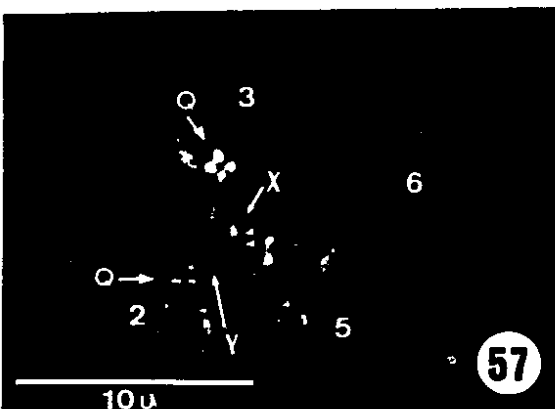
54



55



56



57



58

Este cromossomo apresenta duas constrictões secundárias muito próximas na região subterminal do braço longo (ao invés de uma, como Ca-1, RS-1 e Ba-1), que podem ser evidenciadas apenas em preparações que apresentam os cromossomos bem distendidos (Figuras 57). O Y metacêntrico é muito pequeno, como já descrito no item 4.1 de resultados. Comparando-se os cromossomos Y das demais linhagens, este é o menor e é o único que se apresenta fracamente fluorescente ao longo de todo o seu comprimento, tornando-se quase imperceptível nas preparações utilizando-se esta técnica de bandamento (Figuras 57 e 58). Nesta linhagem foi possível identificar no braço longo do par 2 uma região onde provavelmente ocorreu troca entre segmentos de cromátides-irmãs (Figuras 56 e 57).

A linhagem GO-1, apresenta no par 3, região adjacente ao centrômero bem marcada, só que, neste caso, a banda Q pericentromérica é menos intensa quando comparada à observada em RS-1, Ba-1 e Al-1 (Figuras 59 e 51). O autossomo 2 apresenta uma banda C em apenas um dos lados do centrômero, mais evidente que a existente em Ca-1 (Figuras 59 e 60). Com relação ao cromossomo X, este é pouco fluorescente ao longo de todo o seu comprimento, incluindo o satélite e a região terminal do braço longo, evidenciando-se a constrictão secundária deste braço (Figuras 43 e 59). O Y submetacêntrico apresenta uma fluorescência muito fraca (Figura 60), embora o braço longo seja mais evidente que o pequeno y metacêntrico de Al-1 (Figura 58).

Como descrito acima, quando as diferentes linhagens são comparadas com relação ao padrão de fluorescência, verifica-

se que o cromossomo X de Ca-1 se assemelha ao de RS-1 e difere do observado em Ba-1, Al-1 e GO-1, isto é, Ca-1 = RS-1 # Ba-1, Al-1 e GO-1.

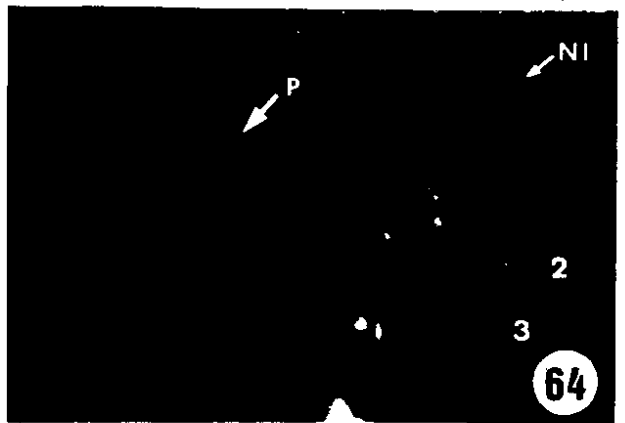
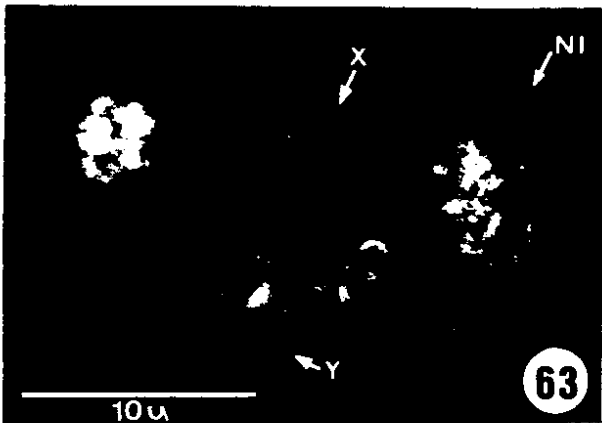
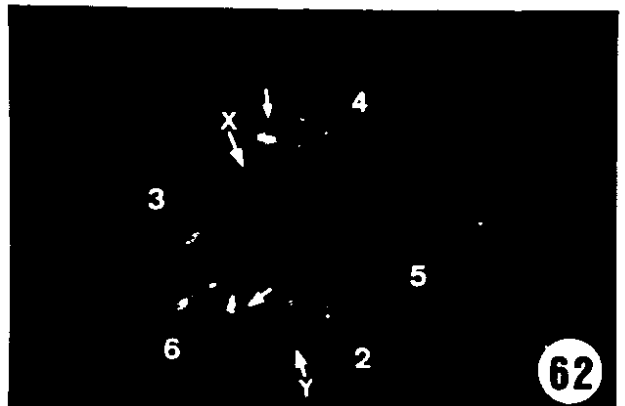
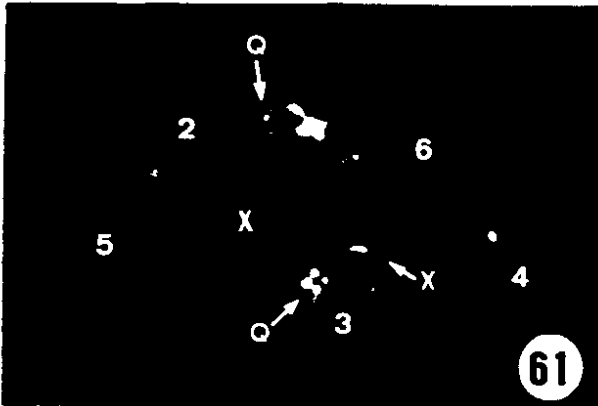
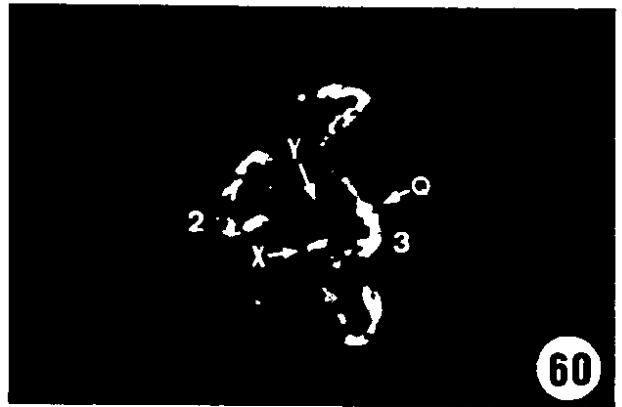
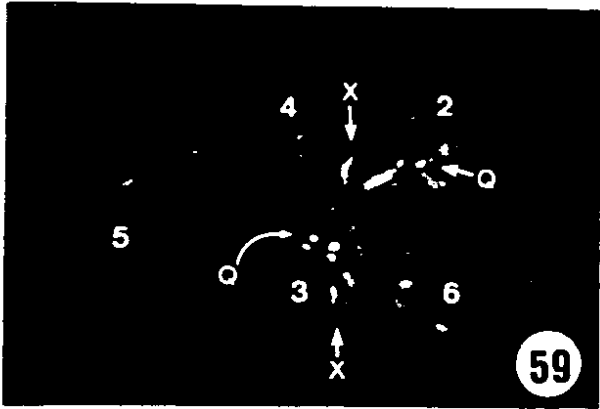
Para o cromossomo Y, a seguinte correlação pode ser feita: embora ambos os Y de Ca-1, RS-1 e Al-1 sejam metacêntricos, a relação de braços e comprimento relativo são diferentes,, como também a intensidade de fluorescência, isto é, em algumas prometáfases o braço curto também apresenta fluorescência em RS-1 e, no caso de Al-1, este não é fluorescente. Portanto, Ca-1 # RS-1 # Al-1 # Ba-1 # GO-1. Já o Y de Ba-1 e GO-1 são <sup>meta</sup>submetacêntricos mas diferem no padrão de fluorescência, ou seja, o de Ba-1 é Q no braço longo e o de GO-1 é fracamente fluorescente, portanto, Ba-1 # GO-1.

Em relação ao cromossomo 2, verifica-se que as linhagens Ca-1 e GO-1 têm, neste par, banda Q em apenas um dos lados do centrômero, ao passo que em RS-1, Ba-1 e Al-1, há banda Q pericentromérica em ambos os lados, sendo que no par 2 de RS-1 e de Al-1 são mais evidentes do que o de Ba-1 (Figuras 48 e 55).

Pela comparação do padrão de fluorescência de cada cromossomo das 5 linhagens, após a utilização desta técnica, foi verificada uma variabilidade interlinhagens, com relação aos seguintes cromossomos: 1. par 2 autossômico que pode ser de três tipos, quanto ao padrão: a) com uma banda Q pericentromérica fraca e em apenas um dos lados do centrômero (linhagens Ca-1 e Go-1); banda mais evidente e em ambos os lados do centrômero (Linhagem RS-1, Ba-1 e Al-1); 2. diferenças na intensidade de fluorescência da heterocromatina centro-

Figuras 59, 60 e 61 - Cromossomos mitóticos de gânglio nervoso de larvas coradas com quinacrina mostarda (método de banda Q) da linhagem 60-1 de *Cochliomyia hominivorax* metáfase de fêmea (59) e prometáfase de macho (60). As setas indicam a banda Q forte pericentromérica no par autossômico 3 e uma banda em apenas um dos lados do centrômero no par 2 (59). (60) prometáfase de um macho em que se observa o cromossomo Y fluorescente em apenas um dos braços e o X fluorescente no satélite até a porção subterminal do braço longo.

Figuras 62, 63 e 64 - Cromossomos mitóticos de gânglio nervoso de larvas de *Cochliomyia macellaria* linhagem de Campinas - SP. (62, 63) metáfases de macho em que se observa os cromossomos X e Y, fracamente fluorescentes. As setas indicam a região do braço mais curto de um dos homólogos do par 4 e da região proximal do braço longo do par 6 também de apenas um dos homólogos, que se apresentaram mais fluorescentes pelo emprego da quinacrina mostarda. Na figura 64 as setas indicam uma prófase (P) e um núcleo interfásico de *C. macellaria*. A escala de 10  $\mu$ m é válida para todas as figuras.



mérica do par 3 que, embora sempre observada em ambos os lados do centrômero, foi mais intensa nas linhagens RS-1, Ba-1 e Al-1 do que em Ca-1 e GO-1 (Figura 43); 3. diferenças no padrão de banda Q do cromossomo Y que pode apresentar: a) banda Q em apenas um dos braços (linhagens Ca-1, RS-1 e Ba-1); b) fracamente fluorescente (linhagem GO-1); c) <sup>não</sup>fluorescente (linhagem Al-1); 4. intensidade de fluorescência do cromossomo X: a) presença de banda Q no satélite e até a região subterminal do braço longo (linhagens Ca-1, RS-1 e Al-1); b) fluorescência fraca na região do satélite, sendo mais intensa no braço longo até a região subterminal (linhagem Ba-1); c) fluorescência mais forte ao longo de todo o seu comprimento (linhagem GO-1).

#### IV.3.2. Padrão de bandas Q dos híbridos dos cruzamentos entre as linhagens

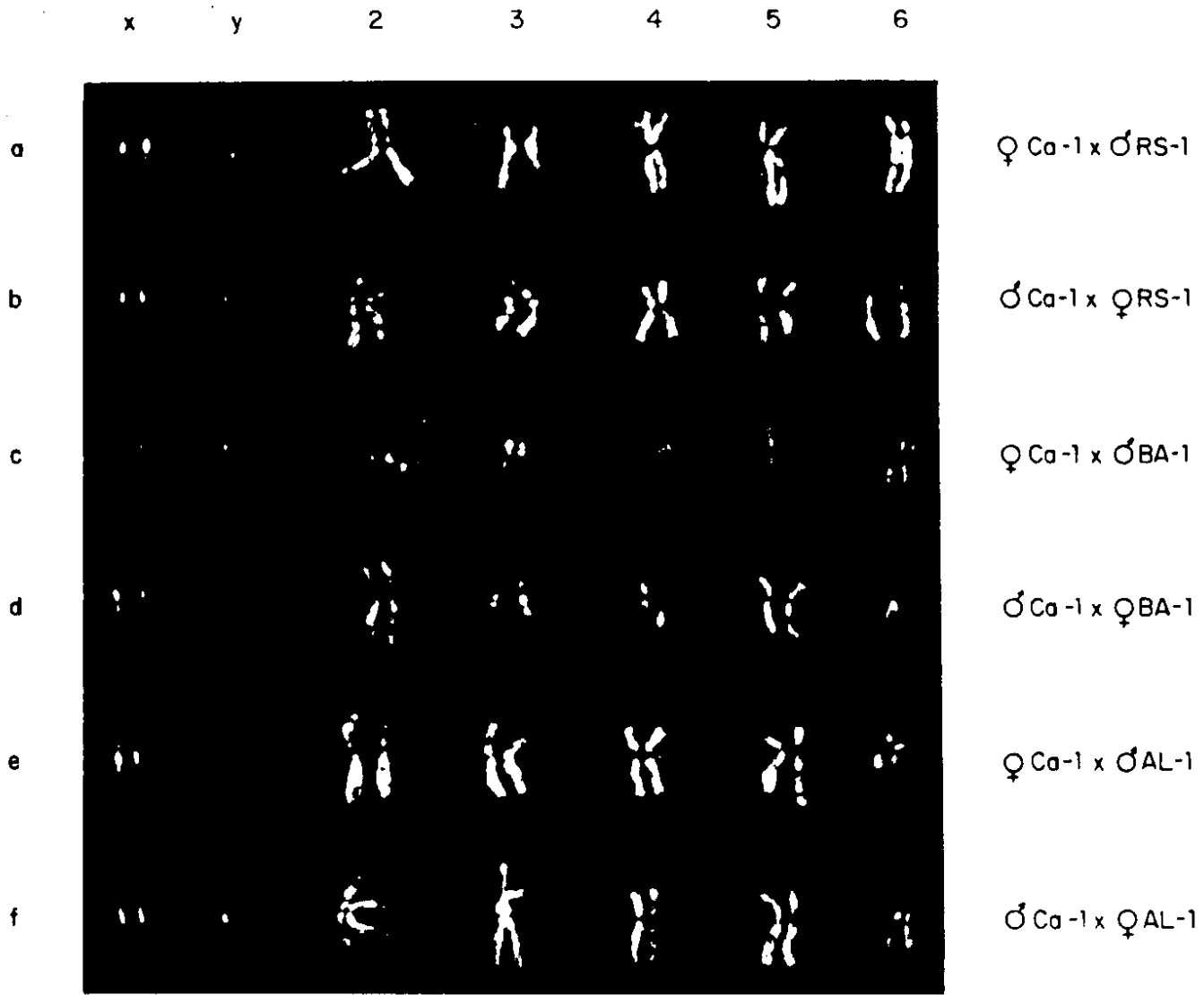
O padrão de banda Q apresentado pelos híbridos das interlinhagens de *C. hominivorax*, indicaram uma variabilidade com relação ao volume e intensidade da banda, dependente do tipo de cruzamento.

O híbrido proveniente de fêmea Ca-1 x macho RS-1, possui uma forte banda Q, pericentromérica, no par 3, como os pais e, uma banda no par 2, menos intensa, em ambos os lados do centrômero, muito semelhante a da fêmea RS-1 e que não ocorre no lado paterno (Ca-1) (Figuras 69 e 71). O cromossomo X é fluorescente no satélite e na



**Figura 44** - Cariótipo dos híbridos obtidos a partir dos cruzamentos entre as linhagens de *Cochliomyia hominivorax*, utilizando a técnica de bandamento Q de: a) fêmea Ca-1 x macho RS-1, b) macho Ca-1 x fêmea RS-1 (linhagens de Caraguatatuba e Porto Alegre), c) fêmea Ca x macho Ba-1, d) macho Ca-1 x fêmea Ba-1 (linhagens Caraguatatuba e Morro do Chapéu), e) fêmea Ca-1 x macho Al-1, f) macho Ca-1 x fêmea Al-1 (linhagens Caraguatatuba e Alfenas).

Ambos os cromossomos Xs das fêmeas híbridas foram indicados na figura.



10μ

parte mediana proximal do braço longo (Figuras 69 e 71), sendo a região terminal, após a constrição secundária, fracamente fluorescente (Figuras 69). O Y metacêntrico é Q em uma dos braços (Figura 69) como nos parentais. No cruzamento recíproco (macho Ca-1 x fêmea RS 1), o padrão é diferente com relação ao par 2 que, neste caso, apresenta uma banda Q+ em apenas um dos lados do centrômero (Figura 68) igual a Ca-1. Neste caso, o par 6 apresenta uma constrição secundária na parte mediana do braço longo, onde, em algumas prometáfases, apresenta uma região mais fluorescente que o restante deste autossomo, como indica a Figura 66. Os cromossomos X e Y, embora apresentem um fluorescência mais forte, são muito semelhantes, quanto ao padrão de bandamento, ao do híbrido do cruzamento recíproco (Figura 69).

Os descendentes do cruzamento entre fêmea Ca-1 macho Ba-1, mostram uma banda Q pericentromérica no par 3, que parece diferir quando se compara os homólogos (Figura 73). Assim, em um deles, a banda é mais volumosa, como em Ba-1 e, no outro, esta é menor em volume, igual a Ca-1 (Figuras 73 e 75).

O autossomo 2 apresenta, também, uma banda Q pericentromérica, menos intensa e nítida em ambos os lados do centrômero, somente em um dos homólogos, igual a Ba-1, sendo o outro somente no lado do braço longo (Figura 72).

Nas fêmeas da F1 os cromossomos X são de tamanho diferentes e apresentam variação no padrão de fluorescência, ou seja um dos X é menor em tamanho e menos intenso o bandamento na região de satélite e no braço longo, semelhante a Ba-1. O X homólogo é maior

com intensidade de fluorescência mais forte, tanto no satélite quanto no braço longo, até a constrição secundária (Figuras 72). O Y é metacêntrico e fluorescente em apenas um dos braços, como Ca-1 (Figuras 73 e 74).

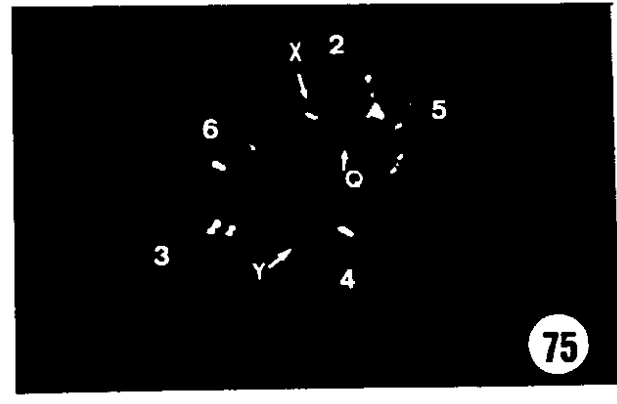
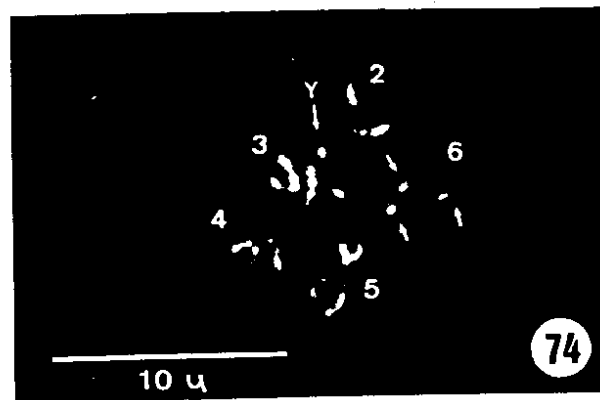
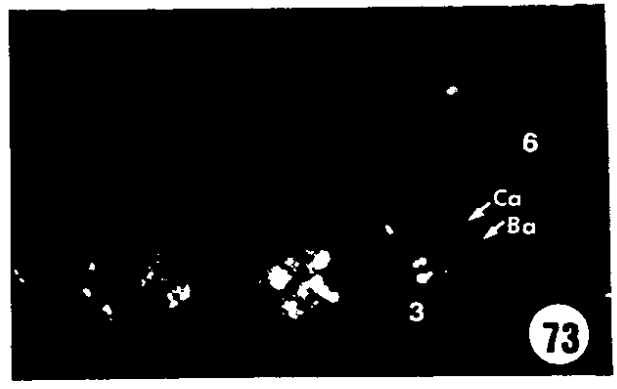
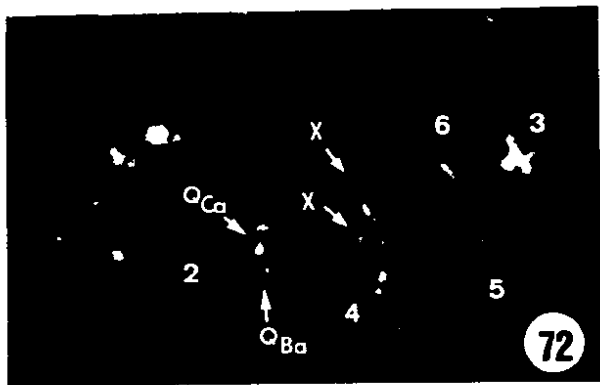
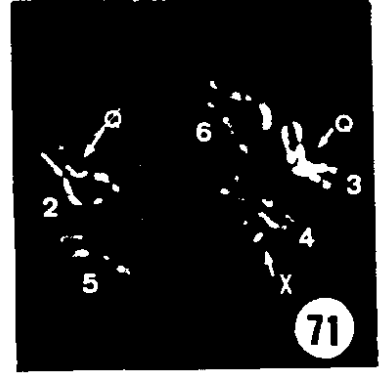
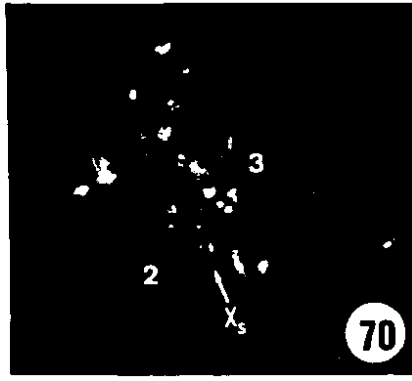
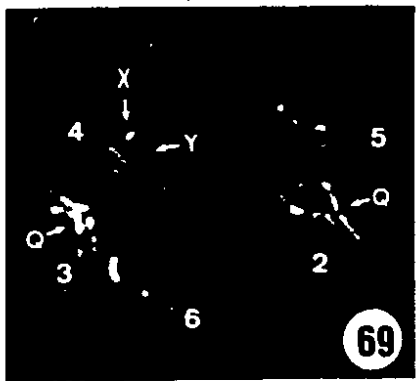
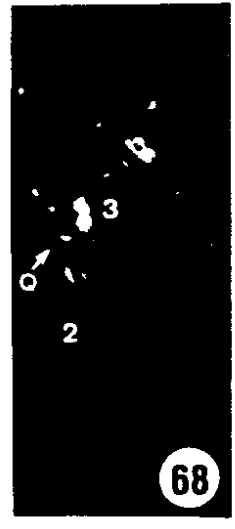
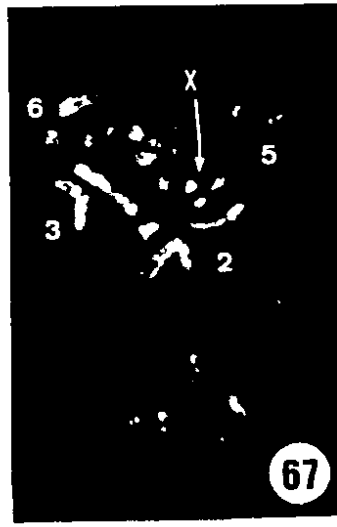
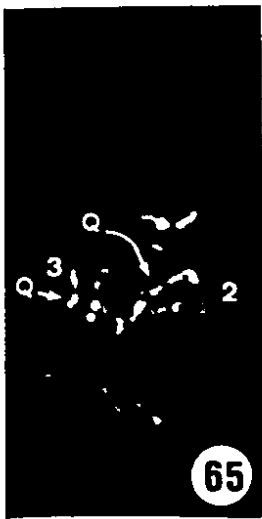
Neste híbrido, observou-se que o par 6 pode, em algumas metáfases, apresentar o braço curto mais fluorescente que o seu homólogo (Figura 74). O braço longo deste par também difere, isto é, um homólogo apresenta cromômeros mais fluorescentes na região proximal até a constrição secundária, que é evidente somente neste cromossomo. No seu homólogo, este padrão se inverte e é mais forte na região terminal como indicam as setas da Figura 74.

No híbrido entre macho Ca-1 x fêmea Ba-1, com exceção do par 3, que apresenta as mesmas características do seu recíproco (Figura 73), todos os demais cromossomos diferem quanto ao padrão de fluorescência. Deste modo, o par 2 possui uma banda Q pericentromérica no lado do braço longo, e somente em um dos homólogos, sendo fraca e nem sempre visível nas metáfases (Figura 75), semelhante a Ca-1. O par 6 não é fluorescente e parece apresentar uma constrição secundária mediana no braço longo, Figuras 72, 74 e 76. Os cromossomos X da fêmea híbrida são heteromórficos, isto é, um deles possui uma fluorescência mais forte no satélite até a região mediana do braço longo, além de ser maior, como em Ba-1. O outro X é menor e nas mesmas regiões descritas para o seu homólogo, apresenta uma fluorescência mais fraca (Figura 77). O Y é metacêntrico e Q no braço longo (Figura 75).

**Figuras 65, 66, 67 e 68** - Cromossomos mitóticos de gânglios nervosos de larvas coradas com quinacrina mostarda (técnica de banda Q), de híbridos F1 resultantes do cruzamento entre fêmea RS-1 x macho Ca-1 (65 e 66) metáfases de machos. As setas indicam a banda Q pericentromérica do par 3 e uma banda Q em apenas um dos lados do centrômero no par 2 como em Ca-1. (67) metáfase de fêmea. A seta indica que o X proveniente de RS-1 é mais fluorescente que o X de Ca-1. (68) prometáfase de fêmea. A seta indica a banda Q em apenas um dos lados do centrômero do par 2, como em Ca-1.

**Figuras 69, 70 e 71** - Cromossomos do híbrido resultante do cruzamento entre macho RS-1 x fêmea Ca-1. (69) metáfase do macho. As setas indicam a banda Q pericentromérica do par 3 e do par 2, sendo que neste caso esta banda ocorre em ambos os lados do centrômero como em RS-1 (indicado também na figura 71). (70) prometáfase de fêmea indicando os cromossomos X morfologicamente diferentes.

**Figuras 72, 73 e 74** - Cromossomos mitóticos do híbrido entre fêmea Ba-1 x macho Ca-1. (72) metáfase de fêmea banda Q forte pericentromérica em ambos os lados no par autossômico 3 e outra no par 2 mais fraca em um dos homólogos (QBa) e mais forte no outro homólogo (QCa). As setas indicam os cromossomos X do híbrido, com comprimentos e intensidade de fluorescência diferentes. (73 e 74) prometáfase e metáfase de machos. (73) As setas indicam que o volume da banda Q pericentromérica do par 3 é diferente nos homólogos correspondendo aos das linhagens parentais. Na figura (74), as setas indicam no par autossômico 6, as regiões com intensidade de fluorescência maior deste par. O cromossomo Y apresenta fluorescência em apenas um dos braços. A escala de 10  $\mu$ m é válida para todas as figuras.



No F1 de macho Ca-1 x fêmea Al-1, observa-se que o par 3 apresenta banda Q pericentromérica muito evidente, como nos progenitores (Figura 78 e 79). No par 2, neste caso, observa-se uma banda Q em ambos os lados do centrômero, em um dos homólogos e no outro somente uma banda pericentromérica no braço longo, bem evidente e mais forte quando comparada aos demais cruzamentos (Figura 79).

As fêmeas híbridas apresentam cromossomos X diferentes, sendo cada um semelhante a cada X dos progenitores. O X semelhante à Al-1 é fluorescente no satélite até a constrição secundária do braço longo, sendo Q- só na região terminal (Figura 80), enquanto o outro possui, na região do satélite, uma fraca fluorescência que é mais forte no braço longo até a região da constrição secundária (Figura 82), semelhante a Ca-1. O cromossomo Y é metacêntrico e um dos braços fluoresce com maior intensidade.

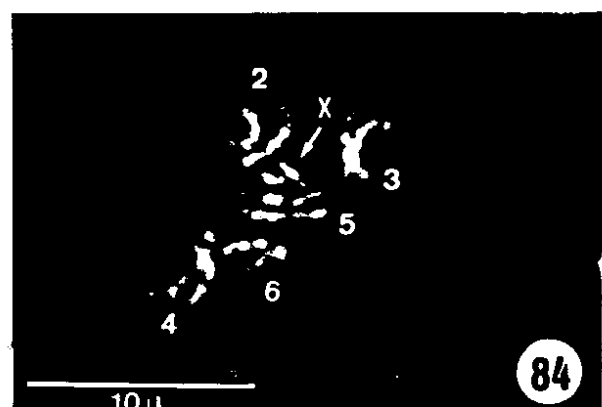
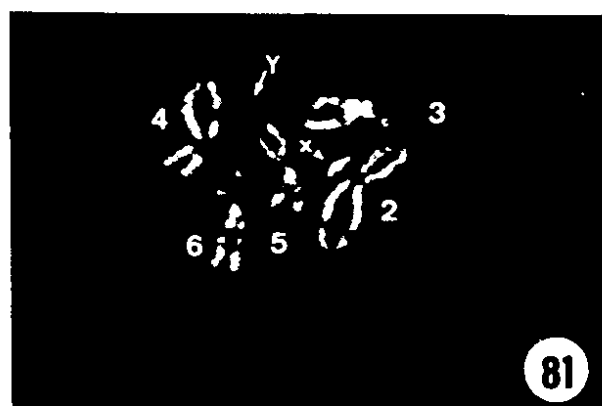
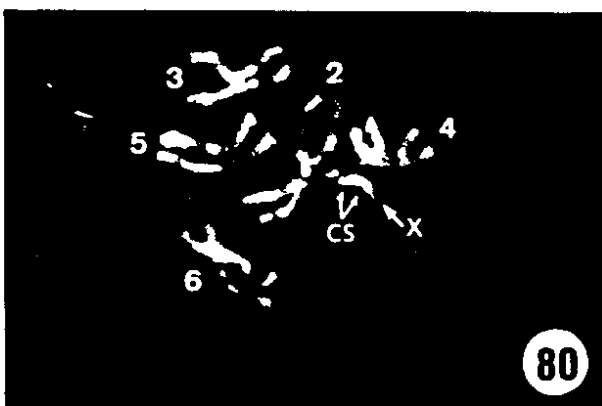
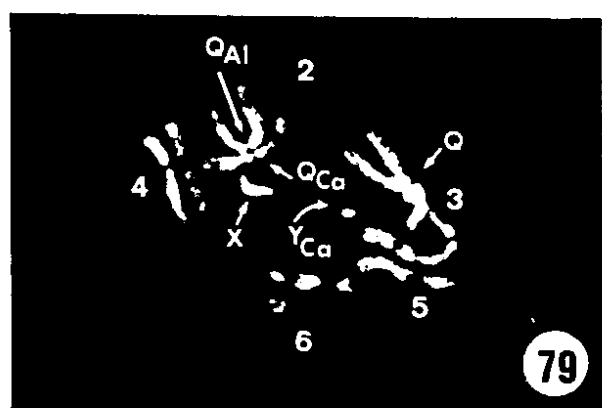
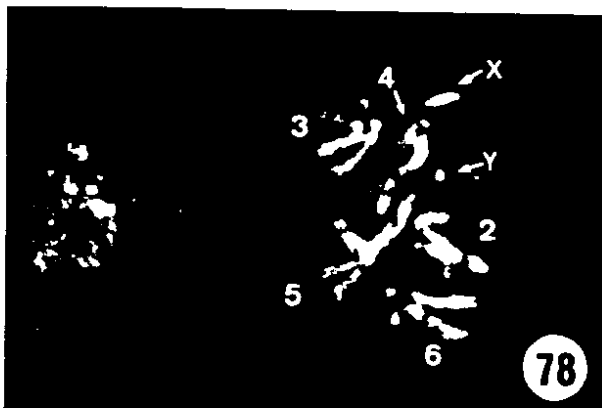
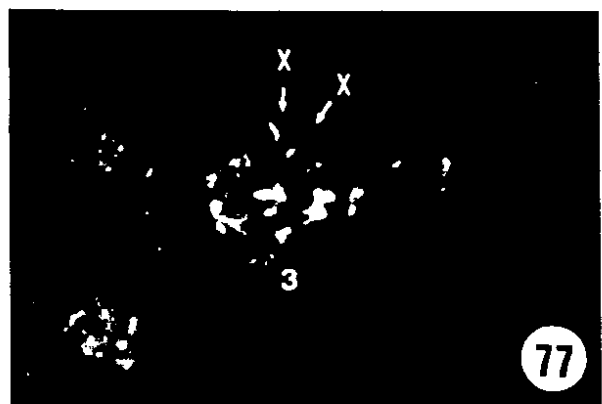
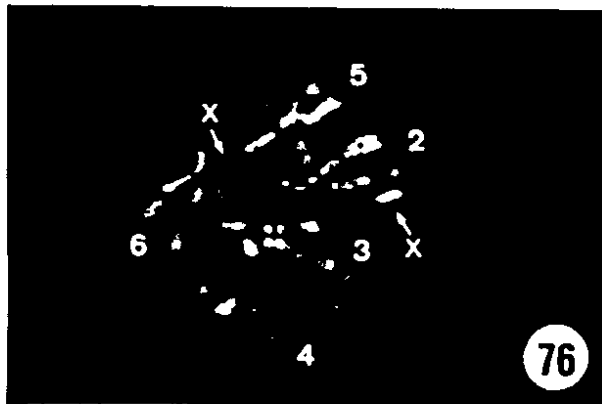
Nos híbridos do cruzamento macho Ca x fêmea Al-1 as diferenças relativas a fêmeas Ca x machos Al-1, estão no par 2 autossômico e no cromossomo Y. Nestes casos, o par 2 apresenta uma banda Q que embora seja mais fraca, é mais nítida em apenas um dos lados do centrômero, ao contrário de em ambos. O Y é um metacêntrico pequeno, com uma fluorescência muito fraca, quase imperceptível, quando analisado por esta técnica, como observado nos machos de Al-1 (Figuras 82 e 83).

Figuras 75, 76 e 77 - Cromossomos mitóticos de gânglio nervoso corados com quinacrina mostarda dos híbridos F1 resultantes do cruzamento entre macho Ba-1 x fêmeas CA-1. (75) metáfase de macho em que se observa a banda Q pericentromérica do par 3 com volume diferente nos homólogos, correspondendo a cada uma das linhagens parentais. A seta indica que a banda Q do par 2 é muito fraca e o cromossomo Y metacêntrico apresenta uma fluorescência fraca em apenas um dos braços. (76 e 77) metáfase e prometáfase de fêmeas em que se observa os cromossomos X do híbrido com intensidade de fluorescência e comprimento diferentes.

Figuras 78, 79 e 80 - Cromossomos mitóticos de híbridos resultantes do cruzamento entre fêmea A1-1 x macho Ca-1. (78 e 79) metáfases de machos, em que se observa a forte banda Q pericentromérica no par 3. As setas da figura 79 indicam a banda Q pericentromérica no par 2 em ambos os lados do centrômero em um dos homólogos semelhante a A1-1 (QA1) e no outro em apenas um dos lados como em Ca-1 (QCa). O cromossomo Y metacêntrico é fluorescente em apenas um dos braços. (80) metáfase de fêmea, onde um dos cromossomos X é fluorescente ao longo do seu comprimento, sendo mais fraca apenas na porção terminal e apresenta duas constricções secundárias (CS), como em A1-1.

Figuras 81, 82, 83 e 84 - Cromossomos mitóticos resultantes do cruzamento entre macho A1-1 x fêmea Ca-1 (81 e 82) metáfases de machos (82) prometáfase de macho em que se observa a banda Q pericentromérica do par 3. Nesta figura indica o cromossomo Y metacêntrico quase imperceptível como o de A1-1. (84) metáfase de fêmea em que se observa os cromossomos X de comprimentos diferentes. A escala de 10 um é válida para todas as figuras.





### IV.3.3. Padrão de banda Q de *Cochliomyia macellaria*

O padrão de fluorescência observado nos cromossomos mitóticos de *C. macellaria* foi muito diferente do apresentado por *C. hominivorax*.

Das vinte lâminas analisadas, verificou-se que nenhum dos cinco pares de autossomos, como os sexuais, apresentara um padrão bem definido com a utilização de quinacrina mostarda (Figura 62 e 63), ao contrário de *C. hominivorax*.

Como indicado nas Figuras 62 e 63, os cromossomos apresentaram uma fluorescência muito fraca, exceto o par 4, que possui uma fluorescência um pouco mais forte no braço curto de um dos cromossomos homólogos (Figura 62). Uma região com a mesma intensidade de fluorescência e tamanho foi observado na região proximal do braço longo do par 6 submetacêntrico (Figura 62). Ambas as regiões fluorescentes, quando comparadas com as bandas Q obtidas nos cromossomos das diferentes linhagens de *C. hominivorax* são bem mais fracas em *C. macellaria*. Uma das explicações possíveis para este padrão observado, pode ser a de que esteja ocorrendo um rearranjo cromossômico, (ou seja, uma translocação recíproca entre cromossomos não homólogos). Embora esta banda tenha persistido em quase todas as lâminas analisadas, desta espécie, ainda achamos que esta interpretação precisa ser melhor explorada, como também diferentes amostras da mesma localidade precisam ser investigadas, para verificar se esta característica se mantém.

A fraca fluorescência ocorre também nos núcleos interfásicos, onde não é observada nenhuma região da cromatina mais corada pela quinacrina mostarda, tanto nos machos como nas fêmeas (Figuras 62 e 63).

Estes resultados, indicam que a técnica de banda é um bom método diagnóstico para diferenciar *C. macellaria*, saprófaga da espécie *C. hominivorax*, blontófaga, muito próxima fenoticamente mas que já tinha sido verificado diferirem a nível de morfologia cromossômica, como de bandamento-C (AZEREDO-ESPIN, 1982).

O que é surpreendente, é o fato de as regiões heterocromáticas dos cromossomos de *C. macellaria* não serem evidenciadas através do bandamento Q, como o foram especialmente nas regiões pericentroméricas com a técnica de banda C (AZEREDO-ESPIN, 1982). Deve-se ressaltar que o bandamento Q foi efetuado simultaneamente em lâminas das linhagens *C. hominivorax* e *C. macellaria*, no sentido de se evitar ao máximo, alguma variação durante o procedimento desta metodologia de coloração.

#### IV.4. Cruzamentos entre as diferentes linhagens

Todos os testes de cruzamento efetuados entre as oito linhagens de *C. hominivorax* com a linhagem considerada padrão Ca-1, produziram descendentes férteis. Porém, deve-se ressaltar que para alguns cruzamentos entre estas linhagens, foi necessário repeti

até quatro vezes o experimento, para a obtenção de híbridos (ver tabela 7).

Para os testes de cruzamento, foram utilizados indivíduos das gerações F2 e F3 das linhagens parentais, a fim de assegurar que estas já se encontraram adaptadas às condições de laboratório. As repetições dos cruzamentos, quando não foi possível obter híbridos na primeira tentativa, foram realizados com as gerações F2, F3, F4 e F5 de laboratório das linhagens parentais.

Foram encontradas dificuldades para obtenção de híbridos nos testes de cruzamentos entre Ca-1 x Al-1, onde somente na terceira repetição obteve-se descendência (tabela 7). Dificuldades semelhantes foram observadas no cruzamento entre Ca-1 x Ba-1, Ca-1 x PP-1 e Ca-1 x MT-2, sendo que neste último caso, somente na quarta repetição, ocorreu a produção de híbridos. Esta dificuldade inicial para obtenção de híbridos, pode estar relacionada com as diferenças cariotípicas e morfométricas encontradas entre as linhagens de *C. hominivorax* e que será discutida no ítem VI. Provavelmente a adaptação em condições de laboratório, ou seja, no decorrer das gerações de cada linhagem (como foi dito anteriormente, utilizamos F2, F3, F4, F5 dos parentais), tenha favorecido a produção de híbridos.

Para citar um exemplo, no caso de fêmea Ca-1 x macho Al-1 em duas tentativas de cruzamentos não se obteve híbridos e, a maior parte das fêmeas não ovipuseram, embora tivessem sido estimuladas. Somente na terceira repetição deste cruzamento, obteve-se posturas de pequena quantidade de ovos férteis, (isto é, 0,67g por galola),

quando em média uma gaiola contendo igual número de machos e fêmeas de uma linhagem parental obtem-se de 1,25 até 2,0 gramas de ovos por gaiola.

Em quase todos os experimentos de cruzamentos, foi observada uma grande mortalidade, especialmente de fêmeas, logo no 12º a 14º dias após a emergência quando as fêmeas vivem em média em condições de laboratório cerca de 30 a 40 dias. Devido a isto, o número de posturas realizadas, envolveram muito poucas fêmeas e o número de descendentes, na maioria dos casos, não ultrapassaram 450 adultos. Somente no cruzamento entre Ca-1 x Ba-1, uma vez obtidos híbridos, após 3 repetições, o número de posturas viáveis foi grande e frequentemente eram obtidas de 1 a 2 gramas de ovos por gaiola, em cada experimento. Deve-se ressaltar que, de um modo geral, as larvas de F1 provenientes deste cruzamento, apresentavam um desenvolvimento mais rápido, cerca de 6 a 7 dias, quando comparadas com as linhagens parentais, onde a duração desta fase foi de 9 a 10 dias.

Embora nosso objetivo não tenha sido o de analisar o comportamento de corte e cópula, em algumas observações dos machos e fêmeas nas gaiolas em que foram efetuados os cruzamentos, foi verificado que não há corte bem definida. A cópula é muito movimentada, tendo-se a impressão de que a fêmea está sempre tentando livrar-se do macho. A agressividade, ou mais exatamente, a atitude de repulsa por parte das fêmeas, quando em presença de machos de outras linhagens indica que a cópula deve ser muito rápida.

NÚMERO DO TESTE DO CRUZAMENTO	LINHAGENS UTILIZADAS	NÚMERO DE REPETIÇÕES DO TESTES DE CRUZAMENTO			
		T1	T2	T3	T4
CZ1	100 fêmeas Ca-1 X 100 machos Al-1	-	-	+	+
CZ2	100 machos Ca-1 X 100 fêmeas Al-1	-	-	+	+
CZ3	100 fêmeas Ca-1 X 100 machos GO-1	-	+	+	+
CZ4	100 machos Ca-1 X 100 fêmeas GO-1	-	-	+	+
CZ5	100 fêmeas Ca-1 X 100 machos RS-1	+	+	+	+
CZ6	100 machos Ca-1 X 100 fêmeas RS-1	+	+	+	+
CZ7	100 machos Ca-1 X 100 fêmeas Ba-1	-	-	+	+
CZ8	100 fêmeas Ca-1 X 100 machos Ba-1	-	-	+	+
CZ9	100 machos Ca-1 X 100 fêmeas MT-1	-	-	+	+
CZ10	100 fêmeas Ca-1 X 100 machos MT-1	-	-	+	+
CZ11	100 machos Ca-1 X 100 fêmeas MT 2	-	-	-	+
CZ12	100 fêmeas Ca-1 X 100 machos MT-1	-	-	-	+
CZ13	100 machos Ca-1 X 100 fêmeas PP-1	-	-	+	+
CZ14	100 fêmeas Ca-1 X 100 machos PP-1	-	-	+	+

TABELA 7 - Cruzamentos entre as linhagens de *Cochliomyia hominivorax*, mantidas em condições de laboratório: Ca-1 (Caraguatatuba - SP); Al-1 (Alfenas - MG); GO-1 (Itaberaí - RS); Ba-1 (Morro do Chapéu - BA); MT-1 (Chapada dos Guimarães - MT); MT-2 (Poconé - MT); PP-1 (Presidente Prudente - SP).

\* As repetições, isto é, número de vezes em que os testes de cruzamento foram efetuados entre as linhagens estão indicados na tabela por T1, T2, T3 e T4. O sinal (+) indica produção de híbridos dos diferentes cruzamentos realizados e o sinal (-) indica ausência de produção de híbridos. Para os testes de cruzamento foram utilizadas gerações diárias, ou seja, F2, F3, F4 e F5 das linhagens parentais, respectivamente em T1, T2, T3 e T4.

Uma vez que, em condições de laboratório, os testes de cruzamentos entre as diferentes linhagens de *C. hominivorax* foram viáveis, procurou-se de forma preliminar, utilizando duas linhagens (RS-1 e Ba-1) e seus híbridos, verificar se: a- os híbridos produzidos eram férteis; b- a proporção sexual da progênie; c- a proporção sexual dos descendentes produzidos quando a F1 era retrocruzada com os parentais.

Os cruzamentos testados foram os híbridos de (CZ5 e CZ6) e (CZ7 e CZ8), cujas linhagens que representam estão indicadas na Tabela 7. Estes híbridos foram retrocruzados com ambos os sexos das linhagens parentais, respectivamente macho e fêmea de RS-1, Ba-1 e Ca-1. Embora sejam resultados preliminares, verificou-se que a proporção de fêmeas foi muito maior que de machos, tanto nos descendentes dos híbridos quando cruzados entre si, como também naqueles resultantes dos híbridos quando retrocruzados com os parentais. De uma amostra de 820 adultos analisados de cada um destes experimentos, verificou-se que 532 eram fêmeas e 288 eram machos.

Deve-se ressaltar que a razão sexual normalmente observada em *C. hominivorax* é de 1:1. Portanto, estes resultados indicam uma alteração significativa e que provavelmente deve estar relacionada com diferenças de compatibilidade de acasalamento entre as diferentes linhagens de *C. hominivorax* testadas.

Além disso, entre os adultos recém-emergidos obtidos a partir dos retrocruzamentos, foram encontrados oito indivíduos

onde não era possível identificar o sexo, uma vez que a distância entre os olhos era intermediária entre a normalmente observada nos machos e fêmeas desta espécie (ver página 85). Estes indivíduos foram separados e mantidos em gaiolas para verificar a longevidade e produção de progênie. Os ovos depositados por estas fêmeas foram em menor número e o desenvolvimento larval foi comprometido, isto é, demorou cerca de onze dias e os adultos não emergiram dos pupários. No momento, estes adultos com olhos intermediários, estão sendo seguidos para analisar a sua longevidade e comportamento em condições de laboratório.

#### IV.5 Análise Morfométrica

Os resultados obtidos indicam que existe uma variabilidade morfométrica, ou seja, no tamanho das moscas, significativo e diagnosticável pela análise estatística empregada neste trabalho. Estas diferenças são evidentes tanto quando se comparam as médias das medidas dos 19 caracteres individuais das 7 linhagens de *C. hominivorax* estudadas, quando pelas 26 relações entre as médias dos caracteres, cujos resultados serão descritos a seguir. Pelo emprego desta metodologia foi também possível separar e agrupar as linhagens, verificar o grau de similaridade interlinhagens e avaliar o potencial deste tipo de análise para melhor entender a variabilidade encontrada, a nível cromossômico, em *C. hominivorax*.



#### IV.5.1. Análise das variações originais

A análise de variância individual de cada uma das 19 variáveis medidas, indica que para todas as variáveis, o Teste F tem um nível de significância menor que 1%. A Tabela 10 apresenta os valores de estatística F para cada variável e para a interação entre sexo e região.

A variável de nº 8, sutura torácica (ST), como indica a Tabela 10, é fortemente discriminatória, isto é,  $F = 357,4$  para ambos os sexos. Por ordem de poder de discriminação, Tabela 10, além da variável ST, outras 9 variáveis apresentaram-se mais discriminatórias, com relação ao valor de F, quando se considera o tamanho dos adultos das sete linhagens analisadas. São elas:

- a. Distância entre R1 a M3 + Cu (variável 2),  $F = 62,89$ ;
- b. Comprimento do 3º segmento da antena (A) (variável 12)  $F = 55,38$ ;
- c. Distância entre M3+4 à subcostal (variável 6)  $F = 53,93$ ;
- d. Distância H à M1+2 (variável 7)  $F = 49,19$ ;
- e. Comprimento do scutum (SCU) (variável 15)  $F = 44,52$ ;
- f. Distância interna do olho (OI) (variável 11)  $F = 42,70$ ;
- g. Distância externa do olho (OE) (variável 10)  $F = 29,78$ ;
- h. Distância entre a nervura R-m à bm-cu (variável 5)  $F = 26,10$ .

O Teste de Tukey foi aplicado para se verificar quais as linhagens que diferem entre si com relação à cada uma das variáveis analisadas. Os resultados deste teste foram resumidos em um

CARÁTER	F	g.l. = (6;336)
1	10,46	
2	62,89	
3	19,77	
4	21,71	
5	26,10	
6	53,93	
7	49,19	
8	357,64	
9	10,08	
10	29,78	
11	42,70	
12	8,51	
13	55,38	
14	30,99	
15	44,52	
16	22,08	
17	23,83	
18	11,58	
19	21,56	

TABELA 10 - Valores da estatística F da análise de variância individual para cada um dos 19 caracteres medidos de machos e fêmeas das linhagens RS-1, Pa-1, Ca-1, PP-1, Ba-1, Al-1 e amostra Ca-2 de *Cochliomyia hominivorax*, a um nível de significância de 5%.

tabela de associação entre as linhagens separadamente para machos e fêmeas. Como indicam as Tabelas 11 e 11', o valor interno representa o número de vezes que as linhagens aparecem juntas num mesmo grupo com relação às dezenove variáveis.

Quando são comparados machos e fêmeas das linhagens RS-1 e PA-1 (tabelas 11 e 11'), verifica-se que estas aparecem em grupos separados para todos os caracteres no caso dos machos e para dezoito caracteres no caso das fêmeas, isto é, elas só são semelhantes para apenas um dos caracteres analisados. Assim somente para a variável 13, elas podem ser colocadas no mesmo grupo. A mesma situação ocorre entre (Pa-1 e Ca-2) e (Pa-1 e Ba-1) para machos e entre (Ba-1 e Al-1) e (Al-1 e RS-1) para fêmeas. Já com CA-2, a linhagem RS-1 aparece em grupos separados para apenas 7 variáveis analisadas, e para 11' quando comparada com BA-1. Em amostras de *C. hominivorax* coletadas em duas épocas diferentes do ano, na mesma localidade, ou seja, Caraguatatuba - SP (linhagem Ca-1, coletada em várias épocas do ano) e a amostra Ca-2, coletada entre Janeiro e Fevereiro de 1985, verificou-se através do teste de Tukey que as amostras aparecem juntas em apenas um dos 19 caracteres analisados para fêmeas e para sete caracteres quando se analisa machos (Tabelas 11 e 11').

O fato de terem sido coletadas em épocas distintas nos leva a pensar no fato de estar agindo um componente sazonal para a determinação do tamanho da mosca, ou que explicação esteja no fato de ser uma amostra de *C. hominivorax*, proveniente de um animal que tenha contraído a doença no seu local de origem, isto é, em outra região, e que

	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ca-2	Ba-1	Al-1
RS-1	19						
Pa-1	0	19					
Ca-1	3	3	19				
PP-1	2	6	7	19			
Ca-2	10	0	7	7	19		
Ba-1	8	0	7	7	8	19	
Al-1	1	10	5	7	2	1	19

Tabela 11. Matriz de associação formada pelo teste de Tukey de machos, isto é, número de vezes em que as linhagens RS-1, Pa-1, Ca-1, PP-1, Ba-1, Al-1 e amostra Ca-2 de *Cochliomyia hominivorax*, podem ser associadas num mesmo grupo, para cada um dos 19 caracteres analisados.

	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ca-2	Ba-1	Al-1
1	19						
1	1	19					
1	2	10	19				
1	5	5	4	19			
2	12	0	1	7	19		
1	6	2	3	4	8	19	
1	0	11	4	8	4	0	19

Tabela 11'. Matriz de associação formada pelo teste de Tukey de fêmeas, isto é, número de vezes em que as linhagens RS-1, Pa-1, Ca-1, PP-1, Ba-1, Al-1 e amostra Ca-2 de *Cochliomyia hominivorax*, podem ser associados num mesmo grupo para cada um dos 19 caracteres analisados.

tenha sido transportado para Caraguatatuba. Além destas interpretações, esta variabilidade pode estar correlacionada com as diferenças cariotípicas observadas entre Ca-1 e Ca-2 e descritas anteriormente. De fato, a análise morfométrica foi efetuada em decorrência de ter sido observada uma variabilidade cariotípica nesta localidade. Como as diferenças envolveram a morfologia dos cromossomos X das fêmeas Ca-2 e o par autossômico 6, é provável que este cariótipo seja de um híbrido que pela primeira vez foi detectado em condições naturais.

Em seguida, aplicou-se, nas 7 linhagens, a análise de variância multivariada, que foi significativa sob todos os critérios de avaliações estatísticas que medem diferenças entre as populações, isto é, lambda de Wilks, traço e máximo alto valor.

A distância de Mahalanobis ( $D^2$ ) entre as linhagens é significativamente diferente de zero ( $p < 10^{-5}$ ) para todos os pares de regiões (Tabelas 19 e 21), indicando que por este método é grande a separação entre as linhagens e amostra de *C. hominivorax* analisadas.

Deve-se salientar que estes testes multivariados, foram calculados em separado para cada sexo.

Ordenando-se médias de cada variável (média com relação aos dois sexos), por região, verifica-se que as linhagens RS-1, Ca-2 e Ba-1, são as que apresentam moscas de menor tamanho, enquanto as linhagens PA-1 e Al-1, são as que apresentam as moscas maiores.

LINHAGENS	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ba-1	Al-1	Ca-2
RS-1	-	6,4342	8,3337	4,1302	4,5886	9,6527	5,8146
Pa-1	6,4342	-	5,4064	3,4130	3,8144	7,0525	4,5734
Ca-1	8,3337	5,4064	-	5,5843	4,2985	5,7327	6,4420
PP-1	4,1302	3,4130	5,5843	-	2,1698	7,3743	4,0235
Ba-1	4,5886	3,8144	4,2985	2,1698	-	6,0530	4,5850
Al-1	9,6257	7,0525	5,7327	7,3743	6,0530	-	7,9912
Ca-2	5,8146	4,5734	6,4420	4,0235	4,5850	7,9912	-

TABELA 18 - Distância de Mahalanobis para o sexo masculino, utilizando as variáveis originais entre as linhagens e amostra de *C. hominivorax* analisadas.

LINHAGENS	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ba-1	Al-1	Ca-2
RS-1	-	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Pa-1	0,000000	-	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Ca-1	0,000000	0,000000	-	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
PP-1	0,000000	0,000000	0,000000	-	0,000000	0,000000	0,000000
Ba-1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000048	-	0,000000	0,000000
Al-1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	-	0,000000
Ca-2	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	-

TABELA 19 - Probabilidade de significância da distância de Mahalanobis entre as linhagens e amostra de *C. hominivorax*. Estes valores indicam que as distâncias entre as linhagens é significativamente diferente de zero e portanto não é devido ao acaso. Assim, quanto menor é a probabilidade de significância, maior é a evidência de que as diferenças existem entre as linhagens e que esta diferença não é devida ao acaso.

LINHAGENS	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ba-1	Al-1	Ca-2
RS-1	-	7,1860	10,9007	5,1048	5,7170	14,8733	5,2670
Pa-1	7,1860	-	5,2384	3,2329	3,7595	10,8269	5,7780
Ca-1	10,9007	5,2384	-	6,7607	11,5427	8,9742	6,4420
PP-1	5,1048	3,2329	6,7944	-	2,7246	12,0938	4,9803
Ba-1	5,7170	3,7595	6,7607	2,7246	-	11,3368	5,2289
Al-1	14,8733	10,8269	11,5427	12,0938	11,3368	-	12,7568
Ca-2	5,2670	8,7788	8,9742	4,9803	5,2289	12,7568	-

TABELA 20 - Distância de Mahalanobis para o sexo feminino, utilizando as relações, entre as linhagens e amostra de *C. hominivorax* analisadas.

LINHAGENS	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ba-1	Al-1	Ca-2
RS-1	-	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Pa-1	0,000000	-	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Ca-1	0,000000	0,000000	-	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
PP-1	0,000000	0,000000	0,000000	-	0,000000	0,000000	0,000000
Ba-1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	-	0,000000	0,000000
Al-1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	-	0,000000
Ca-2	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	-

TABELA 21 - Probabilidade de significância da distância de Mahalanobis entre as linhagens e amostra de *C. hominivorax* analisadas. Estes valores indicam que as distâncias entre as linhagens é significativamente diferente de zero e portanto não é devido ao acaso. Assim, quanto menor é a probabilidade de significância, maior é a evidência de que as diferenças existem entre as linhagens e que esta diferença não é devida ao acaso.



Os fatores que estão interagindo para influenciar e selecionar o tamanho das moscas, são provavelmente mais intrínsecos de cada linhagem do que ambientais, uma vez que as larvas e pupas de todas as linhagens analisadas, foram mantidas nas mesmas condições de laboratório, isto é, temperatura, umidade e fotoperíodo, além da dieta, tanto na fase larval como na de adulto.

Deve-se ressaltar que há uma forte interação entre sexo e região quando se analisam as variáveis 14 (comprimento do scutellum) e 15 (comprimento do scutum), isto é, quando se ordena as regiões, de acordo com a média das variáveis, a ordenação difere significativamente entre os sexos.

#### **IV.5.2 Análise discriminante das variáveis originais**

Nas sete linhagens de *C. hominivorax*, foram analisados 19 caracteres que representassem diferentes regiões do corpo de adultos, no sentido de se assegurar um maior número de informações sobre as diferenças e semelhanças existentes entre as amostras. No entanto, muitas variáveis são fortemente correlacionadas entre si, sendo que possivelmente algumas delas poderiam até ser eliminadas, sem perda significativa de informação. Para verificar esta hipótese, procurou-se extrair do conjunto dos 19 caracteres analisados, um subconjunto menor com poder de discriminar as diferentes linhagens, utilizando-se para isto, a análise discriminante. Empregou-se a técnica "step-wise" para

a seleção de variáveis com maior poder de discriminação, e o critério de Wilks para controlar a entrada e saída de variáveis. O número de variáveis foi arbitrariamente limitado em 10 e o de funções discriminantes em 5. Como este número tenha fornecido bons resultados, não foram testadas outras alternativas.

Para os machos, os caracteres selecionados foram:

a. Variável 2 (distância da nervura R1 à M3 + Cu1); b. Variável 6 (distância da nervura M3+4 à subcostal); c. Variável 7 (distância da nervura H à M1+2); d. Variável 8 (sutura torácica); e. Variável 9 (espiráculo); f. Variável 10 (distância interna do olho); g. Variável 13 (comprimento da antena); h. Variável 17 (comprimento da metatibia).

As primeiras funções discriminantes, são responsáveis por 90% da variabilidade dos dados. Como indicam os dados na Tabela 12, o valor da correlação canônica entre cada função e as linhagens de *C. hominivorax*, mostra que as quatro primeiras funções têm poder discriminatório significativo para os machos.

O coeficiente estandardizado da variável 8 (sutura torácica) é dominante na primeira função derivada, o que já era esperado da análise de variância de cada caracter individual. Deve-se salientar que, retirando-se esta variável, ainda é forte nos machos, a discriminação entre as linhagens.

Resultados semelhantes foram encontrados para as moscas do sexo feminino das diferentes linhagens. A Tabela 13 apre-

FUNÇÃO	AUTO VALOR	Z RELATIVA	CORRELAÇÃO CANÔNICA	lambda de WILK'S	SIGNIFICÂNCIA
0	-	-	-	0,0044	0,000
1	7,49	58,88	0,939	0,0376	0,000
2	2,30	17,47	0,835	0,1239	0,000
3	2,00	15,16	0,816	0,3714	0,000
4	1,12	8,47	0,726	0,7856	0,000
5	0,24	1,83	0,441	0,9748	0,517
6	0,03	0,20	0,159	-	-

LA 12 - Valores da correlação canônica entre cada função para machos das linhagens RS-1, Pa-1, Ca-1, PP-1, B= e amostra Ca-2 de Cochliomyia hominivorax.

FUNÇÃO	AUTO VALOR	Z RELATIVA	CORRELAÇÃO	lambda de WILK'S	SIGNIFICÂNCIA
0	-	-	-	0,0008	0,000
1	18,96	66,12	0,975	0,0168	0,000
2	6,68	23,29	0,9333	0,1291	0,000
3	1,79	6,23	0,801	0,3600	0,000
4	0,64	2,23	0,625	0,5903	0,000
5	0,39	1,36	0,530	0,8208	0,517
6	0,22	0,76	0,423	-	-

LA 13 - Valores da correlação canônica entre cada função para fêmeas das linhagens RS-1, Pa-1, Ca-1, PP-1, B= e amostra Ca-2 Cochliomyia hominivorax.

sentam os resultados numéricos desta análise. No caso das fêmeas, as três primeiras funções têm poder discriminatório significativo.

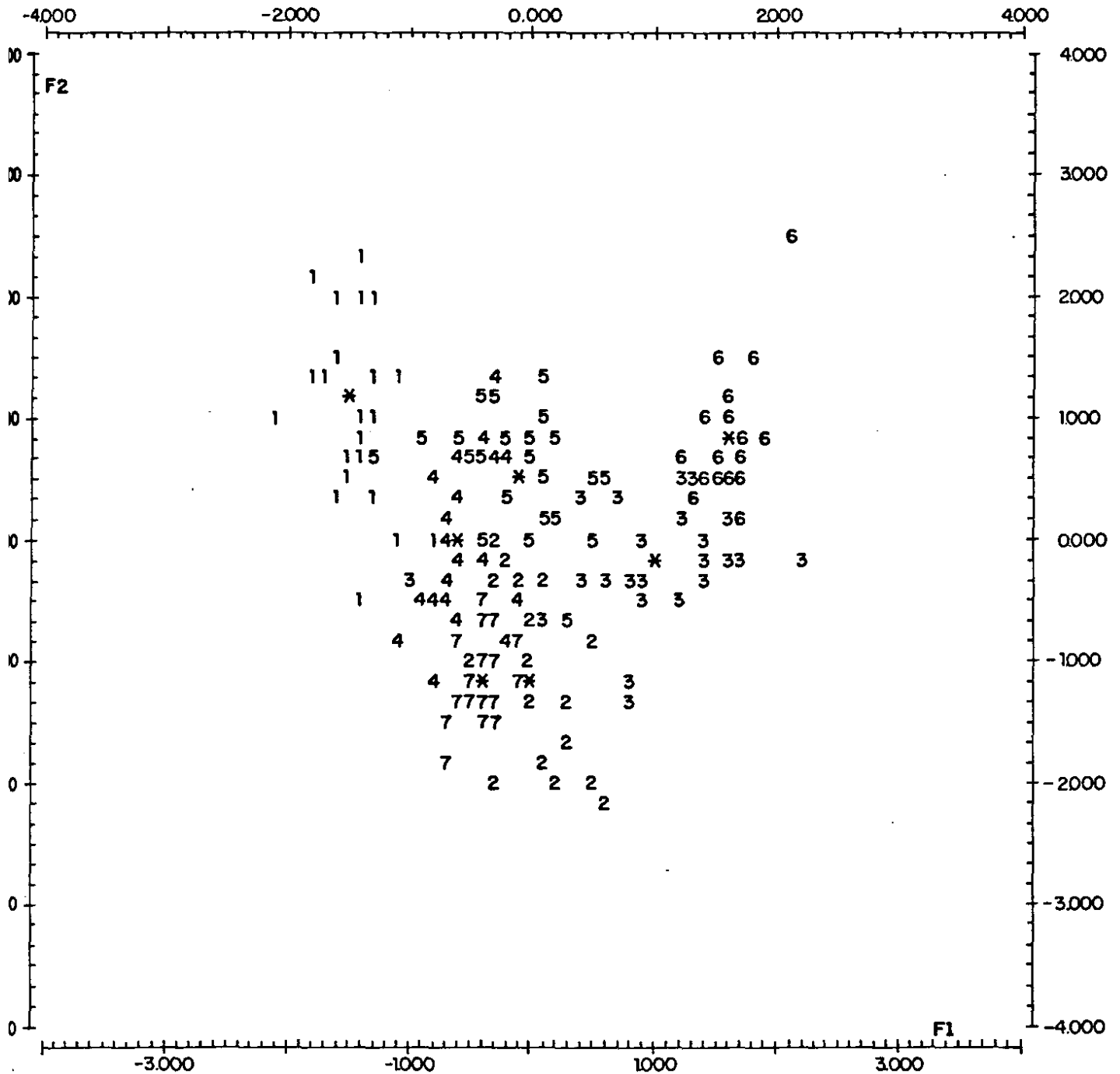
O gráfico da projeção discriminante das duas primeiras funções, para cada sexo, permite visualizar os subgrupos formados (Figuras 86 e 87). Observa-se nestas figuras, que as 7 linhagens podem ser divididas em 5 subgrupos, a saber: a. (linhagem RS-1); b. (linhagem Ca-1); c. (linhagem Ba-1); d. (linhagem Al-1); e. (linhagem Pa-1, PP-1 e Ca2).

A formação destes subgrupos é mais nítida entre as fêmeas do que entre machos das diferentes linhagens. Nestes últimos, as linhagens Pa-1 e Al-1 aparecem no gráfico contíguas, enquanto que para as fêmeas a separação entre elas é mais nítida (Figuras 86 e 87).

#### **IV.5.3. ANÁLISE DAS RELAÇÕES**

##### **5.3.1. Análise de Variância**

Do ponto de vista de caracterização biológica de uma espécie, talvez de maior interesse do que a comparação de médias das variáveis analisadas, seja o estudo considerando as relações entre as variáveis. Deste modo, foram estabelecidas 26 relações entre os diferentes caracteres analisados metricamente, no sentido de se determinar ou não a variabilidade interlinhagens, uma vez que aspectos da forma da mosca, podem ser especificados pela relação entre variáveis.



gura 86 - Projeção discriminante das medidas dos 19 caracteres originais de machos de *Cochliomyia hominivorax* de seis localidades :  
 (1) Porto Alegre (Linhagem RS-1)  
 (2) Paulínia-SP (Linhagem Pa-1)  
 (3) e (5) Caraguatatuba-SP (Linhagem Ca-1 e Linhagem Ca-2)  
 (4) Presidente Prudente-SP (Linhagem PP-1)  
 (6) Morro do Chapéu-BA (Linhagem Ba-1)  
 (7) Alfenas-MG (Linhagem Al-1)

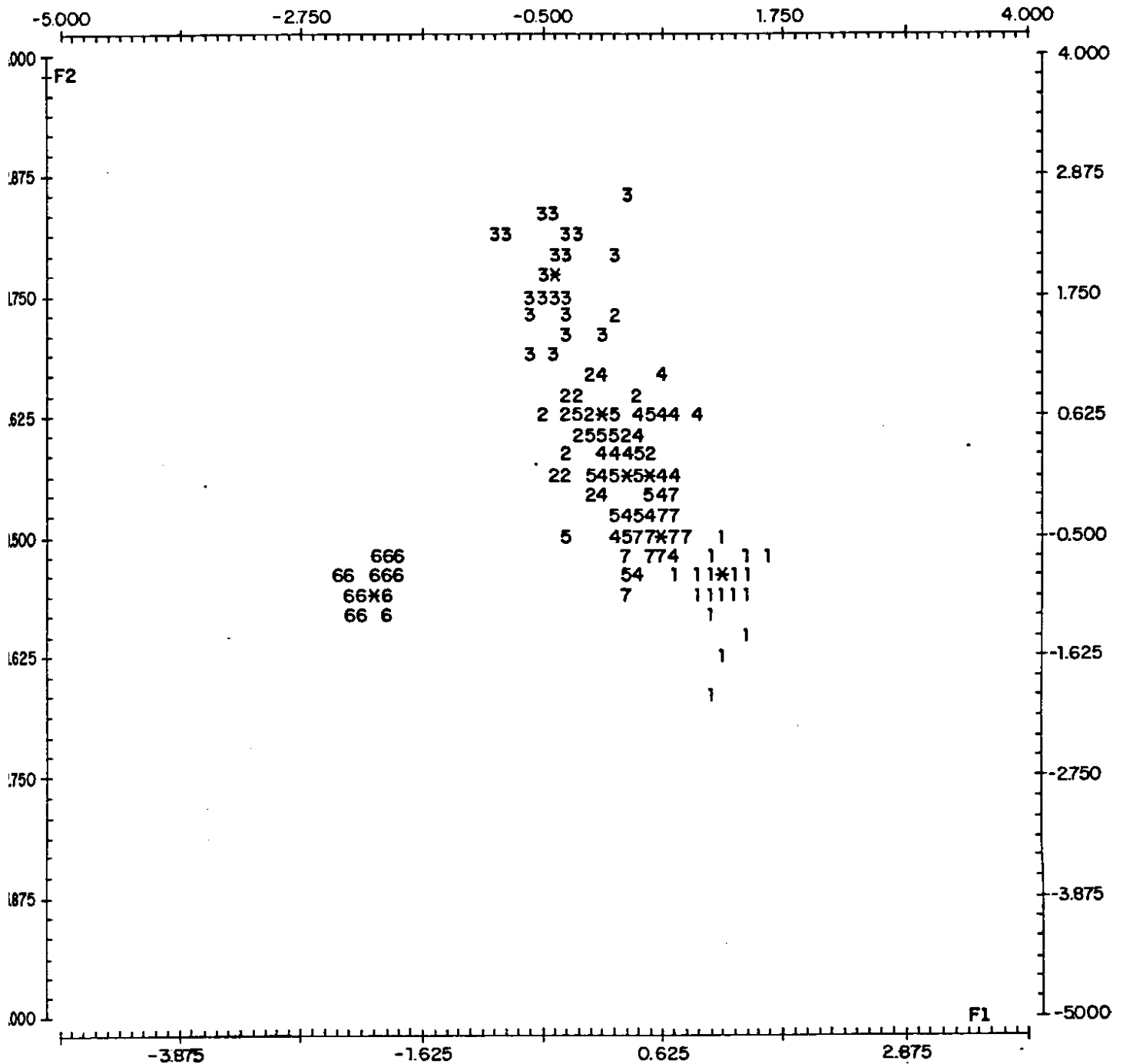


Figura 87 - Projeção discriminante das medidas dos 19 caracteres originais de fêmeas de *Cochliomyia hominivorax* de seis localidades :

- (1) Porto Alegre (Linhagem RS-1)
- (2) Paulínia-SP (Linhagem Pa-1)
- (3) e (5) Caraguatatuba-SP (Linhagem Ca-1 e amostra Ca-2)
- (4) Presidente Prudente-SP (linhagem PP-1)
- (6) Morro do Chapéu-BA (Linhagem Ba-1)
- (7) Alfenas-MG (Linhagem Al-1)

Para quase todas as relações analisadas, e que foram abreviadas por R, com exceção das seguintes: R-m M3/R-m à A1 + C1 (relação 13); metafemur/metatíbia (relação 25) e metafemur/metatarso (relação 26), o teste F é altamente significativo. Estes resultados evidenciam fortemente a existência de diferenças entre as sete linhagens analisadas, com respeito às relações estudadas (Tabela 14). Tabela 14 apresenta os resultados da estatística F, para cada relação.

Deve-se ressaltar que algumas das relações são diagnósticas com respeito a sexo, isto é, por exemplo, relação 22, 17, 11, 4 e 9 (ver páginas 52 e 53 de Material e Métodos)

Através desta análise, verifica-se que, também aqui há uma forte interação entre sexo e a linhagem para a relação R (OE/O1). Deve-se salientar que, *C. hominivorax* apresenta um dimorfismo sexual com relação ao olho composto. Os machos são holópticos (olhos contíguos em cima) e as fêmeas diacópticas (olhos separados na parte superior). Portanto, este carácter é utilizado para a separação dos sexos nesta espécie e também explica a forte interação encontrada quando se considera a relação R22 com o sexo.

O ordenamento das linhagens com base nas médias das relações não foi feito, uma vez que a variável escolhida como denominador da relação foi arbitrária.

Os resultados do teste de Tukey utilizando-se 26 relações para o sexo masculino, indicam que através desta análise

RELAÇÕES	F	g.l. = (6;336)
1	30,86	
2	19,66	
3	11,15	
4	8,37	
5	20,31	
6	23,72	
7	39,98	
8	15,76	
9	37,65	
10	28,09	
11	39,75	
12	15,23	
13	4,60	
14	14,58	
15	9,80	
16	13,92	
17	7,30	
18	16,70	
19	18,63	
20	17,11	
21	15,72	
22	22,52	
23	157,09	
24	9,14	
25	1,56	
26	3,20	

TABELA 14 - Valores de estatística F da análise de variância para cada uma das 26 relações entre os caracteres medidos de machos e fêmeas das linhagens RS-1, Pa-1, Ca-1, PP-1, Ba-1, Al-1 e amostra Ca-2 de *Cochliomyia hominivorax*, a um nível de significância de 5%



possível separar quase todas as linhagens de *C. hominivorax* estudadas.

Como indicam os resultados da tabela 15, verifica-se que, com exceção das linhagens (Pa-1 e PP-1), (Pa-1 e Ca-2), os demais pares de linhagens analisadas podem ser associadas num mesmo grupo para apenas oito relações de um total de 26 estabelecidas entre os dezenove caracteres analisados. Diferenças mais evidentes, aplicando-se este método, foram obtidas quando comparou-se as linhagens (Ba-1 e PP-1) (Ca-1 e PP-1) onde para apenas três relações, dentre as 26 analisadas estas puderam ser associadas num mesmo grupo. Resultados semelhantes foram obtidos pelo teste de Tukey aplicado nas fêmeas das sete linhagens analisadas e que estão resumidos na Tabela 15.

Deve-se ressaltar que baseado nos resultados obtidos empregando-se este teste, verifica-se que ambos os sexos ou apenas um deles podem ser utilizados para caracterizar morfometricamente pelo menos cinco linhagens de *C. hominivorax* dentre as sete analisadas.

### **5.3.2. Análise Discriminante**

A mesma técnica de análise discriminante utilizada anteriormente para as médias (item b.2), foi aplicada nas 26 relações estabelecidas. O número de relações foi igualmente limitado em dez o de funções em cinco. A análise foi realizada separadamente para machos e fêmeas.

	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ca-2	Ba-1	Al-1
RS-1	26						
Pa-1	7	26					
Ca-1	3	5	26				
PP-1	7	8	9	26			
Ca-2	5	9	6	12	26		
Ba-1	6	6	3	4	5	26	
Al-1	11	11	4	5	5	12	26

Tabela 15<sup>1</sup>. Matriz de associação formada pelo teste de Tukey para fêmeas, isto é, número de vezes em que as linhagens RS-1, Pa-1, Ca-1, PP-1, Ba-1, Al-1 e amostra Ca-2 de *Cochliomyia hominivorax* podem ser associadas num mesmo grupo com respeito as 26 relações entre os caracteres medidos.

Como indicado na Tabela 16, para as moscas machos as três primeiras funções discriminantes explicam 85,9% da variabilidade presente nos dados. Se for incluída a quarta função, esse valor aumenta para 96,8%. A estatística de Wilks é altamente significativa até a quarta função discriminante, e a correlação canônica das funções com as linhagens é relativamente alta até a terceira função discriminante, ou seja, 0,61, como indica a Tabela 16. As relações que foram selecionadas pelo "step-wise" para os machos, são as seguintes: R5, R10, R11, R12, R13, R16, R17, R20, R22.

Ao examinar os coeficientes estandardizados da primeira função, verifica-se que as relações R12 e R16, respectivamente  $R-m \rightarrow M3/M3+Cu1 \rightarrow M3$  e  $M3 + Cu1 \rightarrow M3/R-m \rightarrow A1 + CuA2$ , ambas referente à nervura da asa, são as mais importantes, e se matém até a segunda função.

O gráfico da projeção discriminante com respeito às duas primeiras funções das relações das 7 linhagens de *C. hominivorax* analisadas é reproduzido na Figura 88.

Este gráfico indica que a separação entre as diferentes linhagens analisadas é menos nítida do que quando se compara as variáveis originais. Mas, ainda assim, verifica-se que as linhagens RS-1, Ba-1 e Al-1 tem pouco intersecção com as amostras e quando projetadas num gráfico, podem ser separadas das demais linhagens (Figura 88).

FUNÇÃO	AUTO VALOR	% RELATIVA	CORRELAÇÃO CANÔNICA	lambda de WILK'S	SIGNIFICÂNCIA
0	-	-	-	0,0726	0,000
1	1,47	38,98	0,772	0,1795	0,000
2	1,12	29,77	0,727	0,3814	0,000
3	0,61	16,22	0,616	0,6150	0,000
4	0,44	11,86	0,556	0,8904	0,084
5	0,09	2,28	0,282	0,9671	0,353
6	0,03	0,90	0,181	-	-

ELA 16 - Valores da correlação canônica entre cada função para os machos das linhagens RS-1, Pa-1, Ca-1, PP-1, e amostra Ca-2 de *Cochliomyia hominivorax*.

FUNÇÃO	AUTO VALOR	% RELATIVA	CORRELAÇÃO	lambda de WILK'S	SIGNIFICÂNCIA
0	-	-	-	0,0047	0,000
1	16,42	81,72	0,971	0,0824	0,000
2	1,61	8,03	0,786	0,2153	0,000
3	1,05	5,23	0,716	0,4414	0,000
4	0,69	3,45	0,640	0,7470	0,000
5	0,21	1,08	0,423	0,9093	0,098
6	0,09	0,50	0,301	-	-

ELA 17 - Valores da correlação canônica entre cada função para fêmeas das linhagens RS-1, Pa-1, Ca-1, PP-1, B e amostra Ca-2 *Cochliomyia hominivorax*.

Para as fêmeas, temos que as duas primeiras funções explicam aproximadamente 90% da variabilidade encontrada entre as linhagens. A análise da Tabela 17 mostra que a primeira função é dominante e explica 81,7% da variabilidade dos dados, seguida da segunda função com 8%. A estatística lambda de Wilks é significativa para as todas as 6 possíveis funções discriminantes e a correlação canônica das funções com as linhagens é razoavelmente grande até a terceira função isto é, maior que 0,71 (Tabela 17). A primeira função discriminante é dominada pela relação R23, ou seja, scutellum/scutum, e a segunda função, pelas relações R12 e R15.

No gráfico da projeção discriminante da primeira função versus a segunda, das fêmeas, observa-se quase o mesmo tipo de aglomeração que o verificado para os machos das linhagens de *C. homi nivorax* (Figura 89).

Ao considerarmos as relações, como indicam as figuras 88 e 89, verifica-se que os dados estão mais difusos, quando comparados aos obtidos para as variáveis originais. Mas, ainda assim foram mantidas as separações dos seguintes subgrupos, ou seja: (Ca-1) (RS-1), (Ba-1), (Al-1), (Pa-1, PP-1 e Ca-2), como indicado no gráfico de projeção da análise discriminante, para cada sexo.

As distâncias de Mahalanobis entre as linhagens estão contidas nas Tabelas 22 e 24, para machos e fêmeas respectivamente. Para os machos a probabilidade de significância é menor que

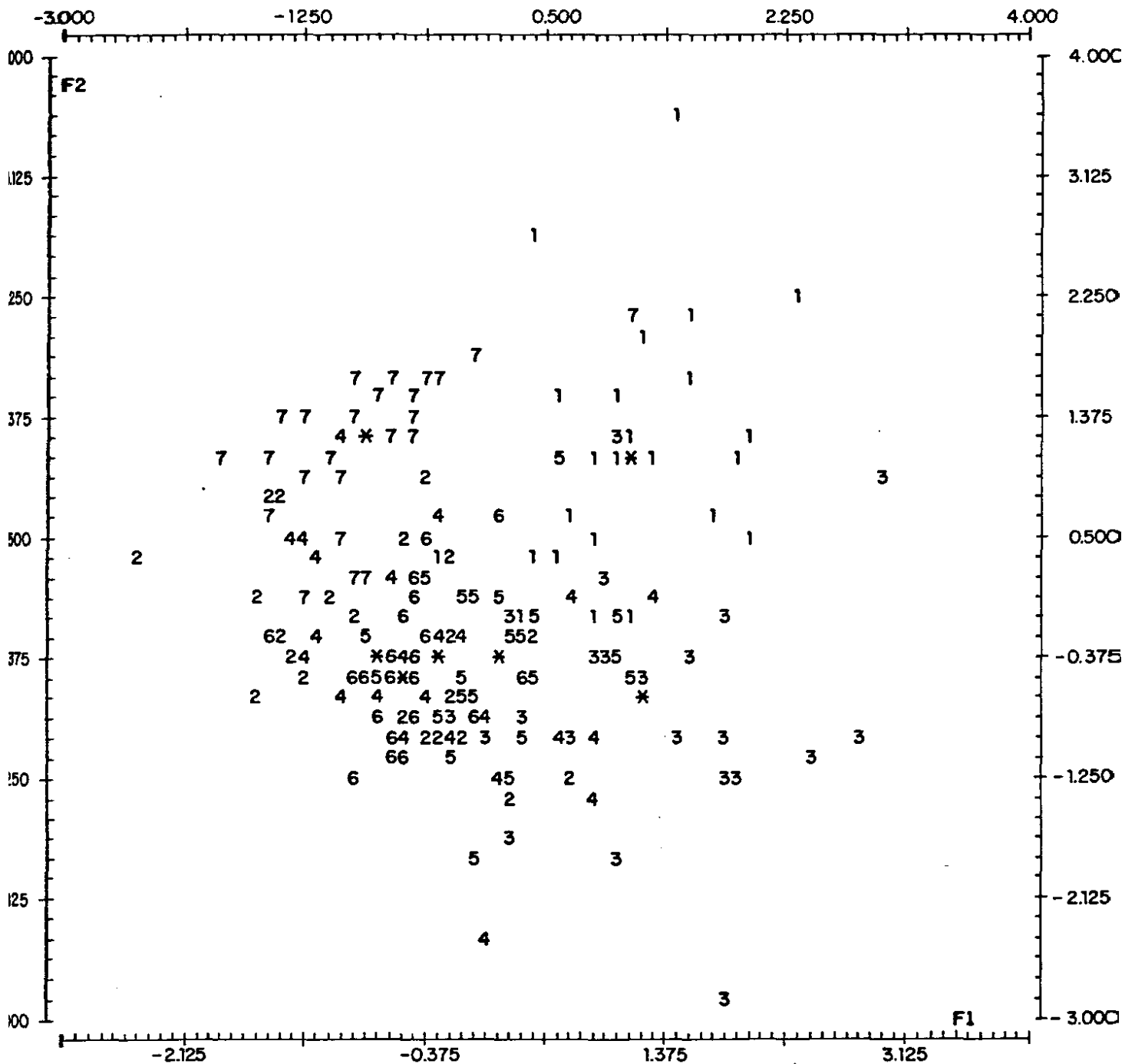


Figura 88 - Projeção discriminante das medidas de 26 relações entre os caracteres de machos de *Cochliomyia hominivorax* de seis localidades :

- (1) Porto Alegre (Linhagem RS-1)
- (2) Paulínia-SP (Linhagem Pa-1)
- (3) e (5) Caraguatatuba-SP (Linhagem Ca-1 e amostra Ca-2)
- (4) Presidente Prudente-SP (Linhagem PP-1)
- (6) Morro do Chapéu-BA (Linhagem Ba-1)
- (7) Alfenas-MG (Linhagem Al-1)

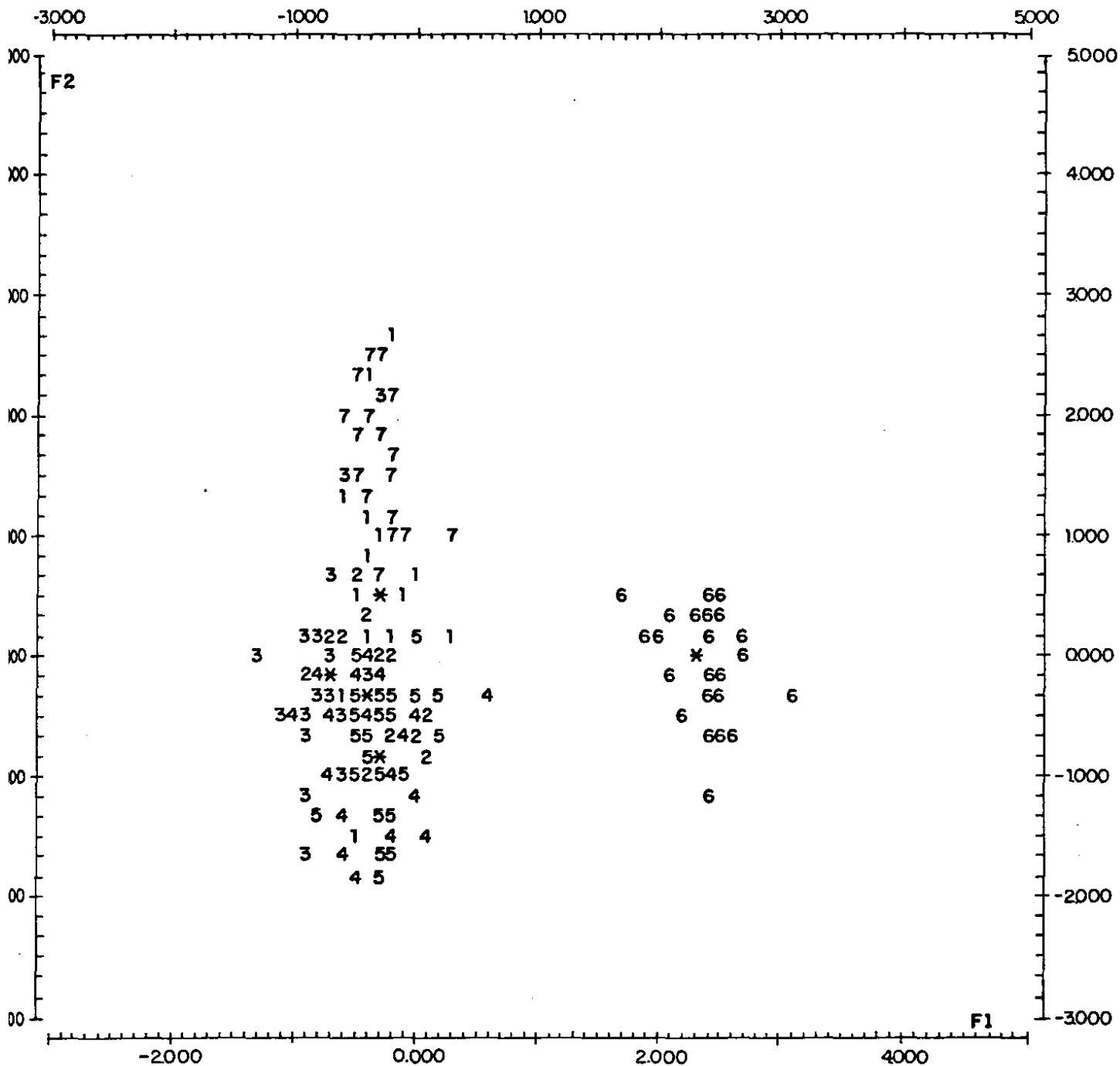


Figura 89 - Projeção discriminante das medidas de 26 relações entre os caracteres de fêmeas de *Cochliomyia hominivorax* de seis localidades :

- (1) Porto Alegre (Linhagem RS-1)
- (2) Paulínia-SP (Linhagem Pa-1)
- (3) e (5) Caraquatatuba-SP (Linhagem Ca-1 e amostra Ca-2)
- (4) Presidente Prudente-SP (Linhagem PP-1)
- (6) Morro do Chapéu-BA (Linhagem Ba-1)
- (7) Alfenas-MG (Linhagem Al-1)

10 para todas as distâncias, com exceção das distâncias entre as linhagens PP-1 e Ba-1 ( $p = 0,92$ ), Pa-1 e PP-1 ( $p = 0,13$ ) e Pa-1 e Ba-1 ( $p = 0,22$ ), que estão indicadas na Tabela 23. Já para as fêmeas, a probabilidade de significância é menor que 10 , considerando como hipótese nula que a distância é zero para todas as linhagens. Para este sexo, as únicas linhagens que estão próximas são Pa-1 e Ba-1 com  $p = 0,017$  (Tabela 25).



LINHAGENS	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ba-1	Al-1	Ca-2
RS-1	-	3,0903	3,5295	3,1607	3,1067	3,9606	3,9246
Pa-1	3,0903	-	2,5995	1,4249	0,8700	2,3105	2,9895
Ca-1	3,5295	2,5995	-	2,8082	2,4343	3,7430	4,2697
PP-1	3,1607	1,4249	2,8082	-	1,3403	2,4284	3,2765
Ba-1	3,1067	0,8700	2,4343	1,3403	-	2,1558	3,2642
Al-1	3,9606	2,3105	3,7430	2,4284	2,1558	-	3,4109
Ca-2	3,9246	2,9895	4,2697	3,2765	3,2642	3,4109	-

TABELA 22 - Distância de Mahalanobis para o sexo masculino, utilizando as relações, entre as linhagens e amostra de *C. hominivorax* analisadas.

LINHAGENS	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ba-1	Al-1	Ca-2
RS-1	-	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Pa-1	0,000000	-	0,000000	0,128058	0,922945	0,000006	0,000000
Ca-1	0,000000	0,000000	-	0,000001	0,000000	0,000000	0,000000
PP-1	0,000000	0,128058	0,000000	-	0,217813	0,000001	0,000000
Ba-1	0,000000	0,922945	0,000001	0,217813	-	0,000058	0,000000
Al-1	0,000000	0,000006	0,000000	0,000001	0,000058	-	0,000000
Ca-2	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	-

TABELA 23 - Probabilidade de significância da distância de Mahalanobis entre as linhagens e amostra de *C. hominivorax*. Estes valores indicam que as distâncias entre as linhagens é significativamente diferente de zero e portanto não é devido ao acaso. Assim, quanto menor é a probabilidade de significância, maior é a evidência de que as diferenças existem entre as linhagens e que esta diferença não é devida ao acaso.

LINHAGENS	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ba-1	Al-1	Ca-2
RS-1	-	2,5869	3,7768	3,4527	3,3124	3,3786	3,4197
Pa-1	2,5869	-	3,7307	2,2960	1,6704	2,4850	3,0920
Ca-1	3,7768	3,7307	-	3,0812	3,8458	4,6244	4,5363
PP-1	3,4527	2,2960	3,0812	-	1,8433	3,3859	3,9634
Ba-1	3,3124	1,6704	3,8458	1,8433	-	2,7599	4,1592
Al-1	3,3786	2,4850	4,6244	3,3859	2,7599	-	3,9071
Ca-2	3,4197	3,0920	4,5363	3,9634	4,1592	3,9071	-

TABELA 24 - Distância de Mahalanobis para o sexo feminino, utilizando as relações, entre as linhagens e amostra de *C. hominivorax* analisadas.

LINHAGENS	RS-1	Pa-1	Ca-1	PP-1	Ba-1	Al-1	Ca-2
RS-1	-	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Pa-1	0,000000	-	0,000000	0,000000	0,017250	0,000000	0,000000
Ca-1	0,000000	0,000000	-	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
PP-1	0,000000	0,000000	0,000000	-	0,000287	0,000000	0,000000
Ba-1	0,000000	0,017250	0,000000	0,002878	-	0,000000	0,000000
Al-1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	-	0,000000
Ca-2	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,0000	-

TABELA 25 - Probabilidade de significância da distância de Mahalanobis entre as linhagens e amostra de *C. hominivorax* analisadas. Estes valores indicam que as distâncias entre as linhagens é significativamente diferente de zero e portanto não é devido ao acaso. Assim, quanto menor é a probabilidade de significância, maior é a evidência de que as diferenças existem entre as linhagens e que esta diferença não é devida ao acaso.

## V - ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS

Foram analisadas 9 linhagens de 8 localidades diferentes (veja-se Tabelas 1 e 2 e Figura 1). As diferenças mais evidentes estão relacionadas com a morfologia e tamanho dos cromossomos sexuais X e Y e com o número e localização das constricções secundárias presentes tanto nos cromossomos sexuais quanto nos autossomos.

Dos 16 cariótipos descritos por diversos autores de linhagens do México e Estados Unidos, apenas uma se assemelha a uma das 9 analisadas de material brasileiro.

Os primeiros trabalhos envolvendo a análise cariotípica de *C. hominivorax* foram obtidas de amostras provindas da criação massal do programa de erradicação dessas moscas no laboratório de Mission no Texas. Wasserman (1957), Boyes (1961) e LaChance et alii (1964), embora recebendo amostras de moscas da mesma criação massal, mas em épocas diferentes, descreveram três cariótipos distintos. Isso indica que na criação massal, novos cariótipos devem ter sido introduzidos com o tempo, método comumente usado para diminuir a endogamia e aumentar a eficiência de criação. Estes autores utilizaram metáfases de gânglio nervoso corados com orceína e confeccionaram idiogramas cujo comprimento relativo e relação de braços estão descritos nas Tabelas 3 e 3'. Para simplificar a comparação entre estes cariótipos com aqueles obtidos em linhagens brasileiras desta espécie, designamos de linhagem K (Kaufman & Wasserman, 1957), linhagem B (Boyes, 1961) e linhagem L (LaChance et alii, 1964).

LA 3 - Comprimento relativo dos pares de cromossomos expressos em TLC\*, das linhagens *Cochliomyia hominivorax* Texas descritas por Kaufmann & Wassermann (1957), Boyes (1961) e La Chance et alii (1964).

ESPÉCIES	PARES DE CROMOSSOMOS (% CTC)*							LOCAL
	Y	X	II	III	IV	V	VI	
<i>hominivorax</i> Kaufmann & Wassermann (1957)	3,5	12,4	13,7	16,1	18,6	18,6	22,5	TEXAS
Boyes (1961)	4,70	8,83	16,53	16,93	17,52	19,0	21,18	TEXAS
La Chance et alii (1964)	7,82	16,19	16,48	17,59	19,54	19,54	21,78	TEXAS

CL (PERCENTAGES OF THE TOTAL COMPLEMENT LENGHT) = COMPRIMENTO TOTAL DO COMPLEMENTO.

LA 3' - Relação de braços (braços longo/braço curto) dos cromossomos das linhagens *C. hominivorax* do Texas descritas por Kaufmann & Wassermann (1957), Boyes (1961) e La Chance et alii (1964).

ESPÉCIES	PARES DE CROMOSSOMOS (% CTC)*							LOCAL
	Y	X	II	III	IV	V	VI	
<i>hominivorax</i> Kaufmann & Wassermann (1957)	-	4,5	5,15	1,07	1,63	1,93	1,72	TEXAS
<i>hominivorax</i> (1961)	-	4,25	1,38	3,11	2,38	1,58	1,43	TEXAS
<i>hominivorax</i> La Chance et alii (1964)	-	0,54	1,42	2,92	1,60	1,33	1,29	TEXAS

A linhagem K, não se assemelha a nenhuma das 9 linhagens analisadas neste trabalho, especialmente pelo tamanho do cromossomo X, assim na linhagem K o CTC do X é 12,4%, em Ca-1 (6,86%), Ca-2 (7,01%), PP-1 (7,04%), em Pa-1 é (6,37%), RS-1 (6,34%), Al-1 (7,49%), Ba-1 (8,03%), GO-1 (6,03%), MT-1 (6,48%) e MT (8,10%) (Tabelas 1 e 3 e Figuras 1 e 1B). Além disso, o X da linhagem K é telocêntrico enquanto que nas linhagens brasileiras o X é acrocêntrico com um satélite na extremidade. O que varia interlinhagens é o número de constricções secundárias no braço longo e o seu comprimento (Figuras 1, 1B, Tabela 1, 3). Neste aspecto, também o Y telocêntrico descrito em K, difere do Y metacêntrico das linhagens Ca-1, Ca-2, PP-1, RS-1, Al-1 e Ba-1 e do submetacêntrico de Go-1, MT-1, MT-2 e Pa-1 (Figura 1). Com relação ao comprimento dos autossomos, de um modo geral, há uma correspondência razoável dos pares 2, 3, 4 e 5 (Tabelas 1,3). Nestes pares, somente o 6 da linhagem K é significativamente menor que os das 9 linhagens descritas além de não apresentar constricções secundária no braço longo, constricção esta que foi considerada diagnóstica para a distinção das linhagens Al-1, Ba-1, Pa-1 e MT-2 (Figuras 1 e 1B). O mesmo ocorre para os pares 2 e 3, onde foram descritas constricções secundárias em PP-1, RS-1, Ba-1, MT-2 em ambos os pares e em Ca-1, MT-1, Al-1 e Pa-1 somente no 3. Todas estas constricções não ocorrem na linhagem K.

O cariótipo das duas outras linhagens do Texas (B e L), foram também diferentes das 9 linhagens brasileiras. Neste caso a distinção era com relação a morfologia do cromossomo Y, que é

I - Comprimento relativo dos pares de cromossomos, expressos em porcentagens do comprimento total do complemento (X CTC), das linhagens de *Cochliomyia hominivorax* (média e desvio padrão de dez metafases de cada linhagem) de Caraguatatuba (Ca) e Nova Odessa (NOI e NOII).

LÍNEA	PARES DE CROMOSSOMOS (% CTC)*							MÉDIA DO CTC EM um	COMPRIMENTO EM um
	X	Y**	2	3	4	5	6		
hominivorax Ca	6,48	4,31	22,22	19,28	16,43	18,21	16,89	27,75	2,0
	1,09	1,12	0,85	0,81	1,03	0,66	0,73	4,41	0,18
hominivorax NOI	6,98	4,50	22,32	10,12	16,14	18,76	16,66	28,64	2,10
	1,34	1,02	1,58	0,66	0,75	0,77	0,98	4,59	0,28
hominivorax NOII	12,38	4,12	21,14	19,06	14,29	17,53	15,55	35,35	4,15
	2,18	0,85	1,56	1,04	0,88	0,86	1,02	3,60	0,78

\*CTC = Porcentagem do Comprimento Total do Complemento.

\*\*A medida do comprimento do cromossomo Y não está incluída como parte do (% CTC) que inclui os dois cromossomos sexuais ou o único X do macho e os autossomos.

I' - Relação de braços dos pares de cromossomos das linhagens *Cochliomyia hominivorax* (média e desvio padrão de dez metafases de cada linhagem) de Caraguatatuba (Ca) e Nova Odessa (NOI e NOII).

LÍNEA	X	Y	2	3	4	5	6
hominivorax Ca	3,05	1,07	1,39	1,39	1,46	1,51	3,0
	0,44	0,15	0,12	0,09	0,18	0,24	0,72
TIPO DE CROMOSSOMO	st	m	m	m	m	m	sm
hominivorax NOI	3,55	1,20	1,50	1,31	1,54	1,45	2,68
	1,38	0,45	0,20	0,29	0,29	0,20	0,28
TIPO DE CROMOSSOMO	st	m	m	m	m	m	sm
hominivorax NOII	1,39	1,06	1,12	1,21	1,19	1,27	1,58
	0,49	0,13	0,05	0,19	0,07	0,18	0,16
TIPO DE CROMOSSOMO	m	m	m	m	m	m	m

Concorda com o sistema de Levan et alii (1964): m = metacêntrico; sm = subtacêntrico; st = centrômero localizado no subterminal.

acrocêntrico nas linhagens B e L e metacêntrico em Ca-1, Ca-2, RS-1, Al-1, Ba-1 e PP-1 e submetacêntrico nas linhagens GO-1, MT-1 e Pa-1 (Figura 1B). Diferenças existem também com relação a presença, número e localização das contrações secundárias. Assim, a linhagem B apresenta contrações proximal no braço longo do par 6, muito semelhante a encontrada em MT-2. No entanto, estas duas linhagens diferem uma vez que em MT-2, os pares 2 e 3 contêm contração secundária distal e proximal no braço curto, respectivamente, que não ocorrem em B (Figura 1B).

A linhagem L não apresenta contração secundária em nenhum par do cariótipo, sendo portanto esta a segunda diferença observada com relação aos cariótipos das demais linhagens, embora os autossomos e o cromossomo X, apresentem um comprimento relativo ao complemento semelhante as linhagens Ca-1, PP-1, RS-1, Ba-1 e Al-1 (Tabelas 1 e 3).

Mais recentemente LaChance et alii (1986) analisaram cariotipicamente 23 linhagens de *C. hominivorax* coletadas em 5 estados mexicanos, ou seja, Oaxaca, Chiapas, Quintana Roo, Colima e Michoacán, e uma linhagem da Ilha de Jamaica. No entanto as comparações entre os cariótipos descritos por estes autores com as linhagens brasileiras, tornaram-se difíceis de serem estabelecidas, especialmente por causa de: 1- diferenças na técnica de preparação dos cromossomos; 2- a análise cariotípica ter sido realizada em cromossomos meióticos ao contrário dos mitóticos utilizados para a descrição das linhagens brasileiras. Comparando-se as microfotografias e a tabela de porcen-

tagem total do comprimento do complemento verifica-se que todos os cromossomos X descritos para as linhagens mexicanas são menores do que qualquer um descrito para as linhagens brasileiras. Assim, o maior cromossomo X descrito para a amostra de Michoacán (CTC = 5,1%) ainda é menor do que o menor X descrito para GO-1 (CTC = 6,03%) como indica a Tabela 1. Provavelmente o grau de condensação diferencial entre cromossomos meióticos versus mitóticos, deve ter contribuído para as diferenças de comprimento observados. LaChance et alii (1986) encontraram diferenças significativas no comprimento dos cromossomos X e Y e entre os autossomos, somente o par 5 apresentou diferenças na média da relação dos braços interlinhagens. Estes autores interpretaram esta variabilidade cariotípica em *C. hominivorax*, como decorrente de um polimorfismo intraespecífico, como anteriormente proposto por McInnis (1981) e McInnis et alii (1983a) para populações mexicanas desta espécie e que será comparada a seguir.

Outras variações cariotípicas foram detectadas pela metodologia de bandamento cromossômico (banda Q). Aqui também, *C. hominivorax* mostrou ser espécie com grande variabilidade. Assim através desse método foi possível evidenciar que a intensidade e volume da fluorescência da heterocromatina dos pares de cromossomos foi diferente para cada uma das cinco linhagens analisadas neste trabalho e descritas no item 3 de resultados. As diferenças mais significativas foram com relação ao cromossomo Y que embora morfologicamente semelhante em Ca-1, RS-1, Al-1 e Ba-1, ou seja, todos metacêntricos, não apresentam o mesmo padrão de fluorescência. Este é um forte indicio de que as regiões heterocromáticas evidenciadas por esta técnica, de-



vem diferir nestas três linhagens, uma vez que o Y de RS-1 e Ca-1 é fluorescente em um dos braços, ao passo que em Al-1, este braço não é fluorescente. O par autossômico 2, apresentou duas variantes e com o padrão obtido, foi possível separar dois grupos, ou seja, linhagens Ca-1 e GO-1, que apresentaram neste par, banda Q em apenas um dos lados do centrômero, e o outro onde esta banda está presente em ambos os lados do centrômero (linhagem RS-1, Ba-1 e Al-1). Este padrão de fluorescência se manteve nos híbridos pois cada cromossomo mantém suas características de origem e os pares, de cromossomos mostravam a origem de cada homólogo.

O padrão de bandamento Q obtido para as linhagens de Ca-1, RS-1, Al-1, Ba-1 e GO-1 só puderam ser comparadas, com os descritos por McInnis (1981) e McInnis et alii (1983b), uma vez que no trabalho de Richardson et alii (1982a), não foram descritas diferenças no padrão de fluorescência entre os 9 gamodemas por eles analisados. Estes últimos autores, ressaltam que em todos os cariótipos, somente o par 3 apresentou uma forte fluorescência em ambos os lados do centrômero, quando corados com quinacrina, não especificando o padrão dos demais cromossomos do cariótipo.

Nessas condições as variações encontradas nos diferentes cariótipos, as quais podemos comparar estão relacionadas com o comprimento relativo e relação de braços. Neste caso, é importante salientar, que a partir das medidas do comprimento relativo e relação de braços que estão indicados nas Tabelas 1 e 2, verifica-se que as diferenças mais evidentes são com relação à morfologia e comprimento.

(Tabela 5 e 6) dos cromossomos X e Y. Assim a linhagem Al-1 e Ba-1 apresentam um cariótipo muito semelhante aos dos gamodemas C e D de Richardson et alii, que foram encontrados em linhagens do México e dos Estados Unidos. Como nas descrições de cariótipos por Richardson et alii, 1982a não há menção de constricções secundárias e estas são evidentes em alguns dos cariótipos por nós analisados, consideramos os gamodemas C e D diferentes de Al-1 e Ba-1, pois este último se caracteriza por apresentar constricções secundárias mediana no braço curto do par 2 e outra no braço longo do par 6 e no X (Figura 1B). Com relação a morfologia, verifica-se que dentre os cinco Y descritos por aqueles autores, em dois cariótipos (D e G) ele é metacêntrico e os três outros submetacêntricos com índices de relações de braços diferentes. A situação inversa foi encontrada para as linhagens brasileiras, ou seja, o Y das linhagens Ca-1, Ca-2, PP-1, RS-1, Al-1, Ba-1 foram metacêntricos enquanto o Y de Pa-1, GO-1, MT-1 e MT-2 foram submetacêntricos.

Associadas as diferenças encontradas nos cromossomos estes autores verificaram que as infestações causadas pelos tipos C, D e E provocam menos danos ao animal hospedeiro do que os tipos A e F, produzindo pouca ou nenhuma drenagem sanguínea na ferida. Além disso, essas feridas são desprovidas do forte odor, que caracteriza outras linhagens. Este tipo de ferida foi encontrada em gado do Novo México e Arizona, porém nunca no Texas. Situação semelhante foi por nós encontrada em amostras de *C. hominivorax* coletadas recentemente em mífases na região de Caucaía (Ceará). As mífases em bovinos encontradas nesta localidade sangravam muito, mas curiosamente não apresenta-

TABELA 5 - Comprimento relativo médio dos dez cariótipos da *Cochliomyia hominivorax* expressos em porcentagem total comprimento do complemento descritos por Richardson et alii (extraídos do relatório e manuscrito não publicados, com permissão dos autores).

TIPO	X	Y	2	3	4	5	6	LOCALIDADE
A	6,84 0,2	4,83 0,4	22,33 0,2	19,52 0,2	16,70 0,3	18,11 0,3	16,50 0,4	NOVO MEXICO, ARIZONA E CALIFÓRNIA
B	8,58	4,10	21,76	20,96	17,76	16,17	14,77	NOVO MÉXICO E ARIZONA
C	7,26	4,64	22,78	18,75	18,55	17,14	15,52	NORTE DO PACÍFICO
D	7,27	4,65	22,63	18,79	17,98	16,57	16,77	OESTE DO TEXAS E CALIFÓRNIA
E	7,62 0,5	5,84	21,84 0,5	18,64 0,5	18,24 0,3	17,23 0,2	16,43 0,3	SUL DO MÉXICO
F	7,44 0,4	5,84	22,33 0,4	18,31 0,35	17,10 0,5	17,30 0,5	17,51 0,4	NOVO MÉXICO E OESTE DO TEXAS
G	7,98	7,36	23,31	17,79	15,75	15,95	19,22	MÉXICO
H	7,03	3,82	22,49	19,28	16,67	18,07	16,47	MÉXICO
I	8,27	4,64	22,18	19,56	16,73	16,53	16,73	SUL DO MÉXICO
J	7,41 0,2	-	23,05 0,2	18,44 0,4	17,23 0,6	16,63 0,2	17,23 0,4	OESTE DO TEXAS

TABELA 6 - Relação dos braços dos cromossomos dos dez cariótipos descritos por Richardson et alii (comunicação pessoal) para *Cochliomyia hominivorax* (extraídos do relatório e manuscrito não publicados, com a permissão dos autores).

TIPO	X	Y	2	3	4	5	6	LOCALIDADE
A	3,69	5,88	1,39	1,33	1,29	1,63	2,29	NOVO MEXICO, ARIZONA E CALIFÓRNIA
B	3,13	-	1,22	1,47	1,39	1,83	1,93	NOVO MÉXICO E ARIZONA
C	3,73	-	1,50	1,68	1,48	1,66	1,90	NOVO MÉXICO E ARIZONA
D	4,27	1,77	1,39	1,25	1,72	1,72	2,49	OESTE DO TEXAS E CALIFÓRNIA
E	3,94	-	1,48	1,35	1,32	1,53	3,23	SUL DO MÉXICO
F	4,31	2,76	1,39	1,26	1,36	1,51	2,85	NOVO MÉXICO E OESTE DO TEXAS
G	3,57	1,56	1,49	1,42	1,55	1,64	2,20	MÉXICO
H	3,26	6,17	1,39	1,26	1,30	1,59	3,09	MÉXICO
I	4,83	2,07	1,41	1,22	1,32	1,56	2,80	SUL DO MÉXICO
J	3,64	-	1,38	1,31	1,35	1,56	2,48	OESTE DO TEXAS

vam o odor característico deste tipo de infestação. Esta amostra de larva foi coletada em novembro de 1986, e esta no momento sendo estudada. Tais resultados podem refletir diferenças das condições do clima da região, como também das condições do hospedeiro, ou das bactérias associadas à mífase como evidenciado em *Proteus rettgeri* por Foss et alii (1983) ou mesmo diferenças genéticas das linhagens de *C. hominivorax* como sugerem Richardson e colaboradores. Deve-se ressaltar que as feridas provocadas pelas diferentes linhagens de *C. hominivorax* analisadas neste trabalho, apresentam cheiro característico, sendo que a variação encontrada na linhagem de Caucáia deve estar associada ao tipo de sangramento que pode estar relacionado com a região no hospedeiro em que se localizava a mífase, ou seja, úbere e testículo. Quanto à interpretação da falta de odor característico, devemos esperar pelos resultados das análises hora em andamento.

Dos cariótipos analisados por McInnis (1981), foi verificado que os quatro tipos de Y descritos, tem em comum o fato de não serem fluorescentes, semelhantes ao Y por nós encontrado na linhagem Al-1. Dentre as linhagens por nós analisadas, foi a única onde o Y (por método da fluorescência) se apresentou quase imperceptível, como indicado nas figuras 57,58. Ainda com relação a linhagem Al-1, o Y não fluorescente é metacêntrico bem como, menor do que o X, e quanto a morfologia, se assemelha ao tipo 3 de Y descrito para amostra de *C. hominivorax* coletada em Aldama (Tamaulipas-México).

O cromossomo Y das linhagens Ca-1, RS-1, e Ba-1 apresentaram fluorescência mais evidente em apenas um dos braços do Y

metacêntrico (Figuras 46, 50 e 51), diferindo dos dois tipos de Y observados em Chiapas, México onde além de morfologicamente diferentes, foram também não fluorescentes (McINNIS et alii, 1983a).

Com relação aos cinco variantes do X acrocêntrico observado em Aldama, três foram fluorescentes no braço curto. Consideramos este braço um satélite, por ser região heterocromática, com morfologia característica, banda Q sempre presente e com intensidade variável dependendo da linhagem considerada (Figuras 45, 50 e 57).

No que diz respeito ao braço longo do X, em todas as linhagens (Ca-1, RS-1, Al-1, Ba-1 e Go-1), a metade proximal foi mais fluorescente que a porção terminal, diferindo das linhagens de Aldama, onde pela descrição de McInnis e colaboradores, bandas Q foram restritas a região da contração secundária que variou de uma a duas. Para o cromossomo X, nós não encontramos um padrão de fluorescência restrito ou delimitado à contração secundária em nenhuma das cinco linhagens analisadas. A variação foi mais relacionada a intensidade de fluorescência e a sua extensão no braço longo do X, que sempre foi mais amplo, do que aquela descrita por McInnis para as linhagens mexicanas.

O emprego do método de banda Q, permitiu a identificação de uma variabilidade no conteúdo de heterocromatina entre as linhagens de *C. hominivorax* analisadas neste trabalho. Neste sentido, podemos concluir que uma significativa variação qualitativa de heterocromatina foi observada em quatro tipos de cromossomos desta espécie.

cie: X, Y, 2 e 3. Como em nossos experimentos de hibridação as características fluorescentes se mantêm em cada cromossomo individualmente, parece-nos claro existirem diferenças genéticas entre diferentes linhagens de *C. hominivorax*, e que podem ser citologicamente detectáveis nos cromossomos mitóticos. Estas diferenças devem ter também significado evolutivo, uma vez que parecem não representar apenas um excesso ou deficiência de DNA repetitivo (heterocromatina no sentido clássico) mas um DNA associado a proteínas com um provável papel genético funcional. Neste aspecto, é bem conhecido o fato de que as mudanças na heterocromatina, decorrente de ganho ou perda de vários DNA satélites, tem um importante papel na diferenciação de espécies de *Drosophila* (Holmquist, 1975a e b; Gatti et alii, 1976; Kurnit, 1979). Além disso em *Lucilia cuprina*, (Bedo, 1980), verificou através da análise do padrão de banda Q de cromossomos Y normal e translocado, que é possível diagnosticar os rearranjos envolvendo este cromossomo.

A variabilidade na morfologia dos cinco tipos de cromossomos X de *C. hominivorax* encontrados em Aldama por Mcinnis (1981), foi interpretada como decorrente de mutações envolvendo adição e deleção de cromatina. No caso do cromossomo Y, as diferenças na posição do centrômero encontradas nas diferentes populações de Aldama, foram atribuídas a inversões pericêntricas.

É provável, como mencionado acima, que parte da variabilidade cariotípica encontrada em *C. hominivorax*, pode ser explicada com base nos vários tipos de aberrações cromossômicas. Diferenças cromossômicas até a década de 70, eram observadas dentro e en-

tre diferentes populações de *Drosophila*, principalmente com base em alterações estruturais, mais facilmente evidenciáveis nos cromossomos politênicos. A técnica de quinacrina tem a vantagem de identificar a variabilidade intra e inter populacionais em cromossomos mitóticos, como também outros tipos de mudanças mesmo na ausência de alterações na ordem dos genes dos cromossomos politênicos (Ellison & Barr, 1971).

Esta situação parece ocorrer em *C. hominivorax*, cuja variabilidade na intensidade e o volume da banda Q foi evidente nas linhagens de Ca-1, RS-1, Ba1, Al-1 e GO-1. Em trabalhos recentes utilizando cromossomos politênicos (Dev et alii, 1985 e observações nossas), como também pela análise de cromossomos meióticos em fase de pareamento entre homólogos (LaChance & Whitten, 1986), não foi observado rearranjos aberrações evidentes.

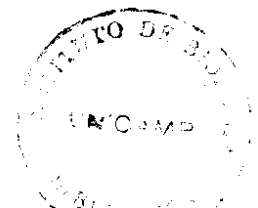
Diferenças cariotípicas foram também evidenciadas entre *C. hominivorax* e *C. macellaria*, seja pelo uso de banda C (Azere-do-Espin, 1982), como pelo uso da banda Q. É interessante verificar que nos cromossomos de *C. macellaria* as bandas C são muito evidentes, em contraste com os cromossomos de *C. hominivorax*, onde essas bandas são pouco definidas. O oposto ocorre com a banda Q, que são melhor definidas nesta última espécie, como indicam as Figuras 43, 62 e 63).



## VI. D I S C U S S Ã O

No final da década de 40 e início da de 50, era crença generalizada dentre os geneticistas e citologistas, que a quantidade do DNA em cada célula de um organismo era constante desde a concepção até a morte. Havia exceções conhecidas, principalmente quanto à formação das células sexuais, de um modo geral, e de casos em que as células germinativas, somáticas e sexuais apresentavam diferentes números de cromossomos (Sciarídeos), ou ainda de outras situações onde ocorriam evidentes casos de poliploidia no desenvolvimento de certas células somáticas.

Os fenômenos de amplificação, tais como os pufes de DNA em Sciarídeos e a redundância gênica na região organizadora do nucléolo, em vários organismos, mudou o conceito de constância do DNA e hoje sabe-se que multiplicação de genes específicos durante o desenvolvimento, é acontecimento relativamente comum nos eucariotos. A descoberta da existência de transposons por McClintock (1934 e 1943), e a possibilidade de incorporação do genoma de vírus no genótipo de diferentes organismos, além da possível existência de eliminação de genes específicos durante o desenvolvimento, mostraram que as moléculas de DNA têm um comportamento estruturado e dinâmico dentro do sistema vivo, que as distingue de outras moléculas orgânicas. Hoje, portanto, admite-se que durante o desenvolvimento orgânico, o genótipo pode sofrer modificações estruturais e outras, que alteram a sequência dos nucleotídeos e a quantidade de DNA do núcleo celular e que levam



ao desenvolvimento dos processos ontogenético nos eucariotos. Embora sejam conhecidos numerosos casos de ocorrência desse tipo de variação e de comportamento do material genético, existem muitas divergências sobre as interpretações quanto ao significado dessas variações na ontogenia e filogenia dos eucariotos.

As alterações genética e estruturais dos cromossomos são admitidas como as principais causas das mudanças permanentes e herdáveis dos organismos (White, 1973). Variabilidade cariotípica entre indivíduos de uma mesma espécie é também conhecida em vários organismos. Essa variabilidade se manifesta de um modo geral e essencialmente em regiões heterocromáticas dos cromossomos e, são em geral, mais frequentes nos cromossomos sexuais (X e Y) (Bonaccorsi, 1980). Muitas espécies, como o *Homo sapiens* (Craig-Holmes & Shaw, 1973), (Pathak & Arrighi, 1973) e *Rattus rattus* (Yosida e Sagai, 1975), apresentam grande variabilidade, tanto para a localização como para a quantidade de DNA repetitivo de blocos heterocromáticos. Variabilidade da heterocromatina dos cromossomos sexuais (X e Y) é encontrada em alguns organismos, como no caso de *Phryne cincta* (Wolf & Sokoloff 1965), *Neanura monticola* (Cassagnau, 1974) e em espécies crípticas de *Anopheles* (Bonaccorsi, 1980), para citar alguns exemplos. *C. hominivorax* está dentre as espécies que apresentam essa variabilidade cariotípica de forma acentuada. Hoje, conhecemos pelos menos 23 cariótipos diferentes para esta espécie. Em linhagens brasileiras, foram detectados três cariótipos por Azeredo-Espin (1982), somando mais 6 descritas neste trabalho. Cada um desses 9 cariótipos permite a identificação da linhagem como de sua proveniência. A situação ca-

riotípica de *C. hominivorax* no México e Estados Unidos, onde essa mosca é também considerada importante praga, não é muito diferente. Kaufmann & Wasserman (1975), Boyes (1961) e La Chance et alii (1964) descreveram três cariótipos diferentes para linhagem de *C. hominivorax* do Texas. Richardson et alii (1982a), identificaram mais 9 outros cariótipos que ocorrem no México e EUA, em McInnis (1981), e McInnis et alii (1983a), detectaram 27 variantes cromossômicos em amostras desta espécie coletadas em duas populações locais do México (Aldama e Chiapas).

Em nossos trabalhos, encontramos apenas uma vez dois cariótipos distintos numa mesma localidade, e estes foram os de duas amostras de Caraguatatuba e mesmo nesse caso, as amostras foram coletadas em épocas diferentes do ano (Tabela 1 e 2 e figuras 1, 2, 3 e 4). Richardson et alii (1982a), encontraram apenas uma localidade com dois cariótipos diferentes (gamodema C e D, no sul de Sonora, Sinaloa e Chiapas), sendo que nas demais localidades como no nosso caso, só foi encontrado um tipo que caracteriza a linhagem. Por outro lado, McInnis (1981) e McInnis et alii (1983b), encontraram em duas localidades do México, 27 variantes, como mencionado acima. Há importantes divergências nas interpretações dos respectivos achados de Richardson et alii (1980, 1982a e 1984) e de McInnis (1981) e McInnis et alii (1983b). Os primeiros acham que *C. hominivorax* deve representar um complexo composto por variantes cariotípicas dentro de uma espécie além de envolver também espécies crípticas. Os últimos acham que pelos resultados encontrados, *C. hominivorax* é uma única espécie com alto grau de polimorfismo cromossômico. Deve-se ressaltar que Richard-

son concorda com a existência de polimorfismo nessa espécie, mesmo tendo verificado que os gamodemas A e F apresentaram dois tipos de cromossomos Y, e que foram por ele definidos como polimorfismo dentro destes tipos, embora não tenha ocorrido sobreposição geográfica (simpatria).

O encontro de dois cariótipos distintos de *C. hominivorax* em três localidades da região centro-oeste, isto é, linhagens (GO-1 = MT-1) e (MT-2), podem ser interpretados como devido a fatores genéticos mas também à características climáticas e de vegetação. Baseado nessas características, temos que, especialmente as localidades Chapada dos Guimarães e Poconé (linhagens MT-1 e MT-2 respectivamente) apresentam clima e vegetação bem diferentes. Poconé está localizado no Pantanal Matogrossense, região que apresenta certas peculiaridades que serão descritas a seguir. Nesta parte da Região Centro-Oeste, ocorrem diversos tipos de associações vegetais que levam à denominação de Complexo do Pantanal (IBGE, 1977).

Como as inundações periódicas, provocadas pelo Rio Paraguai e seus afluentes, não afetam toda a baixada, resultam uma área sempre alagadas, outras que o são apenas temporariamente e outras que ficam a salvo das inundações. A ambientes assim diversos, corresponde variedade na vegetação. Dentre os diferentes tipos de vegetação desta região, se encontram a cobertura de gramíneas, que constituem excelentes pastagens e que reaparecem após o refluxo das águas. Destacam-se as vulgarmente conhecidas por capim-mimoso. Assim, o Pantanal não é uma região permanentemente alagada, semelhante a um pânta-

no, mesmo durante as cheias, como sugere o nome. Deve-se ressaltar que, no quadro formado pelas enchentes lagoas pequenas aparecem, outras de caráter permanente ampliam-se e braços d'água interligam-se. Há, entretanto, certos trechos da baixada que permanecem a salvo das enchentes por se encontrarem num plano mais elevado. São geralmente esses locais, os preferidos pelos fazendeiros para instalarem as sedes das fazendas de criação de gado que é, por sinal, a atividade econômica principal da região. Por causa de sua vocação histórica, o Pantanal tem sido, de longa data, a maior área de criação de gado bovino da região e uma das mais importantes do Brasil.

A outra linhagem MT-1, foi proveniente da Chapada dos Guimarães, cidade próxima à Cuiabá, e que apresenta formações vegetais que constituem prolongamento das que ocorrem na Amazônia. Predomina a Floresta Subcaducifólia Amazônica, a qual se estende até Goiás, onde ocupa uma área menor. Como já mencionado, a linhagem MT-1 é muito semelhante cariotipicamente à linhagem GO-1 coletada em Goiás, como indicam as figuras 18 e 19. É possível que haja uma relação entre o tipo de vegetação e clima, com a adaptação destas linhagens que provavelmente têm a mesma origem, uma vez que estas duas amostras foram obtidas em anos diferentes, mas na mesma época do ano (no mês de fevereiro). É interessante evidenciar que MT-1 é muito mais semelhante à GO-1 do que à MT-2. Pode ser que uma das explicações resida no fato de que a Região Centro-Oeste apresenta uma importante variação de temperatura ao longo de seu espaço geográfico, decorrente da variação de latitude, da sua posição no interior do continente e de diferentes intensidades de massas polares. (dados do IBGE, 1977).

As análises feitas com metodologia de bandamento evidenciaram que, com relação à banda Q, os cromossomos mitóticos de *C. hominivorax* também existem uma acentuada variabilidade de volume e brilho das regiões fluorescentes dos cromossomos. Os cromossomos X, e especialmente o Y e o par 2, foram os que mostraram maior diversidade. Esses resultados indicam que a variabilidade cromossômica está relacionada não apenas com a quantidade de heterocromatina (evidenciada pelos métodos convencionais), mas também com sua qualidade e/o estado fisiológico manifestado pela sua associação com proteínas específicas, como evidenciado pela metodologia de bandamento. Diferença na quantidade de heterocromatina e padrão de fluorescência principalmente dos cromossomos sexuais, são usadas como importante característica citotaxonômica para diferenciar espécies crípticas de *Anophele gambie*<sup>de</sup> e *A. arabiensis* (Gatti et alii, 1977 e Bonaccorsi et alii, 1980). Estas variações foram também úteis para detectar variabilidade intraespecífica em *D. melanogaster* (Halfer, 1981). Em *C. hominivorax* esta técnica é de interesse, pois permitiu diferenciar cada uma das cinco linhagens analisadas por este método. Deve-se ressaltar que os núcleos interfásicos das células de gânglio nervoso de todas as linhagens analisadas, geralmente mostram somente uma região intensamente fluorescente, em forma de grânulo, encostada à membrana nuclear (Figura 51), que deve corresponder ao cromocentro do Y ou/e de certos autossomos, tais como, o par 2 e 3. Entretanto, algumas vezes observa-se duas ou mais regiões fluorescentes separadas dentro de um núcleo (Figura 56). É interessante evidenciar que os núcleos interfásicos de machos das linhagens Al-1, Ba-1 e RS-1, contém mais material fluoree

cente que as fêmeas da própria linhagem e que os machos de Ca-1 e GO-1. Desta forma, os núcleos interfásicos de diferentes sexos intra e interlinhagens podem ser de um modo geral distinguidos.

Embora não tenha sido o objetivo deste trabalho, foi possível identificar através da técnica de banda Q cromátides-irmãs com segmentos trocados de mesmo tamanho e posição semelhante, especialmente no cromossomo número 2 da linhagem A1-1 (Figuras 43, 56 e 57). Trocas de cromátides-irmãs foram evidenciadas primeiramente por Taylor, Woods & Hughes (1957). No entanto a demonstração da existência de intercâmbios entre segmentos de cromátides-irmãs se tornou fácil na década de 70, com o emprego de análogos da desoxitimidina BRdU (5-bromo-2'desoxiuridina) por Zakharov & Egorina (1972). Embora sejam dados preliminares, a existência de trocas de segmentos entre cromátides-irmãs é um dado muito importante uma vez que, de acordo com Latt (1974) e Perry & Evans (1975), sabe-se que certas substâncias que produzem lesões cromossômicas são capazes de aumentar muito o intercâmbio entre cromátides-irmãs. No caso de *C. hominivorax*, deve-se pensar na ação dos inseticidas químicos como possíveis causadores deste intercâmbio, ainda que este seja um campo aberto para futuras investigações.

Nossos resultados indicam que *C. hominivorax* é uma espécie que apresenta grande variabilidade cariotípica manifestada, por variações na quantidade e qualidade do DNA (principalmente na heterocromatina). Expressiva variabilidade encontramos também em características morfológicas externas de adultos de algumas linhagens que

podem ser distinguidas de outras pela análise morfométrica. Assim, a análise morfométrica dos 19 caracteres da morfologia externa de sete linhagens analisadas, indicou a existência de outro parâmetro de variabilidade. Foram evidenciadas variações nas médias dos caracteres medidos interlinhagens como também nas comparações entre as 26 relações de comprimento de caracteres, indicando claramente que as diferenças encontradas devem ter bases genéticas. Pela análise discriminante, foi possível utilizar dez dos 19 caracteres individuais analisados além de dez outros provindos das 26 relações entre os caracteres cujo poder de discriminação foi maior. Dentre os dez primeiros caracteres e os dez últimos, temos que quatro e nove respectivamente eram relacionados com medidas de comprimento entre nervuras de asa, tanto para machos como para fêmeas das diferentes linhagens analisadas. No entanto, não foi encontrada na asa nervura bifurcada na veia R4+5 ou do tipo espora como as descritas por Dixon (1962) para linhagens de *C. hominivorax* da Flórida.

Através da análise morfométrica dos caracteres de seis linhagens e uma amostra de *C. hominivorax* analisados, foi possível estabelecer 5 grupos distintos a saber: (Ca-1), (RS-1), (Ba-1), (Al-1), representando cada uma das linhagens e outro grupo que inclui indivíduos de respectivamente duas linhagens e uma amostra (Pa-1 PP-1 e Ca-2). As informações genéticas sobre a variabilidade encontrada em diferentes populações de *C. hominivorax*, obtidas pela análise cariotípica, devem estar em grande parte relacionadas aos resultados obtidos pela análise morfométrica de caracteres externos. Através do emprego destes dois tipos de metodologias, foi possível caracterizar as seguintes populações de *C. hominivorax*: Ca-1, Ca-2, Al-1, Ba-1 e RS-1.



A análise da variabilidade morfométrica com base em fatores genéticos, tem sido comprovada em diversos grupos de insetos (Dally, 1985 e Terzian, 1986). Nesse sentido, uma série de estudos e raças do complexo *Warranaba virgo* (Orthoptera: Eumastacidae) e em espécies de sirfídeos conduzidos por Atchley et alii (1974a, 1974b, 1979, 1981, 1983) e em *Musca autumnalis* (Bryant, 1984), tem demonstrado uma correlação entre os resultados morfométricos, cariotípicos e de isoenzimas para a separação de populações destas espécies de insetos. Estes exemplos corroboram nossa interpretação sobre a correlação entre estes dois tipos de variabilidade encontrados para diferentes populações de *C. hominivorax* baseado em fatores genéticos e não apenas os fatores ambientais como proposto por Dixon (1962) com relação a variantes de asa encontradas em duas linhagens desta espécie.

Para tentar interpretar o significado e respectivas consequências da variabilidade genética em populações naturais descritas no presente trabalho, e aquelas analisadas e interpretadas pelos grupos de Richardson, McInnis e LaChance, devemos também analisar os resultados obtidos nos cruzamentos entre as linhagens. Embora tenha havido fertilidade recíproca entre a linhagem padrão (Ca-1) e as demais linhagens analisadas no presente trabalho, a diferença na razão sexual dos descendentes dos retrocruzamentos realizados em três dos híbridos testados, como as dificuldades encontradas na efetivação de alguns cruzamentos (ver tabela 7), indicam que existem diferenças genéticas evidenciáveis entre essas linhagens, algumas das quais podendo representar um início de isolamento sexual e de especiação.

O fato de as diversas linhagens testadas serem interférteis nas condições de laboratório, com uma linhagem padrão, não nos permite concluir, no entanto, que essa fertilidade deva ocorrer no caso de indivíduos dessas linhagens se encontrarem em populações naturais.

Com relação às divergências de opinião sobre o complexo *C. hominivorax* entre grupos de Richardson e o grupo de McInnis, nossos novos dados apresentam contribuição de interesse, mas as divergências continuarão válidas. Nessas condições, mantemos nossa opinião já expressa em Azeredo-Espin (1982) de que o complexo *C. hominivorax* deve comportar espécies crípticas, além de espécies com variabilidade cromossômica intraespecífica. Essa variabilidade intraespecífica pode se manifestar por diferenças cariotípicas entre linhagens alopátricas, ou por variações intralinhagem, caracterizando polimorfismo cromossômico no sentido de Ford (ver Dobzhansky, 1970) e outros. Embora não possamos detectar a existência de espécies crípticas<sup>5</sup> em nosso material de análise, achamos que os argumentos apresentados nos trabalhos do grupo de Richardson são suficientes para mantermos nossa opinião de que pode ter havido isolamento sexual entre linhagens de *C. hominivorax*.

Por outro lado, vários problemas ficam ainda sem solução aceitável, tais como os fatores causadores dessa variabilidade cariotípica. Em populações naturais de insetos que não tenham contato direto com o homem, deve-se pensar na evolução normal do cariótipo

onde podem ocorrer aumento ou diminuição da cromatina, como já mencionado anteriormente. No caso específico de *C. hominivorax*, que hoje tem como hospedeiro mais frequente o boi, que é animal de alto valor econômico, pode-se pensar no efeito de inseticidas químicos como agentes causadores de alterações cariotípicas nesta praga. Neste caso, deve-se considerar a interpretação de Mayr (1977), de que há vantagem para que ocorra variação genética em uma população. Assim, quanto maior o número de tipos genéticos em uma população, tanto maior a probabilidade de incluir genótipos capazes de suportar mudanças temporais. *C. hominivorax* é uma espécie de ampla distribuição geográfica, que ocorre praticamente em todo o território brasileiro em vários tipos de hospedeiros, embora o boi seja o principal. O combate à praga pelo uso de agrotóxicos mostrou que com frequência, as linhagens de inseto se tornam resistentes aos inseticidas, eliminando em grande parte ou totalmente seu efeito. No entanto, não temos elementos para confirmar essa hipótese que por ora deve ficar em aberto a espera de futura análise. Deve-se, no entanto, enfatizar que a variabilidade cariotípica de *C. hominivorax* é muito grande para se pensar apenas numa solução simples, ou seja, que essa variabilidade decorra de uma evolução normal do cariótipo dessa espécie. Embora este tipo de variabilidade ocorra em outros organismos, como foi dito acima, a frequência com que ocorre em *C. hominivorax*, sem dúvida coloca esta espécie em evidência com relação as demais.

Outro problema para o qual ainda não se tem resposta adequada, é sobre a manutenção em população natural dessa grande variabilidade cariotípica. Pode-se pensar que essas variações não te

nham papel adaptativo significativo e por serem neutras se mantêm em populações naturais a medida que apareçam. Por outro lado, essa variabilidade sendo relativamente pequena em linhagens de uma mesma localidade e existindo em quantidade significativa na espécie como um todo, nos leva a admitir como hipótese de trabalho que, em cada localidade, por forte pressão de seleção, seja mantido apenas um tipo. Nossas experiências de campo mostram que uma ferida aberta e infestada por larvas de *C. hominivorax* grande quantidade de ovos é depositada nos bordos da ferida por mais de uma fêmea. É muito frequente encontrar larvas de vários estágios convivendo numa mesma mífase. Nesse sentido, parece que a seleção natural deve ser tão forte como outros casos de seleção em populações naturais.

Uma situação que complica a elaboração de um projeto que provavelmente pudesse solucionar as divergências acima, é a possibilidade de se enviar linhagens de *C. hominivorax* de um país para outro, ou mesmo troca de material entre laboratórios. Essa mosca, é praga extremamente grave e há a necessidade de se tomar com ela os mais rigorosos cuidados para evitar que a linhagem<sup>u</sup> de uma região seja introduzida em outra. Com isso, os trabalhos de laboratório ficam muito limitados, sendo essa uma das razões da não solução das divergências de opiniões entre os grupos que trabalham com o complexo *C. hominivorax*.

Qualquer <sup>se</sup> <sup>hm</sup> que seja o resultado que venha obter no futuro, não há dúvida, que *C. hominivorax* é um complexo biológico com alta variabilidade genética, que tem alta capacidade adaptativa mani

festada pela sua ampla distribuição geográfica, e caracterizada pela sua abundância e pelos enormes prejuízos que causa à agropecuária.

## VII - CONCLUSÕES

1. Com os dados do presente trabalho associados aos publicados por outros autores, podemos concluir que *C. hominivorax* é um complexo biológico que apresenta grande variabilidade cariotípica intra e interpopulacional. São conhecidos, ocorrerem na natureza, como populações, pelo menos vinte cariótipos distintos, nove dos quais foram encontrados em linhagens coletadas no Brasil.
  
2. Embora existam divergências de opiniões entre os vários grupos que usam *Cochliomyia hominivorax* como material de trabalho, é nossa interpretação, pelos resultados apresentados na literatura, que esse complexo deve compreender; - populações diferenciadas morfológicamente tanto por seus cromossomos, como por caracteres externos sem isolamento sexual; - populações que além das diferenças morfológicas apresentam também isolamento sexual (RICHARDSON et alii, 1980 e 1982, e MANGAN, 1986). Assim *C. hominivorax* é um complexo que compreende espécies crípticas, raças e populações geneticamente diversificadas.
  
3. Embora as diversas linhagens por nós analisadas sejam, em experiências de laboratório, férteis em relação a uma linhagem padrão, há em alguns desses cruzamentos e análise dos descendentes, indícios de ligeira incompatibilidade genética nos híbridos. No mate-

rial testado neste trabalho como em outro anterior (AZEREDO-ESPIN, 1982), não temos indícios da existência no Brasil, de espécies crípticas dentro do complexo *Cochliomyia hominivorax*.

4. As principais diferenças cariotípicas encontradas, interlinhagens de *C. hominivorax* dizem respeito ao comprimento dos cromossomos, localização e número de constricções secundárias e posição do centrômero, além das diferenças no padrão de bandamento.
5. Pela análise morfológica dos cromossomos corados com Giemsa em nove linhagens, foi possível identificar seis cariótipos diferentes: Ca-2, Rs-1, Ba-1, MT-2, além de Al-1=PP-1 e Go-1=MT-1=PA-1.
6. Nas amostras testadas neste trabalho, apenas nas de Caraguatatuba, foi encontrado um híbrido cromossômico. As fêmeas da amostra, mostravam dois tipos de cromossomos X, um equivalente ao de uma linhagem local (Ca-1) e outro que se assemelha a uma linhagem de Poconé, Mato Grosso (MT2). Igual cariótipo foi encontrado em híbrido induzido no laboratório envolvendo essas duas linhagens. Nas demais localidades foi encontrado um só cariótipo.
7. As diferenças mais significativas encontradas após uso de técnica de banda Q são: intensidade e volume da banda pericentromérica de

cromossomo 3 e do X; presença em ambos os lados ou em apenas único lado de uma banda na região pericentromérica do cromossomo 2; volume e intensidade de fluorescência do cromossomo Y.

8. Essa técnica mostrou ser excelente marcador para diagnosticar cromossomo 3 de todas as linhagens testadas, embora o volume da banda seja variável interlinhagens. As regiões heterocromáticas apresentaram variações quantitativas e qualitativas nas cinco linhagens testadas.
9. Nos híbridos, o padrão de banda de cada cromossomo mantém as características da linhagem da qual provém. Assim, é possível por essa técnica, identificar cada cromossomo, como sua origem parental.
10. Todas as linhagens testadas mostraram-se férteis com relação a uma linhagem considerada padrão. Em alguns desses cruzamentos houve dificuldade na obtenção de fecundação nos testes de laboratório. Em três retrocruzamentos a razão sexual normalmente 1:1 foi alterada e o número de fêmeas na descendência foi maior do que o de machos. Destes cruzamentos, resultaram também indivíduos com a distância entre os olhos, que é característico entre machos e fêmeas, foi alterada e por esse caracter a distinção não podia ser feita.



11. Pela análise morfométrica de dezenove caracteres externos de exemplares de sete populações, utilizando-se análise de variância univariada, multivariada, distância D do Mahalanobis e análise discriminante foi possível identificar cinco subgrupos diferentes: (Ca-1), (Rs-1), (Ba-1), (Al-1) e (Pa-1, PP-1, Ca-2).
  
12. Dentre as 26 relações estabelecidas entre os 19 caracteres morfométricos de adultos analisados, foi possível extrair através da análise discriminante, um subconjunto de 10 caracteres com poder de discriminação das seis linhagens e uma amostra de *C. hominivorax*.
  
13. Dentre os dez caracteres extraídos, nove foram relacionados com medidas de comprimento entre as nervuras da asa, tanto para machos como para fêmeas das diferentes linhagens e amostras analisadas.
  
14. As linhagens Ca-1, Rs-1, Ba-1, Al-1, e amostra de Ca-2, puderam ser cariotípica e morfometricamente caracterizadas, indicando que é possível, também, estabelecer uma correlação entre estas duas metodologias para identificar diferentes linhagens e amostras de *C. hominivorax*.

15. Os dados cariotípicos existentes na literatura aliados aos dados morfométricos, indicam que *Cochliomyia hominivorax* é um complexo biológico em franco processo evolutivo.

## VIII - S U M Á R I O

Nesta dissertação foram realizados estudos cariotípicos, morfométricos e testes de cruzamentos em diferentes linhagens de *Cochliomyia hominivorax*. Esta espécie é considerada uma das principais causadoras de miíases no Brasil, que atacando especialmente animais domésticos ocasiona grandes prejuízos econômicos à pecuária.

Verificou-se que ao lado da uniformidade no número de cromossomos ( $2n = 12$  cromossomos), encontra-se uma grande variação cariotípica, colocando *C. hominivorax* entre as espécies de insetos que apresentam grande variabilidade cariotípica em populações naturais. As variações, ocorrem tanto nos autossomos quanto nos cromossomos sexuais sendo que nestes últimos as variações encontradas foram maiores e mais evidentes que a dos autossomos.

Pela análise morfológica dos cromossomos, corados com Giemsa, de nove linhagens de *C. hominivorax*, foi possível identificar seis cariótipos diferentes. As principais diferenças cariotípicas interlinhagens se referem ao comprimento dos cromossomos, localização e número de constrições secundárias além da posição do centrômero. Através desta análise cromossômica foi possível identificar em condições naturais, ou seja, em Caraguatatuba, além do cariótipo comumente encontrado, um híbrido cromossômico onde as fêmeas da amostra possuíam dois tipos morfológicamente distintos de cromossomos X, sendo um equivalente ao da linhagem local Ca-1 (SP), e outro se assemelha a da linhagem Poconé (MT) linhagem MT-2.

Além do emprego de Giemsa para a coloração dos cromossomos, foi utilizado método de banda Q, cujos resultados demonstraram também variabilidade. Através da utilização de quinacrina mostarda, foram evidenciadas diferenças interlinhagens na intensidade e volume das regiões fluorescentes, tanto nos autossomos como nos cromossomos sexuais. Esta técnica mostrou ser um excelente marcador para diagnosticar o cromossomo 3 de todas as linhagens.

Nos híbridos analisados o padrão de banda Q de cada par de cromossomos mantém as características da linhagem parental as quais foram provenientes, possibilitando a identificação de cada par cromossômico como também inferir sobre a proveniência dos híbridos.

Os resultados dos testes de cruzamentos realizados, indicaram que todas as linhagens mostraram-se interfértéis com relação a uma linhagem considerada padrão (linhagem Ca-1). Porém, em alguns cruzamentos, houve dificuldade na obtenção de fecundação nos testes de laboratório. Nos retrocruzamentos realizados a razão sexual normal de 1:1 foi alterada sendo o número de fêmeas maior que o de machos, além da produção de indivíduos anormais.

A análise morfométrica, também indicou variabilidade entre as linhagens analisadas. Dos dezenove caracteres da morfologia externa de adultos e das 26 relações estabelecidas entre estes caracteres, utilizando análise de variância univariada e multivariada foram identificadas diferenças capazes de identificar as linhagens.

As linhagens de *C. hominivorax* podem ser caracterizadas pela análise cariotípica e morfométrica, indicando que é possível estabelecer uma correlação entre estas duas metodologias para identificar diferentes amostras e linhagens desta espécie.

Temos boas evidências baseadas nos dados cariotípicos existentes na literatura associado aos dados obtidos neste trabalho, incluindo a análise morfométrica, que *C. hominivorax* é um complexo biológico em franco processo evolutivo.

As análises realizadas neste trabalho forneceram significativos dados, complementares aos já existentes, sobre a biologia de *C. hominivorax* e além disso, abriram novas áreas de estudo desta importante praga da pecuária.

## IX- SUMMARY

*Cochliomyia hominivorax* is considered to be one of the main causes of myiasis in Brazil, particularly attacking domestic animals and provoking great economic loss specially to cattle breeders. This dissertation deals with karyotypical and morphometric studies and discusses the results of tests carried out on the crossbreeding process of different strains of *Cochliomyia hominivorax*.

Besides the uniformity in the number of chromosomes ( $2n = 12$  chromosomes), *C. hominivorax* presented a wide karyotypical variation, which places the species among those groups of insects displaying the largest diversity of karyotypes. These variations occurred both in autosomes and in sex chromosomes, in which they were found to be not only larger but also more evident.

Six different karyotypes were identified through morphologic analysis of Giemsa-stained chromosomes belonging to nine strains of *C. hominivorax*. The main karyotypical interstrain differences refer to the length of the chromosomes, the location and number of secondary constrictions, besides the position of the centromere. This chromosomal analysis also enabled us to identify, in the natural site of Caraguatatuba, a chromosomal hybrid in which the females sampled had two morphologically distinct types of chromosomes one of which was equivalent to that of the local Ca-1 (SP strain), whereas the other one was similar to that of the Poconé (MT-2 strain).

Besides staining chromosomes with Giemsa, the Q-band method was also utilized and the results obtained also pointed out to variability. This technique, in which quinacrine mustard is used, permitted us to spot interstrain differences in the intensity and volume of the fluorescent regions both of the autossomes and of the sex chromosomes.

In the hybrids, the standard Q-band of each chromosome conserved parental characteristics, which enabled us not only to identify each chromosomic pair of the hybrids but also to infer their parentage and origin.

Crossbreeding tests indicated that all strains proved to be interfertile in relation to the Ca-1 strain which was considered to be standard. However, in some crossbreedings, it was difficult to obtain fecundation in laboratorial tests. Futhermore, the sexual ratio of 1:1 in the test crossbreeding process was altered since, in addition to the production of abnormal individuals, there was also a greater number of females per male.

Morphometric analysis of the nineteen external characteristics in adult specimens and of the twenty six interrelations established among these fenotypical features enabled us to identify the strains' places of origin.

The positive results achieved through karyotypical and morphometric analysis in effectively characterizing *C. hominivorax* strains indicate that it is possible to associate these two methodologies in order to identify different strains of the species studied.

Indeed, data available in literature, along with the evidence gathered up through morphometric analysis in this dissertation, allow us to state that *C. hominivorax* is a biological complex which is undergoing an unquestionable evolutionary process.

Finally, the complementary data which this dissertation has supplied on the biology of *C. hominivorax* have opened up new areas of study of this plague and have cast some light upon myiasis afflicting Brazilian livestock.



X - R E E R E N C I A S    B I B L I O G R A F I C A S

- Adkisson, K.P., Perreault, W.J. & Gay, H. Differential Fluorescent staining of Drosophila chromosomes with quinacrine mustard. Chromosoma (Berl.) 34 :190 - 205, 1971.
- Alpatov, W.W. Biometrical studies on variation and races of the honey bee (Apis mellifera L.) Q. Rev. Biol. 4: 1-58, 1929.
- Atchley, W.R. Components of sexual dimorphism in Chironomus larvae (Diptera: Chironomidae) Am. Nat. 105: 455-466, 1971.
- Atchley, W.R. Chromosomal evolution and morphometric variability in the thelytokous insect Warramaba virgo (Key) (Orthoptera, Eumastacidae). In: Evolution and speciation : Essays in Honor of M.J.D. White, ed. W R. Atchley, & Woodruff, D.S., New York: Cambridge Univ. Press, 1981, p. 371-397.
- Atchley, W.R. Some genetic aspects of morphometric variation. In: Numerical Taxonomy, ed. J. Felsenstein, Nato ASI Series, Berlin: Springer-Verlag, 1983, p. 346-363.
- Atchley, W.R. & Hensleigh, D.A. The congruence of morphometric shape in relation to genetic divergence in four races of morabine grasshoppers (Orthoptera: Eumastacidae). Evolution 28 416-427, 1974a.

- Atchley, W.R. & Cheney, J. Morphometric differentiation in the viatica group of morabine grasshoppers (Orthoptera : Eumastacidae): Syst. Zool. 23: 400-415, 1974b.
- Atchley, W.R. & Hilburn, L.R. Morphometric variability in larvae of the antarctic fly *Belgica antarctica* (Diptera: Chironomidae). CAN. J. Zool. 57 2311-2318, 1979.
- Azeredo-Espin, A.M.L. "Análise cariotípica de cinco espécies de Calliphoridae (Diptera) do Estado de São Paulo". Tese de Mestrado, Universidade de Campinas, 200p., 1982.
- Azeredo-Espin, A.M.L. & Pavan, C. Karyotypes and possible regions of origin of three species of Calliphoridae (Diptera) recently introduced in Brazil. Rev. Brasil. Genet. 6 (4): 619-638, 1983.
- Azeredo-Espin, A.M.L. & Pavan, C. Análise cariotípica de diferentes linhagens de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) Supl. Ciência e Cultura 36 (7) : 790, 1984
- Azeredo-Espin, A.M.L. & Pavan, C. Análise cariotípica de diferentes linhagens de *Cochliomyia hominivorax* através da técnica de bandamento Q. Supl. Ciência e Cultura 38 (7) : 832, 1986.
- Barr, H.J. & Ellison, J.R. Quinacrine studies of chromosomes and evolutionary studies in *Drosophilla*. Nature 233: 190-191, 1971.

- Baumgartner, D. C. & Greenberg, B. The genus Chrysomya (Diptera : Calliphoridae) in the New World. J. Med. Entomol. 21 (1) : 105-113, 1984.
- Bedo, D.G. C, Q and H. banding in the analysis of Y chromosome rearrangements in Lucilia cuprina (Wiedemann) (Diptera : Calliphoridae) Chromosoma (Berl.) 77 : 299-308, 1980.)
- Bedo, D.G. Differential sex chromosome replication and dosage compensation in polytene trichogen cells of Lucilia cuprina (Diptera: Calliphoridae) Chromosoma 27: 21-32 , 1982.
- Blackith, R.E. & Kevan, D.K. McE. A study of the genus Chrotogonus (Orthoptera).. VIII. Patterns of variation in external morphology. Evolution 21: 76-84, 1967.
- Blackith, R.E. & Reyment, R.A. Multivariate Morphometrics. New York: Academic, 1971, 412p.
- Bostock, C.J. & Christic, S. Quinacrine fluorescence staining of chromosomes and its relationship to DNA base composition. Exp. Cell Res. 86: 157-161, 1974.
- Bonaccorsi, S., Santini, G., Gatti, N, Pimpinelli, S. & Colluzzi, N. Intraspecific polymorphism of sex chromosome heterochromatin in two species of the Anopheles gambiae complex. Chromosoma (Berl.) 76: 57-64, 1980.

- Boyes, J.W. Somatic chromosomes of higher Diptera. V. Interspecific variation in the Calliphoridae. Can. J. Zool., 39: 549-570, 1961.
- Boyes, J.W. & Van Brink, J.M. Chromosomes of calyptrate Diptera. Can. J. Genet. Cytol., 7 : 537-550, 1965.
- Boyes, J.W. & Shewell, G.E. Cytotaxonomy of Calliphoridae (Diptera). Genetica, 45 : 435-488, 1975.
- Bram, S. & Tougaard, P. Polymorphism of natural DNA. Nature (Lond.) 239: 128-131, 1972.
- Brown, K.R. Multivariate assessment of phenetic relationships within the tribe Lucillini (Diptera: Calliphoridae). Aust. J. Zool. 27: 465-477, 1979 b.
- Brown, K.R. Comparative wing morphometrics of some calyptrate diptera. J. Aust. ent. Soc. 18 : 289-303, 1979 a.
- Brown, K.R. & Shipp, E. Wing morphometrics of Australian Lucillini (Diptera : Calliphoridae) Aust. J. Zool. 25: 765-777, 1977.
- Brown., K.R. & Shipp, E. Wing morphometric analysis of Australian Sarcophaginae (Diptera: Sarcophagidae). Syst. Ent. 3 : 179-188, 1978.

- Brown, H.E. & Snow, J.W. Protein utilization by screwworm larvae (Diptera : Calliphoridae) reared on liquid medium. J. Med. Ent., 14 (5): 531-533, 1978.
- Brown, H.E. & Snow, J.W. Screwworm (Diptera: Calliphoridae) A new liquid medium for rearing screwworm larvae. J. Econ. Ent., 16 (1) : 29-32, 1979.
- Bryant, E.H. Morphometric adaptation of the housefly Musca domestica L., in the United States. Evolution 31 : 580-596, 1977.
- Campbell, N.A. A multivariate approach to variation in microfilariae: examination of the species Wuchereria lewisi and demes of the species W. bancrofti. Aust. J. Zool. 24 105-114, 1976.
- Caspersson T., Farber. S., Foley, G.E., Kudynowsky. J, Modest E.J., Simonsson E., Wagh U. & Zech, L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Exp. Cell. Res. 49: 219-222, 1968.
- Childress, D. Polytene chromosomes and linkage group-chromosome correlations in the Australian sheep blowfly Lucilia cuprina (Diptera: Calliphoridae). Chromosoma (Berl.) 26: 208-214, 1969.
- Clayton, F.E. Variations of metaphase chromosomes of Hawaiian Drosophilidae. Univ. Texas Publ. 6918 : 95-110, 1969.
- Colluzzi, N. & Sabatini, A. Cytogenetic observations on species A and B of the Anopheles gambiae complex Parassitologia 9 : 73-88, 1967.

- Colluzzi, M. & Sabatini, A. Cytogenetic observations on species C of Anopheles gambiae complex. Parassitologia 10 : 155-165, 1968.
- Colluzzi, M. & Sabatini, A. Cytogenetic observations on the salt water species, Anopheles merus and Anopheles melas, of the gambiae complex. Parassitologia 11 : 177-187, 1969.
- Comings, D.E., Kovaes, ., Avelino, E. & Harris, D.C. Mechanisms of chromosome banding. V. Quinacrine banding Chromosoma 50: 11-145, 1975.
- Craig-Holmes, A.P. & Shaw, N.W. Polimorphism of human constitutive heterochromatin. Science 174: 702-704, 1971.
- Crystal, M.M. Observations on the role of light, temperature, age and sex in the response of screw-worm flies to attractants J. Econ. Entomol. 57 (3): 324-325, 1964.
- Crystal, M.M. Screw-worm flies (Diptera: Calliphoridae). Influence of sex ratio on primiparaous fertility of caged populations. J. Med. Entomol 15 (1): 85-86, 1978.

- Crystal, M.M. & Ramirez, R. Screwworm flies for sterile male release: Laboratory tests of the quality of candidate strains. J. Med. Entomol. 12 (4): 418-422, 1975.
- Cushing, E.C. & Patton, W.S. Studies on the higher Diptera of medical and veterinary importance, Cochliomyia americana, sp. nov., the screwworm fly of the New World. Ann. Trop. Med. Parasitol. 27 (4) : 539- 551, 1933.
- Daly, H.V. Insect morphometrics. Ann. Rev. Entomol. 30: 415-438, 1985.
- Dev. V.G., Miller. D.A., Miller. O.J., Marshall, J.T. & Hsu T.C. Quinacrine fluorescence of Mus cervicolor chromosomes: Bright centromeric heterochromatin. Exp. Cell. Res. 79: 4475-479, 1973.
- Dev. V., LaChance L.E. & Whitten C.J. Polytene chromosomes of the screw-worm fly, Cochliomyia hominivorax The Journal of Heredity 76: 132-133, 1985.
- Dixon, E.B. Wing variations found in screw-worm flies, Cochliomyia hominivorax and three other Calliphoridae (Diptera) Ann. Entomol. Soc. Am. 55:210-212, 1962.
- Dobzhansky, T. Experiments on sexual isolation in Drosophila X. Reproductive isolation between Drosophila pseudobscura and D.

- persimilis under natural and under laboratory conditions. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 37: 792-796, 1951.
- Dobzhansky, T Genética do processo evolutivo. São Paulo, Polígono S.A 1970, p.435.
- Ellison, J.R. & Barr, H.J. Differences in quinacrine staining of the chromosome of a pair of sibling species: Drosophila melanogaster and Drosophila simulans. Chromosoma (Berl) 34 : 424-435, 1971a.
- Ellison, J.R. & Barr, H.J. Chromosome variation within Drosophila simulans detected by quinacrine staining. Genetics 69 : 119-122, 1971b.
- Ellison, J.R. & Barr, H.J. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late replication and high A:T content in Samoaia leonensis. Chromosoma. 36:375-390, 1972.
- Evans, G.M. & Rees, H. The pattern of DNA replication at mitosis in the chromosomes of Scilla campanulata. Exp. Cell Res. 44 : 150-160, 1966.
- Evans, G.M., Rees, H., Snell, C.L. & Sun, S. The relationship between nuclear DNA amount and the duration of the mitotic cycle. Chromosomes Today. 3:24-31, 1972.



- Faccio Dolfini, S. The distribution of repetitive DNA in the chromosomes of cultured cells of Drosophila melanogaster Chromosoma (Berl) 44 : 383-391, 1974
- Fletcher, L.W.; Turner, J.P. & Husman, C.N. Surface temperature as a factor in the selection of ovipositional sites by three strains of the screw-worm. J. Eco. Entomol., 66 (2) : 422-423, 1973.
- Foss, D.K., McDonald, I.C., Bromel, M. & Gassner, G. Isozyme variation among bacterial isolates originating from the screwworm fly (Diptera : Calliphoridae). Environ. Entomol. 12 : 1773-1781, 1983.
- Foster, G.G., Whitten, J.M. & Konowalow, C. The synthesis of compound autossomes in the australian sheep blowfly Lucilia cuprina. Can. J. Genet. Cytol. 18:169-177, 1976.
- Foster, G.G., Whitten, J.M., Konowalow, C., Bedo, D.G., Maddern, R.H. & Boon, D.J. Cytogenetic studies of Lucilia cuprina dorsalis R.-D. (Diptera:Calliphoridae). Chromosoma 81:151-168, 1980.
- Gagné, R.J. & Peterson, II R.D. Physical changes in the genitalia of males of the screwworm, Cochliomyia hominivorax (Diptera : Calliphoridae), caused by mating. Ann. Entomol. Soc. Am. 75 : 574-578, 1982.
- Gatti, M., Pinpinelli, S. & Santini, G. Characterization of Drosophila heterochromatin. I. Staining and decondensation with

- Hoechst 33258 and quinacrine. Chromosoma (Berl.) 57 : 351-375, 1976.
- Gatti, M., Santini, G., Pimpinelli, S. & Coluzzi, M. Fluorescence banding techniques in the identification of sibling species of the Anopheles gambiae complex. Heredity 38 : 105-108, 1977.
- Gilbert, F.S. Foraging ecology of hoverflies : morphology of the mouthparts in relation to feeding on nectar and pollen in some common urban species. Ecol.Ent. 6 : 245-262, 1981.
- Gilbert, F.S. Morphometric patterns in hoverflies (Diptera : Syrphidae). Proc. R. Soc. Lond. B 224 : 79-90, 1985a.
- Gilbert, F.S. Ecomorphological relationships in hoverflies (Diptera : Syrphidae) Proc. R. Soc. Lond. B 224 : 91-105, 1985b.
- Gilbert, F.S. Size and shape variation in Syrphus ribesii L. (Diptera : Syrphidae) Proc. R. Soc London B 224 : 107-114, 1985c.
- Gibson, M.S. & Phinney, D.E. Selection parameters influencing the growth and survival of Cochliomyia hominivorax (Coquerel) NASA Tech.Memo.Lec. 4090, 26p., 1974.
- Gilmour, J.S.L. & Hoeslop - Harrison, J. The "deme" terminology. Genetica, 27 : 147-161, 1954.

- Gingrich, R.C.; Grahaam, A.J. & Hightower, B.C. Media containing liquified nutrients for mass rearing larvae of the screwworm . J.Econ.Ent., 64 : 678-683, 1971.
- Goldschmidt, R. Lymantria Bibliogr. Genetica 11 : 1-186, 1934.
- Gottesfeld, J.M., Bonner, J., Radda G.K. & Walker, I.O Biophysical studies on the mechanism of quinacrine staining of chromosomes. Biochemistry 13 : 2937-1945, 1974.
- Gould, S.J. & Johnston, R.F. Geographic variation. Ann.Rev.Ecol.Syst. 3 : 457-498, 1972.
- Gropp, A., Hilwig, I. & Seth, P.K. Fluorescence chromosome banding patterns produced by a binzimidazole derivative. Proc. 23rd Nobel Symp. (T. Caspersson and L. Zech, eds). New York : Academic Press 1973.
- Guimarães, J.H., Prado A.P. & Linhares, A.X. Three newly introduced species of Chrysomya Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera : Calliphoridae). Revta.bras.Ent. 22 (1) : 53-60, 1978.
- Guimarães, J.H., Prado A.P. & Buralli, G.M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of Chrysomya Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera : Calliphoridae). Revta.bras.Ent. 23 (4) : 245-755, 1980.

- Halfer, C. Interstrain heterochromatin polymorphisms in *Drosophila melanogaster*. Chromosoma (Berl.) 84 : 195-206, 1981.
- Hatfield, J.M.R., Peden K.W.C. & West R.M. Binding of quinacrine to the human Y chromosome. Chromosoma 52 : 67-71, 1975.
- Henning, W., Henning, I & Stein, H. Repeated sequences in the DNA of *Drosophila* and their localization in giant chromosomes. Chromosoma (Berl.) 32 : 31-63, 1970.
- Hightower, B.G., O'Graddy, J.J.Jr. & Garcia, J.J. Ovipositional behavior of wild type and laboratory adapted strains of screw-worm flies. Envir.Entomol. 1 (2) : 227-229, 1972.
- Holmquist, G. Hoechst 33258 fluorescent staining of *Drosophila* Chromosomes. Chromosoma (Berl) 49 : 333-356, 1975a.
- Holmquist, G. Organization and evolution of *Drosophila virilis* heterochromatin. Nature (Lond.) 257 : 503-506, 1975b.
- Holt, G.G., Adams, T.S. & Sundet, W. Attraction and ovipositional response of screw-worm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera : Calliphoridae), to stimulated bovine wounds. J.Med.Entomol. 16 (3) : 248-253, 1979
- Horz, W. & Altenburger, W. Nucleotide sequence of mouse satellite DNA. Nucleic Acids Res. 9:683-696, 1981.

- Imbiriba, A.S., Izutani, D.T, Milhoretto, I.T. & Luz, E. Introdução de Chrysomya chloropyga (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera : Calliphoridae). Archos Biol.Tecnol., Curitiba, 20 :35-39, 1977.
- IBGE. Geografia do Brasil ed. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. volumes 3 e 4, 1977, p.466.
- Jackson, J. The phenetics and ecology of a narrow hybrid zone. Evolution 27:58-68, 1971.
- Johnson, C. & Wichern, D. Multivariate Statistical Analysis for biologists. 3.ed. 1982. Methuen, London.
- Kaufman, G. & Wasserman, M. Effects of irradiation on the screw-worm, Callitroga hominivorax (Cof.). Univ.Texas\_Publ., 5721 : 246-259, 1957
- Kellogg, V.L. & Bell, R.G. Studies of variation in insects. Proc.Wash.Acad.Sci 6 : 203-232, 1904.
- Keyl, H.G, A demonstrable local geometric increase in the chromosomal DNA of Chironomus. Experientia (Basel) 21 : 191-193, 1965.
- Kurahashi, H. The tribe Calliphorini from Australian and Oriental regions. II Calliphora group (Diptera Calliphoridae) Pac.Insects 13 : 147-204, 1971.

- Kurnit, D.M., Shafit B.R. & Maio J.J. Multiple satellite deoxyribonucleic acids in the calf and their relation to the sex chromosomes. J.Mol.Biol. 81 : 273-284, 1973.
- Laake, E.W. Myiasis in domestic Animals. J.Am.Vet.Med.Assoc. 95 (748) : 47-49, 1939.
- LaChaise, D., Lameunier, F. & Veville, M. Clinal variations in male genitalia in Drosophila teissieri Tsacas. Am.Nat 117 : 600-608, 1981.
- LaChance, L.E., Riemann & Hopkins, D.E. A reciprocal translocation in Cochliomyia hominivorax (Diptera : Calliphoridae). Genetic and cytological evidence for preferential segregation in males. Genetics, 49 : 959-972, 1964.
- LaChance, L.E., Bartlett, A.C., Bram, R.A., Gagné, R.J., Graham, O.H., McInnis, D.O., Whitten, C.J. & Seawright, A. Mating types in screwworm populations ? Science 218 :1142-1143, 1982.
- LaChance, L.E. & Whitten, C.J. Cytogenetic studies of screwworm (Diptera Calliphoridae) populations from southern Mexico and Jamaica. Symposium: Genetics in Entomology. Ann.Entomol.Soc.Am. 79 : 792-798, 1986.

- Latt, S.A. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 3162-3166, 1974.
- Laurence, B.R. Old World blowflies in the New World Parasitology Today 2 (3) : 77-79, 1986.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52 : 201-220, 1964.
- Lopes, H. S. Contributions to the knowledge of the Australian sarcophagid flies belonging to the genus "Trichollioproctia" Baranov, 1938 (Diptera). Anais da Academia Brasileira de Ciências. 26 : 235-276, 1954.
- Lopes, H. S. A remarkable new genus of Sarcophagidae from Australia (Diptera). Studia Entomologica 1 : 545-552, 1958a.
- Lopes, H. S. Insects of Micronesia; Diptera, Sarcophagidae. Insects of Micronesia 13 : 15-49, 1958b.
- Lopes, H. S. A revision of Australia Sarcophagidae. Studia Entomologica. 2 : 33-67, 1959.
- Mangan, R.L. Variation in spine morphology among pre-eradication screwworm larvae, Cochliomyia hominivorax (Coquerel), in relation to larval habitats. Ann. Entomol. Soc. Am. 78 : 440-445, 1985.

- Mangan, R.L. Variation in spine morphology among pre-eradication screwworm larvae, *Cochliomya hominivorax* (Coquerel), in relation to larval habitats. Ann.Entomol.Soc.Am. 78:440-445, 1985.
- Mangan, R.L. Reproductive failure in test crosses with screwworm (Diptera Calliphoridae) populations from southern and western Mexico. J. Econ. Entomol. 79:672-678, 1986.
- Mayr, E. Populações, espécies e evolução. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1977, p.485.
- McClintock, B. A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in *Zea mays*. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 18 : 677-81, 1932.
- McClintock, B. Introduction of instability at selected loci in maize. Genetics 38 : 579-599, 1953.
- McClintock, B. Controlling elements and the gene. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21 : 197-216, 1956.
- McInnis, D.O. Cytogenetics of a local population of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, from northeastern Mexico. Ann.Entomol.Soc.Am. 74 : 582-589, 1981.
- McInnis, D.O. Chromosomal variation in the screwworm polymorphism or cryptic species ? Am.Nat 122: 840-842, 1983a.



- McInnis, D.O., Whitthen, C.J., Mackley, J.W., Peterson II, R.D. & Spencer, J.P. Cytogenetic studies of the screwworm, Cochliomyia hominivorax (Diptera Calliphoridae), from Chiapas, Mexico. Ann.Entomol.Soc.Am. 76 : 628-640, 1983b.
- Melvin, R. & Bushland, R.C. A method of rearing Cochliomyia americana C. & P. on artificial media. U.S. Bul.Entomol.Plant., Quarant. Et 88, p.2, 1936.
- Melvin, R. & Bushland, R.C. The nutritional requirements of screw-worm larvae. J.Econ.Entomol. 36 (6) : 850-852, 1940.
- Metz, C.W. Chromosome studies on the Diptera II. The paired association of chromosomes in the Diptera, and its significance. J.exp.Zool. 21 : 213-262, 1916.
- Moser, G.C., Fallon R.J. & Meiss, H.K. Fluorimetric measurements and chromatin condensation patterns of nuclei from 3T3 cells throughout G1. J.Cell.Physiol. 106 : 293-301, 1981.
- Nankivell, R.N. Karyotype differences in the crenaticeps-group of Atractomorpha (Orthoptera, Acridoidae, Pyrgomorphidae). Chromosoma (Berl.) 56 : 127-142, 1976.
- Natarajan, A.T. & Gropp A. A fluorescence study of heterochromatin and nucleolar organization in the laboratory and tobacco mouse. Exp.Cell.Res. 74 : 245-250, 1972.

- Neff, N.A. & Marcus, L.F. A survey of multivariate methods for systematics. New York. Privately published, 1980, 2334p.
- Nie, N.H., Hull, C.J., Jenkins, J.G., Steinbrenner, K. & Bent, D.H. Statistical package for the social sciences. 2nd. ed. McGraw-Hill, New York, 1975, pp.675.
- Norris, K.R. The ecology of the blowflies in Australia.  
In: Biogeography and Ecology in Australia. Monographie biological  
8 : 514-544, 1959.
- Pachmann, U. & Rigler, R. Quantum yield of acridines interacting with DNA of defined base sequence. A basis for the explanation of acridine in chromosomes. Exp.Cell.Res. 72 : 602-608, 1972.
- Pathak, S. & Arrighi, F.E. Loss of DNA following C banding procedures. Cytogenet.Cell.Genet. 12 : 414-422, 1973.
- Petterson, J.T. & Stone, S. Evolution in the genus Drosophila.  
1a. Ed. MacMillan, New York, 1952.
- Pavan, C. Two types of heterochromatin in Drosophila nebulosa.  
Genetics, 32 : 137-145, 1946.
- Perry, P. & Evans, H.J. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature, 258:121-125, 1975.

Peacock, W.J., Lohe, A.R., Gerlach, W.L., Densmuir, P., Dennis E.S. & Appels, R. Fine structure and evolution of DNA in heterochromatin. Cold.Spring.Harbor.Symp.Quant.Biol. 42 : 1121-1135, 1978.

Pimpinelli, S., Santini, G. & Gatti, M. Characterization of Drosophila heterochromatin. II C - and N- banding. Chromosoma (Berl.) 57 : 377-386, 1976.

Pimentel, R.A. Morphometrics the multivariate Analysis of Biological Data. Dubuque. Kendall/Hunt, 1979, 276p.

Powelson, E.E., Gates, M.A. & Berger, J. A biometrical analysis of 22 stocks of four syngens of Panamecium aurelia. Can.J.Zool 53 : 19-32, 1975.

Ranganath, H.A., Schmidt, E.R. & Hagele, K. Satellite DNA of Drosophila nasuta nasuta and D.n.albomicana : localization in polytene and metaphase chromosomes. Chromosoma (Berl.) 85 : 261-368, 1982.

Rees, J.W. Morphologic variation in the mandible of white-tailed deer (Odocoileus virginianus) : a study of population skeletal variation by principal component and canonical analysis. J.Morphol. 128 : 113-30, 1969.

Ribbert, D. Die polytanchrosomen der borstenbildungszellen von Calliphora erythrocephala. Chromosoma 21 : 296-344, 1967.

- Richardson, R.H., Ellison, J.R. & Averhoff, W.W. Genetic differences among screwworm populations. Annual Report, USDA\_agreement\_nº\_8-7B 30-9-120 : 1-24, 1980.
- Richardson, R.H., Ellison, J.R. & Averhoff, W.W.E. Autocidal control of screwworms in North America. Science 215 : 361-370, 1982a.
- Richardson, R.H., Ellison, J.R. & Averhoff, W.W. Mating types in screwworm populations ? Reply. Science 218 : 1143-1145, 1982b.
- Richardson, R.H. & Ellison, J.R. Screwworm karyotyping and species diversity. Am.Nat. 124 : 765-767, 1984.
- Roback, S.S. The evolution and taxonomy of the Sarcophagidae (Diptera : Sarcophagidae). Illinois\_Biologica\_Monographs, 23 : 1-181, 1954.
- Rostron, J. A multivariate statistical study of skull measurements of five taxa gazelles. Zool.L.Linn.Soc. 4 : 1-14, 1972
- Rowley, J.D. & Bodmer, W.F. Relationship of centromeric heterochromatin to fluorescent banding patterns of metaphase chromosomes in the mouse. Nature 231 : 503-506, 1971.
- Schnedl, W. Giemsa banding quinacrine fluorescence and DNA replication in chromosomes of cattle (Bos taurus). Chromosoma (Berl.) 38: 319-328, 1972.

Schnedl, W. Analysis of the human karyotype by the recent banding techniques. Arch. Genet. 46:65-98, 1973.

Schnedl, W. Banding patterns in chromosomes. Int. Rev. Cytol. Suppl. 4:237-272, 1974.

Simola, K., Selander, R.K. de la Chapalle, A., Corneo, G. & Ginelli, E. Molecular basis of chromosome banding I. The effect of mouse DNA fractions on two fluorescent dyes in vitro. Chromosoma (Berl.) 51 : 199-205, 1975.

Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. Numerical Taxonomy. San Francisco : Freeman, 1973, 573 pp.

Sokal, R.R. Statistical methods in systematics. Biol. Rev. 43 :337:391, 1965.

Sokal, R.R. Analyzing character variation in geographic space.  
In : Numerical Taxonomy, ed. J. Felsenstein, Berlin Spring-Verlag, 384-403, 1983.

Stalker, H.D. & Carson, H.L. Morphological variation in natural population of Drosophila robusta Sturtevant. Evolution 1 : 237-248, 1947

Stalker, ~~H.~~D. & Carson, H.L. An altitudinal transect of Drosophila robusta Sturtevant. Evolution 2: 295-305, 1948.

- Stalker, H.D. & Carson, H.L. Seasonal variation in the morphology of Drosophila robusta Sturtevant 3 : 330-343, 1949.
- Stebbins, G.L. Variation and evolution in plants. New York, Columbia Univ., 1950, p.643.
- Stevens, N.M. A study of the germ cells of certain Diptera, with reference to the heterochromosomes and the phenomena of synapsis. J. Exp. Zool., 5 : 359-374, 1908.
- Sumner, A.T. The nature and mechanisms of chromosome banding. Cancer Genet. Cytogenet. 6 : 59-87, 1982.
- Taylor, J.H., Woods, P.S. & Hughes, W.L. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 43:122-127, 1957.
- Terzian, C. De l'optimisation du nombre de variables morphologiques dans la discrimination entre populations le cas de l'aile chez Drosophila melanogaster Genetica 69 : 219-225, 1986.
- Thorpe, R.S. Biometric analysis of geographic variation and racial affinities. Biol. Rev. 51 : 407-452, 1976.

- Ullerich, F.H. Geschlechtschromosomen und Geschlechtsbestimmung bei einigen Calliphorinen (Calliphoridae, Diptera). Chromosoma, 14: 45-110, 1963.
- Ward, B.L. & Heed, W.B. Chromosome phylogeny of Drosophila pacheae and related species. J.Hered. 61 : 248-258, 1970.
- Weisblum, B. Why centric regions of quinacrine-treated mouse chromosomes show diminished fluorescence. Nature 246 : 150-151, 1973.
- Weisblum, B. & Haseth. Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate-rich regions in DNA. Proc.Natl.Acad.Sci. 69 : 629-632, 1972.
- White, M.J.D. Animal cytology and evolution 3a. ed. London, Cambridge University Press, 1977, p.961.
- Wiley, E.O. The evolutionary species concept reconsidered. Syst.\_Zool. 27:17-26, 1978.
- Wolf, B.E. & Sokoloff, S. Changes in the form of the polytene X-chromosome in Phryne (Sylvicola) cincta - causes and functional significance. Chromosoma Today 5 : 91-108, 1965.
- Vosa, C.G. The discriminating fluorescence patterns of the chromosomes of Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 31 : 446-451, 1970.

- Yosida, T.H. & Sagai, T. Variation of C.bands in several subspecies of Rattus rattus. Chromosoma (Berl.) 50 : 283-300, 1975.
- Zakharov, A.F. & Egolina, N.A. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. 1-BUdR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. Chromosoma 38:341-365, 1972.
- Zuffardi, O., Tiepolo, L., Dolfini, S., Barigozzi, C. & Fraccaro, M. Changes in the fluorescence patterns of translocated Y chromosome segments in Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 34 : 274-280, 1971.