

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Tatiana Teixeira Torres

Variabilidade genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): uma nova perspectiva através de marcadores microssatélites

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Tatiana Teixeira</u> <u>TORRES</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

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

Campinas, SP
2006

BIBLIOTECA CENTRAL CÉSAR LATTES DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO UNICAMP
--

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
T636v
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 70617
PROC. 16.900.123.06
C _____ B _____
PREÇO 11.00
DATA 17/11/06
BIB-ID 391736

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

T636v

Torres, Tatiana Teixeira

Variabilidade genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): uma nova perspectiva através de marcadores microssatélites / Tatiana Teixeira Torres. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Pragas - Controle. 2. Marcadores genéticos. 3. Genética de populações. 4. Metapopulação. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/lb)

Título em inglês: Genetic diversity and population structure in the new world screw-worm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), as revealed by microsatellite markers.

Palavras-chave em inglês: Pests - Control; Genetic markers; Population genetics; Metapopulation.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

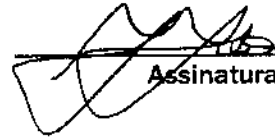
Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Sérgio Furtado dos Reis, Louis Bernard Klaczko, Aldo Malavasi Filho, Antonio Mateo Sole-Cava.

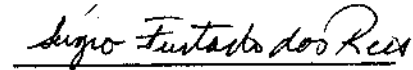
Data da defesa: 28/07/2006.

Campinas, 28 de julho de 2006

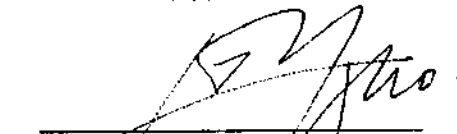
Profa. Dra. Ana Maria L. de Azeredo-Espin (Orientadora)


Assinatura

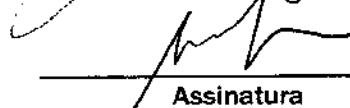
Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis


Assinatura

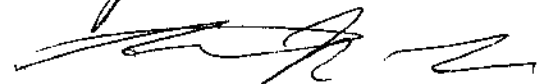
Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko


Assinatura

Prof. Dr. Aldo Malavasi Filho


Assinatura

Prof. Dr. Antonio M. Solé-Cava


Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

Dra. Maria Imaculada Zucchi

Assinatura

*"A mais excitante expressão a se ouvir na ciência,
aquela que anuncia novas descobertas,
não é 'Eureca!' mas 'Engraçado...'"*

Isaac Asimov

*"Climb every mountain
Ford every stream
Follow every rainbow
'Till you find your dream"*

*["Escale toda as montanhas
Cruze todos os rios
Siga todos os arco-íris
Até encontrar seu sonho"]*

Rodgers & Hammerstein

Aos meus pais, Antônio e Délia por trilharem
junto comigo o caminho até encontrar meu
sonho

*"You push me to go the extra mile
You push me when it's difficult to smile
You push me, a better version of myself
You push me, only you and no one else
You push me, see the other point of view
You push me when there's nothing else to do
You push me when I think I know it all
You push me when I stumble and I fall"*

Madonna & Stuart Prince

Ao Mário, pelo carinho, pela dedicação e
pelo empurrãozinho nas horas difíceis

À minha orientadora e amiga Ana Maria, por ter aberto as portas do laboratório de Genética Animal dando a oportunidade de vivenciar um problema biológico fascinante. Pela liberdade de ação e pela confiança depositada em mim, mas estando sempre por perto nos momentos de insegurança para discutir as dúvidas e os problemas. Pelas frutíferas e entusiasmadas discussões sobre os diferentes cenários das mosquinhas, pelas confortantes e estimulantes conversas sobre o futuro, sobre política, sobre futebol, ou sobre assuntos aleatórios. Pelos estímulos, desafios e por abrir meus horizontes dando a oportunidade de participar em outros projetos. Pela oportunidade de participar de gratificantes atividades de ensino tanto na graduação como na pós. Pelo exemplo profissional como orientadora, professora e administradora e pela contribuição decisiva para o meu amadurecimento profissional.

À Rosângela, pelo seu fundamental trabalho de bastidor, desde o cuidado com as seqüências até a ajuda na bancada nas horas de dificuldade. Pelos toques valiosos da Cidinha e amizade desde o meu início no laboratório e pela imprescindível ajuda na criação de toda a infra-estrutura para a realização deste trabalho.

À Ana Cláudia pelo exemplo de garra e entusiasmo em ciência. Por guiar meus primeiros passos no Laboratório de Genética Animal, quando meus interesses ainda não estavam no núcleo, mas no DNA de uma organela, pequeno em tamanho, mas não em informação e em questões intrigantes.

Às minhas amigas da sala DDD, Ana Carolina e Mariana. À Ana Carolina, minha vizinha de computador, pelas tardes repletas das nossas discussões regadas a cafezinho. Pela minha primeira clonagem (aprendi direitinho!). Por me compreender tão bem e por suas palavras de encorajamento em momentos importantes. À Mariana, pela amizade desde a graduação, pela ótima companhia nas diversas empreitadas, viagens de coleta, congressos e passeios. Pela imensa ajuda com as amostras de DNA e pelas informações que eu sempre perdia ou esquecia.

Aos integrantes do lab que acompanhei mais de perto, Renato, Priscila, Bárbara, pelo entusiasmo e anseio de aprender coisas novas.

Ao Pedro Feijão por tornar o *FiRe* uma realidade com seus conhecimentos de bioinformática.

Ao demais integrantes do labanimal, Túlio, Norma, Aline, Johnny, Palocci, pelo companheirismo e pelo descontraído ambiente de trabalho. À Lu e à Karina, que vestiram a camisa do lab.

À Salete, por cuidar das nossas mosquinhas com tanta dedicação na criação.

À Mari Loira, pelo auxílio técnico e pela alegria no laboratório.

Ao Fábio Conte, meu primeiro e mais divertido vizinho de mesa, pela cumplicidade e amizade no início da minha história no lab com a mosca mais cabeçuda da família Calliphoridae.

Ao Joan, Lissiene, Ize e a todos os outros que um dia compartilharam bons momentos no laboratório de Genética Animal.

Às meninas da secretaria do CBMEG, Tânia e Sandra, pela imensa ajuda com a burocracia e com a liberação de verba. Pela paciência com as minhas dúvidas e confusões.

Ao estimado Professor Sérgio Furtado dos Reis, professor desde a graduação, por ter despertado meu interesse por Evolução. Pela contribuição na pré-banca. Pela confiança no meu trabalho e pelo seu interesse e entusiasmo pelos microssatélites. Pela alegria de trabalharmos juntos.

Aos professores Ana, Michel, Gonçalo e Mano, idealizadores da BG380, disciplina que despertou meu interesse pela Genética Molecular e, principalmente pelo ensino. Pela oportunidade de fazer parte da história da disciplina, participando por três anos como monitora voluntária e mais três como participante do programa de estágio docente.

Ao Dr. João Alexandrino, pela interessante discussão durante a pré-banca e pelas excelentes sugestões oferecidas.

Aos professores membros da banca, Prof. Dr. Aldo Malavasi Filho, Prof. Dr. Antonio M. Sole-Cava, Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis e Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko, pelas valiosas sugestões para a melhoria da tese e para a preparação dos manuscritos.

À todos os professores da graduação em Ciências Biológicas e da pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela contribuição para minha formação acadêmica.

Ao Dr. José Eduardo Garcia, pelo pontapé inicial no mundo dos microssatélites e pela hospitalidade em Jaboticabal.

À Dr. Rosana P. V. Brondani por me acolher na Embrapa Arroz e Feijão de forma tão proveitosa e ao mesmo tempo tão amigável.

Ao Dr. Ange-Marie Risterucci pelo eficiente protocolo de isolamento de microssatélites demonstrado no curso ministrado em 2002 na Unicamp.

À professora Anete pela oportunidade de participar como aluna em 2002 e como monitora no dois anos seguintes, do curso “Construção de Bancos Enriquecidos em Microssatélites de Eucariotos”. Por abrir o seu laboratório e disponibilizar equipamentos imprescindíveis no início deste trabalho. Pelo apoio, incentivo e ótima convivência.

À Prianda, pela amizade que surgiu no curso de microssatélites. Por sua alegria cativante e pelos longos papos, no corredor, na secretaria, na porta do CBMEG...

À família Paniago por me acolher de forma tão especial. Por compreender a minha ausência em vários eventos e encontros. Por toda ajuda nas coletas. Em especial à Luisa pela preocupação com o projeto, por todos os contatos com criadores de boi e avestruz, pelo teste e pelas valiosas sugestões para a melhoria do kit de coleta.

Ao Jaci (Goiano), ao Dennis Tipple, ao Winston Giardini, ao Dr. Wilson Köller, aos colegas do lab, Mari, Túlio, Renato, Norma e Aline e a todas as pessoas que contribuíram para a obtenção de amostras de *C. hominivorax* do Brasil. A ajuda de vocês foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Alfredo Coronado, pelo envio das amostras de Barquisimeto na Venezuela.

À Mari, ao Pablo e ao Túlio pela coleta minuciosa no Uruguai em 2003. Aos uruguaios, Santos Gama, Stella Lanzzeri e Estela Martinez pelo constante envio de amostras e pela calorosa acolhida no Uruguai no “Meeting” em 2005.

À todos os participantes do Projeto Coordenado de Pesquisa (CRP) da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), pelas contribuições ao projeto que une tantas linhas de pesquisa e culturas diferentes em torno de um interesse comum, o controle de NWS e OWS. Pelo “workshop” em Campinas e “meeting” em Montevideú. Em especial ao Dr. David Carlson, ao Dr. Martin Hall e ao Dr. Alan Robinson, pelo reconhecimento e estímulo ao meu trabalho.

À Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e ao coordenador do CRP, Dr. Alan Robinson pelo apoio ao projeto, pela logística na obtenção de amostras e pela oportunidade de participar em dois eventos relacionados ao CRP.

Aos meus pais, Antônio e Délia, pelo amor e preocupação, superando as dificuldades impostas pela distância. Pelo apoio incondicional às minhas decisões e pelo incentivo aos novos desafios. À Jujubinha, minha irmãzinha, pela torcida em todos os momentos.

Ao Mário, companheiro e amigo, pelo carinho e afeto sempre presentes ao longo desta jornada. Por toda a compreensão e dedicação durante este tempo em que o meu humor foi algo inconstante. Por vivenciar as minhas questões científicas, pelas discussões e pelas idéias. Obrigada pela força e vibração que foram essenciais nesta etapa da minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio financeiro durante a Iniciação Científica (processo número 00/13864-3), quando este trabalho se iniciou e pelo auxílio durante o Doutorado (processo número 02/00035-4). Pelos auxílios à pesquisa (processos 03/01458-9 e 04/09654-4) que garantiram a execução deste trabalho.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	ii
BANCA EXAMINADORA	iii
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS.....	vii
ÍNDICE	x
ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS.....	xiii
ABREVIações E TERMOS EM INGLÊS.....	xv
RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
ORGANIZAÇÃO DA TESE	5
PARTE 1	INTRODUÇÃO GERAL
1.1 A MOSCA DA BICHEIRA E SUA IMPORTÂNCIA NA PRODUÇÃO ANIMAL.....	8
1.2 DISTRIBUIÇÃO HISTÓRICA E ATUAL: 70 ANOS DE SIT	11
1.3 MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	13
1.4 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES	17
1.5 GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>C. hominivorax</i>	18
OBJETIVOS.....	22
PARTE 2	DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES
CAPÍTULO 1	24
2.1.1 METODOLOGIA DETALHADA	24
2.1.1.1 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA ENRIQUECIDA EM MICROSSATÉLITES	24
<i>Extração e Digestão do DNA Genômico</i>	24
<i>Seleção e recuperação dos Fragmentos de 200 a 800pb</i>	24
<i>Ligação dos Adaptadores</i>	25
<i>Seleção dos fragmentos ricos em repetições AC</i>	25
<i>Clonagem dos fragmentos em fago lambda Zap</i>	27
<i>Seleção dos clones positivos</i>	27
<i>Seleção dos insertos e seqüenciamento</i>	28
<i>Análise das seqüências</i>	29
<i>Amplificações iniciais, Visualização dos Produtos de PCR e Interpretação do Gel</i>	30
2.1.1.2 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS LOCOS CARACTERIZADOS	30
<i>Extração de DNA de <i>C. hominivorax</i> para a avaliação dos marcadores</i>	30
<i>Amplificações</i>	31
<i>Eletroforese</i>	31
<i>Coloração com Prata</i>	32
<i>Análise dos dados de microsatélites</i>	32
<i>Amplificações heterólogas</i>	32
2.1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
2.1.2.1 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA ENRIQUECIDA EM MICROSSATÉLITES	33

2.1.2.2	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS, DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DOS "PRIMERS"	34
2.1.2.3	CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS LOCOS DE MICROSSATÉLITES	35
2.1.3	ARTIGO	38
CAPÍTULO 2		42
2.2.1	METODOLOGIA DETALHADA	42
2.2.1.1	CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA ENRIQUECIDA EM MICROSSATÉLITES	42
	Amostras de <i>C. hominivorax</i>	42
	Extração e Digestão do DNA Genômico	42
	Ligação dos Adaptadores	42
	Pré-amplificação dos fragmentos via PCR	43
	Seleção dos fragmentos ricos em repetições AG	43
	Amplificação dos fragmentos selecionados via PCR	43
	Clonagem dos fragmentos	44
2.2.1.2	SELEÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS	44
	Amplificação dos insertos clonados e "Southern blot"	44
	Sequenciamento, análise das seqüências e desenvolvimento de "primers"	44
2.2.1.3	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO	45
	Amplificações heterólogas	45
2.2.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
2.2.2.1	CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA ENRIQUECIDA EM MICROSSATÉLITES AG	45
2.2.2.2	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS, DESENVOLVIMENTO E UTILIZAÇÃO DOS "PRIMERS"	46
2.2.2.3	CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS LOCOS DE MICROSSATÉLITES	48
2.2.3	ARTIGO	49
CAPÍTULO 3		53
2.3.1	PROGRAMAS UTILIZADOS	54
2.3.1.1	CONJUNTO DE FERRAMENTAS	54
	"Base Calling" dos cromatogramas	54
	Mascaramento das regiões contaminantes	54
	Localização dos microsatélites	54
	Alinhamento das seqüências obtidas	54
	Construção de "primers"	54
2.3.1.2	BANCO DE DADOS RELACIONAL	55
2.3.2	ESTRUTURA E OPERAÇÃO	55
2.3.2.1	CONJUNTO DE FERRAMENTAS	55
2.3.2.2	BANCO DE DADOS RELACIONAL	57
2.3.3	CONCLUSÕES	57
2.3.3.1	CONJUNTO DE FERRAMENTAS	57
2.3.3.2	BANCO DE DADOS RELACIONAL	59
PARTE 2, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS		60
PARTE 3	ANÁLISE DE POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS DE <i>C. hominivorax</i>	
CAPÍTULO 4		62
3.4.1	METODOLOGIA DETALHADA	62

3.4.1.1	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>C. hominivorax</i> NO URUGUAI.....	62
	<i>Extração de DNA de indivíduos de C. hominivorax</i>	63
3.4.1.2	ANÁLISE DOS DADOS DE MICROSSATÉLITES.....	63
	<i>Deteção do polimorfismo dos locos de microsatélites</i>	63
	<i>Eletroforese e Coloração com Prata</i>	64
	<i>Variabilidade Genética</i>	64
	<i>Variabilidade Interpopulacional Espacial</i>	65
	<i>Variabilidade Interpopulacional Temporal</i>	66
	<i>Evidência de redução (gargalo) populacional recente</i>	66
3.4.2	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	66
	<i>Variabilidade Genética</i>	66
	<i>Diferenciação Interpopulacional</i>	70
	<i>Diferenciação Temporal</i>	74
	<i>Evidência de redução (gargalo) populacional recente</i>	76
3.4.3	<u>CONCLUSÕES</u>	78
3.4.4	<u>ARTIGO</u>	80
CAPÍTULO 5		93
3.5.1	<u>METODOLOGIA DETALHADA</u>	93
3.5.1.1	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>C. hominivorax</i> DA AMÉRICA DO SUL.....	93
	<i>Coletas de lavas da mosca da bicheira no Brasil</i>	93
	<i>Obtenção de amostras de C. hominivorax no Brasil – Kit de Coleta</i>	93
	<i>Outras Amostras</i>	93
	<i>Amostras de C. hominivorax do Uruguai</i>	94
3.5.1.2	ANÁLISE DOS DADOS DE MICROSSATÉLITES.....	96
	<i>Deteção do polimorfismo dos locos de microsatélites</i>	96
	<i>Variabilidade Genética e Variabilidade Interpopulacional Espacial</i>	96
3.5.2	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	
	<i>Variabilidade Genética</i>	96
	<i>Evidência de redução (gargalo) populacional recente</i>	100
	<i>Diferenciação Interpopulacional</i>	100
	<i>Teste do modelo de isolamento por distância</i>	103
	A. PROCESSOS DEMOGRÁFICOS CONTEMPORÂNEOS.....	104
	B. PROCESSOS HISTÓRICOS.....	106
PARTE 3, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS		109
CONCLUSÕES GERAIS		112
PARTE 4		ANEXOS
ANEXO 1		115
ANEXO 2		124
ANEXO 3		129
REFERÊNCIAS		131

FIGURAS

Figura 1. À esquerda, fêmea adulta de <i>C. hominivorax</i> e à direita, adultos de <i>C. hominivorax</i> em uma ferida aberta em bovino	9
Figura 2. Distribuição histórica e atual de <i>C. hominivorax</i>	12
Figura 3. Seqüência do sítio de policlonagem do vetor de inserção do fago Lambda ZapII	29
Figura 4. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida dos produtos de amplificação do loco CH10 em amostras de <i>C. hominivorax</i> exemplificando a amplificação com as condições otimizadas	36
Figura 5. Página inicial do portal FiRe	53
Figura 6. Página de submissão dos dados de seqüência	55
Figura 7. Página de resultados do FiRe	56
Figura 8. Alinhamento produzido pelo FiRe através da ferramenta Phrap.	57
Figura 9. Página parcial de resultados da busca no banco de dados FiRe.	58
Figura 10. Locais e ano de coleta das amostras de <i>C. hominivorax</i> do Uruguai	63
Figura 11. Teste do isolamento por distância	74
Figura 12. Kit de coleta de amostras de <i>C. hominivorax</i>	94
Figura 13. Manual explicativo que acompanha o kit de coleta	95
Figura 14. Locais de coleta das amostras de <i>C. hominivorax</i> na América do Sul.	96
Figura 15. Teste do isolamento por distância.	104

TABELAS

Tabela 1. Estimativas de perda anual causada por infestações de <i>C. hominivorax</i> em países da América do Sul	10
Tabela 2. Estudos realizados com marcadores moleculares para a caracterização da variabilidade genética e estrutura de populações naturais de <i>C. hominivorax</i>	20
Tabela 3. Seqüências dos adaptadores "LongSau" e "ShortSau" e do "PrimerSau"	25
Tabela 4. Combinações de "primers" utilizadas na PCR-ancorada	28
Tabela 5. Seqüência dos "primers" desenvolvidos, temperatura de hibridização do "primers" e tamanho esperado dos produtos de PCR	35
Tabela 6. Caracterização dos locos de microssatélites polimórficos isolados de <i>C. hominivorax</i>	37
Tabela 7. Testes de amplificação em outras espécies da família Calliphoridae utilizando "primers" desenvolvidos para <i>C. hominivorax</i>	38
Tabela 8. Caracterização genética dos novos locos de microssatélite isolados de <i>C. hominivorax</i>	47
Tabela 9. Caracterização dos novos locos de microssatélites polimórficos isolados de <i>C. hominivorax</i>	48
Tabela 10. Testes de amplificação em outras espécies da família Calliphoridae utilizando os novos "primers" desenvolvidos para <i>C. hominivorax</i>	49
Tabela 11. Localidades e o número de indivíduos amostrados em cada uma das localidades do Uruguai com suas respectivas informações geográficas	64
Tabela 12. Diversidade genética de amostras de <i>Cochliomyia hominivorax</i> de cinco diferentes localidades ao longo do território Uruguia obtidas em 2003	67
Tabela 13. Diversidade genética de amostras de <i>Cochliomyia hominivorax</i> de cinco diferentes localidades ao longo do território Uruguia obtidas em 2004	68

Tabela 14. Distâncias médias (em km) de dispersão de adultos de <i>C. hominivorax</i> .	72
Tabela 15. Diferenciação populacional entre pares de populações do Uruguai de 2003	73
Tabela 16. Diferenciação populacional entre pares de populações do Uruguai de 2004	73
Tabela 17. Diferenciação populacional temporal nas amostras do Uruguai	75
Tabela 18. Resultado do teste utilizado para detecção de redução populacional	77
Tabela 19. Localidades amostradas com suas respectivas informações geográficas	94
Tabela 20. Diversidade genética de amostras de <i>C. hominivorax</i> da América do Sul	98
Tabela 21. Teste para detecção de redução populacional no programa BOTTLENECK	101
Tabela 22. Estimativas globais de F_{ST} nos grupos de amostras	101

QUADROS

QUADRO 1. TIPOS DE MIÍASES	9
QUADRO 2. CUSTO ANUAL TEÓRICO DE INFESTAÇÕES POR <i>C. hominivorax</i>	10
QUADRO 3. SIT - TÉCNICA DO INSETO ESTÉRIL	11
QUADRO 4. PROCESSO DE MUTAÇÃO EM MICROSSATÉLITES	15
QUADRO 5. ARTEFATOS DE TÉCNICA MAIS COMUNS EM MARCADORES MICROSSATÉLITES	16
QUADRO 6. PORQUE ESTUDAR GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE ESPÉCIES-PRAGA?	19
QUADRO 7. QUAL É A MELHOR ESTATÍSTICA PARA DADOS DE MICROSSATÉLITES?	71
QUADRO 8. METAPOPULAÇÕES	79

Asp	Ácido aspártico
"Base Calling"	Processo de leitura dos dados do seqüenciador
BSA	"Bovine Serum Albumine", albumina sérica bovina
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CGI	"Common Gateway Interface"
"Contig"	Grupo de seqüências com regiões sobrepostas
CRP	Coordinated Research Project
D_A	"Allelic richness", diversidade alélica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAm	DNA mitocondrial
dNTP	Qualquer um dos quatro possíveis desorribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FASTA	Formato de arquivo utilizado em Bioinformática para o intercâmbio de informação entre bancos de dados de seqüência
FiRe	"Find Repeats!"
F_{ST}	Índice de fixação
GenBank	Banco de dados de seqüência do NIH (National Institutes of Health)
Gly	Glicina
Gly137/Asp	Substituição na posição nucleotídica 137 do gene, de glicina para ácido aspártico
H_E	Heterozigosidade esperada
H_O	Heterozigosidade observada
H-W	Hardy-Weinberg
IAEA	International Atomic Energy Agency
IAM	"Infinite Allele Model"
IPTG	Isopropil-thio- β -D-galactopyranoside
Km	Quilômetros
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
N_a	Número de alelos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N_m	Número de migrantes por geração
NWS	"New World screw-worm"
P	P -valor de teste estatístico
pb	Pares de base
PCR	"Polymerase Chain Reaction"

PCR-RFLP	"Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism"
"Pipeline"	Sequência de programa encadeados, funcionando em conjunto
"Primer"	Oligonucleotídeo iniciador
RAPD	"Random Amplified Polymorphic DNA"
RFLP	"Restriction Fragment Length Polymorphism"
<i>R_{ST}</i>	Análogo do <i>F_{ST}</i> específico para microssatélites
"Script"	Programas simples, baseados em uma linguagem (como Java), que executam determinadas operações.
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIT	"Sterile Insect Technique", Técnica do Inseto Estéril
SMM	"Stepwise Mutation Model"
Southern blot	Método de detecção de fragmentos específicos de DNA
SSC	Tampão salino de Citrato de sódio
SSPE	Tampão salino Sódio-Fosfato-EDTA
SSR	"Simple Sequence Repeats"
STR	"Short Tandem Repeats"
TE	Tampão Tris – EDTA
T_m	"Melting temperature", temperatura de fusão
TPM	"Two Phase Model"
TRF	"Tandem Repeats Finder"
US\$	Dólares americanos
VNTR	"Variable Number Tandem Repeats"
WEB ou WWW	"World Wide Web", serviço baseado em hipertexto que permite a navegação entre informações disponíveis em computadores da rede
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
ZIP	Extensão de arquivo condensado

Os microssatélites são uma classe especial de marcadores moleculares tipicamente codominantes e multi-alelicos altamente polimórficos e com uma alta heterozigosidade esperada. Estas características fazem com estes marcadores sejam cada vez mais empregados para investigar questões acerca da variabilidade genética, fluxo gênico e sistemas de acasalamento, até mesmo em espécies com baixos níveis de variabilidade em outros marcadores. A principal limitação dos microssatélites é a necessidade de se desenvolver marcadores microssatélites de novo para cada nova espécie a ser estudada, o que pode ser uma tarefa cara e demorada, mas indispensável na maioria dos casos.

[illegible]

The New World screw-worm (NWS), *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), is an important parasitic insect pest in Neotropical regions. NWS myiasis is caused by the larval stage of the fly infesting tissues of warm-blooded vertebrates. This species has been successfully eradicated from North and most of Central America by the sterile insect technique. In South America, however, this pest continues to affect the development of the livestock sector and an international effort is underway to evaluate the feasibility of eradicating the NWS from endemic areas of Central and South America. Therefore, the aim of this study was to provide some insight into the patterns of genetic variation, structure and gene flow of *C. hominivorax* populations from South America. Those are valuable information required prior to an investment on large-scale efforts aiming at controlling insect pests.

In order to investigate patterns of genetic differentiation of *C. hominivorax* from its current distribution using microsatellite loci, two efforts were made to isolate these markers from enriched genomic libraries. Initially, a set of 10 polymorphic microsatellite loci was isolated from an AC-enriched genomic library. Amplification of the reported loci in 30 screw-worms revealed an average of 6.9 alleles per locus with expected heterozygosities ranging from 0.3831 to 0.8022. In the second effort, seven new polymorphic microsatellite markers were developed using a different protocol. An (AG)_n probe was used instead of (GT)_n in the enrichment step. The number of alleles found in the seven new loci ranged from 3 to 13 per locus, with the expected heterozygosities ranging from 0.4220 to 0.9045. Cross-species amplifications of the 17 microsatellite markers were successful in other Calliphoridae species, suggesting that these loci may be useful in those species after evaluating the extent of polymorphism. These efforts have also motivated the development of a web-based, user-friendly toolkit for microsatellite sequence characterization, the

O volume de dados de sequência e a dificuldade de análise através de ferramentas gratuitas disponíveis motivaram o desenvolvimento em colaboração com outros autores, de um conjunto de ferramentas de bioinformática para facilitar o desenvolvimento de microssatélites. Esta etapa (ainda em andamento) está descrita no capítulo três.

A terceira parte, dividida em dois capítulos, descreve a utilização dos marcadores caracterizados na análise da variabilidade genética e estrutura de populações de *C. hominivorax* na América do Sul. O quarto capítulo descreve o estudo realizado acerca de populações geográficas da mosca da bicheira no Uruguai. A primeira etapa deste estudo (avaliação da estruturação espacial) motivou a sua continuidade e a inclusão de amostras de outro período para a realização de uma caracterização da estruturação temporal de amostras de *C. hominivorax*. Uma etapa preliminar deste estudo está sendo publicada em forma de artigo nos "Proceedings of the International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests". O quinto capítulo descreve a análise da variabilidade genética e estrutura de populações de *C. hominivorax* na América do Sul, incluindo as amostras analisadas anteriormente do Uruguai, amostras de populações geográficas do Brasil e uma amostra da Venezuela. Dois artigos referentes aos capítulos quatro e cinco estão em fase de preparação e não foram incluídos na tese.

No final da terceira parte, há uma conclusão geral, com uma revisão resumida dos capítulos 4 e 5, e uma discussão de uma série de novas questões e perspectivas sobre a estrutura e dinâmica de populações de *C. hominivorax* e as implicações dos resultados encontrados em programas de controle da espécie.

No anexo 1, encontra-se o artigo publicado no periódico "*Veterinary Parasitology*" resultado da colaboração em outro projeto em andamento no Laboratório de Genética Animal, CBMEG, Unicamp. Este projeto também resultou na redação, juntamente com os outros autores, de um pedido de patente com intuito de proteger a atividade inventiva decorrente dos resultados obtidos.

Parte

*Assim como o trabalho no dia de Domingo
não põe ninguém pra diante,
Assim será também os bichos desta bicheira.
Há de cair de nove em nove,
de sete em sete,
de cinco em cinco,
de três em três,
de um em um
até ficar nenhum.*

Reza para curar bicheira, Autor Anônimo

INTRODUÇÃO GERAL

QUADRO 1. TIPOS DE MIÍASES

Existem dois grupos principais de espécies causadoras de miíases: os parasitas obrigatórios ou primários, que se desenvolvem em hospedeiros vivos e os parasitas facultativos ou secundários, que podem se alimentar de tecidos em tecidos necrosados ou material em decomposição (Zumpt, 1965).

Dentro da família Calliphoridae, destacam-se algumas moscas causadoras de miíases secundárias ou facultativas: as espécies do gênero *Chrysomya* (*C. putoria*, *C. megacephala*, *C. albiceps* e *C. rufifacies*) e *Cochliomyia macellaria* (Guimarães et al., 1983; Baumgartner & Greenberg, 1984). Ainda dentro da família Calliphoridae, duas espécies destacam-se por serem parasitas obrigatórios: a *Chrysomya bezziana*, sendo a principal causadora de miíase primária no Velho Mundo e a *Cochliomyia hominivorax*, considerada uma das mais importantes moscas causadoras de miíases primárias na região Neotropical.

A mosca da bicheira (Figura 1), *C. hominivorax* (Coquerel) é um ectoparasita obrigatório de animais homotêrmicos, ou de sangue quente, incluindo o homem. Fêmeas adultas desta espécie depositam seus ovos em pequenas feridas ou aberturas no corpo do hospedeiro. As larvas recém-eclodidas alimentam-se obrigatoriamente do tecido vivo. Não havendo o tratamento da infestação, formam-se lesões em áreas extensas, estimulando ainda outras fêmeas a depositar seus ovos neste hospedeiro (Thomas & Mangan, 1989).



Figura 1. À esquerda, fêmea adulta de *C. hominivorax* e à direita, adultos de *C. hominivorax* em uma ferida aberta em bovino.

O ciclo de vida de *C. hominivorax* é de aproximadamente 18 a 20 dias. No oitavo dia após a emergência, as fêmeas fecundadas podem ovipor uma massa de cerca de 250 ovos. Após 12 horas, as larvas emergem e passam a se alimentar dos tecidos vivos do hospedeiro por cinco dias até atingir o terceiro instar quando caem no solo e se transformam em pupas. O período de pupa

dura, em média, 6 dias, sendo seguido pela emergência dos adultos. Com cerca de oito dias, as fêmeas podem ovipor fechando o ciclo de vida da espécie.

A mosca da bicheira é considerada uma das principais pragas na região Neotropical por infestar animais domésticos, principalmente bovinos. Em casos extremos, o quadro de infestação causado pelas larvas da mosca da bicheira pode levar à morte do hospedeiro, mas as manifestações mais comuns são abortos, redução na produção de leite, peso e fertilidade. As cicatrizes causadas pelas infestações também reduzem a qualidade do couro, causando sua desvalorização no mercado internacional e até mesmo sua inutilização. Os prejuízos econômicos causados por esta espécie são ainda maiores; somados à redução direta da produtividade devido às infestações e mortes, estão os custos da mão-de-obra e dos inseticidas envolvidos no manejo, profilaxia e tratamento dos animais.

Os valores exatos do prejuízo causado pela *C. hominivorax* nos países da América do Sul não são conhecidos. Estimativas baseadas no custo anual teórico (quadro 2), indicam que custos anuais na América do Sul podem estar na ordem de 3,5 bilhões de dólares anuais (Vargas-Terán et al., 2005, Tabela 1).

QUADRO 2. CUSTO ANUAL TEÓRICO DE INFESTAÇÕES POR *C. hominivorax*

Rawlings (1985), utilizando dados coletados de censos e partir de estudos econômicos na região do Caribe, estimou o custo anual com o monitoramento e tratamento de *C. hominivorax* em US\$ 4.76-10.71 por cabeça de gado. Na ausência de dados mais acurados e recentes, a média de US\$ 7.76 por animal por ano é utilizada como o custo anual teórico da *C. hominivorax*.

Tabela 1. Estimativas de perda anual causada por infestações de *C. hominivorax* em países da América do Sul (adaptado de Vargas-Terán et al. (2005))

País	US\$ (milhões)
Brasil	1770
Argentina	618
Colômbia	264
Uruguai	210
Venezuela	199
Peru	187
Bolívia	152
Paraguai	103
Guyana	3
Suriname	1
Equador	0.17
Guyana Francesa	0.16
Chile*	0

* O Chile é declarado como um país livre de *C. hominivorax*

1.2 DISTRIBUIÇÃO HISTÓRICA E ATUAL: 70 ANOS DE SIT

Originalmente a distribuição geográfica da mosca da bicheira estendia-se do Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Uruguai (Hall & Wall, 1995, Fig. 2). O grande prejuízo econômico causado por esta espécie ao longo de toda a sua distribuição e sua biologia peculiar motivaram iniciativas envolvendo a esterilização de machos e a implementação de um programa de erradicação através da liberação de insetos estéreis (SIT, quadro 3).

Em 1958 foi iniciado o programa de erradicação de *C. hominivorax* dos Estados Unidos. O país foi declarado livre de casos de *C. hominivorax* em 1966. Aos Estados Unidos, seguiram-se os programas no México (erradicação declarada em 1991), Belize e Guatemala (1994), El Salvador (1995), Honduras (1996), Nicarágua (1999), Costa Rica (2000) e Panamá (2001). Neste último país, uma barreira permanente está sendo mantida através da liberação de insetos estéreis na divisa com a Colômbia para impedir a recolonização por moscas advindas da América do Sul. O histórico de erradicação da *C. hominivorax* está detalhado em diversas revisões e relatos históricos (Klassen & Curtis, 2005; Baumhover, 2002; Wyss, 2000; Krafur, 1998).

QUADRO 3. SIT - TÉCNICA DO INSETO ESTÉRIL

A técnica do inseto estéril (SIT, do inglês “Sterile Insect Technique”) foi idealizada por E. F. Knipling, há quase 70 anos, em 1937. Sua ideia inicial era de que a liberação no campo de um grande número de machos estéreis durante várias gerações sucessivas poderia levar a uma supressão na densidade populacional da mosca da bicheira (Knipling, 1955). A maior limitação na época era a indução da esterilidade nas moscas, o que foi contornado em 1950, quando H. J. Muller descreveu que a exposição de moscas da espécie *Drosophila melanogaster* a altas doses de raios-x induzia a ocorrência de mutações letais na linhagem germinativa (Muller, 1950). Quando machos expostos à radiação eram cruzados com fêmeas não expostas, mutações na linhagem germinativa destes machos preveniam o desenvolvimento de embriões. Esta nova possibilidade abriu o caminho para diversos testes em *C. hominivorax* que culminaram, em 1954, na primeira liberação em massa de machos esterilizados por radiação na ilha de Curaçao (Baumhover et al., 1955). O sucesso imediato da técnica (em apenas 14 semanas não foi mais verificada nenhuma oviposição de ovos viáveis) provou sua eficácia e permitiu sua aplicação em diversos programas de erradicação já concluídos e alguns ainda em andamento.

Em 1988, foram registrados diversos casos de *C. hominivorax* na Líbia. O medo de que a praga pudesse se dispersar pelo continente Africano motivou a importação de moscas estéreis do México e sua liberação já em 1989. A estratégia foi muito bem sucedida uma vez que somente seis infestações foram registradas em 1991 (Klassen & Curtis, 2005; Lindquist et al., 1993).

representando uma redução dramática quando comparado aos 12.000 casos de 1990. A erradicação foi declarada na Líbia em 1992 (Myers et al., 1998; Kraisur & Lindquist, 1996).

Programas de erradicação estão sendo conduzidos no Panamá e Jamaica e estuda-se a possibilidade de sua implementação nas outras ilhas do Caribe e na América do Sul (IAEA, 1999).

A distribuição atual de *C. hominivorax* compreende uma parte da região do Caribe (Cuba, República Dominicana, Haiti, Jamaica, Trinidad e Tobago) e toda a América do Sul, com exceção do Chile (Wyss & Galvin, 1996, Fig. 2).

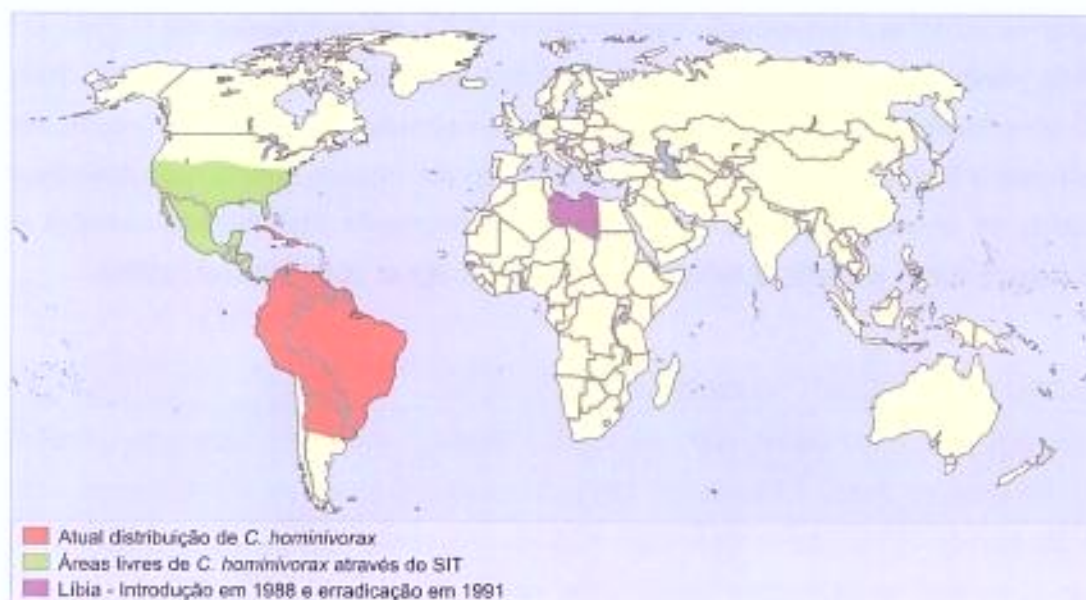


Figura 2. Distribuição histórica e atual de *C. hominivorax*.

Devido ao alto custo associado ao SIT, a principal forma de controle de *C. hominivorax* em sua atual distribuição geográfica é realizada através da aplicação de inseticidas, principalmente os organofosforados. Embora estes produtos tenham sido empregados extensivamente no controle de muitas miíases, há sérias consequências relacionadas a sua aplicação devido aos riscos de gerar efeitos tóxicos para os animais, provocar seleção de parasitas resistentes, deixar resíduos na carne e no leite e de poluir o ambiente. Neste sentido, é interessante informar que foi realizado paralelamente um estudo visando caracterizar um gene possivelmente relacionado à resistência a inseticidas organofosforados em *C. hominivorax*.

O objetivo desse estudo (Assis et al., 2006, anexo 1), foi verificar a presença em *C. hominivorax* de uma mutação pontual descrita no gene *Lca7* para *L. cuprina* (Diptera: Calliphoridae) responsável por converter a atividade típica carboxilesterase da enzima esterase (E3) para uma atividade hidrolase de organofosfatos, tornando o organismo resistente aos inseticidas organofosforados. Com a amplificação e o seqüenciamento de parte do gene em *C. hominivorax* foram verificadas as mesmas substituições de nucleotídeos encontradas no *Lca7* (em *L. cuprina*). Esta porção do gene contém o sítio de substituição Glv137/Asp, o que permitiu a

identificação de indivíduos mutantes para este gene e permitiu verificar, em uma abordagem preliminar, que alelos contendo esta mutação apresentam-se bem distribuídos em diferentes populações geográficas de *C. hominivorax*.

Uma vez confirmada se também há em *C. hominivorax* uma relação direta entre a mutação e a resistência a inseticidas, ficará evidente que a forma de controle utilizada atualmente não é eficiente, e fornecerá subsídios para utilização de formas mais adequadas de controle como SIT.

A importância da *C. hominivorax* como uma praga da pecuária e sua capacidade de dispersão e adaptação, justificam um contínuo investimento em seu monitoramento, tratamento e controle, sendo para tanto, de extrema importância a realização de estudos básicos em ecologia e genética. Além disso, seu “status” como espécie modelo de um programa de controle bem sucedido motiva estudos para se evidenciar padrões biológicos comparáveis a outras espécies-praga. Dentre estes estudos, está a análise da variabilidade genética e da estrutura de populações naturais através de marcadores moleculares como os microssatélites.

1.3 MARCADORES MICROSSATÉLITES

A variabilidade genética pode ser acessada através do uso de vários métodos como estudos de variação morfológica e comportamental e métodos envolvendo ácidos nucleicos e proteínas. Com o desenvolvimento de técnicas de eletroforese, e a análise de variação de proteínas, ocorreu um grande avanço no estudo da genética de populações.

Na última década, houve um rápido desenvolvimento de técnicas moleculares como a utilização de métodos de extração, digestão com endonucleases de restrição, amplificação e seqüenciamento de DNA, o que permitiu a utilização de marcadores genéticos com diferentes modos de herança para estudar a estrutura genética de populações de uma espécie.

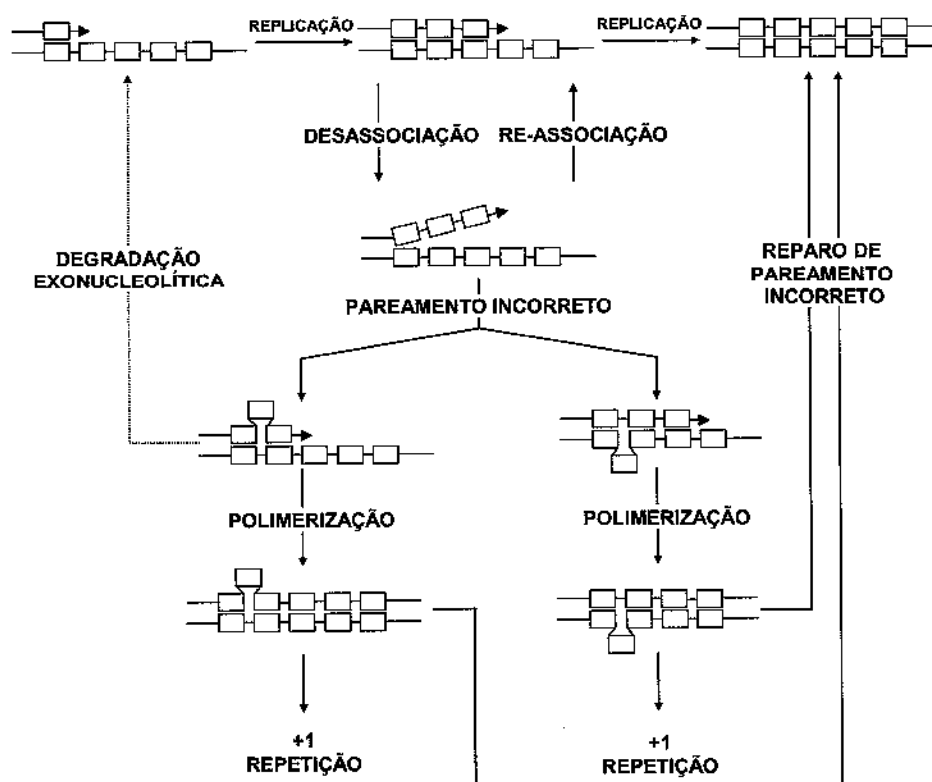
Dentre os marcadores mais utilizados podem ser destacados: (1) análise de isozimas; (2) RFLPs ("Restriction Fragment Length Polymorphisms") nucleares e mitocondriais, (3) RAPDs ("Random Amplified Polymorphic DNA"), (4) Polimorfismos de seqüência nucleotídica dentro de genes de cópia única através de seqüenciamento e (5) VNTRs ("Variable Number Tandem Repeats"), como minissatélites e microssatélites (revisão em Parker *et al.*, 1998 e em Sunnucks, 2000).

As VNTRs, especialmente os microssatélites, vêm sendo amplamente utilizados em genética de populações. Eles foram descobertos no genoma de eucariotos há aproximadamente 25 anos, sendo então considerados como seqüências sem nenhum interesse especial. No final da década de 80, com o advento da técnica de PCR, eles passaram a ser extremamente úteis em estudos de genética de populações (Jarne & Lagoda, 1996).

Os microssatélites, também chamados de "Simple Sequence Repeats" (SSRs) ou "Short Tandem Repeats" (STRs), são regiões de DNA possuindo normalmente de 20 a 100 pares de

QUADRO 4. PROCESSO DE MUTAÇÃO EM MICROSSATÉLITES

O processo mutacional subjacente à evolução em locos de microssatélites é controverso e pouco compreendido. No modelo mais aceito, a maioria das alterações em locos de microssatélites ocorre devido a erros de pareamento durante a replicação (Levinson & Gutman, 1987; Hancock, 1999 e Strauss, 1999). O processo se inicia quando, na replicação, a DNA polimerase se desliga do complexo de replicação, forçando a dissociação das duas fitas de DNA. Para reiniciar a replicação, as duas fitas devem ser re-associadas. Mutações são geradas quando a re-associação entre as fitas é incorreta, resultando em uma ou mais repetições não pareadas. Este erro leva a uma diminuição do comprimento dos microssatélites (quando as repetições não pareadas estão na fita molde) ou a um aumento (quando as repetições não pareadas estão na fita nascente). Este tipo de erro é muito mais comum em regiões de microssatélites, pois as alças geradas são muito mais estáveis nestes casos que em regiões não-repetitivas. Isto ocorre porque o pareamento não é significativamente alterado quando uma ou mais cópias de uma repetição estão em uma alça.



Esquematização do processo de mutação em regiões de microssatélites. Adaptado de Eisen (1999).

Mudanças drásticas no número de repetições, que ocorrem a uma taxa menor, parecem ser causadas por outro fenômeno, a recombinação (“crossing-over”) desigual entre cromossomos homólogos (Eisen, 1999; Hancock, 1999).

Uma terceira limitação é a necessidade de se desenvolver marcadores microssatélites *de novo* para cada nova espécie a ser estudada, o que pode ser uma tarefa cara e demorada, mas indispensável na maioria dos casos.

1.4 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Os microssatélites podem ser amplificados através de PCR, usando-se um par de “primers” construídos a partir de seqüências que flanqueiam as repetições, o que implica na necessidade de se conhecer estas seqüências para se desenhar os “primers”. Em organismos com seqüenciamento completo ou em andamento, os microssatélites, assim como as regiões que os flanqueiam, podem ser caracterizados pela análise das seqüências disponíveis. Mas, para caracterização dos microssatélites em organismos com poucas informações disponíveis, é necessário o isolamento *de novo* dos marcadores, uma tarefa trabalhosa que envolve a clonagem, detecção dos mesmos em uma biblioteca genômica e seqüenciamento (Jarne & Lagoda, 1996).

Este problema pode ser contornado utilizando-se primers desenvolvidos para uma espécie (espécie focal) para amplificar loco homólogo em outras espécies (espécies não focais). Mesmo fornecendo resultados satisfatórios para vários estudos, em sua grande maioria entre grupos de vertebrados (Primmer *et al.*, 1996; Rico *et al.*, 1996; FitzSimmons *et al.*, 1995; Pépin *et al.*, 1995; Engel *et al.*, 1996 e Roed, 1998; Pang *et al.*, 1999; Déka *et al.*, 1994), a utilização de “primers” heterólogos tem sua eficiência reduzida com aumento da distância filogenética. Assim, um dado loco pode não ser amplificado devido ao acúmulo de substituições nas regiões que flanqueiam as repetições e, mesmo sendo amplificada, o microsatélite pode apresentar um menor grau ou não apresentar polimorfismo na espécie não focal (Chambers & MacAvoy, 2000). Estas regiões que flanqueiam as repetições, em geral, têm uma taxa de evolução semelhante à de íntrons, indicando que elas podem ser consideradas seletivamente neutras (Brohede & Ellegren, 1999). Isto contraria a idéia de que a amplificação de locos entre taxa distantemente relacionados seja uma consequência de alguma forma de seleção atuando sobre as regiões flanqueadoras. Assim, o sucesso da amplificação com “primers” heterólogos depende da taxa de divergência nucleotídica, o que varia consideravelmente entre os grupos taxonômicos. Isto impede, na maioria dos casos, a utilização de “primers” universais para locos de microsatélites, ou seja, “primers” com uma ampla aplicação em um determinado grupo de espécies.

Do ponto de vista técnico, o isolamento e a caracterização de regiões microssatélites sempre foi vista como uma tarefa trabalhosa que envolvia a clonagem e detecção dos microssatélites em uma biblioteca genômica (Queller *et al.*, 1993; Jarne & Lagoda, 1996; Parker, *et al.*, 1998). No entanto, com o crescimento do interesse em microssatélites, várias metodologias mais eficientes para o isolamento e caracterização destes marcadores vêm sendo

No final da década de 80, marcadores moleculares começaram a ser utilizados para descrever a variabilidade genética e estrutura de populações naturais de *C. hominivorax* (Tabela 2).

QUADRO 6. POR QUÊ ESTUDAR GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE ESPÉCIES-PRAGA?

- *A existência ou não de populações reprodutivamente isoladas*: este é um dos principais questionamentos que têm sido feitos com relação à estrutura de populações de *C. hominivorax*. Barreiras reprodutivas geneticamente determinadas entre moscas estéreis liberadas e moscas nativas poderiam determinar o fracasso da técnica (Krafsur & Whitten, 1993);
- *Predição da taxa de dispersão de moscas entre as populações*: taxas de fluxo gênico entre as populações podem ser utilizadas para se estimar, indiretamente, as taxas de re-invasão de áreas das quais a espécie já foi erradicada, taxas de invasão de novas áreas, ou ainda prever dispersão de genes que conferem resistência a inseticidas (Krafsur, 2005);
- *Predição da rota de fluxo gênico*: prováveis fontes de re-introduções ou de introduções a novas áreas podem ser examinadas e, em muitos casos determinadas, permitindo a criação de embargos a importações de áreas de risco. (Bonizzoni et al., 2001; Meixner et al., 2002). O estudo da rota de fluxo gênico também é importante na determinação das unidades de manejo para controle e da localização das barreiras anti-recolonização.
- *Controle de qualidade em biofábricas*: o monitoramento da variabilidade nas linhagens mantidas em biofábricas para esterilização e liberação poderia levar a uma melhoria no desempenho das linhagens liberadas (Whitten, 1980; Norris et al., 2001).

Inicialmente, perfis de restrição do DNA mitocondrial (DNAm_t) foram utilizados para analisar populações geográficas de *C. hominivorax* dos Estados Unidos, México, Costa Rica, Guatemala e Jamaica (Roerhdanz & Jonhson, 1988; Roerhdanz, 1989). Foi encontrada uma alta variabilidade e uma estruturação populacional significativa e um reduzido fluxo gênico principalmente entre as amostras continentais e as amostras da ilha da Jamaica.

Krafsur e Whitten (1993) utilizando três locos polimórficos de isozimas, não encontraram diferenciação populacional em 11 amostras geográficas do México, concluindo que *C. hominivorax* constitui uma única população panmítica. Um alto nível de fluxo gênico também foi encontrado para *C. hominivorax* de diferentes localidades da Costa Rica indicando a ausência de estruturação genética (Taylor & Peterson, 1994). Resultados concordantes foram obtidos na comparação entre as amostras anteriormente analisadas do México, Costa Rica com amostras coletadas no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Taylor *et al*, 1996). Os resultados indicaram que

populacional seguindo o modelo de isolamento por distância e as populações periféricas tenderiam a apresentar uma reduzida variabilidade genética com relação à sua distribuição central. Esta comparação foi dificultada pela heterogeneidade nos estudos anteriores, devido a grande diversidade de marcadores e índices empregados para estimar a variabilidade genética.

O objetivo geral do projeto de tese foi determinar a variabilidade genética e quantificar o grau de estruturação genética entre populações geográficas de *C. hominivorax* da América do Sul utilizando marcadores microssatélites, testando a hipótese de distribuição centro-periferia da variabilidade genética. Neste cenário, haveria uma estruturação populacional seguindo o modelo de isolamento por distância e as populações periféricas tenderiam a apresentar uma reduzida variabilidade genética com relação à sua distribuição central. Para testar esta hipótese inicial, foi proposto o estudo populacional ao longo da distribuição geográfica de *C. hominivorax* na América do Sul empregando uma nova classe de marcador molecular, os microssatélites.

Objetivos específicos:

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

1. Construção de bibliotecas enriquecidas em motivos de microssatélites;
2. Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites;
3. Avaliação do potencial dos locos isolados em detectar variabilidade em populações naturais de *C. hominivorax*;
4. Avaliação preliminar do potencial dos “primers” descritos na amplificação de locos ortólogos em outras espécies da família Calliphoridae.

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES

5. Análise de populações geográficas de *C. hominivorax* do Uruguai;
6. Estudo da variabilidade genética e estruturação espacial e temporal de populações geográficas de *C. hominivorax* do Uruguai;
7. Análise de populações geográficas de *C. hominivorax* do Brasil e Venezuela.

*“Qualquer coisa mais complicada que
uma chave de fenda (uma máquina de PCR?)
possui alma e é inerentemente diabólica.”*

*Zimmerman, 20th century
(Galice Guillaume Hoarau)*

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

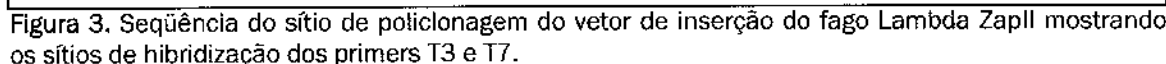
Tatiana Teixeira Torres, Rosana Pereira Vianello Brondani, José Eduardo Garcia
& Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

auxílio do transiluminador de luz ultravioleta, fragmentos de tamanho variando entre 200 e 800 pb foram cortados do gel utilizando um bisturi.

Ligação dos Adaptadores

Tabela 3. Sequências dos adaptadores “LongSau” e “ShortSau” e do “PrimerSau”. O sítio da enzima de restrição *EcoR* I está indicado em **negrito**.

Os adaptadores foram ligados aos fragmentos com a enzima T4-ligase (Amersham Pharmacia Biotech) de acordo com as especificações do fabricante. Foram utilizados 800 picomoles de adaptadores para ligação a 10 µg de DNA digerido. A reação de ligação ocorreu a 12°C por 16 horas.



As seqüências dos insertos de cada um dos clones selecionados foram determinadas através da análise em um seqüenciador automático ABI 377 utilizando o “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (ABI Prism™, Perkin Elmer) e os “primers” universais M13 (5' - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3') ou M13 reverso (5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'). As reações de seqüenciamento foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc.) em um volume final de 10 µL contendo 2 µL de Big Dye, 2 µL de Tampão de Seqüenciamento (200 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 9.0), 3,2 picomol de “primer” e de 200 a 600 ng DNA. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 minuto e 30 s (1 ciclo), seguida de 40 ciclos de 94°C por 12 segundos, 50°C por 6 segundos e 60°C por 4 segundos. As reações foram purificadas segundo recomendações do fabricante do “kit” de sequenciamento.

Os cromatogramas produzidos pelo seqüenciador foram analisados através do programa Chromas 2.21 (Technelysium Pty Ltd). A localização das repetições dentro das seqüências foi realizada manualmente.

Pares de “primers” complementares às seqüências flanqueando as repetições foram desenvolvidos utilizando o programa PRIMER 3 (Rozen & Skaletsky, 1998). Para o desenho dos

Durante as padronizações, mesmo após várias tentativas, as amplificações dos locos *CH06*, *CH07*, *CH16* e *CH18* não produziram nenhum produto. Os locos *CH03*, *CH04*, *CH08* e *CH13* apresentaram resultados ambíguos, sendo detectados produtos de amplificações inespecíficas ou não reprodutíveis, ou seja, o padrão de bandas apresentado não se repetia após alterações sutis nas condições de amplificação. Para não gerar resultados duvidosos na caracterização do polimorfismo, estes locos não foram utilizados nas etapas posteriores. A tabela 5 mostra as melhores temperaturas de hibridização de "primers" padronizadas para cada loco, assim como o tamanho esperado dos produtos de PCR, tendo como referência o tamanho do alelo clonado e seqüenciado.

2.1.2.3. CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS LOCOS DE MICROSSATÉLITES

Uma vez determinadas as melhores condições para a reação de amplificação de cada loco, amostras de DNA extraídas de 30 indivíduos de *C. hominivorax* foram utilizadas para acessar o conteúdo de informação de cada um dos 12 locos selecionados.

Tabela 5. Sequência dos "primers" desenvolvidos, temperatura de hibridização do "primers" (T_h) e tamanho esperado dos produtos de PCR (T_{am}), baseado no tamanho do alelo clonado e sequenciado

Loco	Motivo da repetição	"Primer" Direto (5' → 3')	"Primer" Reverso (5' → 3')	T _h (°C)	Tam. (pb)
CH01	(CA) ₈	GCATTATACAGACTCAAACAC	GTTTGTCTGGTTATAAGC TT	58°C	123
CH02	(CA) ₄₅	TCTTATAGCGCATAGACACG	CATGAAGGCTGCTTGTATG	58°C	130
CH05	(AC) ₂₅	CAATCAACACAAACTCACG	CACCGTTAGTATCGCATG	58°C	156
CH09	(CA) ₇ CG(CA) ₄	ACTATACCGGCCTCACAC	TTGTTGTTGTATGAGTGGTG	56°C	101
CH10	(CA) ₅ (CAAA) ₂ (CA) ₃ CAAA	TGTGGCAACATTTCTTTTG	TTGGCAAAAAATGTCTCTG	56°C	165
CH11	(CA) ₂₆	TTGCTGCAACATACTGGG	TAATTTGTTGGCGGCTTC	58°C	178
CH12	(AC) ₉ TCACCC(AC) ₅ TCACCC(AC) ₅	ATGTCCATCACTTCAAGCAC	TTTGCAGAGGAGTGAGCG	58°C	101
CH14	(CA) ₂ C(CA) ₁₈	TGCTGTTGGGTGTTGTAG	TTATGATGACCTTCTCTACG	58°C	186
CH15	(CA) ₂ AA(CA) ₇	ATCACAAAGAGTAAACATTC	TGTGTGTGTAAGACATGC	58°C	178
CH17	(CA) ₃ CT(CA) ₃ TA(CA) ₂	CGCTACATGGATGGTGAG	CTGGAGGTGGAAATTGTG	58°C	166
CH19	(CA) ₇ CG(CA) ₈	TACAGCAGCGGGTCACAG	AGTACCGTCGCGCTGTTT	60°C	151
CH20	(CA) ₉	ATCCATGTCTACTCAGC	TGCATTTCATTGCTTTC	58°C	114

A interpretação do gel, em alguns casos, foi dificultada devido à ocorrência de bandas fantasmas. O aparecimento de bandas fantasmas é um artefato que ocorre muito freqüentemente em amplificações de repetições de dinucleotídeos e ocorre devido a erros de

pareamento entre duas seqüências complementares na síntese de seqüências repetitivas durante a reação de amplificação via PCR (quadro 5).

A análise dos produtos de PCR foi realizada diretamente no gel seco. Os tamanhos dos alelos foram estimados através da comparação com o padrão de peso molecular. A condução de um controle positivo durante as reações de amplificação foi de extrema importância nesta etapa, pois ele serviu de referência para a determinação do tamanho do fragmento a ser amplificado (a soma do número de pares de base do microssatélite, dos dois "primers" e das seqüências entre eles). Comparando-se os alelos amplificados a partir dos diferentes indivíduos com o alelo clonado de seqüência conhecida, pôde-se estimar o número de repetições diferentes entre eles.

A foto de um gel está sendo mostrada na figura 4 para exemplificar o resultado obtido após a eletroforese dos produtos de PCR. Através da análise das amplificações dos doze locos em 30 indivíduos de *C. hominivorax*, foi verificado que os locos CH17 e CH19 apresentavam apenas um alelo em todos os indivíduos. Estes locos foram considerados monomórficos e não foram utilizados nas análises subseqüentes. Os genótipos dos indivíduos para cada loco foram determinados, agrupados em um arquivo e este dado bruto foi utilizado para as análises no programa GENEPOP.

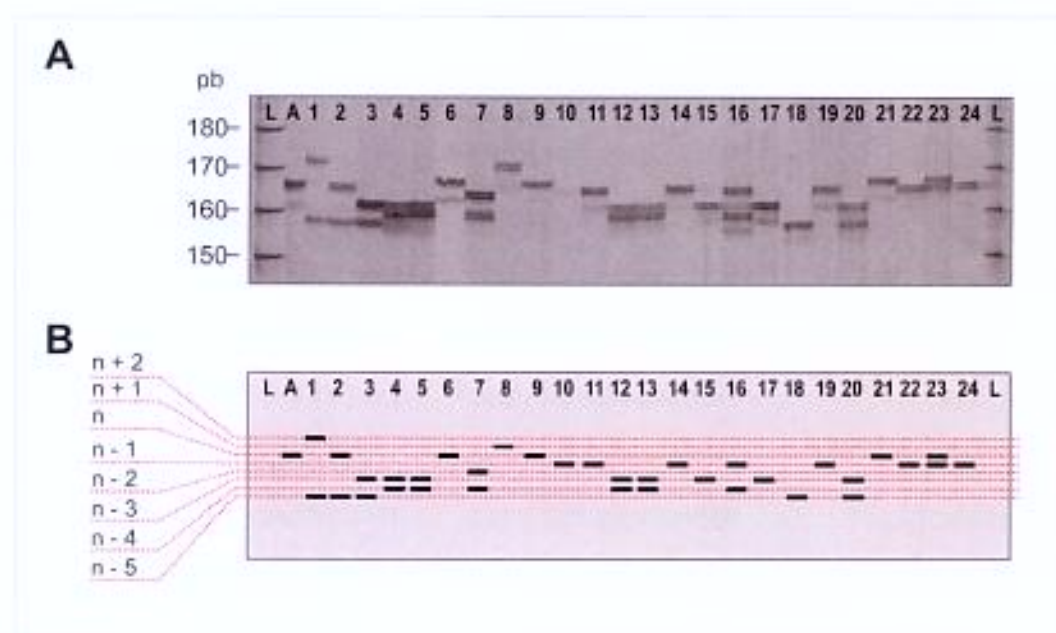


Figura 4. (A) Análise eletroforética em gel de poliacrilamida dos produtos de amplificação do loco CH10 em amostras de *C. hominivorax* exemplificando a amplificação com as condições otimizadas. Neste gel podem ser vistas algumas bandas de intensidade mais fraca, referentes às bandas fantasmas. L - Padrão de peso molecular, Ladder 10bp (Invitrogen). A - Amplificação realizada com DNA plasmidial do clone contendo a região de microssatélite seqüenciada, possuindo 165 pb (controle positivo). Colunas 1 a 24 - produtos de PCR resultantes da amplificação do DNA extraído de indivíduos de *C. hominivorax*. (B) Representação esquemática da imagem do gel mostrada em A, mostrando como foi realizada a leitura dos genótipos; n representa o número de repetições do microssatélite de seqüência e tamanho conhecidos, presente no controle positivo. A partir dele, e com o auxílio do marcador de peso molecular foram estimados o tamanho e o número de repetições de cada alelo, aqui representados por ($n + 2$, $n + 1$, n , $n - 1$ e assim por diante).

Isolation and characterization of microsatellite markers in the new world screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae)

*Laboratório de Genética Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG)—Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), PO Box 6010, 13083-970, Campinas, SP, Brazil, †Laboratório de Biotecnologia, Embrapa-CNPAP, Goiânia, GO, Brazil, ‡Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil

Table 2 Cross-species amplification tests using primers designed for *Cochliomyia hominivorax*

Species	Locus									
	CH01	CH02	CH05	CH09	CH10	CH11	CH12	CH14	CH15	CH20
<i>Cochliomyia macellaria</i>	+ (54 °C)	–	+ (58 °C)	+ (58 °C)	–	–	+ (58 °C)	± (50 °C)	+ (58 °C)	–
<i>Chrysomya bezziana</i>	+ (54 °C)	–	± (54 °C)	–	–	–	+ (58 °C)	± (50 °C)	+ (58 °C)	–
<i>Chrysomya putoria</i>	+ (54 °C)	–	± (54 °C)	–	–	–	+ (58 °C)	± (50 °C)	+ (58 °C)	–
<i>Lucilia cuprina</i>	+ (54 °C)	–	± (54 °C)	–	–	–	+ (58 °C)	± (50 °C)	+ (58 °C)	–

DNA samples from two individuals of each species were tested with the same polymerase chain reaction conditions used for amplification of the *C. hominivorax* samples. Three annealing temperatures were tested (50, 54 and 58 °C); the best temperature is indicated for each species/locus.

+, Successful amplification within expected size range; $\pm$, weak amplification product; -, no amplification or amplification of multiple bands.

their applicability in four other Calliphoridae species (Table 2). This test indicated that six of the loci may also be useful for genetic studies in the secondary screw-worm, *C. macellaria*, and in other Calliphoridae species after specific optimization of the PCR parameters.

The microsatellite loci characterized here will enable investigation into the genetic variability and population structure of NWS from Central and South American populations and should allow monitoring of the expansion of this pest into screw-worm-free areas. Such information will lay the groundwork for future eradication strategies.

Acknowledgements

The authors thank Rosângela Rodrigues for valuable technical assistance and Maria Saete Coulo for maintaining the screw-worm colonies. This work was supported by grants to A.M.L.A.-E. from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant 03/01458-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant 471132/01-2) and the International

Atomic Energy Agency (grant 11822/RO). T.T.T. was supported by a fellowship from FAPESP (grant 02/00035-4).

References

- Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, Grattapaglia D (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 816–827.
- International Atomic Energy Agency (2000) *Genetic Sexing and Population Genetics of Screwworms* August 7–11, 2000. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- La Chance LE, Bartlett AC, Bram RA *et al.* (1982) Mating types in screwworm populations? *Science*, 218, 1142–1143.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248–249.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) PRIMER 3. Code available at: http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.
- Wyss JH, Galvin TJ (1996) Central America regional screwworm eradication program (benefit/cost study). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 791, 241–247.

Figure 1. The effect of the concentration of the solution on the adsorption of the dye. The concentration of the solution was 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100.0, 150.0, 200.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 700.0, 800.0, 900.0, 1000.0, 1500.0, 2000.0, 3000.0, 4000.0, 5000.0, 6000.0, 7000.0, 8000.0, 9000.0, 10000.0, 15000.0, 20000.0, 30000.0, 40000.0, 50000.0, 60000.0, 70000.0, 80000.0, 90000.0, 100000.0, 150000.0, 200000.0, 300000.0, 400000.0, 500000.0, 600000.0, 700000.0, 800000.0, 900000.0, 1000000.0, 1500000.0, 2000000.0, 3000000.0, 4000000.0, 5000000.0, 6000000.0, 7000000.0, 8000000.0, 9000000.0, 10000000.0, 15000000.0, 20000000.0, 30000000.0, 40000000.0, 50000000.0, 60000000.0, 70000000.0, 80000000.0, 90000000.0, 100000000.0, 150000000.0, 200000000.0, 300000000.0, 400000000.0, 500000000.0, 600000000.0, 700000000.0, 800000000.0, 900000000.0, 1000000000.0, 1500000000.0, 2000000000.0, 3000000000.0, 4000000000.0, 5000000000.0, 6000000000.0, 7000000000.0, 8000000000.0, 9000000000.0, 10000000000.0, 15000000000.0, 20000000000.0, 30000000000.0, 40000000000.0, 50000000000.0, 60000000000.0, 70000000000.0, 80000000000.0, 90000000000.0, 100000000000.0, 150000000000.0, 200000000000.0, 300000000000.0, 400000000000.0, 500000000000.0, 600000000000.0, 700000000000.0, 800000000000.0, 900000000000.0, 1000000000000.0, 1500000000000.0, 2000000000000.0, 3000000000000.0, 4000000000000.0, 5000000000000.0, 6000000000000.0, 7000000000000.0, 8000000000000.0, 9000000000000.0, 10000000000000.0, 15000000000000.0, 20000000000000.0, 30000000000000.0, 40000000000000.0, 50000000000000.0, 60000000000000.0, 70000000000000.0, 80000000000000.0, 90000000000000.0, 100000000000000.0, 150000000000000.0, 200000000000000.0, 300000000000000.0, 400000000000000.0, 500000000000000.0, 600000000000000.0, 700000000000000.0, 800000000000000.0, 900000000000000.0, 1000000000000000.0, 1500000000000000.0, 2000000000000000.0, 3000000000000000.0, 4000000000000000.0, 5000000000000000.0, 6000000000000000.0, 7000000000000000.0, 8000000000000000.0, 9000000000000000.0, 10000000000000000.0, 15000000000000000.0, 20000000000000000.0, 30000000000000000.0, 40000000000000000.0, 50000000000000000.0, 60000000000000000.0, 70000000000000000.0, 80000000000000000.0, 90000000000000000.0, 100000000000000000.0, 150000000000000000.0, 200000000000000000.0, 300000000000000000.0, 400000000000000000.0, 500000000000000000.0, 600000000000000000.0, 700000000000000000.0, 800000000000000000.0, 900000000000000000.0, 1000000000000000000.0, 1500000000000000000.0, 2000000000000000000.0, 3000000000000000000.0, 4000000000000000000.0, 5000000000000000000.0, 6000000000000000000.0, 7000000000000000000.0, 8000000000000000000.0, 9000000000000000000.0, 10000000000000000000.0, 15000000000000000000.0, 20000000000000000000.0, 30000000000000000000.0, 40000000000000000000.0, 50000000000000000000.0, 60000000000000000000.0, 70000000000000000000.0, 80000000000000000000.0, 90000000000000000000.0, 100000000000000000000.0, 150000000000000000000.0, 200000000000000000000.0, 300000000000000000000.0, 400000000000000000000.0, 500000000000000000000.0, 600000000000000000000.0, 700000000000000000000.0, 800000000000000000000.0, 900000000000000000000.0, 1000000000000000000000.0, 1500000000000000000000.0, 2000000000000000000000.0, 3000000000000000000000.0, 4000000000000000000000.0, 5000000000000000000000.0, 6000000000000000000000.0, 7000000000000000000000.0, 8000000000000000000000.0, 9000000000000000000000.0, 10000000000000000000000.0, 15000000000000000000000.0, 20000000000000000000000.0, 30000000000000000000000.0, 40000000000000000000000.0, 50000000000000000000000.0, 60000000000000000000000.0, 70000000000000000000000.0, 80000000000000000000000.0, 90000000000000000000000.0, 100000000000000000000000.0, 150000000000000000000000.0, 200000000000000000000000.0, 300000000000000000000000.0, 400000000000000000000000.0, 500000000000000000000000.0, 600000000000000000000000.0, 700000000000000000000000.0, 800000000000000000000000.0, 900000000000000000000000.0, 10000000

4

[illegible]

0.3

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 277: 1039-1043.

Pré-amplificação dos fragmentos via PCR

Para gerar uma maior quantidade de DNA para a seleção, os fragmentos digeridos foram submetidos a uma PCR utilizando como “primer” um dos adaptadores, o Rsa21. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µl utilizando um termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc.). Foram utilizadas as seguintes concentrações finais dos reagentes: 3 U da enzima Taq DNA polimerase, 400 nM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 2 µM do adaptador Rsa21 e 3 µl da reação de ligação. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 4 min, seguida de 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1min. Um passo prolongado de extensão de 72 °C por 8 min foi adicionado após o último ciclo. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o “QIAquick PCR Purification Kit” (Qiagen).

Seleção dos fragmentos ricos em repetições AG

O processo de enriquecimento foi realizado através da hibridização de oligonucleotídeos marcados com biotina complementares a sequência repetitiva AG. Os fragmentos contendo tais repetições foram recuperados através de esferas magnetizadas recobertas com streptavidina (Promega). Para a realização das lavagens, as esferas magnetizadas foram atraídas por um ímã posicionado lateralmente ao tubo em um suporte (Promega).

A fração enriquecida contendo os fragmentos de DNA previamente ligados aos adaptadores foram incubados a 95°C por 15 minutos para a desnaturação da dupla-fita. Ao DNA desnaturado foram adicionados 150 picomoles do oligonucleotídeo biotina-Is(CT)₈. Esta solução de hibridização foi incubada a temperatura ambiente sob constante agitação e após 20 min foi adicionada às esferas magnetizadas previamente lavadas seguindo as recomendações do fabricante. A solução contendo as esferas magnetizadas e o complexo DNA-sonda foi incubada por 10 min à temperatura ambiente sob suave agitação.

Após a incubação, foram realizadas lavagens de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante das esferas magnetizadas (Promega) e os fragmentos selecionados foram recuperados através da lavagem com 250 µl de água milliQ autoclavada.

Amplificação dos fragmentos selecionados via PCR

Os fragmentos enriquecidos foram submetidos a uma PCR utilizando como “primer” o adaptador Rsa21. Esta reação foi realizada conforme descrito anteriormente para a pré-amplificação, sendo que nesta segunda amplificação, os fragmentos selecionados (20 µl da solução recuperada na etapa anterior) foram utilizados como molde para a reação. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o “QIAquick PCR Purification Kit” (Qiagen)

identificadas (20 identificados anteriormente e 10 nesta abordagem) mostrou que os locos descritos não eram complementares e/ou sobrepostos.

Após o alinhamento das seqüências, foram desenhados “primers” às regiões flangeadoras dos novos microssatélites. As seqüências dos “primers” e informações relacionadas estão indicadas na tabela 8.

Tabela 8. Caracterização genética dos novos locos de microsatélite isolados de *C. hominivorax*, incluindo a sequência dos “primers” desenvolvidos, temperatura de hibridização do “primers” (T_h) e tamanho esperado dos produtos de PCR (T_{me}). O motivo da repetição e o tamanho esperado estão baseados na sequência do alelo clonado.

Loco	Motivo da repetição	"Primer" Direto (5' → 3')	"Primer" Reverso (5' → 3')	T _h (°C)	T _{am} (pb)
CH21	(AG) ₉ GG(AG) ₃	GGCGAGCGAGTCCTATTAC	CAGITCCAGGTCAATTTCC	58°C	205
CH22	(AG) ₁₅	TTGCGTATTTGTGTAATTTG	GCCGCACTAGTGATTCTC	58°C	143
CH23	(ATGTGT) ₆	GTTAAGAATATCCTGCTAATG	TTTATATGTCCATTGTGC	58°C	149
CH24	(GA) ₇ GG(GA) ₂	CCCACCAAAAACAATGTC	GTTTCCCACCAGTTCAGG	58°C	138
CH25	(TA) ₂ (AC) ₇ (TA) ₅	CACCTACCTTAAGTGACACG	TTTTTCCTCTTCTGACCTC	58°C	167
CH26	(CATA) ₁₈	TATTTTCCCTTCATTCTTG	GGTGTTTTAATACCCGTAAAC	58°C	177
CH27	(CAA) ₆	TATTTCTTAATGGCTGTC	TCCTCATTTCAATTTCTCAC	58°C	179
CH28	(CAA) ₄ (ATAA) ₃ A(ATAA) ₃	CAATCACCAACCAAAATG	TGTATAAAGATGCGATTGAC	58°C	113
CH29	(CT) ₃ (AC) ₁₀	CATCTACGGTGGTGTAGG	ACATGATATTTTCGCTCTC	58°C	194
CH30	(TA) ₄ AA(TATA) ₂ TG(TA) ₃	TAAAGCATTTCTCCCTTC	ACAGATCCAATGATTTACC	58°C	244

Os locos *CH22*, *CH27* e *CH30* não foram amplificados com sucesso em amostras de *C. hominivorax*. Nas reações utilizando os “primers” desenvolvidos para os locos *CH22* e *CH30*, mesmo utilizando condições pouco estridentes, não houve a amplificação de nenhum produto. Nas reações para o loco *CH27* foram obtidos produtos de intensidade muito fraca e apenas para poucos indivíduos. Para não gerar resultados duvidosos na caracterização do polimorfismo, estes locos não foram utilizados nas análises posteriores. Para os outros sete locos, a amplificação dos alelos foi realizada com sucesso sendo 58 °C a melhor temperatura de hibridização observada. O fato de todos os locos apresentarem a mesma temperatura ótima para a hibridização dos “primers” representa uma grande vantagem para a construção de reações *multiplex*, ou seja, reações de amplificação nas quais mais de um par de “primers” é utilizado na mesma reação. Desta forma, mais de um loco pode ser amplificado ao mesmo tempo, reduzindo os custos e o tempo da análise em laboratórios que possuam uma infra-estrutura adequada para a automatização da análise utilizando marcadores microssatélites.

Tabela 10. Testes de amplificação em outras espécies da família Calliphoridae utilizando os novos “primers” desenvolvidos para *C. hominivorax*.

Espécie	Loco						
	CH21	CH23	CH24	CH25	CH26	CH28	CH29
<i>Cochliomyia macellaria</i>	+	±	+	+	±	+	+
<i>Chrysomya albiceps</i>	+	±	±	±	-	±	+
<i>Chrysomya bezziana</i>	+	±	±	±	-	-	+
<i>Chrysomya putoria</i>	+	±	±	±	-	±	+

+, Amplificação de produtos de PCR dentro do intervalo esperado (baseado nos alelos de *C. hominivorax*);

±, Fraca amplificação de produtos de PCR dentro do intervalo esperado;

-, Ausência de produtos dentro do intervalo esperado.

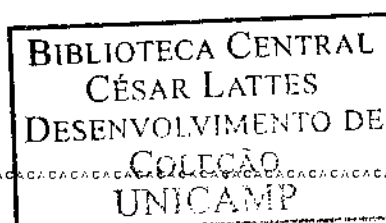
2.2.3 ARTIGO

Artigo publicado no periódico “*Molecular Ecology Notes*”

Development of new polymorphic microsatellite markers for the
New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae)

Torres, T.T. & Azeredo-Espin, A.M.L.

Molecular Ecology Notes, 5 (4): 815-817 (2005)



PRIMER NOTE

Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae)

TATIANA TEIXEIRA TORRES and ANA MARIA LIMA DE AZEREDO-ESPIN

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6010, 13083-875, Campinas, SP, Brazil

Abstract

In this report, we describe the development of seven new polymorphic microsatellite markers for *Cochliomyia hominivorax*, a parasitic insect pest of primary agricultural and veterinary importance throughout the Neotropics. The number of alleles found ranged from 3 to 13 per locus, with the expected heterozygosity ranging from 0.4220 to 0.9045. The across-taxa amplification of some of these new microsatellite loci was successful in four additional Calliphoridae species. In combination with the 10 polymorphic microsatellite markers previously described, the markers developed here should provide a high resolution for assessing the fine-scale genetic structure of New World screw-worms.

Keywords: Calliphoridae, microsatellites, primary screw-worm

Received 03 March 2005; revision received 22 April 2005; accepted 13 May 2005

The New World screw-worm (NWS), *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), is a parasitic insect pest of primary importance in Neotropical regions. NWS myiasis is caused by the larval stage of the fly infesting tissues of warm-blooded vertebrates. This species represents a serious threat to the livestock sector across its current distribution, which includes part of the Caribbean and all South America (except for Chile) (Wyss & Galvin 1996). Originally, *C. hominivorax* was widely distributed from the southern US to central Argentina. However, the species has been successfully eradicated from North and most of Central America by the sterile insect technique (IAEA 2000). The study of the extent and distribution of the natural genetic variability of *C. hominivorax* is of great interest for the description of populations, and should contribute to future strategies of eradication.

Ten dinucleotide microsatellites for the NWS have already been developed (Torres *et al.* 2004), but more are needed to increase the number of markers available for building polymerase chain reaction (PCR) multiplexed systems and to reduce the laboratory costs in automated

genetic analysis. In addition, the utilization of more reliable markers will improve our knowledge of the population structure and gene flow of this species. In this report, we describe the isolation of seven new microsatellites of *C. hominivorax* that may be useful as genetic markers for further population genetic studies.

Microsatellites were isolated using a different protocol from that described in Torres *et al.* (2004) and the repeat probe (AG)_n was used instead of (GT)_n in the enrichment step. Genomic DNA was extracted from colony-bred pupae using a PUREGENE DNA isolation kit (Gentra Systems), according to the manufacturer's instructions, and then digested with *Rsa*I. Blunt-ended DNA fragments were ligated to oligonucleotide adapters according to Edwards *et al.* (1996). Fragments containing AG repeats were selected by hybridization to biotinylated oligonucleotides complementary to the repetitive sequence and recovered by magnetic beads linked to streptavidine using a hybridization-based capture procedure adapted from Bilotte *et al.* (1999). Microsatellite-rich fragments were amplified by PCR and cloned into pCR2.1-TOPO plasmids using a TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Plasmids from individual colonies were prepared and the sequence of the inserts was determined using an ABI PRISM Terminator Cycle sequencing kit and an ABI 377 Automated Sequencer (Applied Biosystems, CA).

Correspondence: T. T. Torres, Laboratório de Genética Animal, CBMEG – UNICAMP, P.O. Box 6010, 13083–875, Campinas, SP, Brazil. Fax: +55-19-3788-1089; E-mail: ttorres@unicamp.br

© 2005 Blackwell Publishing Ltd

*denotes a significant ($\alpha = 0.05$) deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, after sequential Bonferroni correction (Rice 1989).

The polymorphism found in the seven loci characterized in this study ensures that, combined with the 10 loci previously described, they will be extremely useful for investigating many important aspects of the biology of *C. hominivorax*, such as temporal and spatial population dynamics, that are critical to efforts for controlling and monitoring this pest. Additionally, the cross-species amplifications also suggest that these loci may be useful in other

CRIAÇÃO DE UM BANCO DE DADOS RELACIONAL E UM CONJUNTO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA A CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS CONTENDO MICROSSATÉLITES - *FR*

Pedro Cipriano Feijão, Tatiana Teixeira Torres & Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

A caracterização de microssatélites, quer seja a partir de seqüências já disponíveis, quer seja a partir de bibliotecas desenvolvidas especialmente para esta finalidade, envolve a identificação das seqüências contendo os microssatélites e de seqüências adicionadas, como os adaptadores, a verificação da redundância das seqüências, a contagem do número de repetições e o desenvolvimento de primers específicos. A manipulação deste grande volume de dados de seqüência e a dificuldade de análise destes dados através de ferramentas gratuitas disponíveis motivaram o desenvolvimento de um "portal" que contém um conjunto de ferramentas de bioinformática que visam facilitar o desenvolvimento e caracterização de microssatélites.

FiRe (Find Repeats!), é o acrônimo utilizado para designar o este “Portal” de análise de microssatélites que, mesmo em fase de implementação, está atualmente aberto e acessível via WEB (<http://amiga.cbmeg.unicamp.br/fire/>, Figura 5). Além disso, possui uma interface gráfica intuitiva. O portal é composto de dois módulos principais: (a) um sistema de processamento de microssatélites, composto principalmente de um “pipeline” que facilita os procedimentos envolvidos na obtenção e análise de microssatélites; (b) um banco de dados, contendo todas as seqüências obtidas e aberto à submissão de seqüências, que podem ser de livre acesso ou protegidas por senha. O banco de dados também é capaz de armazenar todas as seqüências depositadas no NCBI que contêm anotações contendo a descrição de microssatélites, através de uma atualização automática que ocorre diariamente.



Figura 5. Página inicial do portal FiRe

Após a submissão, os programas agrupados no "pipeline" são executados no servidor e os resultados são mostrados através de uma interface gráfica. Cada sequência de entrada é mostrada, indicando-se quais regiões contêm microssatélites, quais são as sequências redundantes e os "contigs", quais são as regiões que foram mascaradas e quais regiões receberam baixos índices de qualidade de acordo com o *Phred*, através de uma interface gráfica (Figura 7). Existe também a possibilidade de verificar o alinhamento dos cromatogramas (Figura 8).

De acordo com os dados obtidos, o sistema sugere as regiões de provável interesse para a construção de "primers" (Figura 7). O usuário poderá aceitar essas regiões, ou modificá-las. Além disso, diversos parâmetros relativos ao "primer" poderão ser modificados pelo usuário, como os limites de tamanho e qualidades físico-químicas do "primer".

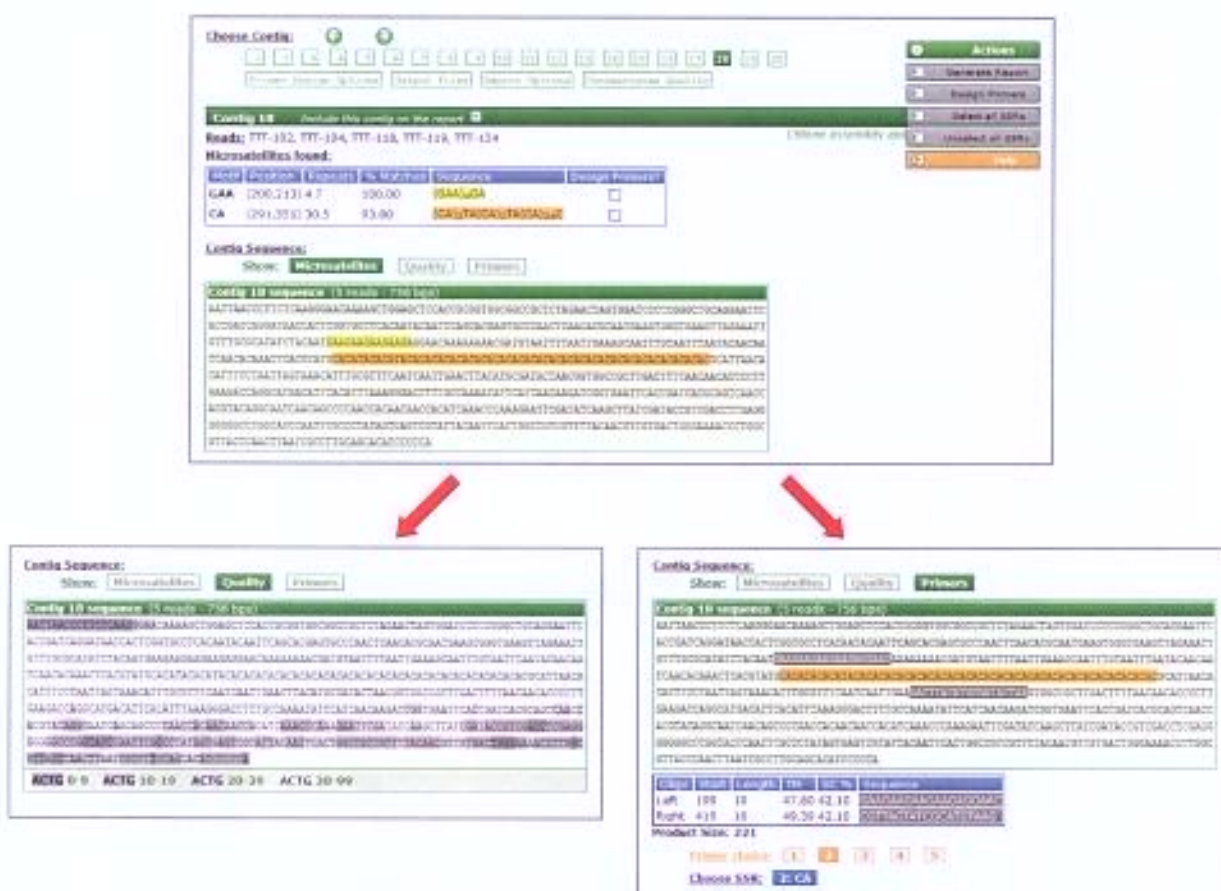


Figura 7. Página de resultados do FiRe mostrando a localização dos microsatélites na sequência, a qualidade das bases e o relatório de construção de "primers". No topo da página, pode-se escolher o "contig" a ser analisado. O exemplo de sequência mostrado é um "contig" formado pelo alinhamento de quatro "reads", ou seja, sequências obtidas através de uma reação de sequenciamento. A sequência mostrada é a do loco CH05, caracterizado no primeiro capítulo.

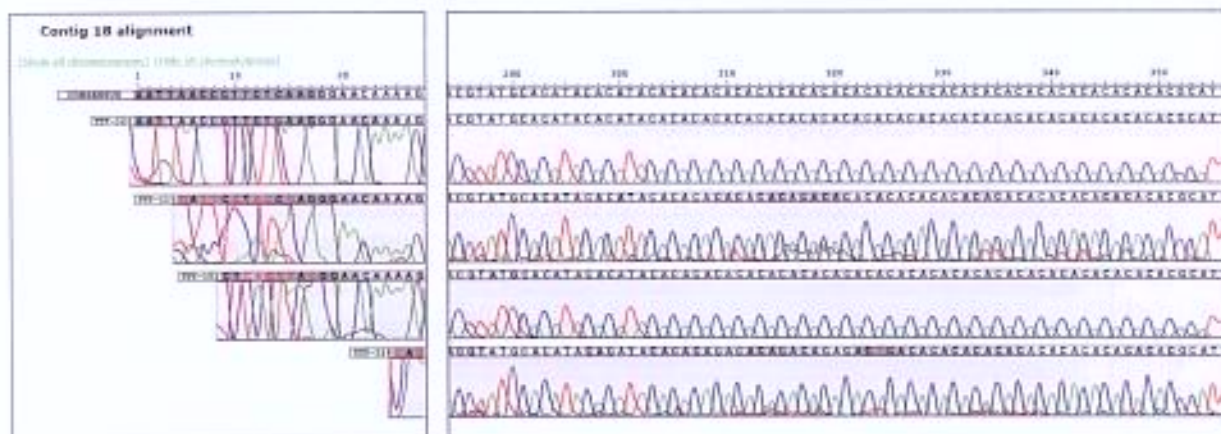


Figura 8. Alinhamento produzido pelo *FiRe* utilizando a ferramenta *Phrap*. A primeira sequência é a do “contig” que foi gerada através do alinhamento dos “reads”. Quando divergências entre bases são encontradas, as bases escolhidas são aquelas com a maior qualidade.

2.3.2.2 BANCO DE DADOS RELACIONAL

O banco de dados do *FiRe* contém sequências de microssatélites automaticamente recuperadas do GenBank. Um “script” em Perl se conecta ao banco de dados do NCBI e busca por sequências relevantes, identificando e selecionando as informações relevantes e armazenando-as de acordo com a organização do banco de dados do *FiRe*. Esta é uma tarefa difícil, dada a grande quantidade de erros de anotação. Além disso, em 78 % dos casos, informações essenciais sobre o motivo da repetição e a localização do microssatélite na sequência estão armazenados incorretamente ou ausentes. Para solucionar este problema, desenvolvemos uma estratégia que encontra os microssatélites, usando o programa TRF nas sequências e armazena a informação juntamente com a anotação original. Devido a estrutura relacional do banco, o *FiRe* garante uma grande flexibilidade nas opções de busca, que podem ser feitas pelo tipo do motivo, número mínimo ou máximo de repetições do microssatélites, informação do taxon ou autores.

Os resultados são então apresentados em uma interface inspirada nas janelas utilizadas pelos principais sistemas operacionais, como mostrado na figura 9, o que torna o seu uso bastante intuitivo. As janelas podem ser maximizadas ou minimizadas e dentro de cada uma delas há janelas aninhadas com informações adicionais.

2.3.3 CONCLUSÕES

2.3.3.1 CONJUNTO DE FERRAMENTAS

Para testar a eficiência do *FiRe*, os dados de sequência de *C. hominivorax* (capítulos 1 e 2) foram utilizados. O *FiRe* foi capaz de encontrar as repetições, excluir a sequência dos vetores e adaptadores e realizar os alinhamentos gerando os mesmos resultados da análise feita manualmente, economizando, no entanto, o esforço de edição de sequências. Resumidamente, a análise que normalmente era realizada em 2 ou 3 dias, foi realizada em menos de 1 minuto. Os “primers” recuperados não foram os mesmos em todos os casos, porque esta função não está

Da forma como é realizada atualmente, a caracterização das seqüências de microssatélites demanda um tempo excessivo. Muito tempo é despendido no processo de transferência de dados de uma ferramenta para outra, além do fato de que em alguns passos é necessário trabalhar individualmente com as seqüências obtidas. A utilização de ferramentas computacionais como o *FiRe* é, então, essencial no isolamento e caracterização de marcadores microssatélites, facilitando a análise da grande quantidade de dados gerados e automatizando procedimentos até então realizados manualmente.

As ferramentas desenvolvidas tratam-se de um sistema integrado escalável, composto principalmente de um “pipeline” onde o usuário poderá executar todos estes passos rapidamente. Todos os parâmetros relativos ao processo serão automaticamente calculados pelo sistema, havendo também a possibilidade de o usuário alterar quaisquer parâmetros dentro de suas necessidades específicas.

O sistema proposto agilizará o processo de análise de seqüências resultantes de uma biblioteca de microssatélites, com a vantagem de ser altamente escalável, aceitando um grande número de seqüências simultaneamente.

As ferramentas foram criadas para atender as necessidades específicas de iniciativas do Laboratório de Genética Animal, CBMEG, Unicamp, mas, com a crescente utilização dos marcadores microssatélites em diversas aplicações, elas serão também extremamente úteis para outros grupos de pesquisa. Sendo assim, elas foram disponibilizadas através de uma interface WEB, na qual o usuário pode submeter suas seqüências, como cromatogramas ou arquivos FASTA, escolhendo diversos parâmetros ao longo do processo e realizando várias tarefas automaticamente.

2.3.3.2 BANCO DE DADOS RELACIONAL

A criação e manutenção de um banco de dados se mostraram necessárias devido à deficiência dos bancos existentes que são, em sua grande maioria, iniciativas isoladas. Temos, por exemplo, bancos de dados para *Drosophila*, baculovirus, *C. elegans*, algodão, entre outros. O banco de dados proposto abrangeria inicialmente, o filo *Arthropoda*, podendo ser ampliado para outros taxa em um futuro próximo.

Além disso, vários destes bancos possuem informações incompletas ou desatualizadas e não permitem buscas avançadas, o que torna a pesquisa mais trabalhosa e lenta. O banco de dados proposto terá diversas opções de busca avançada, por loco, tipo de motivo, quantidade de repetições, *taxon*, autores, periódico publicado, entre outros, além da combinação de quaisquer destes parâmetros, com a apresentação em uma interface clara e intuitiva e que permite a análise de dados de diversas formas, com tabelas, gráficos e outros recursos, o que não é possível em boa parte dos bancos disponíveis atualmente.

*"Nada em biologia faz sentido
exceto à luz da evolução."*

Theodosius Dobzhansky

ANÁLISE DE POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS DE *C. hominivorax*

VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA ESPACIAL E TEMPORAL DE POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS DE *Cochliomyia hominivorax* DO URUGUAI

Tatiana Teixeira Torres & Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Doze dos 17 locos de microssatélites desenvolvidos foram utilizados para o estudo populacional em *C. hominivorax*. Amostras do Uruguai foram escolhidas para dar início a este estudo devido à ampla amostragem obtida através do Projeto de Pesquisa Coordenado "Genetic Sexing And Population Genetics Of Screwworms" (IAEA/FAO). Este projeto tem como um dos objetivos analisar a variabilidade genética e estruturação de populações da mosca da bicheira em toda a América do Sul, visando a elaboração de estratégias eficientes de controle. O Uruguai representa o extremo sul da distribuição desta espécie, sendo assim, uma região candidata aos primeiros testes visando o controle efetivo desta praga.

As análises que serão apresentadas a seguir, foram inicialmente realizadas nas amostras de *C. hominivorax* obtidas em sete localidades distintas no Uruguai no mês de Janeiro de 2003. Este período representa a estação favorável a esta espécie, ou seja, apresenta uma alta temperatura e um nível de precipitação pluvial elevado. Nesta análise foi observado um padrão de estrutura populacional que não era esperado no início do estudo. Este resultado motivou uma comparação temporal da variabilidade genética e estrutura populacional, o que foi realizado através da análise de amostras obtidas na estação favorável subsequente, em 2004.

3.4.1 METODOLOGIA DETALHADA

3.4.1.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE *C. hominivorax* NO URUGUAI

Larvas de *C. hominivorax* foram obtidas diretamente em feridas de animais infestados em fazendas de criação de ovelhas e gado em seis localidades no Uruguai, representativas de diferentes regiões geográficas: Dayman, Salto, Colonia del Sacramento, Bañados de Medina, Cerro Colorado e Paso Muñoz e Joaquín Suárez e em animais de menor porte (cães e gatos) na área urbana de Suarez (Figura 10 e Tabela 11). As amostras foram obtidas em janeiro de 2003 por integrantes do laboratório de Genética Animal, Unicamp e colaboradores do Projeto de Pesquisa Coordenado (CRP) organizado pela FAO e IAEA.

As larvas de terceiro instar foram colocadas diretamente na serragem até a fase de pupa. As larvas de primeiro e segundo instar, no entanto, foram mantidas em carne moída até atingirem a fase de pupa em criação no laboratório de Genética Animal, Unicamp.

Amostras de *C. hominivorax* também foram coletadas em 2004 em cinco das sete localidades citadas anteriormente, San Antonio, Colonia del Sacramento, Bañados de Medina, Cerro Colorado e em Joaquín Suárez (Figura 10 e Tabela 11) por participantes e colaboradores do

CRP/IAEA. Larvas de primeiro e segundo ínstar foram fixadas em etanol absoluto e então enviadas. Larvas de terceiro ínstar foram enviadas em frascos com serragem e mantidas em criação no laboratório de Genética Animal, Unicamp.



Figura 10. Locais e ano de coleta das amostras de *C. hominivorax* do Uruguai.

Extração de DNA de indivíduos de *C. hominivorax*

A extração do DNA total de indivíduos de *C. hominivorax* foi realizada como descrito por Infante-Vargas e Azeredo-Espin (1995). O precipitado final de DNA foi ressuspensionado em T.E. com volumes entre 50 e 200 µl, dependendo do estado de conservação da amostra.

3.4.1.2 ANÁLISE DOS DADOS DE MICROSSATÉLITES

Detecção do polimorfismo dos locos de microsatélites

Doze locos foram selecionados para caracterizar a variabilidade genética de populações desta espécie provenientes do Uruguai (CH01, CH05, CH09, CH10, CH11, CH12, CH14, CH15, CH20, CH21, CH24 e CH26). As amplificações via PCR dos locos de microsatélites foram realizadas em

reações como descritas por Torres *et al.* (2004). Uma amostra do DNA plasmidial do clone contendo o alelo originalmente clonado e sequenciado foi utilizada nas amplificações como um controle positivo, bem como amostras previamente caracterizadas de cada alelo identificado em cada loco.

Tabela 11. Localidades e o número de indivíduos amostrados em cada uma das localidades do Uruguai com suas respectivas informações geográficas.

Localidade (Município, Departamento)	No. de indivíduos (mês de coleta)		Latitude	Longitude
	2003	2004		
Dayman, Paysandú	19 (01)	-	31° 33' 00 S	57° 57' 00 W
San Antonio, Salto	21 (01)	20 (02)	31° 24' 00 S	57° 58' 00 W
Colonia del Sacramento, Colonia	15 (01)	16 (01, 02)	34° 20' 00 S	57° 86' 00 W
Bañados de Medina, Cerro Largo	24 (01)	16 (05)	32° 23' 00 S	54° 21' 00 W
Joaquín Suárez, Canelones	15 (01)	36 (02)	34° 44' 00 S	56° 02' 00 W
Cerro Colorado, Florida	29 (01)	32 (12, 03, 04)	33° 52' 00 S	55° 33' 00 W
Paso Muñoz, Salto	15 (01)	-	31° 27' 00 S	56° 23' 00 W

* Dezembro de 2003

Eletroforese e Coloração com Prata

O preparo das placas e do gel de poliacrilamida e o método de coloração utilizado foram realizados como descrito por Creste *et al.* (2001).

A análise dos produtos de PCR foi realizada diretamente no gel seco. Os tamanhos dos alelos foram estimados através da comparação com o padrão de peso molecular, Ladder 10pb (Invitrogen), com o controle positivo e com os diferentes alelos já caracterizados.

Variabilidade Genética

Foram estimados o tamanho médio dos produtos de PCR, a heterozigosidade observada e a esperada e o número médio de alelos para cada loco.

O cálculo da diversidade alélica ("allelic richness", D_A) de cada população foi realizado no programa Fstat de acordo com Goudet *et al.* (1996), pois através desta estimativa é possível comparar a variabilidade entre as diferentes subpopulações independentemente do tamanho amostral.

Cada loco foi testado para verificar desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando testes implementados no programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995). Uma estimativa não enviesada da probabilidade exata foi obtida usando o modelo de cadeia de Markov ("Markov-chain") de Guo e Thompson (1992), utilizando os seguintes parâmetros: 100 séries de 1000 iterações com 1000 passos de desmemorização.

A frequência de alelos nulos, a amplificação preferencial de alelos menores e possíveis erros de genotipagem devido à presença de bandas fantasmas, foram verificados no programa MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2003).

O desequilíbrio de ligação entre pares de locos dentro de cada população foi investigado utilizando o programa FSTAT (Goudet, 1995). O P-valor foi obtido através da associação aleatória de genótipos seguida de um novo cálculo da estatística sobre os dados gerados aleatoriamente. O P-valor foi então estimado como a proporção das estatísticas obtidas sobre os conjuntos de dados gerados que é maior ou igual à observada.

Os níveis de significância estatística para testes estatísticos simultâneos foram corrigidos utilizando-se o procedimento seqüencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Variabilidade Interpopulacional Espacial

A distribuição da variabilidade genética global foi analisada através do cálculo da estimativa de F_{ST} , θ_{ST} (Weir & Cockerham, 1984). Uma estimativa não enviesada de F_{ST} , θ , foi calculada no programa FSTAT (Goudet, 1995). O número médio de migrantes entre as populações por geração (Nm) foi estimado com base em alelos exclusivos (Barton & Slatkin, 1986).

A diferenciação entre pares de populações também foi estimada a partir da variância nas frequências alélicas segundo Weir & Cockerham (1984). A significância estatística das estimativas de F_{ST} global e entre pares de populações foi testada através da permutação de genótipos entre populações (Goudet *et al.*, 1996).

O modelo de estrutura genética de populações de isolamento por distância foi testado através da regressão linear de $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ (entre os pares de populações) contra o logaritmo natural das distâncias geográficas entre pares de populações (Rousset, 1997).

Variabilidade Interpopulacional Temporal

A diferenciação genética temporal entre as populações dos diferentes períodos, foi analisada através do cálculo da estimativa de F_{ST} , θ (Weir & Cockerham, 1984). A significância da diferenciação temporal foi acessada através do teste G (Goudet et al. 1996) como implementado no Fstat. Os gráficos foram desenhados através do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2006).

Mudanças temporais na diversidade gênica (H_E) e na diversidade alélica (“allelic richness”, D_A) em cada população foram testadas de acordo com Goudet *et al.* (1996). Neste algoritmo, inicialmente é calculado o valor observado da diferença de H_E ou D_A entre as duas datas; por exemplo, “dif H_E ” = [H_E (ano 1) - H_E (ano 2)]. Os indivíduos são então aleatoriamente distribuídos e “dif H_E ” ou “dif D_A ” é calculado para cada conjunto de dados aleatório, gerando uma distribuição de “dif H_E ” ou “dif D_A ”. O *P*-valor é a probabilidade de se obter, na distribuição aleatória, um valor de “dif H_E ” ou “dif D_A ” maior ou igual ao observado.

Tabela 12. Diversidade genética de amostras de *C. hominivorax* de cinco diferentes localidades ao longo do território Uruguaio obtidas em 2003.

	Dayman	S. Antonio	Colonia	B. Medina	J. Suárez	C. Colorado	P. Muñoz
CH01							
N _a / T _a	6 / 19	6 / 21	5 / 15	6 / 24	5 / 15	6 / 29	5 / 15
H _o	0,3158	0,4762	0,5333	0,5833	0,6667	0,5172	0,5333
H _E	0,6230*	0,7607	0,7517	0,6809	0,6943	0,5826	0,7126
CH05							
N _a / T _a	4 / 19	5 / 21	6 / 15	7 / 24	5 / 15	7 / 29	5 / 15
H _o	0,6316	0,5238	0,7333	0,4167	0,5333	0,5172	0,8000
H _E	0,5874	0,6190	0,6552	0,6746	0,4460	0,6636*	0,7747
CH09							
N _a / T _a	3 / 18	4 / 20	4 / 15	7 / 24	2 / 15	6 / 28	5 / 15
H _o	0,2778	0,4500	0,5333	0,7917	0,2000	0,5357	0,5333
H _E	0,3317	0,4423	0,5724	0,7216	0,3701	0,6227	0,6299
CH10							
N _a / T _a	6 / 19	6 / 21	6 / 15	6 / 24	4 / 15	5 / 25	5 / 15
H _o	0,3684	0,1905	0,2000	0,2917	0,6000	0,0400	0,4000
H _E	0,6344*	0,5912*	0,7885*	0,7101*	0,6598	0,5167*	0,4989
CH11							
N _a / T _a	4 / 18	9 / 21	8 / 15	8 / 22	9 / 15	7 / 28	7 / 15
H _o	0,6111	0,5714	0,7333	0,6364	0,6667	0,4286	0,4000
H _E	0,6333	0,7468	0,7770	0,8245*	0,8253	0,7247*	0,6943*
CH12							
N _a / T _a	8 / 18	8 / 21	8 / 15	8 / 24	5 / 15	9 / 29	7 / 15
H _o	0,8333	0,7143	0,6000	0,9167	0,6000	0,7241	0,8000
H _E	0,8476	0,8479	0,8736	0,8475	0,6460	0,8173	0,7931
CH14							
N _a / T _a	7 / 19	7 / 21	6 / 15	8 / 23	4 / 15	6 / 28	5 / 15
H _o	0,4737	0,4762	0,5333	0,5217	0,6000	0,5357	0,5333
H _E	0,8009*	0,6690*	0,7425	0,6135	0,6713	0,8019*	0,6713
CH15							
N _a / T _a	7 / 18	9 / 21	6 / 15	6 / 24	3 / 15	7 / 29	5 / 15
H _o	0,5556	0,4762	0,5333	0,3750	0,2667	0,2759	0,4000
H _E	0,8381*	0,7770*	0,7862	0,7943*	0,5080	0,7883*	0,7310*
CH20							
N _a / T _a	7 / 19	7 / 21	5 / 15	7 / 24	5 / 15	6 / 29	4 / 15
H _o	0,3684	0,4762	0,5333	0,5000	0,8000	0,6897	0,5333
H _E	0,7084*	0,7120	0,6414	0,6835*	0,7540	0,7048	0,6920
CH21							
N _a / T _a	14 / 19	10 / 20	14 / 15	12 / 24	9 / 15	12 / 29	9 / 15
H _o	0,7895	0,7500	0,8667	0,8333	0,5333	0,6429	0,6000
H _E	0,9289	0,8603	0,9402	0,8670	0,8506*	0,9039*	0,8874*
CH24							
N _a / T _a	4 / 18	5 / 21	5 / 13	6 / 23	3 / 15	6 / 21	5 / 15
H _o	0,5556	0,3810	1,0000	0,4783	0,6000	0,5909	0,6000
H _E	0,6873	0,8130*	0,7846	0,7749*	0,6069	0,7505	0,7793
CH26							
N _a / T _a	10 / 18	11 / 21	8 / 15	10 / 24	5 / 15	11 / 28	11 / 15
H _o	0,9444	0,7619	0,7333	0,7500	0,8667	0,9643	1,0000
H _E	0,8746	0,8850	0,8529	0,8466	0,6874	0,8916	0,8943
Todos							
N _a	6,67	7,25	6,75	7,58	4,92	7,33	6,08
H _o média	0,5604	0,5206	0,6278	0,5912	0,5778	0,5385	0,5944
H _E média	0,7080*	0,7270*	0,7639*	0,7535*	0,6433*	0,7307*	0,7299*

N_a, número médio de alelos por loco; T_a, número de amostras analisadas por loco e por população;

H_E, estimativa não enviesada da heterozigiosidade esperada; H_o, heterozigiosidade observada;

* Desvio significativo das proporções de H-W, após o procedimento sequencial de Bonferroni ($\alpha = 0.05$).

Para as amostras de 2003, a estimativa global de F_{ST} foi 0,030 ($P < 0,0001$), ou seja, foi detectada uma estruturação populacional baixa, mas significativa nas amostras analisadas. O número médio de migrantes entre as populações por geração (Nm) baseado em alelos exclusivos (Barton & Slatkin, 1986) foi 6,25, indicando um grande fluxo gênico mesmo entre localidades geograficamente distantes, o que está de acordo com a alta taxa de dispersão descrita para *C. hominivorax* (Mayer & Atzeni, 1993), associada à ausência de barreiras naturais no Uruguai. O fluxo gênico tem sido amplamente discutido em relação à sua magnitude e influência na estrutura genética das populações. A importância do fluxo gênico em populações naturais está na homogeneização das frequências alélicas entre as populações pequenas, contrapondo os efeitos da deriva genética. O alto fluxo gênico entre as amostras de *C. hominivorax* poderia explicar a baixa diferenciação inter-populacional em 2003.

A maior parte da variação foi encontrada dentro das populações geográficas, corroborando os resultados previamente obtidos através PCR-RFLP do DNA mitocondrial (Lyra et al., 2006) utilizando o mesmo conjunto amostral. Nesse trabalho, no entanto, a diferenciação encontrada não foi estatisticamente significativa e as amostras analisadas foram consideradas como constituintes de uma única população panmítica.

Diferenças entre marcadores nucleares e mitocondriais também foram encontradas em vários outros estudos (Kim *et al.*, 1998; Wilmer *et al.*, 1999; Piertney *et al.*, 2000; Wirth & Bernatchez, 2001; Johnson *et al.*, 2003). Entre outros fatores como diferenças na intensidade de seleção e forma de herança, a diferença encontrada pode ser explicada por diferenças nas taxas de mutação dos marcadores. Taxas de mutação em marcadores microssatélites são mais altas que as taxas registradas em marcadores de DNA mitocondrial (Frankham *et al.* 2002). Este fato pode levar à detecção de uma maior nível de estruturação em marcadores microssatélites. Neste caso em particular, a análise de poucos sítios do DNA mitocondrial (DNAm_t) através de PCR-RFLP, também pode ter enviesado os resultados.

Uma outra explicação possível é a dispersão diferencial entre machos e fêmeas. Piertney et al. (2000) demonstraram, utilizando níveis observados de dispersão mediada por fêmeas, que a estrutura populacional detectada por marcadores microssatélites pode ser maior que a estrutura inferida através de marcadores de DNAm. Mayer e Atzeni (1993) verificaram uma dispersão maior de fêmeas de *C. hominivorax* com relação aos machos (Tabela 14). Esta diferença de dispersão, no entanto, deveria ser extremamente alta para que fossem geradas diferenças significativas nos índices de diferenciação.

Tabela 14. Distâncias médias (em km) de dispersão de adultos de *C. hominivorax*. Adaptado de Mayer e Atzeni (1993).

Habitat	Ideal	Desfavorável
Fêmeas	2,85	22,07
Machos	1,25	9,64

As estimativas de F_{ST} entre pares de subpopulações de 2003 variaram de 0.0060 a 0.0820 (Tabela 15) e não foram significativamente diferentes de zero para seis de 21 pares. As populações de Cerro Colorado e Joaquín Suarez diferenciaram-se significativamente das outras amostras.

Tabela 15. Diferenciação populacional (estimativas de F_{ST}) entre pares de populações do Uruguai de 2003

Área de estudo	S. Antonio	C. Colorado	Colonia	B. Medina	J. Suárez	P. Muñoz
Dayman	0,0139 ^{NS}	0,0144*	0,0180*	0,0252 ^{NS}	0,0601*	0,0215 ^{NS}
S. Antonio		0,0174*	0,0087 ^{NS}	0,0195*	0,0685*	0,0214 ^{NS}
C. Colorado			0,0189*	0,0185*	0,0650*	0,0319*
Colonia				0,0060 ^{NS}	0,0633*	0,0301*
B. Medina					0,0820*	0,0283*
J. Suárez						0,0585*

NS, não significativo; *, significativo com $\alpha = 0,05$ após a correção de Bonferroni.

Diferentemente do ano anterior, em 2004 foi obtido um valor moderado de F_{ST} igual a 0,059 ($P < 0,0001$). No entanto, este aparente aumento na diferenciação populacional após um ano, não foi estatisticamente significativo ("Wilcoxon signed-rank test", $P = 0.2451$) Em 2004, o número de migrantes por geração foi de 2,11 migrantes por geração.

Em 2004, as estimativas de F_{ST} entre pares de subpopulações variaram de 0.0213 a 0.1103 (Tabela 16) e não foi significativo para um único par de subpopulações: Banãdos de Medina x San Antonio.

Tabela 16. Diferenciação populacional (estimativas de F_{ST}) entre pares de populações do Uruguai de 2004

Área de estudio	Colonia	S. Antonio	B. Medina	C. Colorado
Suarez	0,0824*	0,0405*	0,0213*	0,0424*
Colonia		0,1103*	0,0841*	0,1049*
S. Antonio			0,0267 ^{NS}	0,0637*
B. Medina				0,0557*

NS, não significativo; *, significativo com $\alpha = 0,05$ após a correção de Bonferroni.

A correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das amostras do Uruguai não foi significativa após o teste de Mantel tanto nas amostras de 2003 ($P = 0,54000$, Figura 11A), como nas amostras de 2004 ($P = 0,64300$, Figura 11B).

Uma vez que migração restrita resulta em uma correlação positiva entre distância geográficas e genéticas (Slatkin, 1993), modelos simples de migração não são suficientes para explicar a baixa diferenciação entre as populações de *C. hominivorax* no Uruguai. Um fator que deve ser observado no caso desta espécie é a possibilidade de ocorrência de migração passiva das larvas através do movimento de animais infestados entre diferentes fazendas, que ocorre

populações é coerente com a observação empírica de dinâmica populacional de *C. hominivorax* e com a alta sensibilidade a variações microgeográficas observada nesta espécie (Phillips *et al.*, 2004). Esta espécie sofre uma drástica redução populacional no período de seca, que equivale ao inverno Uruguaio, e se recupera rapidamente nas estações chuvosas. Assim, a subpopulação de Colonia sofreu uma redução da variabilidade provavelmente devido a um gargalo populacional mais severo que nas outras subpopulações ou foi recolonizada por um número menor de indivíduos ou ainda por indivíduos provenientes de uma única população fonte.

Foram encontrados nas populações testadas, em geral, valores de θ temporal maiores que os valores para diferenciação espacial (Tabela 17). Como a variação temporal observada entre populações de *C. hominivorax* do Uruguai foi significativa e apresenta uma maior magnitude que a variação entre as populações de uma mesma data, pode-se inferir que a diferenciação espacial observada não é decorrente de diferenças genéticas fixadas entre as diferentes localidades amostradas.

Tabela 17. Diferenciação populacional temporal nas amostras do Uruguai. São dados os valores das estimativas de F_{ST} e os valores de P para a diferenciação entre as diversidades gênicas (H_E) e diversidades alélicas (D_A , “allelic richness”) obtidas em duas datas diferentes.

Populações 2003 x 2004	Parâmetro testado						
	θ	H_E			D_A		
		2003	2004	P -valor	2003	2004	P -valor
San Antonio	0,049*	0,7270	0,6974	0,3173	3,9	3,5	0,3846
Colonia	0,096*	0,7639	0,6254	0,0031*	4,0	3,2	0,0256*
B. Medina	0,049*	0,7535	0,7142	0,5419	4,0	3,9	0,8937
J. Suárez	0,074*	0,6433	0,7700	0,0160*	3,2	4,1	0,0185*
C. Colorado	0,070*	0,7307	0,7783	0,7718	4,0	3,7	0,4234

NS, não significativo; *, significativo $\alpha = 0.05$

Devido a variações temporais, as diferenças genéticas entre as localidades são transientes, e modificadas, por exemplo, a cada estação favorável. Desta forma, cada localidade não constituiria uma entidade genética definida, mas apresentaria flutuações com o tempo. Este padrão também foi observado na mosca *Drosophila buzzatii* (Barker *et al.* 1986), no molusco bivalvo *Spisula ovalis* (David *et al.* 1997) e no molusco *Phalacrus substriatus* (Ingvarsson *et al.*, 1997).

A variabilidade e estrutura de populações depende fortemente dos detalhes dos processos de extinção local, recolonização, e migração (McCauley, 1991; Harrison & Hastings, 1996). O surgimento de uma nova população após a extinção da população que inicialmente ocupava o habitat, o “turnover” de populações, pode levar ao aumento, manutenção ou à diminuição da diferenciação populacional, dependendo da origem e número dos migrantes, ou seja, se eles são provenientes de apenas uma ou de diferentes subpopulações locais e se seu número é maior ou menor quando comparado ao número de migrantes para populações

Na subpopulação de Cerro Colorado (2003), no entanto, há evidência de gargalo populacional sob dois modelos de mutação IAM e TPM. Esta população pode ter sofrido uma redução populacional severa. Devido ao gargalo, esta subpopulação ficou sujeita aos efeitos de deriva e endocruzamento, diminuindo os níveis de variabilidade genética. No entanto, o mesmo regime de coletas foi empregado em 2004 e, nesta subpopulação, não foi detectada uma variabilidade reduzida com relação às outras subpopulações. Neste caso, pode ser ressaltada a colonização por um maior número de indivíduos, ou de indivíduos provenientes de várias populações diferentes.

Tabela 18. Resultado do teste utilizado para detecção de redução populacional no programa BOTTLENECK.

Localidade (Ano)	Modelo de mutação	P-valor		Interpretação
		H_{Def}	H_{Exc}	
Dayman (2003)	IAM	0.99597	0.00525	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.71533	0.31104	Equilíbrio
	SMM	0.31104	0.71533	Equilíbrio
San Antonio (2003)	IAM	0.89819	0.11670	Equilíbrio
	TPM	0.28467	0.74072	Equilíbrio
	SMM	0.02124	0.98291	Deficiência Heterozigotos
San Antonio (2004)	IAM	0.99939	0.00085	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.91187	0.10181	Equilíbrio
	SMM	0.13306	0.88330	Equilíbrio
Colonia (2003)	IAM	0.99695	0.00403	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.66138	0.36670	Equilíbrio
	SMM	0.08813	0.92432	Equilíbrio
Colonia (2004)	IAM	0.99475	0.00671	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.80981	0.21191	Equilíbrio
	SMM	0.19019	0.83032	Equilíbrio
B. Medina (2003)	IAM	0.97388	0.03198	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.66138	0.36670	Equilíbrio
	SMM	0.02124	0.98291	Deficiência Heterozigotos
B. Medina (2004)	IAM	0.95386	0.05493	Equilíbrio
	TPM	0.71533	0.31104	Equilíbrio
	SMM	0.16968	0.84937	Equilíbrio
J. Suárez (2003)	IAM	0.99329	0.01709	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.91187	0.10181	Equilíbrio
	SMM	0.33670	0.66138	Equilíbrio
J. Suárez (2004)	IAM	0.99988	0.00024	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.95386	0.05493	Equilíbrio
	SMM	0.15063	0.86694	Equilíbrio
Cerro Colorado (2003)	IAM	0.99695	0.00403	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.66138	0.36670	Equilíbrio
	SMM	0.08813	0.92432	Equilíbrio
Cerro Colorado (2004)	IAM	0.99878	0.00171	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.99329	0.01709	Excesso Heterozigotos
	SMM	0.10181	0.91187	Equilíbrio
Paso Muñoz (2003)	IAM	0.99475	0.00671	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.84937	0.16968	Equilíbrio
	SMM	0.36670	0.66138	Equilíbrio

IAM. Modelo de mutação de alelos infinitos ("Infinite Allele Model");

TPM: Modelo de mutação de duas-fases ("Two-Phase Model"), com 70% de SMM;

SMM. Modelo de mutação passo-a-passo ("Stepwise Mutation Model");

H_{Exc} , P -valor do teste "Wilcoxon sign-rank (one-tailed)" para hipótese alternativa de excesso de heterozigotos; H_{Def} , P -valor do teste "Wilcoxon sign-rank (one-tailed)" para hipótese alternativa de deficiência de heterozigotos;

4. Diferenciação populacional significativa entre subpopulações da mesma localidade em períodos diferentes;
5. Estimativas de diferenciação temporal, em geral, maiores que as estimativas de diferenciação espacial;

Estas observações podem ser geradas independentemente por diversos fatores, entre eles, redução populacional, deriva, endogamia, artefato de técnica (como alelos nulos) entre outros. Contudo, estes resultados quando observados conjuntamente, são mais bem explicados a luz de um modelo de metapopulações (Quadro 8).

QUADRO 8. METAPOPULAÇÕES

A teoria de metapopulações foi proposta pelo ecólogo norte-americano Richard Levins (1970), para suprir a maior deficiência dos modelos clássicos de dinâmica de populações, que ignoravam o fluxo de indivíduos entre populações vizinhas. Seu objetivo, na época, era o planejamento de técnicas mais eficazes para o controle de pragas da agricultura.

Uma metapopulação pode ser definida como uma população de populações (Hansky & Gaggioti, 2004) e é constituída por várias populações locais que são efêmeras e a sua persistência ocorre através de um balanço entre extinção de populações locais e a recolonização subsequente de habitats não ocupados. As populações dentro da metapopulação podem estar conectadas por migração, estar sujeitas à extinção e recolonização, sofrer crescimento ou redução no decorrer do tempo e ainda sofrer ação da seleção natural sobre a variabilidade genética (Wakeley, 2004).

De acordo com os resultados obtidos, a dinâmica populacional local da mosca da bicheira inclui flutuações populacionais e eventos de migração e, conseqüentemente, a importância relativa da diferenciação espacial e temporal das populações Uruguaias é dependente da ocorrência de migração, extinção e colonização. A diferenciação genética temporal pode ocorrer quando há ocorrência de extinção local, devido a flutuações significativas no tamanho populacional e a colonização subsequente do habitat por indivíduos de populações de outras localidades mais distantes.

Massonnet e colaboradores (2002), ao investigar padrões de variabilidade e diferenciação genética em um afídeo (*Macrosiphoniella tanacetaria*), utilizaram um regime de amostragem bastante similar ao adotado no nosso trabalho, amostrando sete populações do afídeo em 1999 e 2001. Assim como observado em *C. hominivorax*, estes autores verificaram um desvio nas proporções de H-W, desequilíbrio de ligação entre pares de locos, ausência de isolamento por distância, estruturação temporal e explicaram estas observações através do modelo de metapopulações.

ASSESSING GENETIC VARIATION IN NEW WORLD SCREW-WORM POPULATIONS FROM URUGUAY

T. T. TORRES, M. L. LYRA, P. FRESIA AND
A. M. L. AZEREDO-ESPIN

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG)
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

SUMMARY

The New World screw-worm (NWS), *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), is an important parasitic insect pest in Neotropical regions. NWS myiasis is caused by the larval stage of the fly infesting tissues of warm-blooded vertebrates. This species represents a serious threat to the livestock sector across its current distribution, which includes part of the Caribbean and all of South America (except for Chile). Knowledge of the extent and distribution of genetic variability of *C. hominivorax* is of great interest for the description of populations and for contributing to future strategies of control. This paper describes the analysis of genetic variability and structure of NWS populations in Uruguay using two different molecular markers, mitochondrial DNA (mtDNA) and microsatellites.

1. INTRODUCTION

The New World screw-worm (NWS), *Cochliomyia hominivorax*, is one of the most important parasitic insect pests in Central and South America, causing invasive myiasis in warm-blooded vertebrates and responsible for important economic losses to livestock rearing. The current distribution of NWS includes part of the Caribbean and all of South America (except for Chile). This species has been successfully eradicated from North and most of Central America by the sterile insect technique, SIT (IAEA 2000). In 1988, the pest was introduced into Libya, but its spread to livestock and wildlife in the rest of Africa and the Mediterranean region was prevented by a successful SIT campaign (Vargas-Terán et al. 1994).

there whereas the homogenous populations of North America were possibly formed by a founder effect.

It is clear from the above that the available information is insufficient to infer patterns of genetic variation and structure among NWS populations throughout their geographical range. Therefore, an effort was made to add to the body of information available on these aspects by using mitochondrial DNA (mtDNA) and microsatellites to analyse the genetic variability and structure of NWS Uruguayan populations.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling of NWS in Uruguay

C. hominivorax samples were obtained from seven distinct geographic locations in Uruguay with distances between them ranging from 50 to 418 Km (Fig. 1, Table 1). Screw-worm larvae were collected directly from infested wounds in sheep, cattle and dogs in January 2003. Sampling of related individuals was avoided by choosing wounds in different animals and/or farms and by classifying larvae from the same wound by instar.



Figure 1. NWS collection sites

Among the populations, nine haplotypes were observed. The mean nucleotide diversity (π) was 0.0229 and the haplotype diversity (H_s) was 0.6355, indicating high mtDNA variability. The similarity index (F) was high (96.7%) and the estimate of nucleotide divergence between populations (δ) was very low (0.00055), suggesting a high similarity among samples from the different locations. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed no evidence of population differentiation, indicating that the species *C. hominivorax* forms a single panmictic population in Uruguay. Lyra et al. (2005) suggested that the distribution of *C. hominivorax* in the extreme south of the species' occurrence and the fact that there are no geographical barriers or important climatic differences between studied regions were responsible for the lack of differentiation in Uruguay.

Microsatellites, or simple sequence repeats (SSR), are short sequences made up of a single motif with no more than six bases that is tandemly repeated (Goldstein and Schlötterer 1999). They are found in large numbers and are relatively evenly spaced throughout the genome of every eukaryotic organism analyzed so far.

Among the several classes of molecular markers, microsatellite loci stand out as co-dominant markers with a high number of alleles per locus, high polymorphism and a high-expected heterozygosity value. Due to these features, variation in these co-dominant markers has been increasingly used as the marker of choice to investigate questions regarding population structure, gene flow and mating system even in populations which have low levels of allozyme and mitochondrial variation.

The recent isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for *C. hominivorax* (Torres et al. 2004, Torres and Azeredo-Espin, 2005) enables investigation of genetic variability and population structure of this pest in Uruguay.

Ten previously characterized microsatellite markers (Torres et al. 2004) were used in this study. The primer sequences and the procedures for microsatellite amplifications and analyses of PCR products were described by Torres et al. (2004).

For the nine microsatellite loci analyzed, the number of alleles detected per locus and per population ranged from 2 to 10, with an average of 6 (Table 2). The observed heterozygosity (H_O), varied from 0.19 to 0.91 and the expected heterozygosities (H_E) varied from 0.37 to 0.87 (Table 2).

Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (exact probability test, $P < 0.05$) was recorded for all sampling localities. In all cases, departures from expectations were due to an excess of homozygotes. Among the possible factors that might account for the deviations observed is the Wahlund effect, since screw-worms were sampled from different farms at each location. However, such effects should be apparent in most of the loci across populations, which was not the case for this data set. Another factor that could also have caused the observed deviations is the presence of null alleles. These result from mutations such as substitutions, insertions, or deletions in one or both priming sites preventing the binding of the DNA strand and primers (Callen et al. 1993) and non-amplification of the allele. At the population level this can lead to a misinterpretation of the number of heterozygotes and consequently of HW deviations. Only the locus *CH10* presented a significant number of null alleles and the analysis excluding this locus was not significantly altered. Furthermore, these results are being confirmed by the preliminary analysis of new populations using these loci and additional loci from Torres and Azeredo-Espin(2005). The occurrence of demographic changes that affected NWS populations may therefore be the main cause of the observed homozygote excess. These in turn could have arisen from decreases in temperature and humidity in the Uruguayan winter and/or persistent insecticide treatment which can cause mass population mortality and local extinction of screw-worm populations.

Linkage disequilibrium was found in only two of 252 comparisons among the loci and populations analyzed, but no common pair of loci showed non-random associations in all the populations (data not shown).

3.2. Inter-population Variability

Most variation was found within rather than between populations and the seven populations exhibited remarkably similar allele distributions. This is consistent with the results found by the PCR-RFLP of the mtDNA.

Two measures of inter-population genetic differentiation were used in this study (F_{ST} and R_{ST}). The global multilocus estimate of R_{ST} was 0.015 and of F_{ST} was 0.031. Both estimates, although low, were numerically very similar and significantly different from zero ($P = 0.05$, for R_{ST} and $P = 0.001$, for F_{ST}), suggesting that little differentiation exists among these populations.

Table 3. F_{ST} estimates for all population pairwise comparisons.

Study area	Salto	Colonia	B. Medina	Suarez	C. Colorado	P. Muñoz
Dayman	0.0080 ^{NS}	0.0171 ^{NS}	0.0194 ^{NS}	0.0497*	0.0209 ^{NS}	0.0281 ^{NS}
Salto		0.0112 ^{NS}	0.0111*	0.0709*	0.0201*	0.0240*
Colonia			-0.0005 ^{NS}	0.0675*	0.0200 ^{NS}	0.0378*
B. Medina				0.0853*	0.0163 ^{NS}	0.0334*
Suarez					0.0664*	0.0533*
C. Colorado						0.0399*

NS, not significant, * significant at the 5% nominal level after standard Bonferroni corrections.

These low levels of sub-structuring could be attributed to the high dispersal capacity of NWS, since migration is assumed to prevent genetic differentiation at neutral markers (Agis and Schlötterer 2001). However, the analysed populations showed no isolation by distance ($P = 0.6115$). Since restricted migration results in positive correlation between geographical and genetic distance (Slatkin 1993), simple migration models may not be sufficient to explain the low differentiation between NWS populations. One factor that could be responsible for this pattern of genetic differentiation is the passive migration of larvae by the movement of infested animals. However, an alternative explanation can be considered as responsible for the low differentiation and the lack of isolation by distance. It was noted (Slatkin 1993) that the absence of isolation by distance could be indicative of a recent re-colonization event. Considering the hypothesis of mass mortality by climatic conditions or insecticide treatment, a re-colonization by a large founder population could cause a demographic turnover if this population spread rapidly over Uruguay during climatically favorable seasons. In this case, a very similar allele distribution would be expected over the country. To test this hypothesis it is necessary to compare Uruguayan screw-worm samples collected during different hot/rainy seasons, as well as samples from intermediate and central populations which can be acting as stable sources of NWS for re-colonization events.

4. CONCLUSIONS

Information about patterns of genetic variation, structure and gene flow is needed before investing in large-scale efforts to control insect pests. To a large extent this can be obtained using modern molecular techniques. Mitochondrial and microsatellite markers have helped to provide this information for NWS populations in Uruguay.

The results presented here and elsewhere by Lyra et al. (2005) suggest that the seven populations from Uruguay are very similar, sharing homogenous haplotype

The results presented here provide some baseline data on genetic variation to which other NWS populations can be compared. Analysis of other populations throughout its geographical distribution would determine if similar patterns of genetic variation and gene flow are observed and lay the groundwork for future control strategies against this livestock pest.

7. REFERENCES

- Agis, M., and C. Schlötterer. 2001. Microsatellite variation in natural *Drosophila melanogaster* populations from New South Wales (Australia) and Tasmania. *Molecular Ecology* 10: 1197-1205.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- Callen, D. F., A. D. Thompson, Y. Shen, H. A. Phillips, R. I. Richards, J. C. Mulley, and G. R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)_n microsatellite marker. *American Journal of Human Genetics* 52: 922-927.
- Dueñas, J. C. R., G. M. Panzetta-Dutari, A. Blanco, and C. N. Gardenal. 2002. Restriction Fragment-Length Polymorphism of the mtDNA AT-Rich Region as a Genetic Marker in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95: 352-35.

Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.

Taylor, D. B., and A. L. Peterson II. 1994. Population genetics and gene variation in primary and secondary screwworm (DIPTERA: CALLIPHORIDAE). *Annals of the Entomological Society of America* 87: 626-633.

Taylor, D. B., A. L. Peterson II, and G. Maya-Borja. 1996. Population genetics and gene variation in screwworms (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) from Brazil. *Biochemical Genetics* 34: 67-76.

Torres, T. T., R. P. V. Brondani, J. E. Garcia, and A. M. L. Azeredo-Espin. 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the new world screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes* 4: 182-184.

Torres, T. T., and A. M. L. Azeredo-Espin. 2005. Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes* 5: 815-817.

Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, and P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.

Vargas-Teran, M., B.S. Hursey, and Cunningham. 1994. The eradication of the screwworm from Libya using the sterile insect technique. *Parasitology Today* 10:119-122.

Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

COMPLEXO PADRÃO DE ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES GEOGRÁFICAS DE *Cochliomyia hominivorax* DA AMÉRICA DO SUL

Tatiana Teixeira Torres & Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Neste capítulo será descrito o estudo populacional ao longo da distribuição geográfica de *C. hominivorax* na América do Sul empregando os marcadores desenvolvidos. Esta análise forneceu um panorama do padrão de variabilidade genética e estruturação desta espécie no continente. As observações decorrentes desta caracterização desafiaram a hipótese inicial de distribuição centro-periferia da variabilidade genética em subpopulações de *C. hominivorax* e geraram uma série de novos questionamentos acerca da estrutura populacional desta praga da pecuária.

3.5.1 METODOLOGIA DETALHADA

3.5.1.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE *C. hominivorax* DA AMÉRICA DO SUL

Coletas de lavas da mosca da bicheira no Brasil

Larvas de *C. hominivorax* foram coletadas diretamente em feridas de animais infestados em fazendas de criação de gado em oito localidades no Brasil (Tabela 19, Figura 14), Pinheiro Machado, RS; Fagundes Varela, RS; Carambei, PR; Costa Rica, MS; Caiapônia, GO; Goiânia, GO; São Sebastião do Paraíso, MG e Estiva, MG.

*Obtenção de amostras de *C. hominivorax* no Brasil – Kit de Coleta*

Para facilitar a obtenção de amostras de diferentes localidades do Brasil foi desenvolvido um kit de coleta (Figura 12), contendo doze frascos com etanol absoluto rotulados com etiquetas para identificação das amostras, uma pinça descartável, pares de luvas descartáveis, lápis e um manual com informações e instruções de coleta e armazenamento (Figura 13). Amostras de quatro regiões foram obtidas através de sua utilização: Santo Antônio das Missões, PR; Cocalinho, MT e Santa Maria das Barreiras, PA e Goianira, GO.

Outras Amostras

Fêmeas adultas de *C. hominivorax* de Campo Grande, MS, fixadas em etanol absoluto foram gentilmente enviadas pelo Dr. Wilson Köller, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

Observações

1. Larvas da mesma ferida devem ser colocadas no mesmo frasco e larvas de feridas diferentes **NÃO devem ser misturadas**. Se a quantidade de larvas em uma ferida for muito grande, não há necessidade de coletar todas; use somente um frasco por ferida!

2. A solução presente nos frascos, o etanol, é um tipo de álcool especial para conservar as amostras. Como o álcool comum, ele é inflamável e deve ser mantido distante do fogo. Não é tóxico e não apresenta perigo algum se houver contato com a pele. Não ingerir e manter fora do alcance de crianças.

As larvas obtidas serão utilizadas para caracterizar a variabilidade genética da mosca da bicheira, ou seja, para verificar se existem diferenças genéticas entre amostras provenientes de diferentes localidades do Brasil. Esta análise permitirá avaliar qual a melhor estratégia de controle desta praga nestas localidades. É importante ressaltar que a mosca da bicheira é um organismo modelo para estes estudos e, uma vez estabelecido como estratégia para esta espécie, as técnicas com outras pragas como a mosca da cefala, o berro e o carrapato, serão muito beneficiadas.

Dobra

Laboratório de Genética Animal
Centro de Biol. Molecular e Engenharia Genética - CBMEG
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Caixa Postal: 6010 CEP: 13083-875
Campinas - SP - Brasil
Fone: (019) 3788-1141
Fax: (019) 3788-1089
mailto:mones@unicamp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA

A mosca da bicheira

Cochliomyia hominivorax

BIOLOGIA & COLETAS



A mosca da bicheira

A mosca da bicheira é um parasita de animais de sangue quente. Durante a fase de larva ela se alimenta do tecido de hospedeiros vivos, infestando animais domésticos, principalmente bovinos, mas podendo ser encontrada também no homem! As infestações reduzem a qualidade do couro devido à presença de cicatrizes e prejudicam a produção de carne e leite, o que gera graves prejuízos aos criadores de gado.



O nome científico desta espécie é *Cochliomyia hominivorax* e foi dado por um médico francês, o Doutor Charles Coquerel. Ele identificou esta espécie como sendo a responsável pela morte de centenas de prisioneiros em uma penitenciária da Guiana Francesa e lhe deu o nome de "comedora de homens" (*homme* = homem; *vorax* = comedora).

Ciclo de vida

As fêmeas desta espécie depositam uma massa de ovos de 200-300 ovos dentro ou próximo a uma ferida do animal vivo. Os ovos levam de 10 a 12 horas para eclodir e as larvas passam a se alimentar do tecido do hospedeiro. Após 5 dias, as larvas caem no solo onde tornam-se pupas. Os adultos emergem das pupas após 7 dias e, após mais 3 dias, ocorre a cópula, reiniciando o ciclo.

Dobra



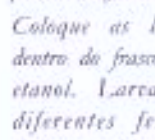
No Brasil e em outros países na América do Sul o controle da mosca da bicheira ainda é feito somente através da aplicação de inseticidas. Graças a uma técnica baseada na liberação de machos estéreis, esta mosca já foi erradicada dos Estados Unidos, México e grande parte da América Central.

Dobra

Como coletar



Com a pinça fornecida colete as larvas diretamente da ferida do animal infestado. Não utilize nenhum produto na ferida antes da coleta.



Coloque as larvas dentro do frasco com etanol. Larvas de diferentes feridas devem ser colocadas em diferentes frascos (1 ferida = 1 frasco).



Com um lápis, anote na etiqueta colada no tubo o nome da cidade onde a fazenda está localizada, o tipo de hospedeiro (boi, cachorro, ovelha, aves, etc...) e a data da coleta. Após estes procedimentos, o animal poderá ser tratado com o produto de preferência.

Figura 13. Manual explicativo que acompanha o kit para coleta de amostras de *C. hominivorax*.

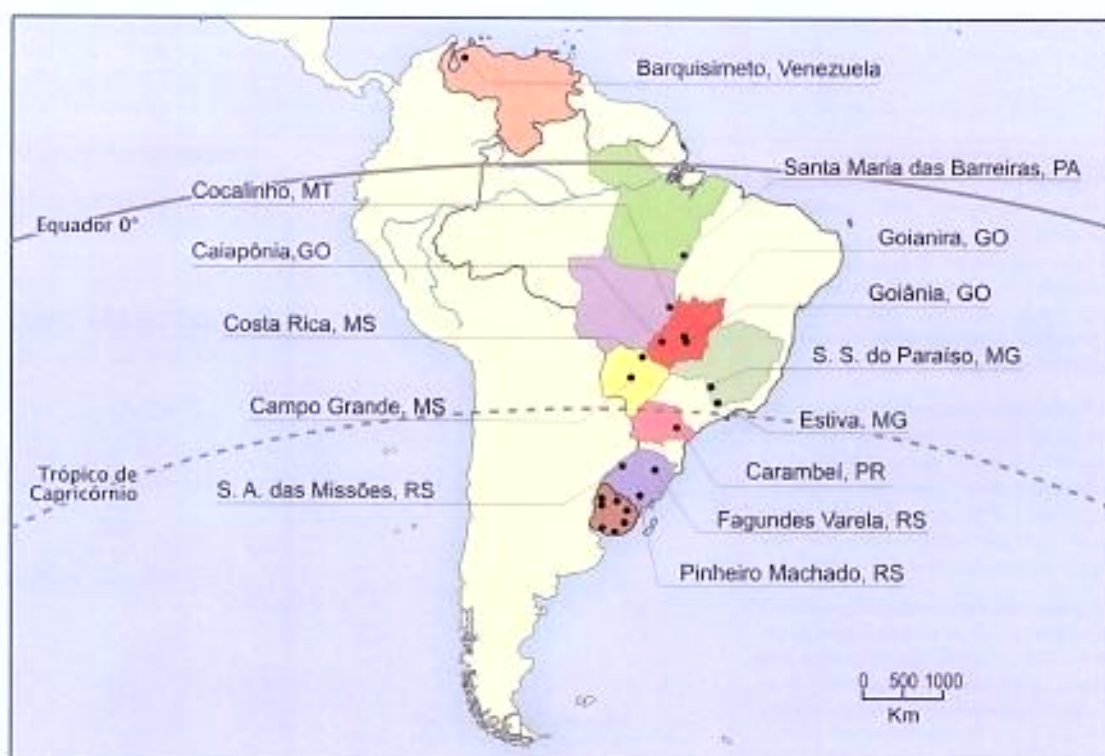


Figura 14. Locais de coleta das amostras de *C. hominivorax* na América do Sul. As amostras do Uruguai foram descritas no capítulo anterior.

3.5.1.2 ANÁLISE DOS DADOS DE MICROSSATÉLITES

Deteção do polimorfismo dos locos de microssatélites

Os doze locos selecionados anteriormente foram empregados na análise conjunta das populações geográficas da América do Sul. As amplificações via PCR dos locos de microssatélites e a forma de visualização foram realizadas como descrito no capítulo anterior.

Variabilidade Genética e Variabilidade Interpopulacional Espacial

As análises dos novos dados gerados foram realizadas como descrito no capítulo anterior. Adicionalmente, foram realizadas comparações entre a variabilidade genética de grupos de amostras através de testes "Wilcoxon signed rank". Os cálculos foram realizados no pacote estatístico R (R Development Core Team, 2006).

O teste de evidência de redução populacional recente também foi realizado de acordo com Cornuet e Luikart (1996) e Piry et al. (1999), como descrito no capítulo anterior.

3.5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variabilidade Genética

O número de alelos, a heterozigosidade observada, H_o , e a heterozigosidade esperada, H_e , por loco e por população são indicados na Tabela 20. A heterozigosidade esperada, excluindo as amostras do Uruguai, variou de 0,1941 (Pinheiro Machado-RS, loco CH09) até 0,9384 (Costa

Tabela 20. Continuação.

	C. Rica	Calapônia	Goianira	Goiânia	Cocalinho	S.M. Barreiras	Barquisimeto
CH01							
N _a	7 / 12	7 / 42	5 / 24	6 / 20	4 / 14	6 / 46	7 / 31
H _o	0.6667	0.7143	0.6087	0.6000	0.4615	0.5435	0.7419
H _e	0.8696	0.7332	0.6957	0.7051	0.5015	0.6894	0.6653
CH05							
N _a	4 / 12	7 / 42	6 / 24	7 / 20	4 / 15	8 / 46	6 / 30
H _o	0.7500	0.7143	0.6087	0.9500	0.7143	0.7391	0.4667
H _e	0.6812	0.7249	0.6493	0.7256	0.6270	0.7066	0.7181*
CH09							
N _a	3 / 10	8 / 42	4 / 22	4 / 20	5 / 15	6 / 44	3 / 31
H _o	0.2000	0.6429	0.2857	0.5000	0.6429	0.5909	0.4839
H _e	0.1947	0.6675	0.3031	0.5295	0.6905	0.5922	0.5685
CH10							
N _a	4 / 12	7 / 41	4 / 24	6 / 18	7 / 14	7 / 42	6 / 24
H _o	0.0000	0.1951	0.1304	0.0556	0.2308	0.2619	0.2083
H _e	0.6957*	0.7778*	0.6541*	0.7095*	0.8646*	0.7364*	0.6773*
CH11							
N _a	4 / 12	11 / 42	7 / 24	6 / 20	5 / 12	8 / 43	9 / 29
H _o	0.3333	0.7143	0.7826	0.5500	0.7273	0.4651	0.3448
H _e	0.6957	0.7567	0.7585	0.6397	0.8052	0.7417*	0.5789*
CH12							
N _a	9 / 12	10 / 41	8 / 24	10 / 20	8 / 15	11 / 46	6 / 31
H _o	1.0000	0.7561	0.9130	0.8000	0.9286	0.8043	0.7742
H _e	0.8514	0.8251	0.8348	0.8667	0.8280	0.8591	0.7245
CH14							
N _a	5 / 10	9 / 42	7 / 24	6 / 20	5 / 14	9 / 45	6 / 30
H _o	0.7500	0.3571	0.2609	0.4500	0.3846	0.3556	0.2667
H _e	0.7971	0.7785*	0.7700*	0.6987*	0.6923*	0.7635*	0.5412*
CH15							
N _a	7 / 11	10 / 37	7 / 24	5 / 18	6 / 12	9 / 43	10 / 31
H _o	0.4000	0.2973	0.3158	0.2778	0.3636	0.4186	0.5484
H _e	0.8158*	0.8678*	0.8122*	0.6778*	0.7316*	0.8788*	0.8440*
CH20							
N _a	4 / 12	7 / 41	5 / 17	4 / 20	4 / 14	6 / 46	7 / 31
H _o	0.5455	0.6341	0.4375	0.1500	0.6154	0.5435	0.7097
H _e	0.7273	0.6594	0.6310	0.6397*	0.6277	0.7033*	0.8001
CH21							
N _a	14 / 12	18 / 42	12 / 23	13 / 20	10 / 14	13 / 44	14 / 31
H _o	1.0000	0.8810	0.8182	0.8500	0.9231	0.8409	0.8387
H _e	0.9384	0.9294*	0.8869	0.9013	0.8954	0.9143*	0.9069
CH24							
N _a	4 / 11	8 / 41	6 / 23	6 / 18	4 / 13	8 / 46	5 / 30
H _o	0.2727	0.6585	0.7727	0.5556	0.7500	0.6304	0.7667
H _e	0.6883*	0.7796	0.7780	0.7000	0.6993	0.7733	0.7542
CH26							
N _a	6 / 12	12 / 41	10 / 24	9 / 20	10 / 15	14 / 45	13 / 31
H _o	0.8333	0.8537	0.9565	0.8000	0.7143	0.8889	0.8387
H _e	0.7645	0.8777	0.8686	0.8846	0.8942	0.9151	0.8763
Todos							
N _a	5.9	9.5	6.8	6.8	6.0	8.8	7.7
H _o média	0.4341	0.5965	0.8545	0.6800	0.8240	0.5898	0.5651
H _e média	0.7050*	0.7815*	0.7266*	0.7340*	0.7202*	0.7232*	0.7381*

N_a, número médio de alelos por loco; T_a, número de amostras analisadas por loco e por população;H_e, estimativa não enviesada da heterozigosidade esperada; H_o, heterozigosidade observada;* Desvio significativo das proporções de H-W, após o procedimento sequencial de Bonferroni ($\alpha = 0.05$).

Tabela 21. Teste utilizado para detecção de redução populacional no programa BOTTLENECK.

Localidade	Modelo de mutação	P-valor		Interpretação
		H_{Def}	H_{Exc}	
Pinheiro Machado, RS	IAM	0.96143	0.04614	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.39551	0.6333	Equilíbrio
	SMM	0.02612	0.97876	Deficiência Heterozigotos
Fagundes Varela, RS	IAM	0.97388	0.03198	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.83032	0.19019	Equilíbrio
	SMM	0.45483	0.57495	Equilíbrio
Sto . Ant. das Missões, RS	IAM	0.66138	0.3667	Equilíbrio
	TPM	0.13306	0.8833	Equilíbrio
	SMM	0.00305	0.99768	Deficiência Heterozigotos
Carambeí, PR	IAM	0.99475	0.00671	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.71533	0.31104	Equilíbrio
	SMM	0.04614	0.96143	Deficiência Heterozigotos
Estiva, MG	IAM	0.99878	0.00171	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.57495	0.45483	Equilíbrio
	SMM	0.00403	0.99695	Deficiência Heterozigotos
S. S. do Paraíso, MG	IAM	0.92432	0.08813	Equilíbrio
	TPM	0.57495	0.45483	Equilíbrio
	SMM	0.0647	0.94507	Equilíbrio
Campo Grande, MS	IAM	0.97388	0.03198	Equilíbrio
	TPM	0.74072	0.28467	Equilíbrio
	SMM	0.05493	0.95386	Equilíbrio
Costa Rica, MS	IAM	0.99329	0.01709	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.05493	0.95386	Equilíbrio
	SMM	0.68896	0.33862	Equilíbrio
Caiaipônia, GO	IAM	0.99939	0.00085	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.78809	0.23486	Equilíbrio
	SMM	0.00671	0.99475	Deficiência Heterozigotos
Goianira, GO	IAM	0.99329	0.01709	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.94507	0.0647	Equilíbrio
	SMM	0.1167	0.89819	Equilíbrio
Goiânia, GO	IAM	0.99963	0.00061	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.66138	0.3667	Equilíbrio
	SMM	0.01709	0.99329	Equilíbrio
Cocalinho, MT	IAM	0.99976	0.00037	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.96802	0.03857	Excesso Heterozigotos
	SMM	0.39551	0.6333	Equilíbrio
S. M. das Barreiras, PA	IAM	1	0.00012	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.95386	0.05493	Equilíbrio
	SMM	0.10181	0.91187	Equilíbrio
Barquisimeto, Venezuela	IAM	0.97388	0.03198	Excesso Heterozigotos
	TPM	0.74072	0.28467	Equilíbrio
	SMM	0.05493	0.95386	Equilíbrio

IAM. Modelo de mutação de alelos infinitos ("Infinite Allele Model");

TPM, Modelo de mutação de duas-fases ("Two-Phase Model"), com 70% de SMM;

SMM, Modelo de mutação passo-a-passo ("Stepwise Mutation Model");

H_{Exc} , P -valor do teste "Wilcoxon sign-rank (one-tailed)" para hipótese alternativa de excesso de heterozigotos; H_{Def} , P -valor do teste "Wilcoxon sign-rank (one-tailed)" para hipótese alternativa de deficiência de heterozigotos;

Tabela 22. Estimativas globais de F_{ST} nos grupos de amostras.

	Estimativa de $F_{ST}(\theta)$	P-valor
Grupo 1 (21 subpopulações)	0,032	$P < 0,00001$
Grupo 2 (19 subpopulações)	0,045	$P < 0,00001$
Grupo 3 (26 subpopulações)	0,043	$P < 0,00001$

Grupo 1: Subpopulações do Uruguai obtidas em 2003, do Brasil e da Venezuela (Barquisimeto)

Grupo 2: Subpopulações do Uruguai obtidas em 2004, do Brasil e da Venezuela (Barquisimeto)

Grupo 3: Todas as subpopulações do Uruguai, do Brasil e da Venezuela (Barquisimeto)

As estimativas globais de F_{ST} , apesar de baixas, foram significativas indicando uma estruturação populacional nas amostras analisadas. Mesmo em uma espécie com uma alta taxa de dispersão estes valores são surpreendentemente baixos tendo em vista a vasta extensão territorial abrangida (amostras distantes por até 5 000 km foram comparadas).

Os resultados que estão sendo obtidos através PCR-RFLP do DNA mitocondrial (M. L. Lyra, comunicação pessoal), utilizando o mesmo conjunto amostral, também estão indicando uma baixa estruturação populacional (estimativa de F_{ST} , $\phi_{ST} = 0,039$, $P < 0,05$).

Para testar a influência da migração no baixo nível de estruturação, as estimativas de F_{ST} entre pares de subpopulações foram calculadas (dentro dos grupos 1 e 2) e foi verificado se havia relação entre as distâncias genéticas e geográficas. As estimativas de F_{ST} para todos os pares do grupo 1 estão indicadas na tabela I e do grupo 2 na tabela II (Anexo 3).

As estimativas de F_{ST} entre pares de subpopulações também foram em geral baixas e não foram significativamente diferentes de zero para 112 de 210 pares nas comparações dentro do grupo 1 e para 126 de 171 pares nas comparações dentro do grupo 2. As estimativas estatisticamente significativas variaram de 0,0107 (entre Santa Maria das Barreiras, PA e Caiapônia, GO) a 0,1302 (entre Colonia del Sacramento (2004), Uruguai e Santo Antônio das Missões, RS). A única subpopulação que apresentou todas as estimativas significativas foi a de Barquisimeto, Venezuela, ou seja, ela se diferenciou de todas as outras subpopulações. Mesmo assim, as estimativas foram baixas variando de 0,0251 (com São Sebastião do Paraíso, MG) e 0,1193 (com Colonia del Sacramento (2004), Uruguai).

Estes resultados estão em contraste com os resultados obtidos por Infante-Vargas e Azeredo-Espin (1995), Infante-Malachias *et al.* (1999) e Infante-Malachias (1999), que, utilizando marcadores RFLP do DNAm, RAPD e Isozimas, respectivamente, indicaram que as amostras de *C. hominivorax* de populações brasileiras apresentavam altos índices de diferenciação genética, com reduzido fluxo gênico. As particularidades de cada marcador molecular poderiam explicar a divergência observada entre os estudos, bem como as diferentes localidades amostradas (nos estudos anteriores foram amostradas populações geográficas do Estado de São Paulo).

Entretanto, uma das principais diferenças entre o presente estudo e os anteriores é o critério de amostragem. Como não houve sucesso em se utilizar atrativos artificiais para coletar a espécie em armadilhas (A. M. L. de Azeredo-Espin, comunicação pessoal), a alternativa empregada vem sendo a coleta de larvas diretamente em feridas de animais infestados. Esta abordagem pode gerar desvios nos resultados caso um critério não seja estabelecido para se evitar a utilização de indivíduos resultantes de um único cruzamento como uma amostra da subpopulação. Isto ocorre pois as larvas que estão se alimentando em uma ferida aberta podem ser originárias de poucas oviposições ou apenas uma (Thomas & Mangan, 1989). Se todos os indivíduos de uma ferida forem coletados, o tamanho da amostra pode ser adequado de 20-30

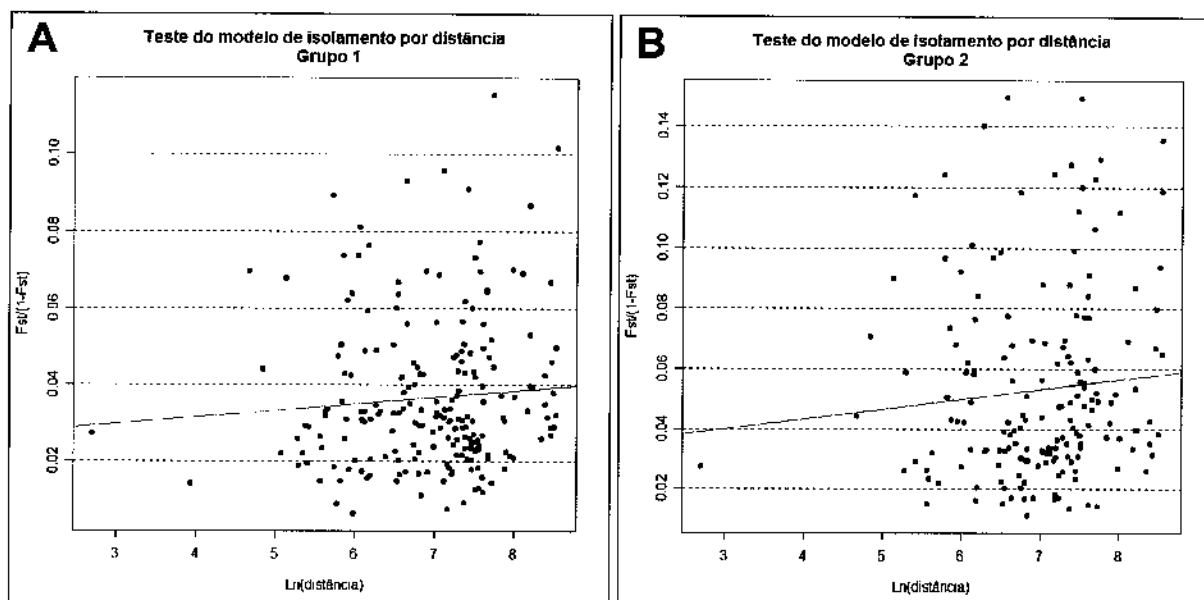


Figura 15. Teste do isolamento por distância. Regressão linear de $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ entre os pares de populações contra o logaritmo natural das distâncias geográficas entre pares de populações. A, subpopulações do grupo 1. B, subpopulações do grupo 2.

Diante deste cenário, novas inferências podem ser feitas acerca dos processos influenciando a estrutura populacional de *C. hominivorax*. Estas tentativas de se explicar os padrões observados podem ser divididas em dois processos principais: (A) Processos demográficos contemporâneos e (B) processos históricos.

A. PROCESSOS DEMOGRÁFICOS CONTEMPORÂNEOS

Os resultados da análise conjunta das amostras da América do Sul foram semelhantes aos apresentados nas amostras do Uruguai isoladamente (capítulo 4). Como discutido, a simples migração das moscas entre as diferentes subpopulações não é suficiente para explicar a baixa diferenciação populacional, uma vez que isto resultaria em uma correlação positiva entre distâncias geográficas e genéticas.

A migração passiva das larvas através de animais infestados poderia explicar em parte as observações em uma escala local. O transporte de animais pode ocorrer entre diferentes fazendas do mesmo proprietário, ou então em estágios precoces da infestação (como ovos ou larvas de primeiro ínstar) através da venda de animais, o que é proporcionado pelas práticas inadequadas de manejo e falta de fiscalização no transporte de animais domésticos. A migração passiva, no entanto, não deve ser responsável pelas observações na escala analisada, por várias razões, (1) o custo do transporte de animais por grandes distâncias é muito alto, restringindo esta prática; (2) as infestações em estágios mais adiantados são de fácil detecção, o que dificulta a venda de animais infestados e (3) a fiscalização é mais restrita em fronteiras internacionais.

Os resultados obtidos neste capítulo juntamente com a análise temporal descrita no capítulo anterior indicam que a dinâmica populacional local da mosca da bicheira inclui

flutuações populacionais dependentes da ocorrência de migração, extinção e recolonização. A diferenciação genética temporal pode ocorrer quando há ocorrência de extinção local, devido a flutuações significativas no tamanho populacional e a colonização subsequente do habitat por indivíduos de populações de outras localidades mais distantes. Assim, os dados obtidos podem se encaixar em um modelo de metapopulações. No entanto, para uma espécie de distribuição continental, ocorrendo também em ilhas oceânicas, pode-se aplicar o modelo metapopulacional?

Uma metapopulação (quadro 8), pode ser definida como o conjunto de subpopulações de determinada espécie, sendo que cada uma das subpopulações ocupa um diferente fragmento de um habitat subdividido. A maioria das espécies está naturalmente distribuída como metapopulações (Dobson, 2003; Hansky & Gaggiotti, 2004): muitos insetos vivem em árvores ou outras plantas, que são um fragmento de habitat; muitos peixes e invertebrados marinhos vivem em corais de recife; a maioria dos parasitas vivem em hospedeiros que são efetivamente fragmentos de habitat. No caso específico de *C. hominivorax*, há fragmentação de habitats sob vários aspectos: cada fazenda onde a larva se desenvolve em um animal pode ser considerada um fragmento, bem como cada região essencialmente de pecuária, que, geralmente, não são contínuas, apresentando regiões de produção agrícola que poderiam atuar na fragmentação do habitat. Por fim, a distribuição de matas, onde há sítios de agregação das moscas adultas (Phillips et al., 2004), é atualmente fragmentada devido à ação humana.

Assim, de acordo com a distribuição da espécie em habitats fragmentados e com os resultados aqui demonstrados, seria interessante ver cada subpopulação de *C. hominivorax* como uma metapopulação.

A teoria de metapopulações vem recebendo uma maior atenção dos pesquisadores interessados na influência deste modelo em programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção e em programas de controle de espécies-praga (Hansky & Gaggiotti, 2004). Para algumas outras espécies apresentando características comuns à *C. hominivorax*, como ampla distribuição e status de praga, já foram descritas estruturas populacionais de acordo com o modelo de metapopulações. Este modelo de dinâmica populacional foi descrito para a mosca do mediterrâneo, *Ceratitis capitata*. Em um estudo ecológico em uma extensão 3000 km² de culturas agrícolas, Israely et al. (2005) analisaram componentes espaciais e temporais influenciando o padrão de distribuição da mosca em Israel. Neste país, mesmo com o controle rotineiro e a redução temporária da densidade populacional, a mosca se recupera rapidamente. Assim como *C. hominivorax*, a mosca *C. capitata* não resiste ao inverno israelense, mas recoloniza esta região no início da estação favorável a partir de áreas mais propícias na costa do Mediterrâneo e no vale do rio Jordão. Os resultados obtidos na análise temporal indicaram que em duas das três localidades analisadas, a recuperação das populações no início do verão seria, provavelmente, um resultado de recolonização a partir de outras populações e não do crescimento de uma população residual que sobreviveu ao inverno. A conclusão foi de que a migração das moscas por

grandes distâncias tinha um papel fundamental na manutenção das populações da mosca do mediterrâneo no país.

Outro exemplo vem de *Anopheles gambiae*, principal inseto vetor do *Plasmodium falciparum*, parasita causador da malária. A diversidade genética de populações deste mosquito, é afetada por flutuações na estrutura genética temporal e geográfica. As populações de *A. gambiae* são caracterizadas por heterogeneidade geográfica, ausência de cruzamento ao acaso e ausência de limites para dispersão. Estudos micro-geográficos em uma vila em Mali indicaram uma estrutura de metapopulação (Taylor & Manoukis 2002). No entanto, duas estruturas diferentes de metapopulação são propostas para esta espécie para tentar explicar a manutenção das populações locais. No primeiro cenário, as populações locais desaparecem completamente durante a estação seca e são restabelecidas na estação favorável. No segundo, as populações locais são mantidas *in situ* por alguma forma de estivação ou diapausa dos indivíduos na estação seca. Com o retorno de condições favoráveis, os indivíduos estivados restaurariam a população. Com os dados obtidos para esta espécie até o momento, ainda não foi possível determinar qual fator tem maior importância no padrão observado de estrutura genética.

Em uma espécie de gafanhoto, *Schistocerca gregaria* (Ibrahim, 2001), foi descrita estrutura de metapopulações altamente dependente de processos de extinção e recolonização. Esta espécie, juntamente com espécies do gênero *Locusta* representam as maiores pragas da agricultura em áreas desérticas do velho mundo. Durante a época chamada de recessão, esta espécie fica reduzida a pequenos tamanhos populacionais dificilmente detectáveis que estão sujeitas a extinções locais. No entanto, na época dos surtos da praga, há um aumento surpreendente na densidade populacional criando as nuvens de gafanhotos que atacam culturas agrícolas em até 60 países no velho mundo. Segundo o autor, a estrutura de metapopulação, principalmente a recolonização de nichos desocupados, é fundamental para manter os ciclos de surtos e retração populacional desta espécie.

B. PROCESSOS HISTÓRICOS

Estimativas de fluxo gênico entre populações de uma espécie são geralmente baseadas em índices de diferenciação como estimativas de F_{ST} . Esta abordagem se baseia em uma série de pressupostos. O mais crucial deles é aquele que é o mais provável de ser violado em várias populações naturais, é o equilíbrio entre mutação, migração e deriva. A violação do equilíbrio é crítica em espécies-praga (organismos que dependem dos homens e de seus recursos, como agentes causadores de doenças humanas, de animais domésticos, de plantas cultivadas), cujo tamanho efetivo de populações é geralmente alto e cuja história demográfica é recente (Donnelly et al., 2001).

Lehmann et al. (1996) conduziram um estudo da distribuição da variabilidade genética de locos de isozimas e microssatélites entre populações de *A. gambiae* do Quênia e Senegal, na

África. Estes autores encontraram uma baixa diferenciação populacional ($F_{ST} = 0,016$) e estimaram um alto nível de fluxo gênico entre as populações ($Nm > 7.7$) separadas por mais de 6000 km. Besansky et al. (1997), analisando dados de sequência de uma região do gene mitocondrial ND5 (665 bp) de sete vilas no Quênia e três em Senegal, encontraram uma homogeneidade entre as subpopulações dos dois países ($F_{ST} = 0,085$) e, conseqüentemente, as estimativas de fluxo gênico foram altas ($Nm = 5.4$). Resultados similares foram obtidos para *A. arabiensis*, cujas populações separadas por até 7000 km também foram homogêneas ($F_{ST} = 0.044$, $Nm = 10.8$). Em 2001, Donnelly e colaboradores, ao analisar a variabilidade genética de 18 locos de microssatélites em populações africanas de *Anopheles arabiensis* e *A. gambiae*, verificaram que as populações analisadas não estavam em equilíbrio mutação-migração-deriva e que esta observação era consistente com a detecção nos estudos anteriores de baixos níveis de diferenciação genética ao longo da distribuição destas duas espécies. Nestes estudos, os autores atribuem os baixos níveis de divergência entre populações distantemente separadas à história destas populações, como sendo uma conseqüência de uma expansão recente nos últimos 2 a 5 mil anos, associada à expansão de populações humanas na África. Nestes estudos, a expansão populacional acarretou na ausência do equilíbrio mutação-migração-deriva, provavelmente inflando a taxa de fluxo gênico.

cenário, esta espécie não era nativa ao continente, mas foi introduzida e tornou-se um problema para pecuária nos países da América do Sul.

O gênero *Cochliomyia* é formado por quatro espécies, *C. hominivorax* (Coquerel), *C. macellaria* (Fabricius), *C. aldrichi* (Del Ponte) e *C. minima* (Shanon), sendo que destas espécies somente *C. hominivorax* é descrita como ectoparasita obrigatório (Dear, 1985). A distribuição de *C. macellaria* é simpátrica à *C. hominivorax*. *C. aldrich* está presente na Flórida (Estados Unidos), nas Bermudas, Bahamas, Cuba, Porto Rico, San Salvador, Ilhas Virgens e Ilhas Caimãs (Dear, 1985). Há registros desta espécie também na República Dominicana e Antilhas (Hall, 1965). A distribuição de *C. minima* é mais restrita, incluindo Jamaica, Cuba, República Dominicana, Porto Rico, Ilhas Virgens, Antilhas e na Flórida (Hall, 1965; Dear, 1985). Com estas observações, a radiação do gênero pode ter ocorrido fora do continente sul americano e as duas espécies, *C. hominivorax* e *C. macellaria*, podem ter sido introduzidas na América do Sul. No entanto, estudos anteriores apontam a América do Sul como o provável centro de diversidade e origem da mosca da bicheira (Infante-Malaquias, 1999) e nenhum estudo avaliando a dinâmica e estrutura genética de populações de quaisquer destas espécies foi realizada de uma forma abrangente fora da América do Sul, sendo assim, ainda prematuro defender o status de *C. hominivorax* como uma espécie introduzida.

Independente de qual seja o cenário que melhor descreva a história evolutiva desta espécie, fica evidente a influência humana na estrutura de populações desta praga da pecuária e do potencial de dispersão e adaptação da espécie, que deve ser considerada uma espécie de alto risco quando introduzida em um novo ambiente.

Geralmente, modelos de genética de populações ignoram a complexidade de sistemas biológicos. Estimativas de parâmetros evolutivos, como por exemplo fluxo gênico, raramente são válidas porque os parâmetros que definem estes modelos são variáveis espaciais e temporalmente e são muito sensíveis a forças evolutivas. Modelos convencionais pressupõem que a estrutura populacional e parâmetros demográficos como tamanho populacional e taxas de dispersão são uniformes e constantes no tempo e espaço. Pressupostos de equilíbrio demográfico e genético não são realistas e são, naturalmente, violados, como verificado nas populações de *C. hominivorax* da América do Sul.

Como apresentado nos capítulos 4 e 5, a estrutura populacional de *C. hominivorax* não segue os modelos clássicos de genética de populações. A ausência de equilíbrio, a manutenção da variabilidade em toda extensão analisada, a baixa diferenciação populacional e a ausência de correlação entre distâncias genéticas e geográficas levaram à rejeição da hipótese inicial formulada com base em estudos anteriores. Duas novas hipóteses foram propostas para tentar explicar os resultados obtidos:

1. As subpopulações de *C. hominivorax* seguem o modelo de metapopulações em uma escala microgeográfica e
2. Houve uma expansão recente da espécie no continente sul-americano, provavelmente coincidente com a introdução do gado e de sistemas de pecuária intensiva.

Para testar se as duas hipóteses, isoladamente ou combinadas, estão modelando a estrutura populacional de *C. hominivorax* na América do Sul, ainda são necessárias algumas investigações. Nas amostras já analisadas a comparação com marcadores do DNAm_t poderá ajudar na compreensão da expansão desta espécie, uma vez que estes marcadores apresentam uma taxa mais lenta de evolução podendo recuperar a história da expansão de *C. hominivorax*. Esta análise vem sendo conduzida em nosso laboratório através da técnica de PCR-RFLP (Lyra et al., 2005, M. L. Lyra, comunicação pessoal). Seria interessante, nesse contexto, que também fosse realizado o sequenciamento de regiões específicas do DNAm_t, tais como a região controle e a citocromo oxidase, subunidade I.

A análise de amostras da mosca da bicheira coletadas nas ilhas do Caribe, como Cuba e Jamaica, fornecerá um quadro mais completo ao longo de toda a distribuição geográfica atual desta espécie. Desta forma poder-se-á investigar se padrões semelhantes de variabilidade genética e diferenciação de populações são observados. Em particular, esta análise global da espécie também poderá sugerir um provável local de centro de origem da espécie.

Para verificar a dinâmica das subpopulações de *C. hominivorax*, uma abordagem microgeográfica deverá ser adotada. Associada a estudos ecológicos investigando dinâmica populacional e taxas de extinção e recolonização específicas para cada subpopulação, a análise utilizando os marcadores microsatélites desenvolvidos poderá gerar resultados acerca do tamanho populacional e padrões de recolonização, como rota e taxa de fluxo gênico.

Os dados obtidos neste estudo revelam um novo cenário muito mais complexo do que se havia imaginado para *C. hominivorax*, e, desta forma, as implicações para o estabelecimento de programas de controle não são intuitivas. Cada uma destas hipóteses tem implicações distintas em programas de controle.

Em *C. hominivorax*, há uma longa lista de sucesso em programas de erradicação através do SIT. O único caso de programa problemático ocorreu na Jamaica. M. J. B. Vreysen (comunicação pessoal) e Vreysen *et al.* (2005) atribuíram o insucesso do programa a problemas operacionais como ausência de estrutura de manejo, financiamento e monitoramento adequados ao funcionamento do SIT. Outras dificuldades foram associadas a problemas de base biológica como a falta de controle de qualidade das moscas liberadas e a ausência de estudos básicos em dinâmica, distribuição e densidade das populações-alvo, bem como de estudos de compatibilidade sexual. Estes parâmetros populacionais podem ser inferidos indiretamente através de estudos de genética de populações. Em estudos futuros, caso os padrões observados na Jamaica reproduzam os encontrados na América do Sul, será um alerta com relação à eficácia do programa no continente.

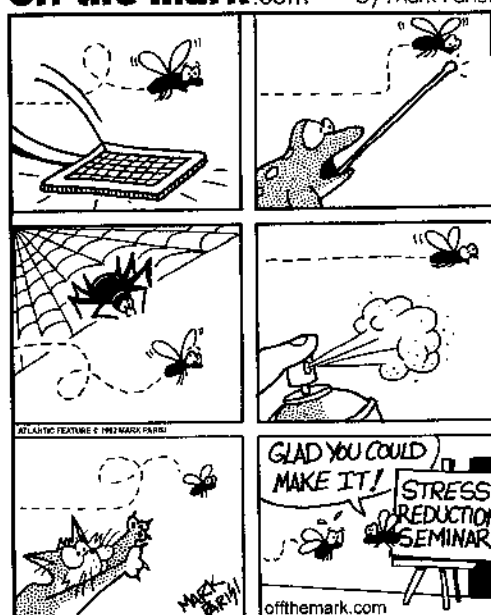
Como outro exemplo de uma iniciativa sem sucesso está a liberação de insetos estéreis de *C. capitata* em Israel entre janeiro de 2001 e agosto de 2002. A esperada redução nas populações de *C. capitata* não foi observada. Israely *et al.* (2005) alegaram que se acreditava que a mosca do mediterrâneo possuía uma habilidade restrita de migração e que era incapaz de migrar entre fragmentos. Os autores atribuíram o fracasso do SIT no país à dinâmica da espécie cujas populações eram efêmeras e sua manutenção dependia da migração por grandes distâncias.

Como nos locais onde houve programas de sucesso não foram realizados estudos prévios para a investigação da dinâmica e estrutura genética de populações de *C. hominivorax*, é difícil prever o resultado de programas semelhantes na América do Sul ou ilhas do Caribe. Caso o cenário proposto neste estudo seja confirmado por investigações adicionais, é provável que a melhor estratégia para o controle de populações de *C. hominivorax* seja uma ação sincronizada e de grande amplitude geográfica e não da forma como é realizado atualmente através de iniciativas isoladas. Também é importante para o sucesso do programa de controle que haja o uso de um sistema integrado, com o uso coordenado de diferentes métodos de controle e o aproveitamento das restrições climáticas para auxiliar na redução populacional. Somente dessa

7. Eventos de extinção e recolonização podem ter uma grande importância na estrutura genética de populações de *C. hominivorax*. Estas alterações demográficas podem ter sido causadas pela diminuição na temperatura e umidade no inverno e/ou aplicação recorrente de inseticidas, que podem ter causado mortalidade em massa e conseqüente redução ou extinção local de populações seguidas por recolonização em épocas favoráveis;
8. Devido à diferenciação temporal observada, é provável que a estivação, ou diapausa, tenha uma reduzida importância na manutenção das populações de *C. hominivorax* após estações desfavoráveis;
9. A recolonização ocorrida após a redução populacional na estação desfavorável é acompanhada pela manutenção da variabilidade genética que pode ter sido garantida devido a uma rápida taxa de crescimento das populações de *C. hominivorax*, o que também demonstra o potencial invasor da espécie em novos ambientes;
10. Neste estudo populacional, que é o mais abrangente já realizado na espécie, a ausência de equilíbrio foi acompanhada da manutenção da variabilidade em toda extensão analisada, da baixa diferenciação populacional e da ausência de correlação entre distâncias genéticas e geográficas;
11. A estrutura populacional de *C. hominivorax* pode ser um resultado de (A) eventos demográficos contemporâneos como redução ou extinção populacional, migração e recolonização; ou (B) eventos históricos como a expansão populacional com a introdução da pecuária;
12. A melhor estratégia para o controle de populações de *C. hominivorax* deverá ser uma ação sincronizada e de grande amplitude geográfica com o uso de um sistema integrado de controle, com o uso coordenado dos diferentes métodos disponíveis.

Parte

off the mark.com by Mark Parisi



Reproduzido com autorização do autor

ANEXOS

BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE
COLEÇÃO
UNICAMP

Received 9 November 2005; received in revised form 4 April 2006; accepted 4 April 2006

Cochliomyia hominivorax (Calliphoridae) is one of the most important myiasis-causing flies and is responsible for severe economic losses to the livestock industry throughout the Neotropical region. In Brazil, *C. hominivorax* has been controlled mainly with organophosphate (OP) insecticides, although the inappropriate use of these chemicals can result in the selection of resistant flies. Changes in carboxylesterase activity have been associated with OP insecticides in some arthropodan species. In this work, we isolated and characterized part of the E3 gene in *C. hominivorax* (*ChaE7*), which contained the same substitutions responsible for the acquisition of OP hydrolase activity in *Lucilia cuprina* (Calliphoridae). Digestion of the polymerase chain reaction products with a restriction enzyme that specifically recognized the mutation site unambiguously differentiated wild and mutated esterase alleles. The PCR-RFLP assay therefore provided a fast, reliable DNA-based method for identifying *C. hominivorax* individuals with a mutation in the esterase gene. Further bioassays to determine the association of this mutation with OP resistance in *C. hominivorax* should allow the development of more effective strategies for managing this species.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Carboxylesterase; Insecticide resistance; Myiasis; New World screw-worm; Pest management; PCR-RFLP

The infestation of live vertebrate hosts by dipteran larvae, a condition known as myiasis (Zumpt, 1965), remains an unsolved problem for animal production in Neotropical regions. *Cochliomyia hominivorax*

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 1141; fax: +55 19 3788 1089.

E-mail address: rassis@unicamp.br (R.A. de Carvalho).

The *LcaE7* gene (Newcomb et al., 1997b) encodes the major ali-esterase of *L. cuprina*, also known as esterase isozyme E3. *L. cuprina* *αE7* alleles from three strains (an OP-susceptible, a diazinon and a malathion-resistant) have been isolated and expressed in vitro (Campbell et al., 1998). Biochemical assays using these expressed proteins showed that a single amino acid substitution at position 137 (Gly137Asp) in the diazinon-resistant strain simultaneously abolished the ali-esterase activity and increased the rate of dephosphorylation to yield OP insecticide hydrolase activity, especially of diethyl OPs. Diethyl OP insecticides contain two ethoxy groups attached to their central phosphorus atom and are commonly used to control *C. hominivorax*. In contrast, malathion-resistant strain contained a different amino acid substitution (Trp251Leu) that conferred specificity towards dimethyl OPs (Campbell et al., 1998), which are not

Based on the foregoing studies, we have isolated and sequenced a region of the E3 gene in *C. hominivorax*, which is orthologous to that previously described for *L. cuprina* and contains the Gly137Asp and Trp251Leu mutations. The characterization of this sequence allowed the development of a rapid and efficient method for identifying Gly137Asp mutants of *C. hominivorax*.

2.1. Amplification and sequencing

2.1. Amplification and sequencing

The initial conditions were the same as described in Newcomb et al. (1997b) and, once the amplification conditions had been standardized, the PCR was done in a Perkin-Elmer 9600 thermal cycler. The 15 μ L PCR mix contained 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl,

Fig. 1. Alignment of the nucleotide sequences of the three alleles of *ChaE7* from *C. hominivorax* and of a heterozygote individual (GenBank accession numbers from DQ266357 to DQ266360) with the Lc743 cDNA clone of *LcaE7* from *L. cuprina* (GenBank accession number U56636). 'wild' represents the *C. hominivorax* wild genotype, while 'mut1' and 'mut2' represent the mutant genotypes and 'het' represents the heterozygote. The position of intron 3 was determined by comparison with the cDNA sequence of *LcaE7* from *L. cuprina* and is indicated with abutting arrowheads above the nucleotide sequence. The nucleotide sites responsible for the acquisition of the OP hydrolase activity are shaded. Dots indicate identity with the wild allele *ChaE7*. R = A/G, S = G/C, Y = C/T and W = A/T.

In addition to the Gly137/Asp mutation, a second mutation involved in OP resistance in *L. cuprina* was identified in *C. hominivorax* sequences. This second mutation, known as "malathion resistance" (Smyth et al., 2000), is specific for dimethyl OP resistance, while the Gly137Asp mutation, known as "diazinon resistance", is considered a general form of OP resistance (Hughes and McKenzie, 1987; Price, 1991). The residue Trp251, also predicted to be close to the catalytic residues, was substituted by Ser (Trp251Ser)

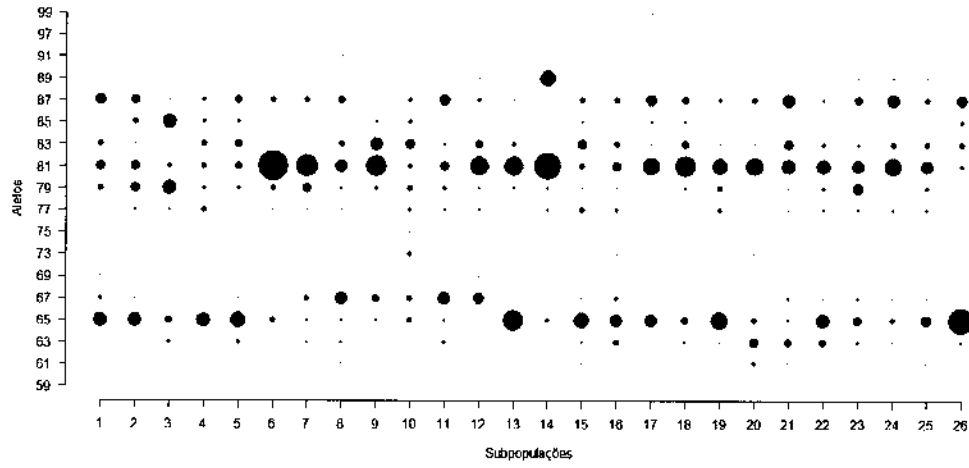
This approach, however, has a drawback in its application: it detects only one type of resistance, the esterase-based metabolic detoxification. Therefore, other resistance mechanisms, such as mutated target site or overexpression of detoxifying enzymes cannot be investigated, nor phenotypic resistance can be measured. Nevertheless, PCR-RFLP represents a fast, easy to use and reliable method for detecting Gly/Asp

- [illegible]

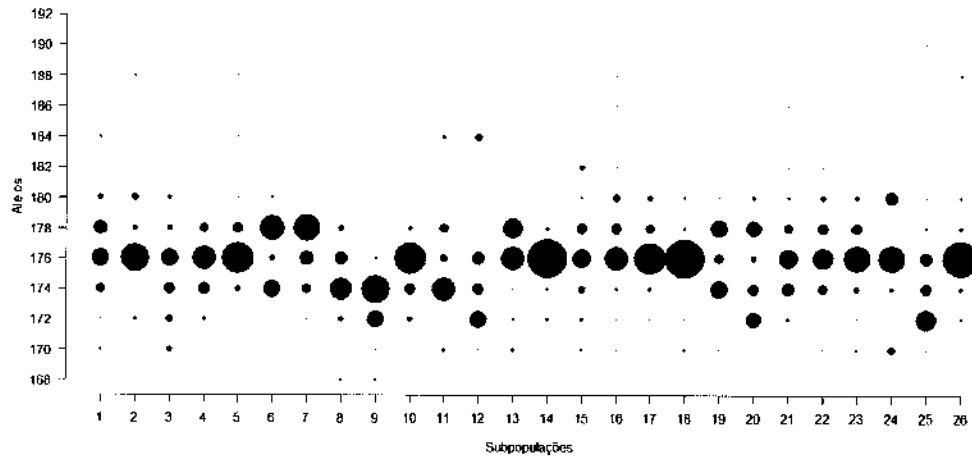
A bubble plot showing the number of alleles (Y-axis, 85 to 105) versus subpopulations (X-axis, 1 to 26). The size of each bubble represents the number of individuals (N) in that subpopulation. Most subpopulations have a high number of alleles (around 101-102), while subpopulation 9 has a significantly lower number of alleles (around 91).

The bubble plot displays the relationship between 26 subpopulations (x-axis) and 51 alleles (y-axis). The size of each bubble represents the frequency of a specific allele in a specific subpopulation. The y-axis is labeled 'Alelos' and ranges from 134 to 184. The x-axis is labeled 'Subpopulações' and ranges from 1 to 26. The plot shows that many alleles are present across multiple subpopulations, with some alleles showing higher frequencies in specific groups.

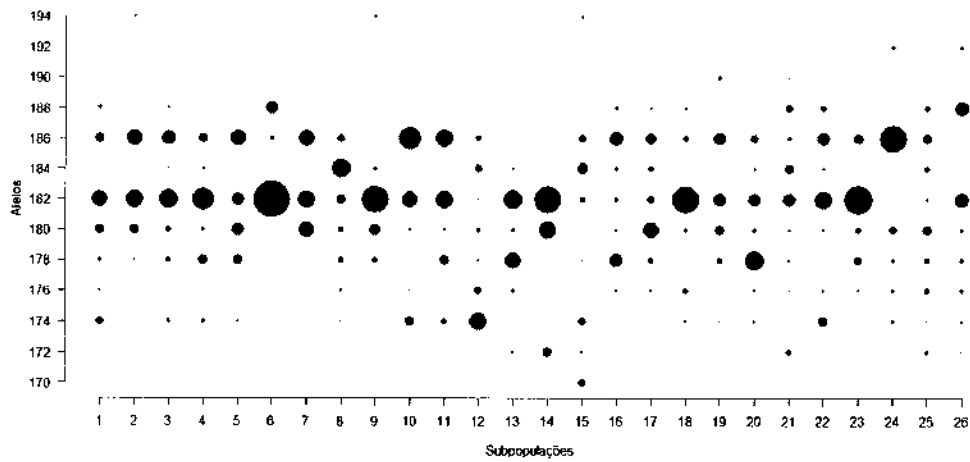
Frequência dos alelos - Loco CH12

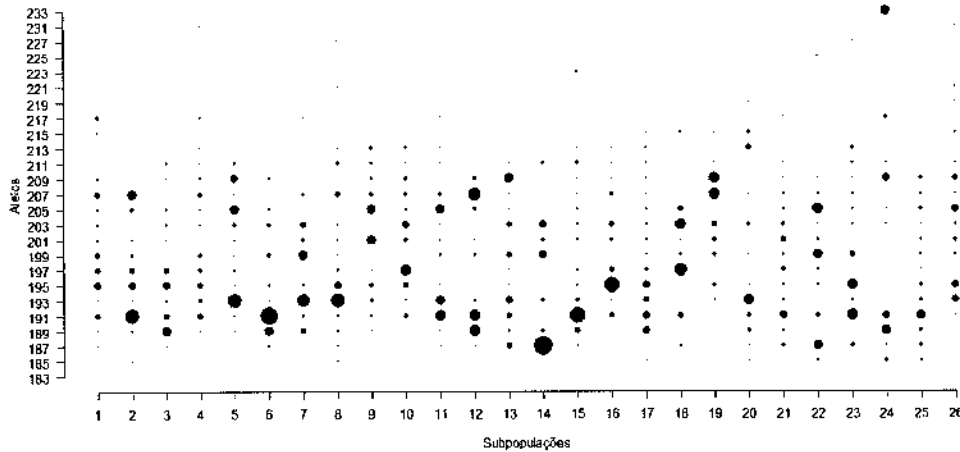
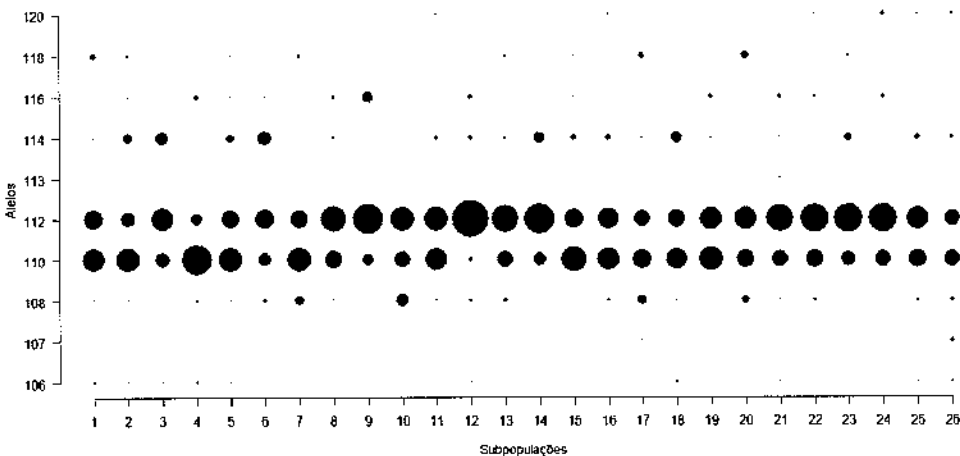


Freqüência dos alelos - Loco CH14



Frequência dos alelos - Loco CH15





	Dayman	San Antonio	Carro Colorado	Colônia	B. de Medina	Joaquín Suárez	Paso Muñoz	Pirineiro Machado	Fagundes Varela	São Ant. Missões	Carambel	Estiva	S.S. do Paraíso	Campo Grande	Costa Rica	Calapônia	Goianira	Goianita	Cocalinho	S.M. das Barrerias	Barquilha-melo
Dayman	0.0139	0.0144	0.018	0.0252	0.0601*	0.0215	0.0298*	0.0567*	0.0168	0.0232	0.0211	0.0255*	0.0071	0.0465*	0.0173	0.0248*	0.0177	0.0381	0.0175*	0.0279*	
San Antonio	50.68	0.0174	0.0087	0.0195*	0.0685*	0.0214	0.0302	0.0401	0.0152	0.0306*	0.0227*	0.0123	0.0253	0.0537	0.0240*	0.0226	0.0127	0.0473*	0.0218	0.0250*	
Cerro Colorado	338.70	377.39	0.0189	0.0185	0.0650*	0.0319*	0.0454*	0.0480*	0.0207	0.0344*	0.0280*	0.0396*	0.0301*	0.0463*	0.0235*	0.0343*	0.0154	0.0453*	0.0209*	0.0474*	
Colônia	312.25	322.73	222.11	0.006	0.0633*	0.0301	0.0335	0.0437	0.0169	0.0187*	0.0197*	0.0222*	0.0089	0.0242	0.0117	0.0201	0.0211	0.0427	0.0205	0.0312*	
B. de Medina	358.17	408.20	199.44	389.35	0.0820*	0.0283	0.0422*	0.0285	0.0320	0.0284*	0.0162*	0.0211*	0.0295	0.0441	0.0232*	0.0403*	0.0225	0.0259*	0.0296*	0.0281*	
Joaquín Suárez	389.62	418.91	106.22	169.08	304.64	0.0585	0.0750*	0.0852*	0.0625*	0.0873*	0.0834*	0.0567*	0.0483*	0.0682*	0.0530*	0.0804*	0.0608*	0.1036*	0.0653*	0.0924*	
Paso Muñoz	159.92	209.71	280.12	362.66	218.41	366.94	0.0327*	0.0468*	0.0344	0.0410*	0.0277	0.0371*	0.0144	0.042	0.0200*	0.0416*	0.0263	0.0650*	0.0305*	0.0439*	
Pirineiro Machado	442.40	492.96	325.21	526.02	127.52	428.84	285.07	0.0482	0.0409	0.0338*	0.0323*	0.0326*	0.0305	0.0465	0.0282*	0.0228	0.0252	0.0717*	0.0358*	0.0367*	
Fagundes Varela	692.62	727.42	659.97	847.82	460.53	764.74	531.28	336.63	0.0685	0.0561*	0.0412*	0.0167	0.0650	0.0643	0.0296	0.0452	0.0237	0.0583	0.0493	0.0627*	
São Ant. Missões	443.29	473.76	586.31	707.29	438.69	896.15	344.84	385.09	349.27	0.0271	0.0311*	0.0308	0.0163	0.0533	0.0179	0.0358	0.0249	0.0414	0.0140	0.0304*	
Carambel	1084.00	1119.91	1127.93	1300.85	929.35	1233.78	954.71	809.06	474.41	651.55	0.0200*	0.0314*	0.0146	0.0529*	0.0217*	0.0286	0.0323*	0.0279*	0.0297*	0.0408*	
Estiva	1570.06	1608.17	1574.74	1764.93	1375.95	1677.93	1433.02	1249.55	916.86	1144.34	494.32	0.0252*	0.0286	0.0386	0.0199*	0.0366*	0.0326*	0.0268	0.0298*	0.0337*	
S.S. do Paraíso	1624.90	1837.38	1868.46	1845.55	1469.13	1773.71	1489.15	1345.94	1008.72	1185.99	545.01	197.81	0.0379*	0.0599	0.0220	0.0319*	0.0166	0.0428	0.0346*	0.0251*	
Campo Grande	1296.49	1308.03	1498.19	1594.18	1330.50	1597.90	1238.96	1247.27	991.80	901.97	686.09	919.14	796.82	0.0255	0.0158	0.0197	0.0315	0.0404	0.0166*	0.0380*	
Costa Rica	1541.34	1555.87	1721.83	1832.35	1544.89	1824.18	1472.69	1451.05	1165.61	1129.89	778.72	890.38	696.75	261.11	0.0281	0.0319	0.0465	0.0709	0.0318	0.0799*	
Calapônia	1755.00	1771.64	1919.71	2040.44	1736.81	2023.55	1678.82	1636.61	1334.48	1334.26	907.42	853.79	674.86	487.33	226.29	0.0146	0.0228*	0.0310*	0.0107*	0.0322*	
Goianira	1903.16	1925.36	2030.60	2172.16	1838.94	2136.37	1809.86	1728.54	1406.00	1467.02	943.06	754.68	55								

Tabela II. Diferenciação populacional (estimativas de F_{ST}) entre pares de populações da América do Sul, excluindo as amostras de 2003 do Uruguai (grupo 2), diagonal superior. Na diagonal inferior estão as distâncias geográficas entre os pares (em km).

	Joaquín Suarez	Colonía	San Antonio	B. de Medina	Cerro Colorado	Pinheiro Machado	Fagundes Varela	Sio Ant. Missões	Carambel	Estiva	S.S. do Paraiso	Costa Grande	Calapônia	Goianira	Goiania	Cocalinho	S.M. das Barreiras	Barquisi- meio
Joaquín Suarez		0.0824*	0.0405*	0.0213 ^{NS}	0.0424*	0.0557*	0.0636*	0.0376*	0.0326*	0.0386*	0.0556*	0.0130*	0.0363*	0.0443*	0.0473*	0.0467*	0.0259*	0.0610*
Colonía	169.08		0.1103*	0.0841*	0.1049*	0.1228*	0.1058*	0.1302*	0.1105*	0.1008*	0.1071*	0.1131	0.1300*	0.0860*	0.1092*	0.1144*	0.1005*	0.1193*
San Antonio	418.91	322.73		0.0267	0.0637*	0.0775*	0.0718*	0.055	0.0421*	0.0464*	0.0325	0.0284	0.0604	0.0487*	0.0513*	0.0398*	0.0464*	0.0740*
B. de Medina	304.64	399.35	408.20		0.0557*	0.0659*	0.0916	0.0584	0.0483*	0.0581*	0.0631*	0.0163	0.0337	0.0371*	0.0337	0.0528	0.0595	0.0856*
Cerro Colorado	106.22	222.11	377.39	199.44		0.0880*	0.0896	0.0882*	0.0809*	0.0808*	0.0902*	0.0651*	0.0723*	0.0524*	0.0714*	0.0776*	0.0566*	0.1060*
Pinheiro Machado	428.84	526.02	492.96	127.52	325.21		0.0482	0.0409*	0.0338*	0.0323*	0.0326*	0.0305	0.0455	0.0282*	0.0228	0.0252	0.0717*	0.0367*
Fagundes Varela	764.74	847.82	727.42	460.53	659.97	336.63		0.0685	0.0561*	0.0412*	0.0167*	0.065	0.0643	0.0296*	0.0452	0.0237	0.0583	0.0627*
Sio Ant. Missões	686.15	707.29	473.76	438.69	596.31	385.09	349.27		0.0271	0.0311*	0.0308	0.0163	0.0533	0.0179	0.0358	0.0249	0.0414	0.014
Carambel	1233.78	1300.85	1119.91	929.35	1127.93	809.06	474.41	651.55		0.0200*	0.0314	0.0146	0.0529*	0.0217*	0.0286	0.0323	0.0279*	0.0408*
Estiva	1677.93	1764.93	1608.17	1375.95	1574.74	1249.55	916.86	1144.34	494.32		0.0252*	0.0286*	0.0386	0.0199*	0.0368*	0.0326*	0.0268	0.0337*
S.S. do Paraiso	1773.71	1845.55	1837.38	1469.13	1668.45	1345.94	1008.72	1185.99	545.01	197.81		0.0379*	0.0599	0.0220*	0.0319*	0.0166	0.0428	0.0251*
Campo Grande	1597.90	1594.18	1308.03	1330.50	1498.19	1247.27	991.80	901.97	686.09	919.14	796.82		0.0255	0.0158	0.0197	0.0315	0.0404	0.0380*
Costa Rica	1824.18	1832.35	1555.87	1544.69	1721.83	1451.05	1165.61	1129.89	778.72	860.38	696.75	261.11		0.0281	0.0319	0.0465	0.0709	0.0799*
Calapônia	2023.55	2040.44	1771.64	1736.81	1919.71	1636.61	1334.48	1334.26	907.42	863.79	674.86	487.33	226.29		0.0146	0.0228*	0.0310*	0.0322*
Goianira	2136.37	2172.16	1925.36	1838.94	2030.60	1728.54	1406.00	1467.02	943.06	754.68	557.01	704.68	458.22	262.83		0.0265	0.0482*	0.0506*
Goiania	2126.01	2162.66	1917.10	1828.24	2020.20	1717.47	1394.35	1457.90	930.63	739.87	765.23	702.08	457.94	267.52	14.81		0.0413*	0.0381*
Cocalinho	2299.63	2311.87	2036.03	2015.05	2196.32	1915.03	1614.59	1607.64	1182.81	1081.50	884.49	732.48	490.36	280.17	342.71	356.68		0.0646*
S.M. das Barreiras	2952.47	2970.16	2696.95	2682.88	2848.19	2558.90	2245.56	2284.21	1790.70	1566.50	1376.71	1392.83	1141.08	929.96	850.42	863.71	661.07	
Barquisi- meio	5180.05	5102.99	4780.85	4986.20	5102.80	4937.72	4737.06	4554.38	4421.81	4424.52	4228.24	3757.42	3647.80	3571.34	3680.44	3695.05	3344.14	3024.99

Brondani, R. P. V., Brondani, C., Tarchini, R. & Gattapaglia, D. (1998). Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**: 816-827.

Brookfield, J.F.Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, **5**: 453-455.

Bush, G.L. & Neck, R.W. (1976). Ecological genetics of the Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) and its bearing on the quality control of mass reared insect. *Environmental Entomology*, **5**: 821-826.

Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C. & Sutherland, G.R. (1993). Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)_n microsatellite marker. *American Journal of Human Genetics*, **52**: 922-927.

Chambers, G.K. & MacAvoy, E.S. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **126**: 455-476.

Chung, M.Y., Ranum, L.P.W., Duvick, L.A., Servadio, A., Zoghbi, H.Y. & Orr, H.T. (1993). Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type-I. *Nature genetics*, **5**(3): 254-258.

Cornuet J.M. & Luikart G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**:2001-2014.

Creste, S., Tulmann Neto, A. & Figueira, A. (2001). Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Reporter*, **19**: 299-306.

David, P., Perdieu, M.A., Pernot, A.F. & Jarne, P. (1997). Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution*, **51**(4): 1318-1322.

Dear, J.P. (1985). A revision of the New World Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **3**: 109-169.

Déka, R., Shriver, M.D. & Yu, L.M. (1994). Conservation of human chromosome 13 polymorphic microsatellite (CA)_n repeats in chimpanzees. *Genomics*, **22**: 226-230.

Dev, V., LaChance, L.E. & Whitten, C.J. (1986). Polytene chromosomes, karyotype correlations, and population cytology of the primary screwworm fly. *The Journal of Heredity*, **77**: 427-434.

Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., & Freimer, N.B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**: 3166-3170.

Dobson, A. (2003). Metalife! *Science*, **301**: 1488-1490.

Donnelly, M.J., Licht, M.C. & Lehmann, T. (2001). Evidence for recent population expansion in the evolutionary history of the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Molecular Biology and Evolution*, **18**(7):1353-1364.

Engel, S. R., Linn, R. A., Taylor, J. F. & Davis, S. K. (1996). Conservation of microsatellite loci across species of Artiodactyls: implications for population studies. *Journal of Mammalogy*, **77**: 504-518.

Eisen, J.A., 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (Eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, pp. 34-48.

Estoup, A., Tailliez, C., Cornuet, J.M. & Solignac, M. (1995). Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in 2 bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution*, **12** (6): 1074-1084.

Ewing, B. & Green, P. (1998). Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, **8**:186-194.

(FAO) Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1992). The New World screwworm eradication programme. North Africa 1988-1992. FAO, Rome, Italy.

(FAO) Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006). Livestock report 2006. FAO, Rome, Italy.

- FitzSimmons, N. N., Moritz, C. & Moore, S. S. (1995). Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **12**: 432-440.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gaggiotti, O.E., Lange, O., Rassmann, K. & Gliddon, C. (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, **8**, 1513-1520.
- Goldstein, D.B., Pollock, D.D. (1997). Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, **88**: 335-342.
- Goodman, S.J. (1997). Rst Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and a determining their significance. *Molecular Ecology*, **6**: 881-885.
- Goudet, J. (1995) Fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.
- Goudet, J., Raymond, M., de Meeüs, T. & Rousset, F. (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, **144**, 1933-1940.
- Guimarães, J.H., Papavero, N. & Prado, A.P. (1983). As Miíases na região Neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Revista Brasileira de Zoologia*, **1**(4):239-416.
- Guo, S.W. & Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**: 361-372.
- Hall, M. & Wall, R. (1995). Myiasis of human and domestic animals. *Advances in Parasitology*, **35**: 257-334.
- Hancock, J.M. (1999). Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D.B. & Schlotterer, C. (eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-9.
- Hanski, I.A. & Gaggiotti, O.E. (2004). *Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations*. Elsevier Academic Press, London, UK, 696p.
- Harrison, S., Hastings, A. (1996) Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 180-183.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. (1997). *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hedrick, P.W. (1999). *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, London.
- Hedrick P.W., Gilpin M.E. (1997) Genetic effective size of a metapopulation. In: *Metapopulation Biology, Ecology, Genetics and Evolution* (eds by Hanski I, Gilpin M.E.), Academic Press, San Diego, CA. pp. 165-181.
- Hite, J. M., Eckert, K. A. & ChengHall, K. C. (1996). Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)_nd(G-T)_n microsatellite. *Nucleic Acids Research*, **24**(12): 2429-2434.
- Hutter, C.M., Schug, D.M. & Aquadro, C.F. (1998). Microsatellite variation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: a reciprocal test of the Ascertainment Bias Hypothesis. *Molecular Biology and Evolution*, **15**(12): 1620-1636.
- Ibrahim, K. (2001). Plague dynamics and population genetics of the desert locust: can turnover during recession maintain population genetic structure? *Molecular Ecology*, **10**(3): 581-591.
- Infante-Vargas, M.E. & Azeredo-Espin, A.M.L. (1995). Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) from Brazil. *Biochemical Genetics*, **33**: 237-256.
- Infante-Malaquias, M.E. (1999). Estrutura genética de populações de *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) da região Sudeste do Brasil: análise através de três tipos de marcadores moleculares. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 122pp.
- Infante-Malachias, M.E., Yotoko, K.S.C & Azeredo-Espin, A.M.L. (1999). Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) from Southeastern Brazil and Northern Argentina. *Genome*, **42**: 772-779.

Infante-Vargas, M.E. (1994). Análise do DNA mitocondrial em populações de *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) do Estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 118pp.

Ingvarsson, P.K., Olsson, K. & Ericson, L. (1997). Extinction-recolonization dynamics in the mycophagous beetle *Phalacrus substriatus*. *Evolution*, **51**(1):187-195.

Innis, M.A. & Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCR. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (Eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press Inc., San Diego, Calif. pp. 3-12.

International Atomic Energy Agency (IAEA). (1999). Genetic Sexing and Population Genetics of Screwworms. Aug. 7-11, 2000, Vienna, Austria. 19 pp.

Israely, N., Ziv, Y. & Galun, R. (2005). Metapopulation spatial-temporal distribution patterns of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in a patchy environment. *Annals of the Entomological Society of America*, **98**(3): 302-308

Jarne, P & Lagoda, P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**(10): 424-429.

Johnson, J.A., Toepfer, J.E., Dunn, P.O. (2003). Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite population structure in fragmented populations of greater prairie-chickens. *Molecular Ecology*, **12**: 3335-3347.

Katti, M.V., Ranjekar, P.K. & Gupta, V.S. (2001). Differential Distribution of Simple Sequence Repeats in Eukaryotic Genome Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **18**:1161-1167

Kauffman, G. & Wasserman, M. (1957). Effects of irradiation on the screwworm, *Callitroga hominivorax* (Coq). University of Texas. Publication number 5721: 246-259.

Keller LF, Jeffery KJ, Arcese P, et al. (2001) Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **268**, 1387-1394.

Kim, I., Phillips, C.J., Monjeau, J.A., Birney, E.C., Noack, K., Pumo, D.E., Sikes, R.S. & Dole, J.A. (1998). Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Molecular Ecology*, **7**: 667-678.

Kimura, M., Crow, J. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**:725-738.

Kimura, M., Ohta, T. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **75**: 2868-2872.

Klassen, W. & Curtis, C. F. (2005). History of the Sterile Insect Technique. In: Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson, A. (eds.), Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, The Netherlands, pp. 3-36.

Knipling, E.F., & Rainwater, H. T. (1937). Species and incidence of dipterous larvae concerned in wound myiasis. *Journal of Parasitology*, **23**(5): 451-455.

Knipling, E.F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economical Entomology*, **48**(4): 459-462.

Krafsur, E.S. (1998). Sterile Insect Technique for Suppressing and Eradicating Insect Population: 55 Years and Counting. *Journal of Agricultural Entomology*, **15**(4): 303-317.

Krafsur, E.S. & Lindquist, D.A. (1996). Did the sterile insect technique or weather eradicate screwworms (Diptera: Calliphoridae) from Libya? *Journal of Medical Entomology*, **33**(6): 877-887.

Krafsur, E.S. & Whitten, C.J. (1993). Breeding structure of screwworm fly populations (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) in Colima, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, **30**: 477-480.

Krafsur, E.S. (2005). Role of Population Genetics in the Sterile Insect Technique. In: Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson, A. (eds.), Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, The Netherlands, pp. 389-406.

- Lehmann, T., Hawley, W.A., Kamau, L., Fontenille, D., Simard, F. & Collins, F.H. (1996). Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity*, **77**: 192-200.
- Levins, R. (1970). Extinction. In: Some Mathematical Problems in Biology (ed M. Desternhaber). American Mathematical Society, Providence, pp.77-107.
- Levinson, G. & Gutman, G.A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 203-221.
- Lindquist, D. A., Abusowa, M. & Klassen, W. (1993). Eradication of the New World screwworm from the Libyan Arab Jamahiriya. pp. 319-330. In: Proceedings: Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques. FAO/IAEA International Symposium, 19-23 October 1992, Vienna, Austria, STI/PUB/909. IAEA, Vienna, Austria.
- Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M. & Sherwin, W.B. (1998). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, **89**(3): 238-247.
- Lyra, M.L., Fresia, P., Gama, S., Cristina, J., Klaczko, L.B. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2005). Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal of Medical Entomology*, **42**: 589-595
- Massonet, B., Simon, J.C. & Weisser, W.W. Metapopulation structure of the specialized herbivore *Macrosiphoniella tanacetaria* (Homoptera, Aphididae) (2002). *Molecular Ecology*, **11**: 2511-2521.
- Mayer, D.G. & Atzeni, M.G. (1993). Estimation of dispersal distances for *Cochliomyia hominivorax* (Diptera, Calliphoridae). *Environmental Entomology*, **22**(2): 368-374.
- McCauley, D.E. (1991). Genetic consequences of local population extinction and recolonization. *Trends in Ecology and Evolution*, **6**: 5-8.
- McInnis, D.O. (1981). Cytogenetics of a Local Population of the Screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, From Northeastern Mexico. *Annals of the Entomological Society of America*, **74**(6):582-589.
- Meunier, C., Hurtrez-Bousses, S., Durand P., Rondelaud, D. & Renaud, F. (2004). Small effective population sizes in a widespread selfing species, *Lymnaea truncatula* (Gastropoda: Pulmonata). *Heredity*, **92**: 316-322.
- Meixner, M.D., McPheron, B.A., Silva, J.G., Gasparich, G.E. & Sheppard, W.S. (2002). The Mediterranean fruit fly in California: evidence for multiple introductions and persistent populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. *Molecular Ecology*, **11**, 891-899.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. (1996). A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, **142**(3):1061-1064.
- Muller, H.J. (1950). Radiation damage to genetic material. *American Scientist*, **38**:33-59.
- Myers, J.H., Savoie, A. & van Randen, E. (1998). Eradication and pest management. *Annual Review of Entomology*, **43**: 471-491.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89** (3): 583-590.
- Nei, M., Maruyama, T. & Chakraborty, R. (1975). Bottleneck Effect And Genetic-Variability In Populations. *Evolution*, **29** (1): 1-10.
- Norris, D.E., Shurtleff, A.C., Toure, Y.T. & Lanzaro, G.C. (2001). Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **38**(2): 336-340.
- Paetkau, D. & Strobeck, C. (1995). The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology*, **4**: 519-520.
- Pang, S.W.Y., Ritland, C., Carlson, J.E. & Cheng, K.M. (1999). Japanese quail microsatellite loci amplified with chicken-specific primers. *Animal Genetics*, **30**: 195-199.
- Pannell, J.R., Charlesworth, B. (2000). Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **355**: 1851-1864.

- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.D. & Fuerst, P.A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, **79**(2): 361-382.
- Pascual, M., Schug, D.M. & Aquadro, C.F. (2000). High density of long dinucleotide microsatellites in *Drosophila subobscura*. *Molecular Biology and Evolution*, **17**(8): 1259-1267.
- Pépin, L., Amigues, Y. & Lépingle, A. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogenetic analysis. *Heredity*, **74**: 53-61.
- Phillips, P.L., Welch, J. B. & Kramer, M. (2004). Seasonal and Spatial Distributions of Adult Screwworms (Diptera: Calliphoridae) in the Panama Canal Area, Republic of Panama. *Journal of Medical Entomology*, **41**(1): 121-129
- Piertney, S.B., MacColl, A.D.C., Bacon, P.J., Racey, P.A., Lambin, X., Dallas, J.F. (2000). Matrilineal genetic structure and female-mediated gene flow in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): an analysis using mitochondrial DNA. *Evolution*, **54**: 279-289.
- Primmer, C. R., Moller, A. P. & Ellegren, H. (1996). A wide range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, **5**: 395-378.
- Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J.M. (1999). BOTTLENECK: A computer program for detecting recent 536 reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**: 502-503.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E., & Hughes, C.R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, **8**: 285-288.
- R Development Core Team (2003). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-00-3, URL <http://www.R-project.org>.
- Rafalsky, J.A., Voguel, J.M., Morgante, M., Powell, W., Andre, C. & Tingey, S.V. (1996). Generating and using DNA markers in plants. In: Birren, B. and Lai, E. (eds.), *Analysis of Non-Mammalian Genomes – A Practical Guide*. Academic Press. pp 75-134.
- Rawlins, S.C. (1985). Current Trends in Screwworm Myiasis in the Caribbean Region. *Veterinary Parasitology*, **18**(3): 241-250.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Richardson, R.H., Ellison, J.R. & Averhoff, W.W. (1982a). Autocidal control of screwworms in North America. *Science*, **215**: 361-370.
- Richardson, R.H., Ellison, J.R. & Averhoff, W.W. (1982b). Mating types in screwworm populations? Reply. *Science*, **218**: 1143-1145.
- Rice, W.R. (1989) Analyzing table of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Rico, C., Rico, I. & Hewitt, G. (1996). 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences*, **263**: 549-557.
- Roed, K. H. (1998). Microsatellite variation in Scandinavian Cervidae using primers derived from Bovidae. *Hereditas*, **129**: 19-25.
- Roehrdanz, R.L. & Johnson, D.A. (1988). Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Journal of Medical Entomology*, **25**: 136-141.
- Roehrdanz, R.L. (1989). Intraspecific Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm Fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochemical Genetics*, **27**(9/10): 551-569.
- Roslin, T. (2001). Spatial population structure in a patchily distributed beetle. *Molecular Ecology*, **10**(4): 823-837.
- Rousset, F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. (1998). PRIMER 3. Code available at: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html

- Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E.F. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E. & Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17(5): 914-921
- Shriver, M.D., Jin, L., Chakraborty, R. & Boerwinkle, E. (1993). VNTR allele frequency distributions under the Stepwise Mutation Model - a computer-simulation approach. *Genetics*, 134: 983-993.
- Slatkin, M. (1993) Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*, 47, 264-279.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139(1): 457-462.
- Stajich, J. E., Block, D., Boulez, K., Brenner, S. E., Chervitz, S. A., Dagdigian, C., Fuellen, G., Gilbert, J.G., Korf, I., Lapp, H., Lehvaslaiho, H., Matsalla, C., Mungall, C. J., Osborne, B. I., Pocock, M. R., Schattner, P., Senger, M., Stein, L. D., Stupka, E., Wilkinson, M. D. & Birney, E. (2002). The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome Research*, 12(10):1611-1618.
- Strauss, B.S. (1999). Frameshift mutation, microsatellites and mismatch repair. *Mutational Research*, 437: 195-203.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.
- Taylor, C. E., & N. C. Manoukis. (2002). Effective population size in relation to genetic modification of *Anopheles gambiae* sensu stricto, pp. 133-146. In W. Takken and T. W. Scott [eds.], *Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Taylor, D.B. & Peterson II, R.D. (1994). Population genetics and gene variation in primary and secondary screwworm (DIPTERA: CALLIPHORIDAE). *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 626-633
- Taylor, D.B. , Peterson II, R.D. & Moya-Borja, G. (1996). Population genetics and gene variation in screwworms (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) from Brazil. *Biochemical Genetics*, 34: 67-76.
- Thomas, D. B. & Mangan, R.L. (1989). Oviposition and wound-visiting behaviour of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Annals of the Entomological Society of America*, 82: 526-534.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Thoren, P.A., Paxton, R. J. & Estoup, A. (1995). Unusually high-frequency of (CT)(n) and (GT)(n) microsatellite loci in a yellow-jacket wasp, *vespula-rufa* (l) (Hymenoptera, Vespidae). *Insect Molecular Biology*, 4(3): 141-148.
- Torres, T.T., Brondani, R.P.V., Garcia, J.E. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2004). Isolation and characterization of microsatellite markers in the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes*, 4, 182-184.
- Torres, T.T. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2005). Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes*, 4, in press.
- Toth, G., Gaspari, Z. & Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10:967-981
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, B., Wills, D. & Shipley, P. (2003). MICROCHECKER, microsatellite data checking software. <http://www.microchecker.hull.ac.uk/>.
- Vargas-Terán, M., Hofmann, H.C. & Tweddle, N.E. (2005). Impact of Screwworm Eradication Programmes Using the Sterile Insect Technique. In: Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson, A. (eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, The Netherlands, pp. 629-650.
- Vreysen, M.J.B., Gerardo-Abaya, J. & Cayol, J.P. (2005). Lessons Learned from Area-Wide Insect Pest Management Programmes with a SIT component: an FAO/IAEA Perspective. pp. 24-25. In: *Book of Extended Synopses of the FAO/IAEA International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests:*

