

LUCIANNE VIEIRA VARGAS HORLE



**Análise de Restrição de rDNA de Três Espécies de Dípteros
Muscóideos de Importância Médico-Veterinária**

este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) <i>Lucianne Vieira Vargas Horle</i> <i>de</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>8/2/96 x Lucianne Vieira Vargas Horle</i>

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia, da Universidade de
Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas, área
de Biologia Celular.

Orientadora
Profa. Dra. Shirlei M. Recco-Pimentel

Campinas, 1996



UNIDADE	BC
CHAMADA	T/UNICAMP
	H782a
Ex.	
BOC	27188
ROC	667196
C	☐
D	☒
REÇO	R\$ 11,00
DATA	30/03/96
CPD	C.N. 000264410-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

H782a Horle, Lucianne Vieira Vargas
Análise de restrição de rDNA de três espécies de
dípteros muscóideos de importância médico-veterinária
/ Lucianne Vieira Vargas Horle. -- Campinas, SP : [s.n.],
1996.

Orientador: Shirlei Maria Recco-Pimentel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Díptero. 2. Ácido desoxirribonucleico. 3. Mosca-
do-chifre. 4. Mosca varejeira. I. Recco-Pimentel, Shirlei
Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Local e Data: Campinas, 08/02/1996

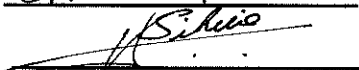
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

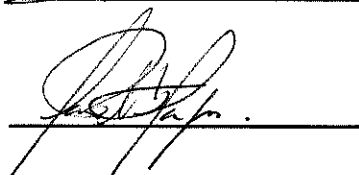
Prof.Dr. SHIRLEI MARIA RECCO-FIMENTEL (Orientador)



Prof.Dr. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA

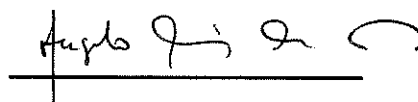


Prof.Dr. MARIA RISOLETA FREIRE MARQUES



SUPLENTE:

Prof(a).Dr(a). ANGELO PIRES DO PRADO



APROVADA

DEDICATÓRIA

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes, porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas: só nos obriga a sermos conscientes . Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditamos no nosso sonho, nada é por acaso.”

(Henfil)

Dedico a minha avó,
aos meus pais,
ao meu irmão,
e ao meu marido.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pela orientação, críticas, apoio e amizade.

À Dra. Rita Maria Pereira Avancini, pelas contribuições e críticas durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Wanderley Dias da Silveira, pelas valiosas críticas, pelas importantes contribuições, pelo incentivo e apoio indispensáveis à realização deste trabalho, além da amizade, atenção sempre concedidas e colaboração para que uma das etapas do trabalho fosse realizada em seu laboratório.

À Dra. Maria Risoleta Freire Marques, pelas discussões e sugestões feitas na análise deste trabalho.

Ao Dr. Ângelo Pires do Prado, pelas informações prestadas sobre as espécies estudadas neste trabalho e sugestões feitas na análise prévia da tese.

Ao amigo Rogério, por contribuir em algumas etapas metodológicas e na obtenção de alguns dos resultados, pelo apoio, incentivo e agradável convivência durante a realização deste trabalho.

À Dra. Laudénir Maria Prioli, pela atenção e colaboração para que uma das etapas do trabalho fosse realizada em seu laboratório no CBMEG.

À Dra. Maricilda Palandi de Mello, do CBMEG, pela atenção sempre concedida.

Ao amigo Guido, pela enorme e imprescindível ajuda, apoio, incentivo, atenção, paciência, amizade e muitas horas de alegria.

À amiga Fernanda, pelo incentivo, apoio, carinho, paciência e por muitos momentos de alegria.

Ao amigo Rubens, pela ajuda imprescindível ao computador e durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Sérgio, Fabiana, Marcelo e Alessandra, pelo grande apoio, incentivo, ajuda, atenção e agradável convivência.

À amiga Patrícia, pela ajuda nas coletas e troca de informações durante a realização deste trabalho.

À Rosângela do CBMEG, pela ajuda imprescindível em uma das etapas do trabalho e paciência.

Aos amigos do CBMEG, Ed, Sandra, Raquel, Li, Marcela e Luciana, pela ajuda, atenção e agradável convivência.

Aos amigos da Biologia Celular: Fernando, Arnaldo, Luciana, Christiane, Tatiana, Zé Ricardo, Dani, Estela, Paula, Marcelo, Silvy, Maurício, Odair, Alexandre, Selma, Márcio e Marco, pelo apoio e por terem tornado os dias de trabalho mais agradáveis.

À técnica de laboratório, Klélia, pela sua eficiência em manter o laboratório sempre em ordem e amizade.

Aos amigos Sidney, Liliam e Cidinha, pela ajuda, atenção e eficiência.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular.

Ao Departamento de Parasitologia pelo fornecimento das moscas.

Ao Léo, pela imprescindível ajuda no computador, paciência, carinho, incentivo, apoio, companheirismo e amor.

A CAPES e FAEP, pelo apoio financeiro fornecido durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, a minha Gratidão.

ÍNDICE

Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
1.1. As espécies em estudo	1
1.1.1 <i>Haematobia irritans</i>	1
1.1.2 <i>Muscina stabulans</i>	3
1.1.3 <i>Chrysomya putoria</i>	3
1.2. DNA ribossomal (rDNA) de eucariotos	4
1.2.1. Organização básica do rDNA	4
1.2.2. Heterogeneidade no comprimento da unidade de repetição em insetos	8
1.3. Evolução da família multigênica rDNA	11
1.4. O rDNA como marcador	14
1.5. Estudo comparativo de rDNA através de sítios de restrição	16
2. Objetivos	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Obtenção das moscas	19

3.2. Sondas	19
3.3. Extração e purificação em larga escala de DNA plasmidial	21
3.4. Extração de DNA genômico	22
3.5. Eletroforese em gel de agarose	23
3.6. Digestão de DNA genômico com enzimas de restrição	23
3.7. Transferência de fragmentos de restrição - “Southern-blot”	24
3.8. Marcação do DNA para obtenção das sondas não radioativas	24
3.9. Hibridização	25
3.10. Construção da curva padrão	26
4. Resultados	27
4.1. Extração e Digestão de DNA genômico	27
4.2. Identificação dos fragmentos por hibridização em filtro	32
4.2.1. Características gerais do rDNA nas três espécies	32
4.2.2. Comparação entre os mapas de restrição	43
4.2.3. Especificidades dos mapas	45
5. Discussão	48
5.1. Características gerais do rDNA nas três espécies	48
5.2. Particularidades	53
6. Conclusões	56
7. Referências Bibliográficas	57

RESUMO

O DNA ribossomal de três dípteros de importância médico-veterinária (*Haematobia irritans*, *Muscina stabulans* e *Chrysomya putoria*) foi analisado através do estudo dos sítios de restrição para as enzimas Eco RI, Bam HI, Hind III, Pst I, Sal I, Bgl II e Sma I em digestões simples e duplas.

Os plasmídios recombinantes pDm 238, HM 456, HM123 e pc Hi 18 foram marcados pelo método de “random priming” e detectados por quimioluminescência.

Os tamanhos estimados das unidades de repetição dos rDNAs de *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria* são, respectivamente, 9,8; 9,0 e 11,0 kb.

Comparando-se os mapas de restrição das três espécies entre si e com o de *Drosophila melanogaster* e de *Calliphora erythrocephala* verificou-se que os sítios para as enzimas Eco RI, Hind III, Bgl II e Sma I, da região codificadora 18S, e Pst I, na região transcrita interna (ITS), são altamente conservados. Na região do 28S em *M. stabulans* e *C. putoria* está presente o mesmo número de sítios Hind III, Bgl II, e Sma I, porém localizam-se em pontos diferentes. No rDNA das três espécies estudadas não foi identificado sítio para Bam HI e em *C. putoria* foi encontrado um segundo sítio Eco RI, localizado na região IGS. Apenas na espécie *H. irritans* foi possível localizar um sítio Bgl II na região IGS. Os mapas de restrição de *C. putoria* e *C. erythrocephala*, que pertencem à família Calliphoridae, são mais semelhantes entre si do que *H. irritans* e *M. stabulans*, da família Muscidae.

A presença de inserções no gene 28S, bem como de variação intraespecífica no tamanho de IGS, a exemplo do que é descrito para outros dípteros, seriam explicações para a presença de fragmentos adicionais, de bandas difusas e de fragmentos com tamanhos maiores ou menores do que os possíveis no mapa de restrição das três espécies.

As enzimas Eco RI, Bgl II e Hind III produzem um padrão de bandas, com a utilização da sonda pDm 238, que permite fazer a distinção do rDNA das três espécies entre si. A localização dos sítios de restrição do rDNA destas espécies poderá servir de base para estudos futuros de clonagem e sequenciamento, bem como estudos filogenéticos.

ABSTRACT

Three species of flies (*Haematobia irritans*, *Muscina stabulans*, and *Chrysomya putoria*) which present economic and sanitary importance had their rDNA studied and compared.

Genomic DNA obtained by phenol/chloroform extraction of proteins and ethanol precipitation of the DNA was digested with the restriction enzymes: Eco RI, Bam HI, Hind III, Pst I, Sal I, Bgl II and Sma I either in simple or double digestions. Probing DNA from each species with the recombinants plasmids pDm 238, HM 123, HM 456 and pcHi 18, identified some conserved sites and a few unique ones on each rDNA.

The conserved sites among the three studied species plus two species available from literature, *Drosophila melanogaster* and *Calliphora erythrocephala* were: Eco RI, Hind III, Bgl II and Sma I located in the coding region 18S and Pst I in the internal transcribed region (ITS). No Bam HI site was identified in any of the three flies. *M. stabulans* and *C. putoria* presented the same number of sites Hind III, Bgl II and Sma I in the coding region 28S but they mapped in different regions. Furthermore, *C. putoria* was the only fly presenting a second Eco RI site located in the intergenic region (IGS).

C. putoria had the longest rDNA cistron which was estimated to be 11Kb, when compared to *H. irritans* (9.8Kb) and to *M. stabulans* (9.0Kb). Restriction maps of the rDNA cistron in *C. putoria* and the other calliphorid, *Calliphora erythrocephala*, are more similar than maps of the two muscid, *H. irritans* and *M. stabulans*. A number of variant bands detected in some digestions may be explained by the presence of insertions in the 28S region as well as intraspecific variation in the IGS length as described in other Diptera.

Species-specific patterns were identified for the three flies when the DNA was digested with each of the following restriction enzymes Eco RI, Bgl II and Hind III (probed with pDm 238).

1. INTRODUÇÃO

1.1. AS ESPÉCIES EM ESTUDO

1.1.1. *Haematobia irritans* (Linnaeus), 1758 (Diptera: Muscidae)

Nome Popular : Mosca dos Chifres

Esta pequena mosca hematófoga é um parasita obrigatório externo do gado bovino e apresenta grande importância econômica. A mosca dos chifres foi introduzida nas Américas através dos EUA em gado importado do sul da França ao redor de 1886 (LANCASTER & MEISH, 1986). Na América do Sul, esta praga já é conhecida em quase todos os países. A primeira ocorrência relatada no Brasil foi em Boa Vista, Roraima, em 1980. Acredita-se que a mosca tenha entrado no território brasileiro através da fronteira com a Venezuela (VALÉRIO & GUITMARÃES, 1983). Tanto os indivíduos machos como as fêmeas, desta espécie, são sugadores que possuem uma probóscide proeminente similar a *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus), 1758, embora apresentem quase a metade do seu tamanho (MARCHIONDO, 1987). Enquanto se alimentam, normalmente se posicionam de cabeça para baixo. O nome comum “mosca dos chifres” se deve ao seu “habitat” original que correspondia à área circunvizinha às bases dos chifres do animal (WILLIAMS *et al.*, 1984).

O ciclo de vida da mosca dos chifres, desde ovo até adulto, varia de 8 a 12 dias no clima quente e de 30 a 45 dias em clima frio (MARCHIONDO, 1987). Cada fêmea produz de 20 a 24 ovos por ciclo de oviposição e aproximadamente 200 ovos durante toda a sua vida. Os ovos são alongados, apresentando comprimento de 1,3 a 1,5 mm e cor marron-avermelhada (WILLIAMS *et al.*, 1984).

A fêmea somente oviposita em fezes com umidade de 80 a 90% e que tenham sido recentemente eliminadas pelos bovinos ou bubalinos (MORGAN, 1964). Esta umidade não é mantida na superfície das fezes em razão da exposição ao ar e ao sol. Sendo assim, a porção mais interna, que tem sua umidade preservada, torna-se o habitat ideal para o desenvolvimento da larva da mosca dos chifres (PALMER & BAY, 1982).

A deposição dos ovos ocorre durante o dia inteiro. A incubação é afetada por temperatura e umidade, encontrando suas condições ótimas em torno de 32°C (LANCASTER & MEISH, 1986).

A pupariação ocorre na posição interna da placa de fezes ou no solo imediatamente abaixo dela. As pupas apresentam coloração marrom e comprimento de 3 a 4 mm (WILLIAMS *et al.*, 1984). Depois de 2 a 8 dias as moscas adultas emergem do pupário e após duas ou três horas iniciam sua alimentação no gado (MARCHIONDO, 1987). Os adultos vivem de 6 a 8 semanas. Infestações estimadas de 10.000 moscas em um único animal já foram relatadas, sendo comum a presença de centenas de moscas por cabeça de gado (LANCASTER & MEISH, 1986).

As moscas dos chifres se alimentam em intervalos de 25 - 30 minutos e com uma frequência de 20 a 40 vezes ao dia (HARRIS *et al.*, 1974). A retirada de sangue não é o único problema que estas moscas causam ao gado. A ocorrência de repetidas picadas de centenas de moscas, diariamente, produz incômodo e irritação no gado (LANCASTER & MEISH, 1986). A irritação causada pelas moscas pode reduzir o pastoreiro, interferir na digestão e assimilação normal de nutrientes e aumentar a perda de energia. O movimento brusco com a cabeça, o sacudir de rabo, o tremor do corpo e o pisar no chão com força são reações do gado relacionados à infestação. Estas mudanças comportamentais explicariam o papel desta praga na redução de ganho de peso e da produção de leite (GRANETT & HANSENS, 1957; PALMER & BAY, 1982; HARVEY & LAUNCHBAUGH, 1982). Além disso, as picadas múltiplas da probóscide da mosca na pele do animal causam sérias feridas, predispondo estes locais à invasão bacteriana (LANCASTER & MEISH, 1986).

As moscas dos chifres servem, ainda, como vetor biológico para o nematóide *Stephanofilaria stilesi*, (Chitwood), 1934 (Stephanofiliariidae) causador de dermatites normalmente associadas à região abdominal ventral do gado (MARCHIONDO, 1987).

Embora seja primariamente uma praga do gado bovino, a mosca dos chifres pode atacar também outros animais como carneiros e cavalos (WILLIAMS *et al.*, 1984).

O controle desta praga tem dependido quase que exclusivamente do uso de inseticidas (MARCHIONDO, 1987).

1.1.2. *Muscina stabulans* (Fallén), 1817 (Diptera: Muscidae)

Esta mosca é maior do que *Musca domestica*, porém é similar, podendo até ser confundida com esta última. As moscas adultas normalmente são encontradas próximas à habitação humana, especialmente em estábulos abertos, granjas de aves ou qualquer local onde exista material orgânico em decomposição, como lixeiras urbanas e etc (HEWITT, 1912; GREENBERG, 1971).

A larva madura tem 13 mm de comprimento e cor esbranquiçada. A pupa é lisa e apresenta cor marron-avermelhada no final do desenvolvimento (WILLIAMS *et al.*, 1984).

As larvas são encontradas em uma variedade de substratos, como frutas em decomposição, ovos quebrados, excrementos animais e em insetos mortos. Nos últimos estágios, as larvas podem ser predadores facultativos podendo ser encontradas atacando larvas de outros dípteros e também atacando filhotes de alguns passáros, como o pardal, causando a morte destes (HEWITT, 1912; GREENBERG, 1971). QUEIROZ & CARVALHO (1987) mostraram que as moscas adultas desta espécie apresentam atração por sardinha fresca, fígado cru de galinha e cebola em decomposição.

De maneira similar à mosca doméstica, este díptero está envolvido na transmissão mecânica de vários organismos patogênicos para o homem e animais (WILLIAMS *et al.*, 1984).

1.1.3. *Chrysomya putoria* (Wiedemann), 1830 (Diptera: Calliphoridae)

Nome popular : Mosca Varejeira

Esta espécie foi introduzida no Brasil a partir da região sul, provavelmente em torno de 1975, coincidindo com a chegada de navio de refugiados africanos provenientes de Angola e Moçambique (GUIMARÃES *et al.*, 1978). O gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy, representa um veiculador potencial de agentes patogênicos, pois há ocorrência de

poliovírus, *Salmonella* e outros patógenos entéricos nestas moscas no Velho Mundo (GREENBERG, 1971).

LIMA & LUZ (1991) observaram em Curitiba (PR) a presença de *E. Coli* enteropatogênica clássica em *C. putoria* coletadas em locais com condições sanitárias precárias. As moscas varejeiras possuem o hábito de visitar depósitos de lixo, aterros sanitários e carcaças de animais (LAURENCE, 1986; LIMA & LUZ, 1991). Estas são, ainda, atraídas por vísceras de galinha e fezes humanas (LINHARES, 1981).

O ovo de *C. putoria* tem aproximadamente 1mm de comprimento (ZUMPT, 1965) e a mosca adulta em torno de 6-10 mm de comprimento (GUIMARÃES *et al.*, 1978). Segundo GREENBERG (1971) esta espécie alimenta-se e oviposita em diferentes tipos de materiais orgânicos em decomposição.

Chrysomya putoria pode produzir miíase cutânea semi-específica. Miíase é a invasão em tecido vivo humano ou de outro animal vertebrado pela larva de díptero alimentando-se deste tecido por algum tempo (JAMES, 1947; ZUMPT, 1965). Esta espécie possui excelente adaptação a novos ambientes além de apresentar rápida dispersão (GUIMARÃES *et al.*, 1979; PRADO & GUIMARÃES, 1982).

1.2. DNA RIBOSSOMAL (rDNA) DE EUCARIOTOS

1.2.1. Organização básica do rDNA

Em organismos eucariotos, o DNA ribossomal é composto por unidades de repetição organizadas “in tandem” localizadas em sítio(s) do(s) cromossomo(s) denominado(s) de “região organizadora do nucléolo” (NOR). Cada unidade de repetição consiste de três elementos básicos: (1) segmentos correspondentes aos rRNAs maduros 18S, 5,8S e 28S; (2) sequências transcritas como parte de uma molécula precursora inicial mas não encontrada nos RNAs maduros (ITS: espaçador transcrito interno; ETS: espaçador transcrito externo); (3) sequências espaçadoras não transcritas (NTS: espaçador não transcrito, atualmente denominado de IGS: espaçador intergênico) (PERRY, 1976;

BECKINGHAM, 1982). O ETS encontra-se entre o promotor presente no IGS e o gene 18S. O ITS encontra-se entre as regiões codificadoras 18S e 28S. O ITS pode ser adicionalmente subdividido em ITS 1, o qual está localizado entre os genes 5,8S e 18S e ITS 2, que separa os genes 5,8S e 28S (Figura 1). Em insetos as regiões codificadoras 18S, 5,8S e 28S apresentam tamanhos estimados de 2Kb; 0,2Kb e 4Kb, respectivamente. (BECKINGHAM, 1982).

O número de unidades de repetição pode variar de 50 até 5000 por genoma haplóide em eucariotos (LONG & DAWID, 1980; BECKINGHAM, 1982).

Em *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae) as sequências correspondentes aos rRNAs 18S e 28S são repetidas e aglomeradas em duas regiões organizadoras nucleolares, uma no cromossomo X e outra no Y (RITOSSA *et al.*, 1965), sendo que cada aglomerado contém quase 250 genes de rRNA (TARTOF, 1979).

Mesmo sabendo-se que surgiram divergências na sequência do promotor para a polimerase I no decorrer da evolução (TAUTZ *et al.*, 1987) e que não há identidade nas sequências das outras regiões de IGS entre espécies próximas, há notável similaridade na região central do promotor para RNA polimerase I, com alta proporção de nucleotídeos pirimídicos e poli(A), em espécies de *Drosophila*, de *Glossina* (Glossinidae) e em *Aedes albopictus* (Culicidae) (TAUTZ *et al.*, 1987; CROSS & DOVER, 1987a; BALDRIDGE & FALLON, 1992). A região ETS difere muito na sequência sem apresentar efeito nas funções de rRNA nas espécies, por exemplo os ETSs entre *Glossina* e *Drosophila* são completamente divergentes, exceto por uma pequena sequência AACATA no limite entre ETS e o gene 18S (CROSS & DOVER, 1987b).

Em insetos superiores, o rRNA 28S sofre uma clivagem adicional para produzir duas moléculas: 28S α e 28S β . Estas moléculas possuem, cada uma, tamanho aproximado do rRNA 18S e estão ligadas entre si por pontes de hidrogênio (SHINE & DALGARNO, 1973). Análise em nível de microscopia eletrônica mostrou lacunas de 100-340pb entre as regiões codificadoras 28S α e 28S β do rDNA de insetos (PELLEGRINI *et al.*, 1977; WELLAUER & DAWID, 1977). WELLAUER & DAWID (1977) sugeriram que isto ocorre devido à eliminação de um segmento de cerca de 140pb do rRNA 28S. PELLEGRINI e colaboradores (1977) entretanto, consideraram que a clivagem que produz

os domínios α e β normalmente não é acompanhada pela perda de nucleotídeos, uma vez que apenas 10% das moléculas estudadas apresentaram lacunas (170pb) na região codificadora 28S.

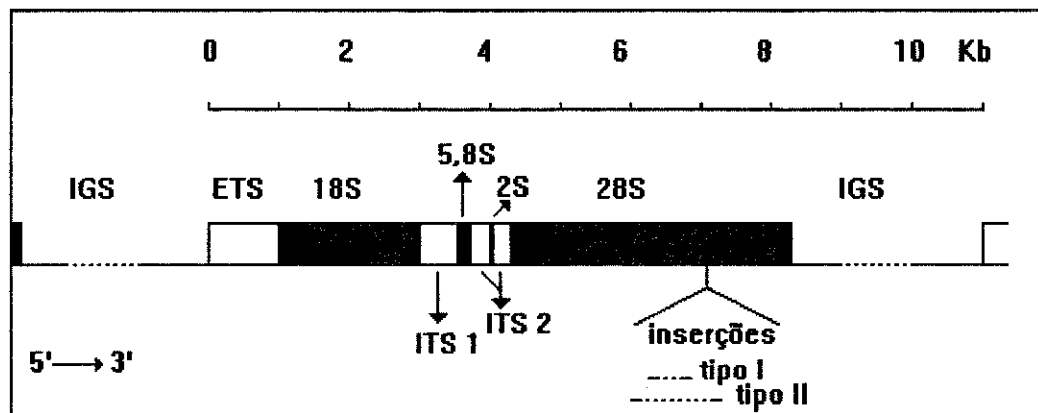


Figura 1- Estrutura da unidade de repetição de rDNA em *Drosophila melanogaster* (BECKINGHAM, 1982; WILLIAMS & ROBBINS, 1992).

A porção transcrita da unidade de repetição está representada por um retângulo e a porção não transcrita por uma linha. Os espaçadores que são transcritos estão representados por retângulos vazados e as sequências codificadoras de RNAs estão representadas por retângulos cheios. As linhas pontilhadas dentro da região intergênica e das inserções representam variação no comprimento.

Em *D. melanogaster*, além do rRNA 5,8S, há um outro tipo pequeno de RNA ligado por pontes de hidrogênio ao rRNA 28S, o rRNA 2S com 30pb. Experimentos demonstraram que os dois pequenos rRNAs surgem como resultado de um processamento pós-transcricional de RNA 28S e que as clivagens relacionadas a estes rRNAs ocorrem no citoplasma após a clivagem central do rRNA 28S que produz as moléculas 28S α e 28S β . O rRNA 2S não é encontrado nos eucariotos em geral nem mesmo em outros insetos (JORDAN *et al.*, 1976; JORDAN & GLOVER, 1977).

A existência de sequências espaçadoras no rDNA tem sido considerada por FEDEROFF (1979) como sendo simplesmente uma condição de equilíbrio em aglomerados de genes “in tandem”, ou que os espaçadores devem ter uma função não dependente da sequência. COEN & DOVER (1982) e DE WINTER & MOSS (1986) também sugeriram

um papel funcional não dependente da sequência de bases para esta região. TAUTZ e colaboradores (1987) propuseram que os espaçadores não transcritos contêm sinais importantes para regulação da transcrição, processamento dos transcritos e, provavelmente, replicação da unidade. REEDER (1989) propôs que os tipos de elementos de controle e sua organização dentro dos espaçadores não transcritos são completamente conservados na maioria dos eucariotos. Este pesquisador sugeriu a existência de pelo menos 6 tipos diferentes de elementos regulatórios: (1)- gene promotor na extremidade 5' da região codificadora do precursor de rRNA, (2)- um ou mais promotores-espaçadores acima do gene promotor, (3)- elementos que estimulam ("enhancers") o gene promotor, (4)- um terminador da transcrição acima do gene promotor, (5)- um ou mais terminadores na extremidade 3' da região codificadora do precursor rRNA e, (6)- origem de replicação do DNA. Cada unidade de repetição contém, no IGS, duas unidades de transcrição reconhecidas pela polimerase I, sendo que uma unidade inicia-se no gene promotor e termina na extremidade 3' da região codificadora do precursor e a outra inicia-se no promotor-espaçador e termina imediatamente acima do gene promotor (Figura 2).

BALDRIDGE & FALLON (1992) sugeriram que a sequência rica em A/T presente na parte central do promotor em insetos possua significância funcional do ponto de vista termodinâmico, facilitando a separação das fitas duplex de DNA e o início da transcrição.

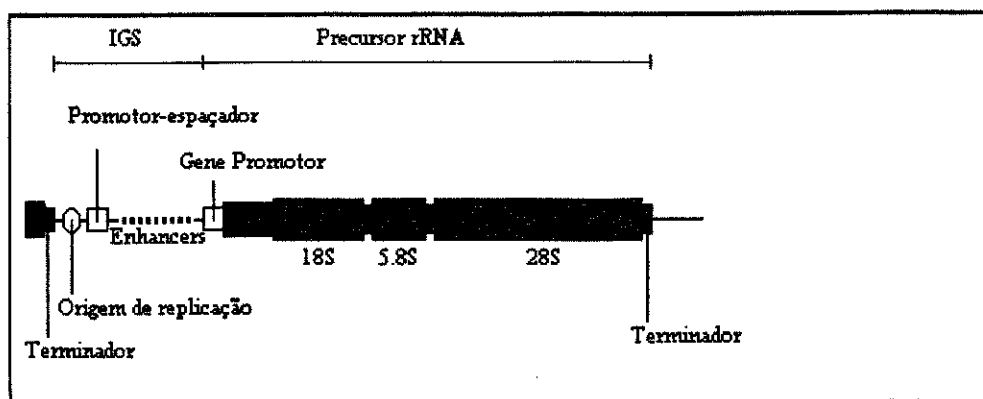


Figura 2- Elementos regulatórios de genes ribossomais presentes no IGS (REEDER, 1989).

1.2.2. Heterogeneidade no comprimento da unidade de repetição em insetos

A unidade de repetição do rDNA pode variar em tamanho, mesmo dentro da espécie, devido à presença de subrepetições no IGS ou de inserções na região codificadora 28S.

a) Subrepetições :

Apesar de pouca homologia nas sequências de bases nas regiões espaçadoras não transcritas entre *Drosophila melanogaster*, *D. virilis* e *D. hydei*, a similaridade na organização desta estrutura é notável. A região contém uma série de subrepetições curtas definidas através de sítios para as enzimas Alu I em *D. melanogaster*, Hpa II em *D. hydei*, Fnu DII e Hpa II em *D. virilis*. Nestas espécies, as subrepetições são de 240pb de comprimento, sendo que a diferença está relacionada com o número de subrepetições presentes em IGS (KUNZ *et al.*, 1981; RAE *et al.*, 1981; COEN *et al.*, 1982a). A comparação das subrepetições de 240pb presentes em IGS com as sequências que circundam o ponto de início da transcrição em *D. melanogaster*, *D. yakuba*, *D. simulans* e *D. teissieri* indica que a sequência altamente conservada no ponto de início da transcrição é duplicada dentro das subrepetições de IGS (HAYWARD & GLOVER, 1989). Estes pesquisadores sugerem que a duplicação deva ter uma significância funcional.

Comparação de clones de rDNA das subespécies *Chironomus thummi piger* (Chironomidae) (9,0Kb) e *C. thummi thummi* (~14,5Kb) mostrou que a diferença no tamanho dos cístrons é devida a um segmento adicional de DNA de cerca de 5Kb na região IGS, consistindo de elementos repetitivos. Estes elementos, com comprimento de aproximadamente 120pb, são organizados “in tandem” e caracterizados por sítios de restrição para a enzima Cla I (SCHMIDT, 1981; SCHAFER & SCHMIDT, 1981; SCHMIDT *et al.*, 1982; ISRAELEWSKI & SCHMIDT, 1982).

BECKINGHAM (1981) demonstrou que existem duas classes principais de unidades repetitivas de rDNA em *Calliphora erythrocephala* (Calliphoridae) que diferem entre si em

cerca de 1Kb de comprimento, devido à variação no IGS. SCHAFER e colaboradores (1981) revelaram que a variação é devida à alteração no número de subrepetições de 350pb, definidas pela presença de sítios para as enzimas Hpa I, Sau 3A e Alu I.

CROSS & DOVER (1987a) observaram a presença de subrepetições de 420pb na região IGS do rDNA de *Glossina morsitans morsitans* detectadas através de sítios de restrição Hha I. Na espécie *Aedes albopictus*, a região intergênica é mais longa do que a de *A. aegypti* devido à presença de subrepetições com múltiplos sítios para as enzimas Alu I, Sst I, Pvu I e Xho I (BLACK *et al.*, 1989; FALLON *et al.*, 1991). Em *Anopheles gambiae* (Culicidae) as subrepetições foram definidas pela presença de sítios Xho I (MCLAIN & COLLINS, 1989).

b) Inserções :

A presença de um segmento adicional de DNA, denominado íntron, inserção ou sequência interveniente que interrompe a região codificadora 28S também é responsável pela heterogeneidade de tamanho observada em algumas espécies de dípteros (BECKINGHAM, 1982).

A primeira demonstração de genes interrompidos no genoma de eucariotos foi feita em rDNA de *D. melanogaster*, no qual aproximadamente metade da região codificadora rRNA 28S continha inserção com 5,5Kb de comprimento (GLOVER & HOGNESS, 1977; WHITE & HOGNESS, 1977). PELLEGRINI e colaboradores (1977) através de análises a nível de microscopia eletrônica determinaram que aproximadamente 45% de todas as sequências codificadoras para o 28S possuem inserções, mas WELLAUER & DAWID (1977) relataram que 66% das unidades contém inserções em uma preparação de rDNA proveniente do cromossomo X. Esta discrepância foi resolvida com a informação de que existem dois tipos de inserções no rDNA desta espécie. Desta maneira, WELLAUER e colaboradores (1978) estabeleceram que 49% das unidades de rDNA contidas no cromossomo X contém inserções tipo I, sendo que destas 70% tem o comprimento de 5Kb e que 16% das unidades contém inserções tipo II com segmentos entre 1,5 e 4Kb. Uma porcentagem semelhante da inserção tipo II está também presente no rDNA do cromossomo

Y de *Drosophila*. ROIHA e colaboradores (1981) mostraram que os dois tipos de inserções presentes em *D. melanogaster* ocorrem em posições diferentes no gene 28S e são separados por 51pb. Um segmento curto de rDNA é deletado no local da inserção do tipo I, porém não ocorre deleção em sequências de rDNA vizinhas ao sítio da inserção do tipo II.

Em *D. hydei*, cerca de 45% dos genes rRNA do cromossomo X são interrompidos por inserções dentro da região 28S. Em contraste com *D. melanogaster*, estas inserções pertencem a uma única classe, com 6Kb. Embora nesta espécie existam dois organizadores nucleolares (NORs) no cromossomo Y, os genes que contêm inserções parecem estar restritos ao NOR presente no cromossomo X (RENKAWITZ-POHL *et al.*, 1980; KUNZ *et al.*, 1981). O rDNA de *D. virilis* também apresenta somente uma classe de inserção com comprimento de 5Kb, porém alguns cistrons podem conter duplicação “in tandem” desta sequência, ou seja inserções com 10Kb (RAE *et al.*, 1981).

BECKINGHAM & WHITE (1980) demonstraram que a posição da inserção dentro da região codificadora 28S β é a mesma nas espécies *D. melanogaster* e *Calliphora erythrocephala*, porém o padrão dos sítios de enzima de restrição dentro da inserção não apresenta similaridade com nenhum dos dois tipos encontrados em *D. melanogaster*. Através da análise com “Southern-blot”, BECKINGHAM (1981) revelou que a classe de inserção presente em rDNA de *C. erythrocephala* contém 6,1Kb e que apenas 5% das unidades de repetição possuem essas inserções.

MCLAIN & COLLINS (1989) demonstraram que o cístron rDNA de *Anopheles gambiae* contém genes 28S interrompidos por inserções e sugerem que estas sequências evoluem rapidamente já que não existe homologia detectável entre as inserções de várias espécies de *Anopheles*. COLLINS e colaboradores (1990) sugeriram a presença de inserções com 2,5Kb nas espécies *Anopheles freeborni* e *A. hermsi*. O rDNA da espécie *Glossina morsitans morsitans* contém inserções com 0,9; 1,3 e 1,8Kb (CROSS & DOVER, 1987a).

Estudo realizado com rDNA de *Sciara coprophila* (Sciaridae) revelou presença de três tipos de inserções, sendo que estes foram denominados tipos I, II e III contendo 5,6; 1,4-2,9 e 0,9-6,6Kb; respectivamente. Os tipos I e II correspondem aos tipos I e II encontrados em *D. melanogaster* (KERREBROCK *et al.*, 1989).

SCHMIDT e colaboradores (1982) não detectaram inserções nos rDNAs de *Chironomus thummi piger* e *C. thummi thummi*. O mesmo ocorre para a espécie *Aedes albopictus* (FALLON *et al.*, 1991).

Uma característica interessante das inserções refere-se à presença de repetições de sequências invertidas (100-400pb) nas extremidades destas (PELLEGRINI *et al.*, 1977). Estes pesquisadores especulam que estas sequências são elementos transponíveis.

LONG & DAWID (1979) constataram que em *D. melanogaster* os genes ribossomais que contém inserções não contribuem significativamente para a síntese de rRNA 28S. Estes pesquisadores sugerem que a transcrição ativa de genes ribossomais com inserções ocorra em algumas células especializadas nesta espécie, mas que estas células não constituem uma porcentagem alta da massa total do inseto.

1.3. EVOLUÇÃO DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA rDNA

Nos últimos anos, famílias multigênicas têm recebido considerável atenção em estudos evolutivos. Muitos destes estudos mostraram que os membros de uma família de genes são mais homogêneos nas sequências dentro do que entre espécies (COEN *et al.*, 1982a, b; DOVER, 1982; WILLIAMS *et al.*, 1987; BLACK *et al.*, 1989).

As famílias multigênicas apresentam papéis variados e estão relacionadas a diferentes funções biológicas. Muitas das proteínas estruturais envolvidas com a organização e segregação cromossômica, matriz extracelular, citoesqueleto, matriz nuclear, divisão celular e várias estruturas externas do organismo são produtos de famílias multigênicas. Todos os RNAs funcionalmente importantes envolvidos com a divisão ("splicing") de genes, processamento de RNA e maquinaria de tradução são também provenientes de famílias multigênicas. Além disso, sequências envolvidas com a estimulação e regulação da transcrição estão muitas vezes em cópias múltiplas (DOVER, 1986).

O número de cópias em uma família multigênica varia de 2 a mais de 10^6 . O genoma humano, por exemplo, contém a família ALU com mais de 500.000 cópias, entre as quais há somente uma pequena variação na sequência de nucleotídeos (FUTUYMA, 1992).

BROWN e colaboradores (1972) através de estudos comparativos de genes de RNA ribossomais de *Xenopus laevis* e *X. borealis* (Pipidae) notaram pela primeira vez que, enquanto os genes 18S e 28S destas espécies eram altamente similares, as regiões de espaçadores não transcritos eram muito diferentes. Em contraste, as regiões espaçadoras não transcritas eram parecidas dentro de cada indivíduo e entre indivíduos da mesma espécie. Desta maneira, parecia que as regiões IGS em cada espécie tinham evoluído juntas embora tenham rapidamente divergido entre as espécies. Estes pesquisadores concluíram que um mecanismo de correção deveria ocorrer para espalhar a mutação a partir de uma sequência espaçadora para as vizinhas, mais rápido do que novas mudanças pudessem surgir nesta sequência; eles denominaram este fenômeno de **evolução horizontal** em contraste com a evolução vertical que se refere à difusão de uma mutação através das gerações de uma população. Este fenômeno, em 1980, foi denominado de evolução combinada (“concerted evolution”) (LI & GRAUR, 1991). A família de rDNA foi a primeira a revelar o padrão de homogeneidade intraespecífico conhecido como evolução combinada, no qual unidades repetitivas compartilham mutações que são específicas para cada espécie (FEDEROFF, 1979; DOVER, 1982; 1986). Isto foi também observado em famílias de genes do sistema imune, dos RNAs nucleares pequenos (snRNA), das histonas, das globinas e em outras famílias gênicas independente do seu tamanho, função ou distribuição no cromossomo (DOVER, 1986).

Mecanismos evolutivos alternativos foram propostos para explicar a homogeneidade de famílias repetidas “in tandem” incluindo a hipótese “master-slave”, teoria de replicação saltatória e teoria da conversão democrática do gene (SMITH, 1973; FEDEROFF, 1979).

SMITH (1973) porém, considerou uma explicação mais plausível para a homogeneização de uma família que é repetida “in tandem” em um cromossomo, a de que seria consequência de permuta (“crossing-over”) desigual entre cromátides. Esta hipótese foi mais tarde confirmada por TARTOF (1974). A permuta desigual deve ocorrer entre duas cromátides irmãs de um cromossomo durante a mitose ou entre dois cromossomos homólogos na meiose. É um processo de recombinação recíproca que cria uma duplicação na sequência em uma das cromátides e uma deleção correspondente na outra. Como resultado da troca desigual, ambos os cromossomos filhos tornam-se mais homogêneos do

que o cromossomo parental (LI & GRAUR, 1991). A troca desigual pode ser detectada através de experimentos com bromodeoxiuridina ou com ^3H timidina (SMITH, 1976).

Outro processo considerado muito importante para a evolução combinada é a conversão gênica (DOVER, 1982). Este processo de recombinação não recíproca pode ocorrer entre genes distantes na mesma cromatíde, em cromossomos homólogos e em não homólogos. A conversão gênica consiste em transferir um gene ou segmento de um gene de um locus para outro mudando a frequência de dois tipos de repetição em somente um dos cromossomos filhos e não alterando o número total de repetições em cada cromossomo (LI & GRAUR, 1991). A permuta desigual parece ser mais importante do que a conversão gênica no caso de famílias de genes “in tandem” como as de rDNA e de histonas (OHTA & DOVER, 1983).

Além da permuta e da conversão gênica há outros mecanismos tais como, transposição e replicação que podem causar ganhos ou perdas de genes variantes em uma família (DOVER, 1982).

As trocas genéticas envolvendo permuta desigual ou conversão gênica podem apagar parte ou toda a diferença existente que tenha sido lentamente acumulada entre os genes, ou podem contribuir para a manutenção da homogeneidade nos membros de uma família multigênica dentro de espécies únicas. Tal homogeneidade é exemplificada pelos genes em famílias multigênicas que desenvolvem-se em evolução combinada, tanto que membros individuais de família multigênica dentro das espécies compartilham uma maior similaridade genética do que genes equivalentes a partir de espécies diferentes (MAEDA & SMITHIES, 1986; DOVER, 1986). Evolução combinada requer, não somente a transferência horizontal de mutações entre os membros da família (homogeneização), mas também o espalhamento de mutações para todos os indivíduos na população (fixação).

DOVER (1982, 1986) propôs o termo “impulso molecular” (molecular drive) para o processo que explica o padrão observado de “concerted evolution”. Como a seleção natural, o “impulso molecular” pode retardar ou acelerar o limite de evolução em uma região do DNA. Um exemplo de “impulso molecular” é o da própria família de genes de rDNA onde existem dados indicando uma coevolução molecular entre os múltiplos promotores/elementos estimuladores e os genes responsáveis pela polimerase I e cofatores

envolvidos com a transcrição de rDNA. Em vários grupos de espécies sabe-se que existe incompatibilidade molecular entre rDNA de uma espécie e a maquinaria de transcrição de outra espécie (DOVER, 1986).

1.4. O rDNA COMO MARCADOR

Muitos estudos evolutivos de DNA envolvem os genomas de organelas como cloroplastos e mitocôndrias. A rápida evolução de DNA mitocondrial, ligada à herança materna, faz com que esta seja uma ferramenta útil para estudos evolutivos intraespecíficos em nível de populações e espécies proximamente relacionadas. Entretanto, por evoluírem rapidamente há uma limitação com relação à escala do tempo no qual o DNA mitocondrial pode fornecer informação útil. O DNA de cloroplastos é evolutivamente mais conservado do que o DNA mitocondrial, porém este é limitado às plantas (HILLIS & DAVIS, 1986).

O DNA ribossomal pode ser especialmente útil para estudos evolutivos por várias razões: (1) é altamente repetido “in tandem”, (2) o comprimento da unidade de repetição de rDNA está dentro de um limite que pode ser examinado por análise de fragmento de restrição, (3) possui regiões conservadas e não conservadas (IGS) e (4) evolui através do mecanismo de evolução combinada. Assim, o rDNA de um único indivíduo normalmente é representativo da espécie (HILLIS & DAVIS, 1986).

Desta maneira, os genes ribossomais podem ser úteis para estudos filogenéticos tanto em distâncias evolutivas pequenas quanto longas. Comparações entre rDNAs de *Xenopus* e humano mostraram enorme similaridade entre as sequências dos genes ribossomais, mas considerável divergências entre segmentos espaçadores como o ETS (WILSON *et al.*, 1984).

HILLIS & DAVIS (1986) mostraram que análises de sítios de restrição de rDNA do gênero *Rana* (Ranidae) forneciam informações sobre a evolução dentro e entre as espécies deste gênero que compartilham um ancestral há aproximadamente 50 milhões de anos. Em estudo posterior, realizado em 54 espécies de rãs e 2 espécies de salamandras, HILLIS &

DAVIS (1987) propuseram que a localização de regiões de variabilidade dentro do gene 28S em anfíbios facilitaria investigações filogenéticas baseadas em rDNA.

Segundo KAMBHAMPATI & RAI (1990) os resultados de variação temporal no IGS presente em rDNA de populações de *A. albopictus* é similar ao encontrado em estudos anteriores que utilizaram aloenzimas como marcador. LUPOLI e colaboradores (1990) demonstraram que a utilização de rDNA de *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera, Aphididae) como marcador genético apresenta melhores resultados do que eletroforese de aloenzimas, pois este método não foi capaz de diferenciar populações desta espécie.

Estudos de rDNA, em vários grupos de espécies de dípteros, incluindo as do complexo *A. gambiae*, grupo de *D. melanogaster* e várias espécies de *Glossina* mostraram que o rDNA é um marcador sensível para espécies proximamente relacionadas (COLLINS *et al.*, 1987; TAUTZ *et al.*, 1987; CROSS & DOVER, 1987a; b).

A filogenia molecular de espécies proximamente relacionadas é geralmente obtida a partir de estudos comparativos de regiões de DNA que se desenvolvem rapidamente como o DNA mitocondrial, porém SCHLOTTERER e colaboradores (1994) propuseram, através de estudo de rDNA realizado com espécies do gênero *Drosophila* e com *Musca domestica*, que as sequências ITS podem ser utilizadas para este propósito, pois estas existem em todos os eucariotos e evoluem rapidamente pelo menos em comparação com regiões codificadoras de rDNA.

Apesar disso OHTA & DOVER (1983) sugeriram que a utilização de famílias multigênicas como marcadores genéticos pode dificultar a interpretação, devido ao processo de evolução combinada. O grau de homogeneidade encontrado em sequências repetidas “in tandem” depende do balanço entre o limite de “homogeneização” e o de mutações. Se o limite de “homogeneização” é menor que o de mutações poder-se-ia encontrar sequências variantes, entretanto se o nível de polimorfismo for baixo, então não há restrições (SCHLOTTERER *et al.*, 1994).

1.5. ESTUDO COMPARATIVO DE rDNA ATRAVÉS DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO

Em alguns grupos de Diptera, famílias de genes de rDNA têm sido estudadas para fazer comparações intraespecíficas e em diferentes níveis taxonômicos (CROSS & DOVER, 1987b; TAUTZ *et al.*, 1987; BEACH *et al.*, 1989; BLACK *et al.*, 1989; COLLINS *et al.*, 1990). Regiões distintas do rDNA evoluem a taxas diferentes. Essas variações existentes nas diferentes regiões do rDNA podem ser estudadas através de mapas de restrição e/ou de sequenciamento (BEACH *et al.*, 1989; BLACK *et al.*, 1989; PORTER & COLLINS, 1991).

Variações interespecíficas dos sítios de restrição no IGS foram descritas em *Didelphis aurita* e *D. albiventris* (Marsupial, Didelphidae), mas não existe variação intraindividual porque talvez exista um processo rápido de homogeneização entre as diferentes unidades de repetição destes mamíferos (SILVA *et al.*, 1995).

A análise de restrição da unidade de transcrição de rDNA em primatas, como chimpanzé pigmeu (*Pan paniscus*), chimpanzé comum (*Pan troglodytes*), gorila (*Gorilla gorilla*), orangotango (*Pongo pygmaeus*) e macaco rhesus (*Macacca mulatta*), revelou considerável conservação no comprimento da região ETS e região IGS adjacente entre estas espécies de primatas. Através disto, uma filogenia entre os primatas foi construída baseando-se na estrutura do rDNA (WILSON *et al.*, 1984).

Através da análise de sítios de restrição do rDNA, em populações de vegetais pertencentes ao complexo *Lisianthus skinneri* (Gentianaceae), foi verificado que ocorre variação no comprimento do ITS dentro e entre indivíduos das populações, porém o IGS não varia dentro de populações ou indivíduos (SYTSMA & SCHAAL, 1990).

BLACK e colaboradores (1989) revelaram através de mapa de restrição que os espaçadores não transcritos são pouco conservados entre e dentro de populações de *Aedes albopictus* (Culicidae) do mundo inteiro, demonstrando assim que não existe relação entre o comprimento do IGS e a proximidade geográfica das populações.

FILES & HIRSH (1981) mostraram, através de mapa de restrição, que duas espécies de nematódeos proximamente relacionadas, *Caenorhabditis elegans* e *C. briggsae*,

(Rhabditidae) apresentavam divergências na região IGS, como sítios adicionais distintos além de diferenças, na região codificadora destas espécies.

Heterogeneidade intraespecífica e interespecífica no comprimento de IGS, demonstradas em espécies de *Drosophila* através de análise de restrição foi atribuída às subrepetições presentes nesta região (KUNZ *et al.*, 1981; WILLIAMS *et al.*, 1985).

Diferenças intraespecíficas e interespecíficas em IGS foram observadas em espécies de *Anopheles gambiae*, *A. melas*, *A. merus*, *A. quadrimaculatus* e *A. arabiensis* (MCLAIN & COLLINS, 1989). A comparação de rDNA de *A. freeborni* e *A. hermsi*, duas espécies de mosquitos morfológicamente indistinguíveis na América do Norte, revelou variação quanto aos sítios de restrição de algumas enzimas. As diferenças interespecíficas no rDNA foram observadas no espaçador transcrito externo (ETS) e espaçador transcrito interno (ITS) (COLLINS *et al.*, 1990).

DEGELMANN e colaboradores (1979) demonstraram variação no comprimento da unidade de repetição das espécies *Chironomus thummi* e *C. melanotus*, provavelmente relacionada à presença de grande quantidade de heterocromatina nestas espécies. A variabilidade observada em *C. thummi* foi encontrada na região IGS. A partir de estudos realizados nas subespécies *C. thummi thummi* e *C. thummi piger* pode-se verificar que somente a subespécie *C. th. thummi* continha subrepetições. SCHIMDT e colaboradores (1982) propuseram que estes elementos presentes na região IGS seriam provenientes de transposição de sequências repetitivas de DNA centromérico. MOREIRA e colaboradores (1992) demonstraram variação na região codificadora 28S também entre as espécies *C. thummi* e *C. sancticaroli*.

A organização da unidade de repetição do rDNA de células em cultura, das espécies *A. aegypti* e *A. albopictus*, foi analisada através de “Southern-blot” e comparada com mosquitos correspondentes no estágio adulto. O rDNA presente nas células de *A. albopictus* apresentou considerável variabilidade em sítios Eco RI quando comparado com mosquitos adultos criados em laboratório, o que pode ser devido à presença de inserções ou aumento da heterogeneidade na região IGS em células em cultura (FALLON *et al.*, 1991).

2. OBJETIVOS

Considerando que pouca atenção tem sido dada a estudos do genoma de dípteros muscóideos de importância médico-veterinária; que não há relatos na literatura de análise de rDNA desse grupo e que o rDNA é um modelo adequado para estudos filogenéticos, os objetivos deste trabalho foram:

2.1. Caracterizar, através da análise dos sítios de restrição, o DNA ribossomal das espécies *Haematobia irritans*, *Muscina stabulans* e *Chrysomya putoria*.

2.2. Comparar as variações existentes nos mapas de restrição em diferentes níveis taxonômicos : entre gêneros de uma família (*Muscina* e *Haematobia*) e entre famílias (Calliphoridae e Muscidae) filogeneticamente relacionadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS MOSCAS

As moscas adultas da espécie *Haematobia irritans* foram coletadas no campo, congeladas em N₂ líquido e guardadas a -20 ou -70°C até o uso. As moscas adultas das espécies *Muscina stabulans* e *Chrysomya putoria* foram cedidas pelo Departamento de Parasitologia da UNICAMP onde as criações são mantidas.

3.2. SONDAS

1. pDm 238: Este plasmídeo recombinante contém um fragmento de 11,5Kb correspondente à unidade repetitiva de rDNA de *Drosophila melanogaster*, inserido no sítio Eco RI do plasmídeo pBR322 (ROIHA *et al.*, 1981). Este plasmídeo foi cedido pela Dra. Luisa M. Botelha, do Centro de Investigações Biológicas de Madrid (Figura 3).

2. HM 123 e HM 456: Estes plasmídios recombinantes contêm, respectivamente, os fragmentos de 3Kb contendo a região codificadora de rRNA 28S e 4Kb contendo a região codificadora de rRNA 18S, de *Xenopus laevis*, inseridos no plasmídeo pBR313 (MEUNIER-ROTIVAL *et al.*, 1979). Estes recombinantes foram fornecidos pela Dra. Itamar R. Ruiz, do Instituto Butantan de São Paulo (Figura 4).

3. pChi 18: Este recombinante contém um fragmento do rDNA de *H. irritans* amplificado por PCR, correspondente à região codificadora do gene rRNA 18S com tamanho de 1800pb e inserido nos sítios Xho I e Pst I do fagemídeo pcDNA II de 3Kb. Este recombinante foi preparado e cedido pela Profa. Dra. Rita M. P. Avancini, do Depto. de Parasitologia, IB, UNICAMP (Figura 5).

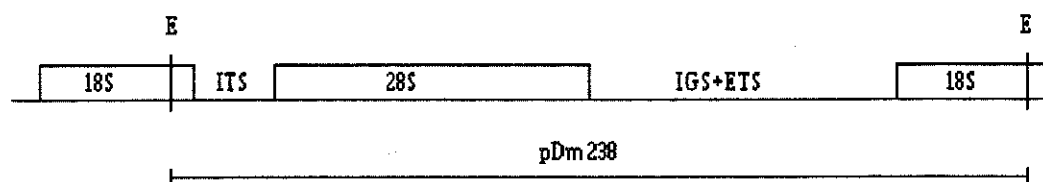


Figura 3- Unidade de repetição de rDNA de *D. melanogaster* inserida no plasmídeo pBr 322, formando pDm 238. E=Eco RI

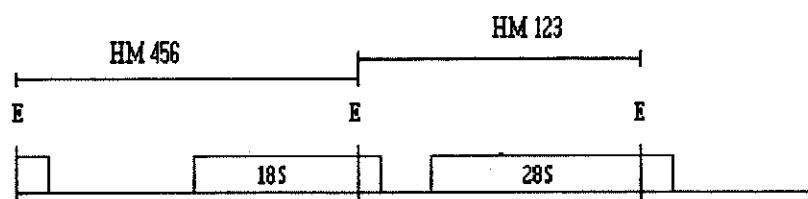


Figura 4- Fragmentos do rDNA de *Xenopus laevis* inseridos no plasmídeo pBr 313, formando HM 123 e HM 456. E=Eco RI

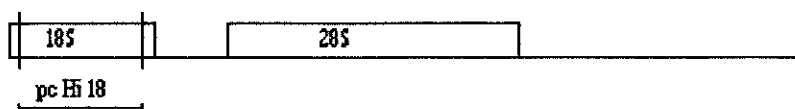


Figura 5- Fragmento de unidade de rDNA de *Haematobia irritans* inserido no fagemídeo pcDNA II, formando pcHi 18. P=Pst I e X=Xho I

3.3. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DE DNA PLASMIDIAL

Foi utilizado o método descrito por BIRBOIN & DOLY (1979) para extração de DNA plasmidial. Amostras de *E.coli* contidas em meio estoque LA (meio LB [triptona 10g/l; extrato de levedura 5g/l e NaCl 10g/l pH 7,2] e ágar 20g/l) foram inoculadas durante à noite em tubo de ensaio com 4 ml de meio LB na presença de ampicilina (150µl/ml). A seguir foram retirados 100-500µl do crescimento bacteriano, inoculados em 50ml de meio LB contendo 150µg/ml de ampicilina e incubados a 37°C durante à noite, em agitador, a 150 rpm. Foram retirados 100 ml de crescimento bacteriano e centrifugados por 10 min a 4000 rpm. O sedimento foi ressuspensionado em 5 ml de solução I (Tris 25mM pH 8,0; EDTA 10mM; lisozima 2mg/ml e glicose 50mM) gelada e mantido em gelo por 30 min. A seguir foram acrescentados 10 ml de solução II (NaOH 0,2N e SDS 1%) para cada tubo e este invertido vagarosamente várias vezes. Após manter o tubo em gelo por 5 min, foram adicionados 7,5 ml de solução III (acetato de sódio 3M, pH 4,8) e o tubo invertido novamente. O tubo foi mantido em gelo por 15 min e centrifugado por 10-15 min a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo. Foram acrescentados 0,6 volumes de isopropanol gelado, misturado e mantido a -20°C por 30 min. Em seguida o tubo foi centrifugado por 10 min a 12000 rpm, e o sobrenadante descartado. O sedimento foi secado, ressuspensionado em 400 µl de H₂O e mantido em gelo por 30 min. As alíquotas de 400 µl foram transferidas para tubos eppendorf. Foram adicionados NaCl 0,1M e 2,5 volume de etanol 100% gelado e mantido a -20°C por 30 min. Foi submetido a centrifugação por 5 min a 12000 rpm, lavado o conteúdo com etanol 70% gelado e centrifugado novamente. Depois de seco, o sedimento foi ressuspensionado em 600 µl em H₂O milli-Q.

A coluna "MagicTM DNA Clean-up System Resin" (Promega) contendo guanidina tiocianato 6M foi utilizada para purificação.

3.4. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Foi utilizado o método descrito por COEN e colaboradores (1982b) com algumas modificações. Foram trituradas, separadamente, em N₂ líquido 50 moscas das espécies *M. stabulans* e *C. putoria* e 150 moscas das espécies *H. irritans* e *D. melanogaster*. O pó foi colocado em tubo córex contendo 4 ml de tampão de lise (Tris 100mM pH 7,5; NaCl 600mM; EDTA 100mM e sacarose 5%). Em seguida foi adicionado SDS 10% para concentração final de 1%, misturado por alguns segundos e incubado em banho-Maria a 65°C por 45 min. Após este tempo, foi acrescentado proteinase K (20mg/ml) na concentração final de 0,4µg/ml e novamente incubado em banho-Maria a 37°C por 2 horas. Foi adicionado acetato de potássio 1M, pH 7,5 para concentração final de 0,8M e incubado em gelo por 45 min. Em seguida foi centrifugado por 5 min em centrífuga Beckman rotor JA 20.1 a 6000 rpm. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo córex. Ao sobrenadante foi acrescentado igual volume de fenol equilibrado pH 8,0, misturado por inversão e centrifugado por 10 min a 6000 rpm. À fase aquosa foi acrescentado igual volume de fenol equilibrado/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado como descrito acima. Esta etapa foi repetida mais uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico e à fase aquosa foram adicionados 2 volumes de etanol 100% gelado, misturado por inversão, mantido por 45 min a -20°C e centrifugado por 20 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado em etanol 70% gelado e centrifugado por 2 min a 6000 rpm. O sedimento foi seco ao ar e ressuspendido em 200 µl de TE (Tris 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM). Após isto, foi acrescentado RNase 10mg/ml para a concentração final de 100µg/ml e incubado em banho-Maria a 37°C durante 1 hora.

3.5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para análise e estimativa da concentração de DNA plasmidial e genômico foi utilizado eletroforese em gel de agarose 0,7% em TBE (Tris-borato 45mM pH 8,0; EDTA 1mM) e a observação das bandas foi feita através de U.V. na presença de corante brometo de etídio, como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989).

3.6. DIGESTÃO DE DNA GENÔMICO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Foi utilizado o método descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). Foi acrescentado cerca de 1 µg de DNA e adicionado tampão de digestão apropriado (10X) para a concentração final de 1X. O volume total foi completado com H₂O milli-Q. Em seguida foi acrescentado espermidina para concentração final de 4mM e o sistema mantido em gelo por 5 min. A seguir, foi acrescentado 1 µl de enzima e centrifugado momentaneamente. O sistema foi incubado durante à noite, em banho-Maria, a 37°C. As enzimas utilizadas para as digestões simples e duplas foram: Eco RI, Hind III, Bam HI, Pst I, Sal I, Sma I e Bgl II. No caso das digestões duplas em que as enzimas não atuam nas mesmas condições de salinidade foi realizado primeiro a digestão durante à noite com a enzima cujo requerimento salino é mais baixo e em seguida a concentração salina foi corrigida e a segunda digestão realizada por 2 horas. As enzimas utilizadas eram procedentes da PHARMACIA.

3.7. TRANSFERÊNCIA DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO - "SOUTHERN - BLOT"

Foi utilizado o método descrito por SOUTHERN (1975). O DNA genômico digerido com enzimas de restrição foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,2% durante à noite. Para denaturação do DNA, o gel foi incubado à temperatura ambiente, em solução de HCl 0,25N 2 vezes, por 10 min com agitação periódica e em seguida lavado com H₂O Milli-Q. O gel foi incubado em solução contendo NaCl 1,5M e NaOH 0,5M à temperatura ambiente 2 vezes, por 20 min com agitação periódica. Novamente, o gel foi lavado com H₂O Milli-Q. Para neutralização da reação, o gel foi incubado em solução contendo Tris-HCl 0,5M pH 8,0 e NaCl 3M à temperatura ambiente, 2 vezes por 30 min com agitação suave. O gel foi lavado com H₂O Milli-Q. Em seguida foi montado o sistema para a transferência do DNA para membrana de nylon. Foi utilizada a solução SSC 20X (NaCl 3M, citrato trissódico 0,3M, pH 7,0) como tampão de transferência e deixado transferir à noite. Depois de desmontado o sistema, a membrana de nylon foi colocada entre papéis de filtro para secagem em estufa por 10 min a 65°C e 1 hora a 80°C.

3.8. MARCAÇÃO DO DNA PARA OBTENÇÃO DAS SONDAS NÃO RADIOATIVAS

Foi utilizada marcação com digoxigenina ("kit" da Boehringer). O DNA na concentração de 300-400 ng/μl foi dissolvido colocando-se 1 μl de DNA em 19 μl de H₂O Milli-Q. A amostra de DNA foi denaturada em banho-Maria fervente por 5 min sendo imediatamente transferida para o gelo. Para a reação foram utilizados 15 μl de DNA denaturado, 2 μl de mistura de hexanucleotídeos, 2 μl de mistura de dNTPs e 1 μl de enzima Klenow. Em seguida esta mistura foi centrifugada momentaneamente e incubada durante à noite em banho-Maria a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 2 μl de EDTA 0,2M

pH 8,0 e o DNA foi precipitado com 2,5 µl de LiCl 4 M, 75 µl de etanol 100% gelado, misturado bem e mantido por 30min a -70°C. Em seguida foi centrifugado por 10 min a 12000 rpm. O sedimento foi lavado com 200 µl de etanol 70% gelado, centrifugado novamente por 10 min, seco e dissolvido em 50 µl de TE. Para facilitar a dissolução foi colocado em banho-Maria por 30 minutos a 37°C.

3.9. HIBRIDIZAÇÃO

Imediatamente antes do uso, a sonda foi denaturada em banho-Maria fervente por 5 min. A membrana foi incubada em solução de pré-hibridização (SSC 5X, solução bloqueadora 1%, laurilsarcosil 0,1%, SDS 0,02% e formamida 50%) durante 4 horas, a 42°C, sob agitação constante. Em seguida, a solução de pré-hibridização foi descartada e imediatamente foi adicionada a solução de hibridização (SSC 5X, solução bloqueadora 1%, laurilsarcosil 0,1%, SDS 0,02% e formamida 50%) contendo a sonda. A hibridização foi realizada durante à noite sob agitação constante a 42°C. Após a hibridização, a membrana foi colocada em recipiente contendo solução de lavagem A (SSC 2X e SDS 0,1%) 2 vezes por 15 min, à temperatura ambiente. Esta solução foi descartada e adicionada solução de lavagem B (SSC 0,1X e SDS 0,1%) 2 vezes por 15 min, a 68°C. Em seguida, a membrana foi lavada com tampão ("Tween 20" 0,3% e tampão I: ácido maleico 0,1 M pH 7,5 e NaCl 0,15 M) por 1 min. Este foi descartado e a membrana foi incubada em tampão II (solução bloqueadora 10% diluída 1:10 em tampão I) por 4 horas sob agitação constante à temperatura ambiente. O conjugado anti-digoxigenina foi diluído 1:10000 em tampão II e a membrana incubada nesta solução por 30 min sob agitação, à temperatura ambiente. O excesso do conjugado foi retirado colocando-se a membrana em tampão de lavagem 2 vezes por 15 min, sob agitação, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi equilibrada com tampão III (Tris 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl₂ 50 mM) por 5 min à temperatura ambiente. A solução estoque de AMPPD (10 mg/ml) foi diluída 1:100 em tampão III e a membrana incubada em saco plástico com 10 ml de solução de AMPPD, por 5 min, no escuro. O excesso de solução foi retirado, a membrana empacotada em saco

estufa a 37 °C por 15 min. O filme de raio X foi exposto à membrana
tura ambiente e em seguida, incubado em solução reveladora por 3
ora por 2 min, no escuro.

ÇÃO DA CURVA PADRÃO

ØX Hae III que apresenta fragmentos de tamanhos conhecidos foi
para a construção da curva padrão. Esta curva foi obtida em papel
ira a determinação dos tamanhos dos fragmentos de restrição do
os.

4. RESULTADOS

4.1. EXTRAÇÃO E DIGESTÃO DE DNA GENÔMICO

O método de extração descrito por COEN e colaboradores (1982b) mostrou ser muito eficiente para nosso propósito, já que se obtém boa concentração de DNA e também menor grau de degradação.

As Figuras 6, 7 e 8 mostram respectivamente, os DNAs genômicos de *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria*, digeridos com enzimas de restrição e separados em gel de agarose 1,2% para posterior transferência para membrana de nylon. Para cada espécie foram preparadas duas membranas e cada uma delas foi hibridizada com duas sondas: uma com HM 123 e pcHi 18 e a outra com HM 456 e pDM 238, nessa ordem. Nas três figuras, a amostra 1 corresponde ao marcador λ Hind III/ ϕ X Hae III utilizado para construção da curva padrão feita para estimar o tamanho dos fragmentos de rDNA hibridizados. A amostra 2 contém cerca 1 μ g de DNA de *D. melanogaster* digerido com Eco RI. Este DNA foi utilizado como controle para as sondas. As amostras 3 a 14 correspondem, cada uma, a cerca de 1 μ g de DNA das espécies citadas acima, digerido com as enzimas Eco RI, Hind III, Pst I, Sal I, Bgl II e Sma I em digestões simples e duplas. Em todas as amostras a digestão foi adequada.

A Figura 9 mostra os DNAs genômicos das espécies *M. stabulans*, *C. putoria* e *H. irritans*, íntegros e digeridos com as enzimas de restrição Eco RI e Bam HI e separados em gel de agarose 1,2%. A amostra 1 corresponde ao marcador "High marker", sendo a amostra 2 correspondente ao marcador λ Hind III. A amostra 3 corresponde ao DNA genômico da espécie *Hyla albopunctata* (Hylidae, Anura) digerido pela enzima Bam HI. Este foi utilizado como controle da digestão com esta enzima, uma vez que, se sabe pela literatura que no rDNA de anfíbios existe sítio Bam HI (BOTCHAN *et al.*, 1977). Devido ao gel de agarose possuir a concentração de 1,2%, não foi possível separar com nitidez os fragmentos do marcador "High marker" ficando os fragmentos sobrepostos. Para a separação adequada seria necessário utilizar um gel de agarose de 0,4% o que seria

inadequado para a transferência de “Southern-blot”. A digestão foi adequada para todas as amostras correspondentes aos DNAs genômicos das espécies de insetos e anfíbio.

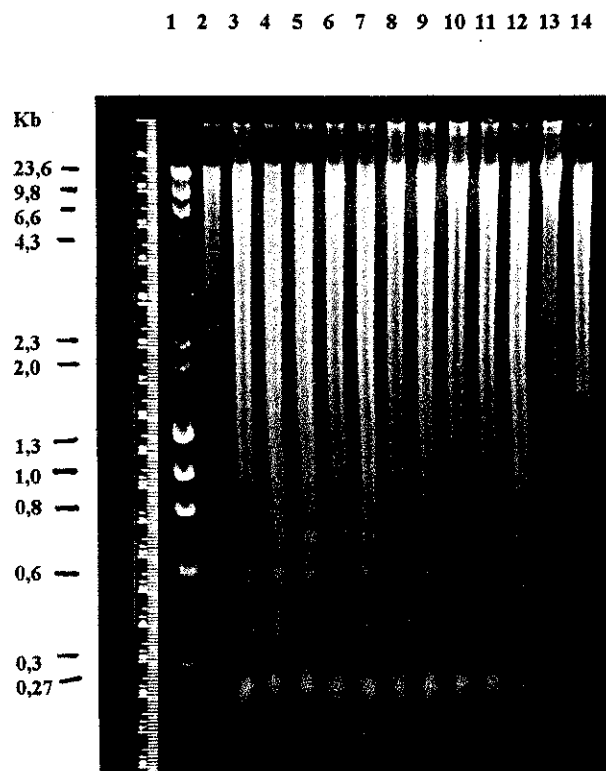


Figura 6 - Separação dos fragmentos de restrição do DNA genômico de *H. irritans* amostras 3 a 14), por eletroforese em gel de agarose 1,2%.

1. λ Hind III/ ϕ Hae III; 2. DNA de *D. melanogaster* digerido com Eco RI; 3. Eco RI; 4. Eco RI/Hind III; 5. Eco RI/Pst I; 6. Hind III; 7. Pst I/Hind III; 8. Pst I; 9. Sal I/Pst I; 10. Sal I; 11. Bgl II; 12. Bgl II/Hind III; 13. Sma I e 14. Sma I/Hind III

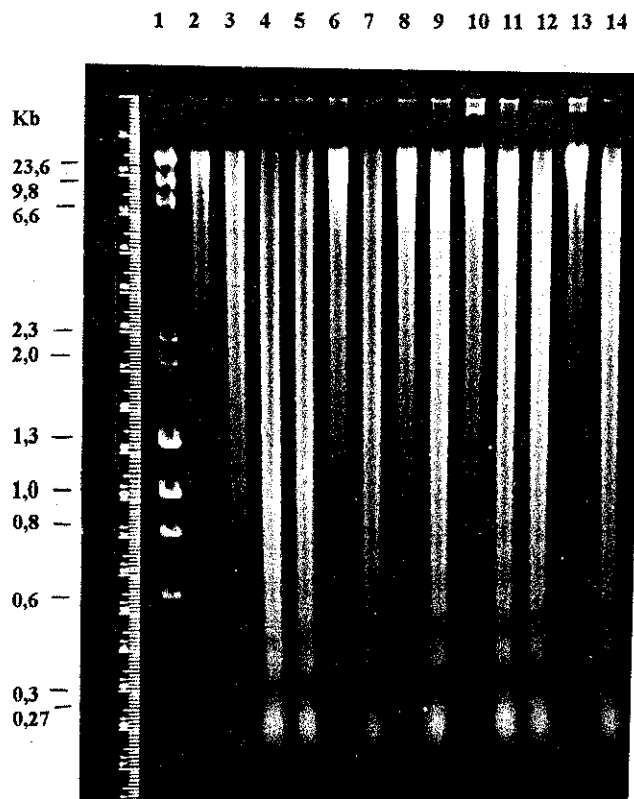


Figura 7 - Separação dos fragmentos de restrição do DNA genômico de *M. stabulans* (amostras 3 a 14), por eletroforese em gel de agarose 1,2%.

1. λ Hind III/ ϕ Hae III; 2. DNA de *D. melanogaster* digerido com Eco RI; 3. Eco RI; 4. Eco RI/Hind III; 5. Eco RI/Pst I; 6. Hind III; 7. Pst I/Hind III; 8. Pst I; 9. Sal I/Pst I; 10. Sal I; 11. Bgl II; 12. Bgl II/Hind III; 13. Sma I e 14. Sma I/Hind III

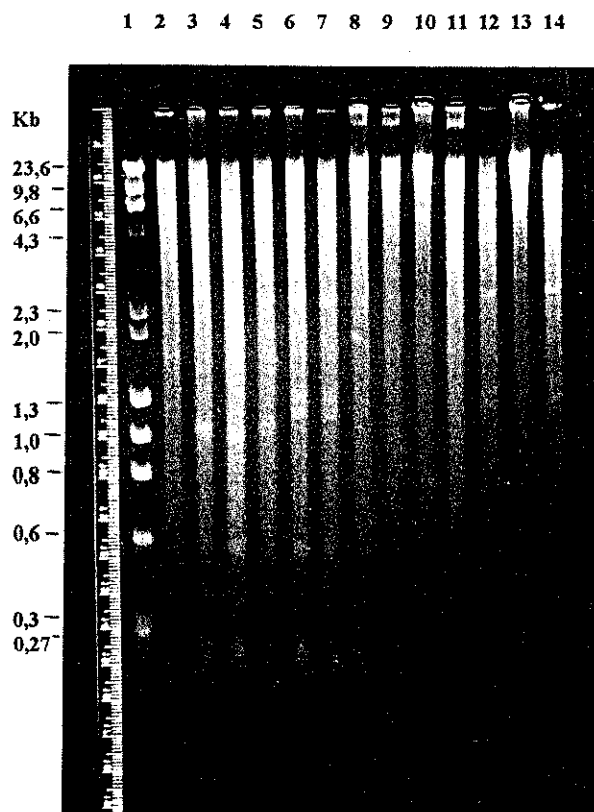


Figura 8 - Separação dos fragmentos de restrição do DNA genômico de *C. putoria* (amostras 3 a 14), por eletroforese em gel de agarose 1,2%.

1. λ Hind III/ ϕ Hae III; 2. DNA de *D. melanogaster* digerido com Eco RI; 3. Eco RI; 4. Eco RI/Hind III; 5. Eco RI/Pst I; 6. Hind III; 7. Pst I/Hind III; 8. Pst I; 9. Sal I/Pst I; 10. Sal I; 11. Bgl II; 12. Bgl II/Hind III; 13. Sma I e 14. Sma I/Hind III

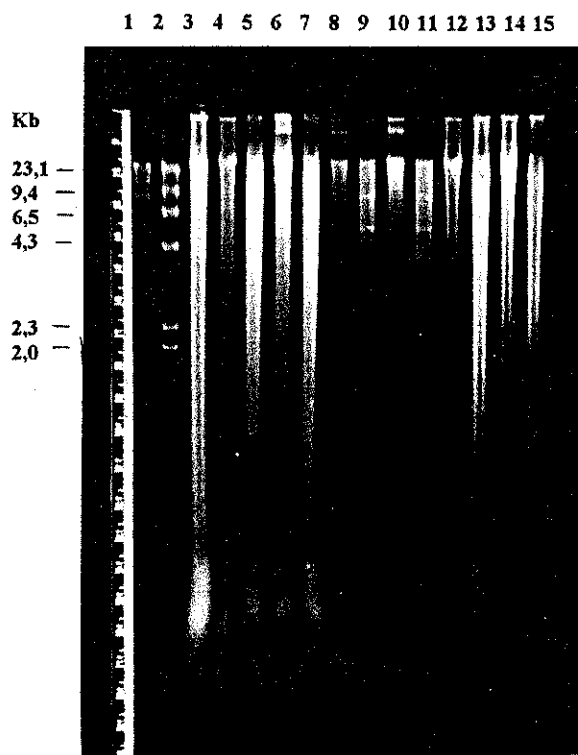


Figura 9 - Separação dos fragmentos de restrição dos DNAs genômicos de *H. albopunctata*, *M. stabulans*, *C. putoria* e *H. irritans* por eletroforese em gel de agarose 1,2%.

1. "High marker"; 2. λ Hind III; 3. DNA de *H. albopunctata* digerido com Bam HI; 4. DNA de *M. stabulans* íntegro; 5. DNA de *M. stabulans* digerido com Eco RI; 6. DNA de *M. stabulans* digerido com Bam HI; 7. DNA de *M. stabulans* digerido com Eco RI/Bam HI; 8. DNA de *C. putoria* íntegro; 9. DNA de *C. putoria* digerido com Eco RI; 10. DNA de *C. putoria* digerido com Bam HI; 11. DNA de *C. putoria* digerido com Eco RI/Bam HI; 12. DNA de *H. irritans* íntegro; 13. DNA de *H. irritans* digerido com Eco RI; 14. DNA de *H. irritans* digerido com Bam HI e 15. DNA de *H. irritans* digerido com Eco RI/Bam HI.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS POR HIBRIDIZAÇÃO EM FILTRO

4.2.1. Características gerais do rDNA nas três espécies

As figuras 10, 11, 12 e 13 mostram os fragmentos de restrição dos DNAs genômicos de *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria* hibridizados com as sondas pDm 238, pcHi 18, HM 123 e HM 456. Os fragmentos Eco RI de 11 e 17 kb, obtidos do DNA de *D. melanogaster* correspondem, em tamanho e número, às bandas descritas na literatura para esta espécie, servindo, portanto, como um controle para hibridização (TARTOF & DAWID, 1976; WELLAUER & DAWID, 1977; WELLAUER *et al.*, 1978).

Nas tabelas I a III, estão indicados os tamanhos dos fragmentos de DNA mostrados nas figuras 10 a 13.

A partir dos resultados de digestões simples e duplas mostrados nessas figuras e tabelas, algumas informações gerais a respeito das três espécies analisadas foram obtidas.

Os tamanhos das unidades de repetição de *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria* são, respectivamente, 9,8; 9,0 e 11Kb.

Não foi detectado sítio Bam HI nas espécies estudadas, uma vez que a banda correspondente à digestão com esta enzima apresenta tamanho superior a 23Kb (Figura 13).

Com relação à enzima Sal I ocorreu sempre o mesmo problema, ou seja, uma banda difusa que contém no mínimo o mesmo valor da unidade de repetição de cada espécie e no máximo um valor equivalente ao dobro do valor da unidade de repetição de cada espécie (Figuras 10, 11 e 12).

Outra característica comum às três espécies foi a presença de uma única banda após digestão com Pst I, assim como, a presença de um sítio Eco RI dentro do gene 18S. As três espécies também têm em comum a presença de três sítios Hind III, dois sítios Bgl II e dois sítios Sma I dentro das regiões codificadoras.

Figura 10-Hibridização não-radioativa das sondas pDm 238(a), pcHi 18(b), HM 123(c) e HM456 (d) com o DNA genômico de *H. irritans* digerido com enzimas de restrição. E=Eco RI, H=Hind III, P=Pst I, S=Sal I, Bg=Bgl II, Sm=S, E/H=Eco RI/Hind III, E/P=Eco RI/Pst I, P/H=Pst I/Hind III, S/P=Sal I/Pst I, Bg/H=Bgl II/Hind III e Sm/H=Sma I/Hind III.

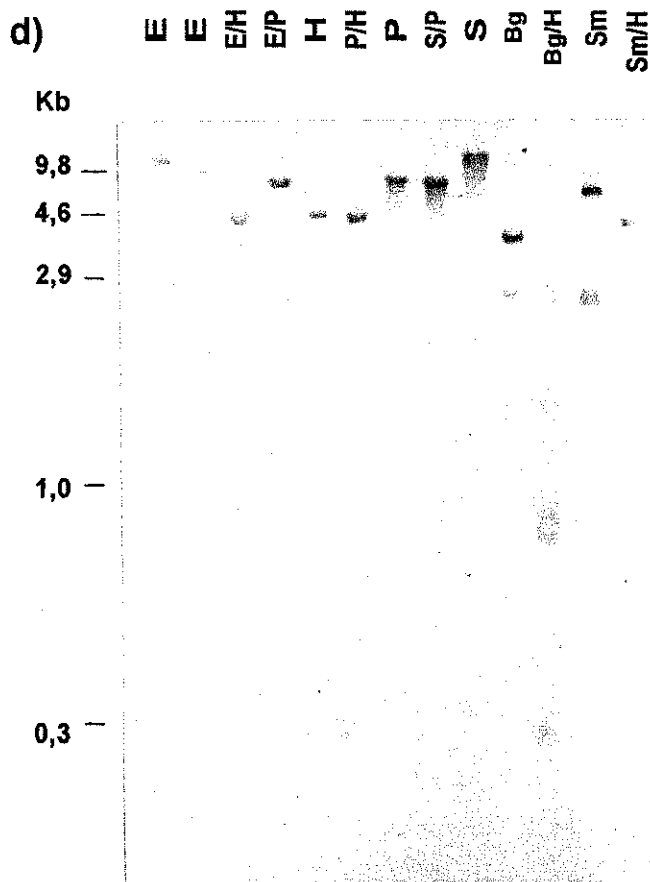
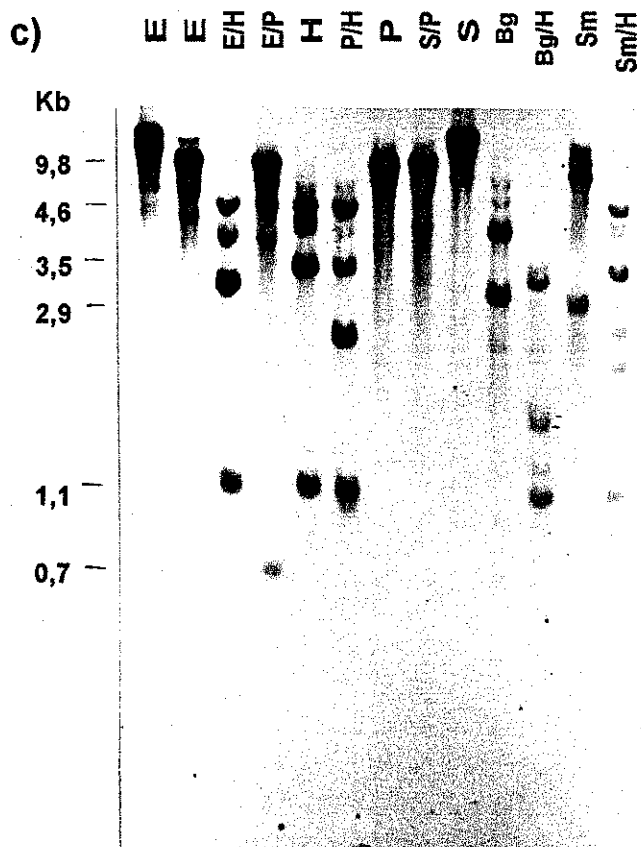
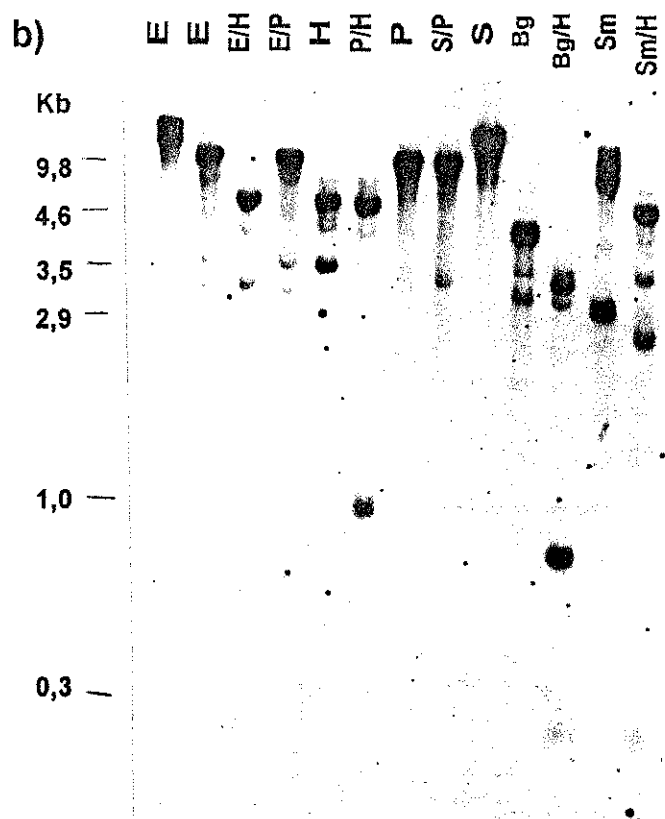
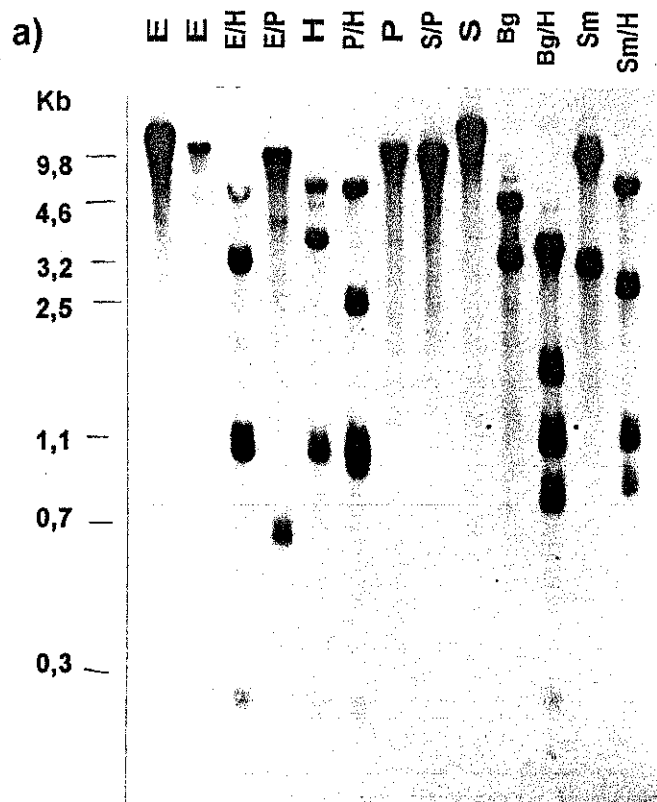


Tabela I. Tamanhos estimados, em Kb, dos fragmentos de rDNA de *H. irritans* hibridizados com as sondas pDm 238, pcHi 18, HM 123 e HM 456.

Enzimas de restrição	pDm 238	pc Hi 18	HM 123	HM 456
Eco RI	9,8	9,8	9,8	9,8
Hind III	4,6/3,5/1,1/0,29/0,29	4,6/3,5/0,29	4,6/3,5/1,1	4,6/0,29
Bam HI	>23,6	>23,6	>23,6	>23,6
Pst I	9,8	9,8	9,8	9,8
Sal I	9,8-19,0	9,8-19,0	9,8-19,0	9,8-19,0
Bgl II	3,9/3,0	3,9/3,0	3,9/3,0	3,9/3,0
Sma I	6,9/2,9	6,9/2,9	6,9/2,9	2,9
Eco RI/Hind III	4,6/3,2/1,1/0,3/0,29/ 0,29	4,6/3,2/0,3/0,29	4,6/3,2/1,1	4,6/0,3/0,29
Eco RI/Bam HI	9,8	9,8	9,8	9,8
Eco RI/Pst I	9,0/0,7	9,0/0,7	9,0/0,7	9,0/0,7
Pst I/Hind III	4,6/2,5/1,1/1,0/0,29/ 0,29	4,6/1,0/0,29	4,6/2,5/1,1/1,0	4,6/1,0/0,29
Sal I/Pst I	9,8	9,8	9,8	9,8
Bgl II/Hind III	3,2/1,9/1,6/1,1/0,9/ 0,8/0,29/0,29	3,2/0,8/0,29	3,2/1,6/1,1	3,2/1,9/0,9/0,8/0,29
Sma I/Hind III	4,6/2,6/1,1/0,9/0,29/ 0,29	4,6/2,6/0,3/0,29	4,6/2,6/2,0/1,1/0,9	4,6/2,6/0,29

Figura 11-Hibridização não-radioativa das sondas pDm 238(a), pcHi 18(b), HM123(c) e HM456(d) com o DNA genômico de *M. stabulans* digerido com enzimas de restrição. E=Eco RI, H=Hind III, P=Pst I, S=Sal I, Bg=Bgl II, Sm=Sma I, E/H=Eco RI/Hind III, E/P=Eco RI/Pst I, P/H=Pst I/Hind III, S/P=Sal I/Pst I, Bg/H=Bgl II/Hind III e Sm/H=Sma I/Hind III.

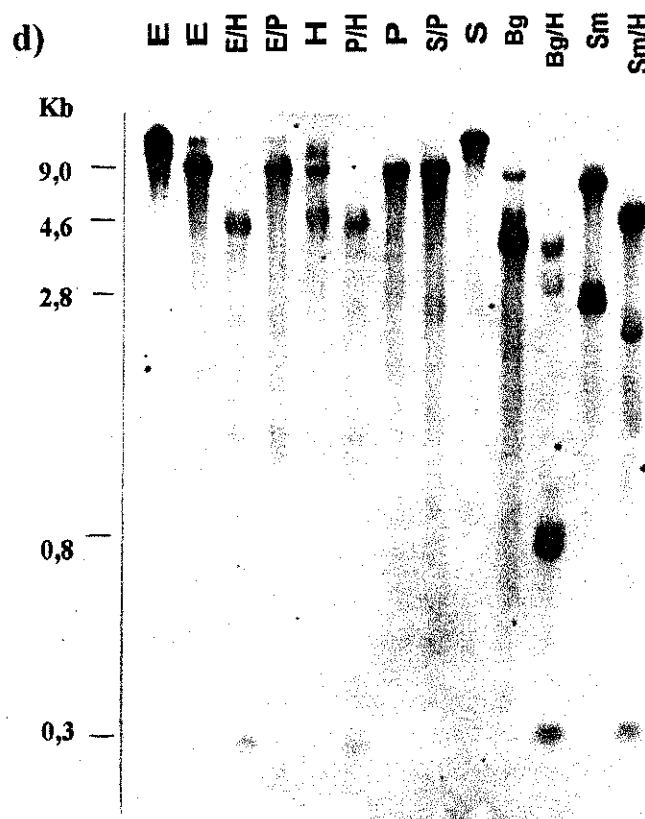
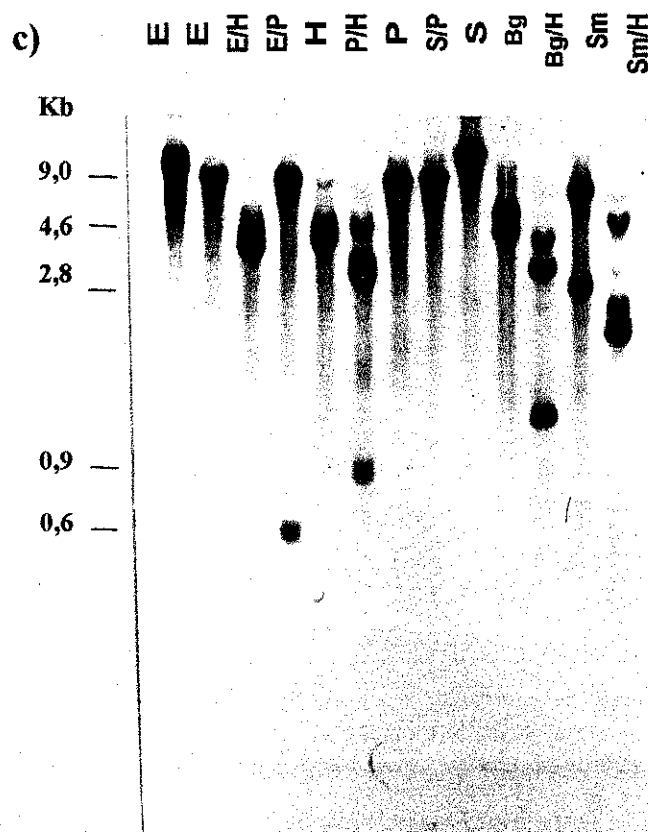
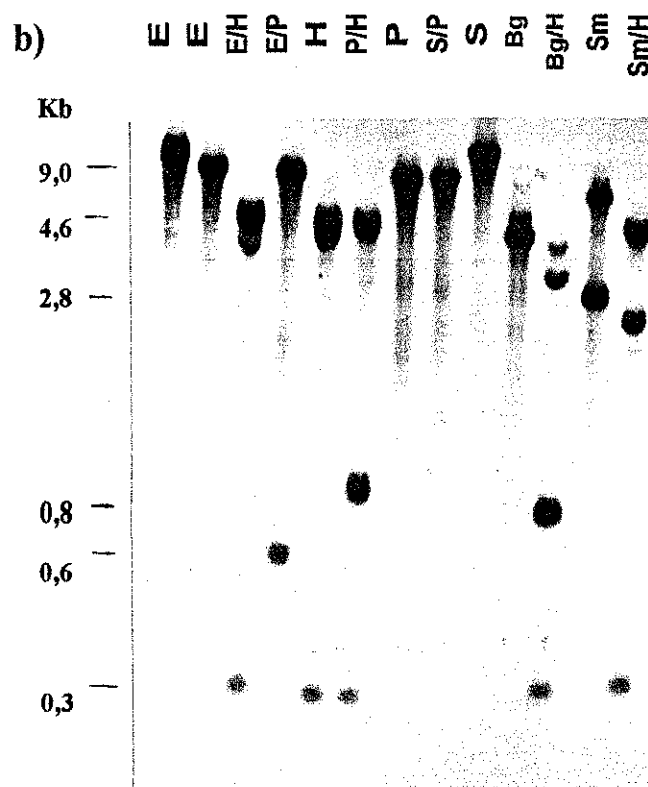
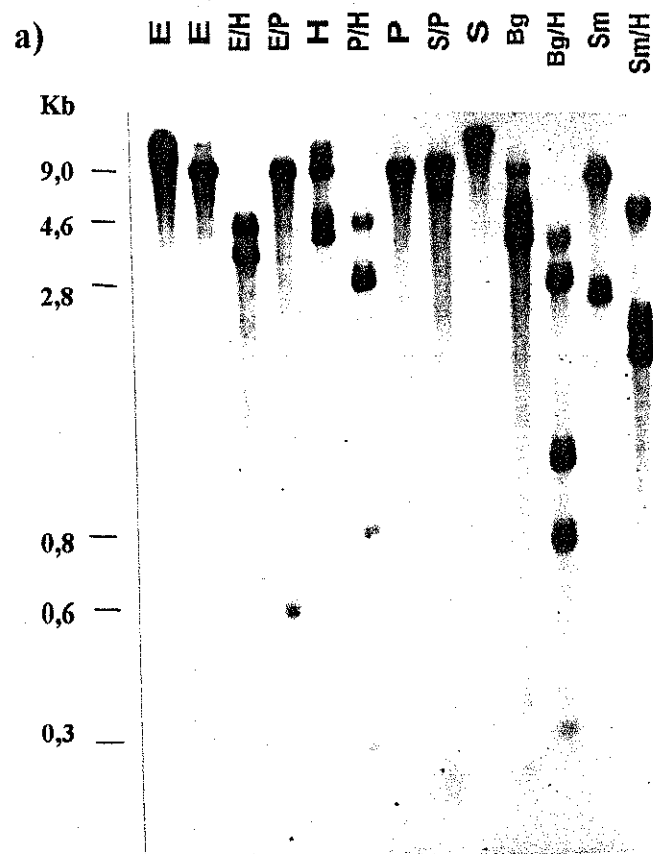
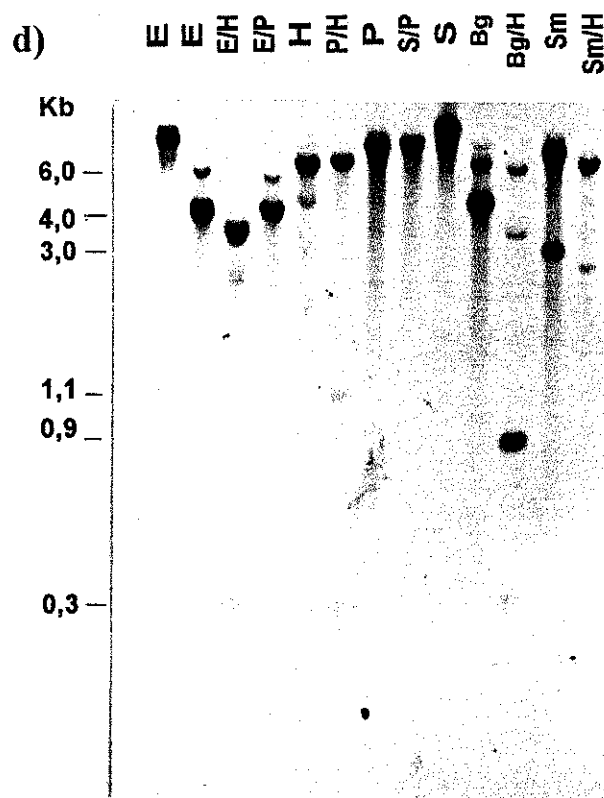
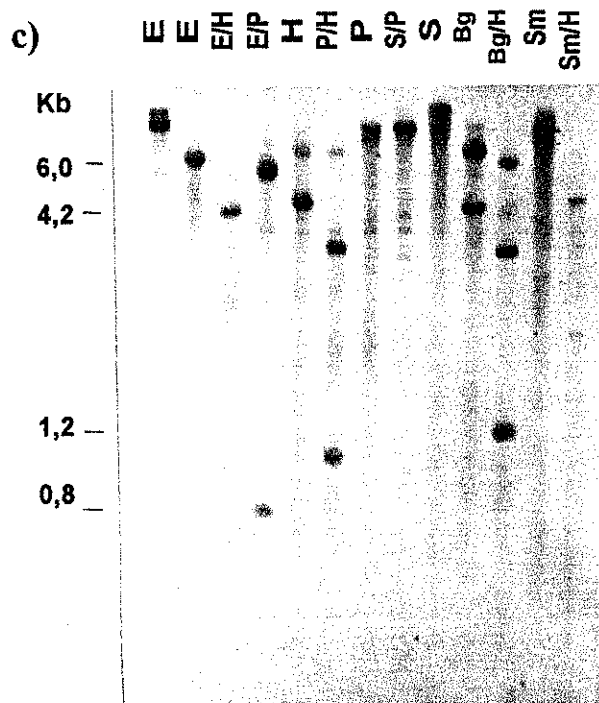
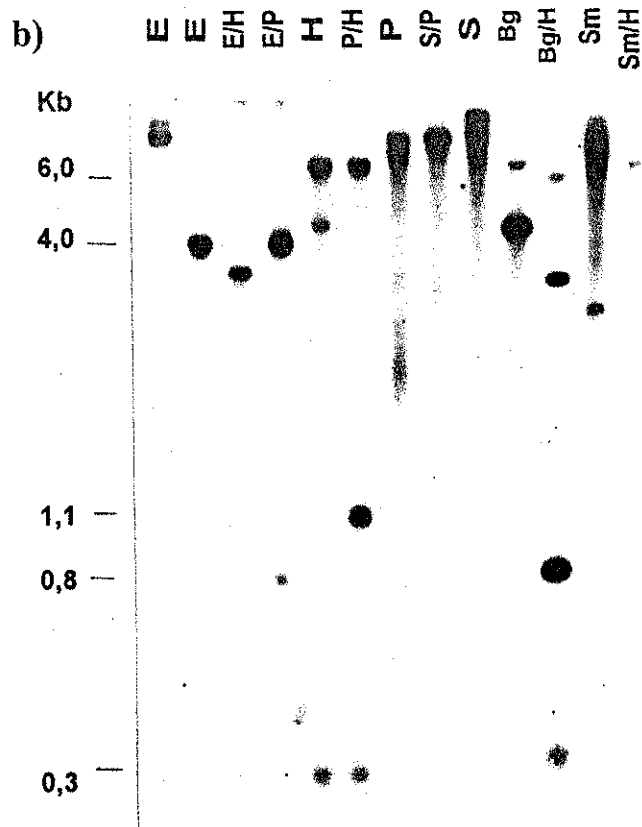
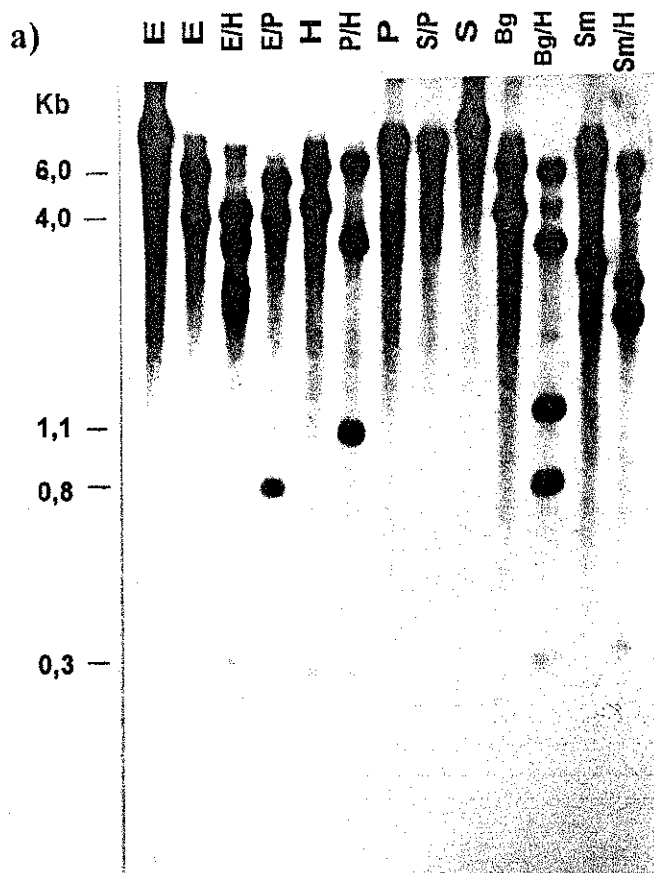


Tabela II. Tamanhos estimados em Kb dos fragmentos de rDNA de *M. stabulans* hibridizados com as sondas pDm 238, pcHi 18, HM 123 e HM 456.

Enzimas de restrição	pDm 238	pc Hi 18	HM 123	HM 456
Eco RI	9,0	9,0	9,0	9,0
Hind III	4,9/4,2	4,6/4,2/0,29	4,6/4,2	4,9
Bam HI	>23,6	>23,6	>23,6	>23,6
Pst I	9,0	9,0	9,0	9,0
Sal I	9,0-18,0	9,0-18,0	9,0-18,0	9,0-18,0
Bgl II	5,0/4,0	5,0/4,0	5,0/4,0	5,0/4,0
Sma I	8,0/2,8	8,0/2,8	8,0/2,8	8,0/2,8
Eco RI/Hind III	4,6/3,9/0,3/0,29	4,6/3,9/0,3/0,29	4,6/3,9	4,6/0,3/0,29
Eco RI/Bam HI	9,0	9,0	9,0	9,0
Eco RI/Pst I	9,0/0,6	9,0/0,6	9,0/0,6	9,0
Pst I/Hind III	4,6/3,2/0,9/0,29	4,6/0,9/0,29	4,6/0,9	4,6/0,29
Sal I/Pst I	9,0	9,0	9,0	9,0
Bgl II/Hind III	4,0/2,9/1,2/0,8/0,29	4,0/2,9/0,8/0,29	4,0/2,9/1,2	4,0/2,9/0,8/0,29
Sma I/Hind III	4,8/2,5/2,2/0,29	4,8/2,5/0,29	4,8/2,5/2,2	4,8/2,5/0,29

Figura 12-Hibridização não-radioativa das sondas pDm 238(a), pcHi 18(b), HM 123(c) e HM456(d) com o DNA genômico de *C. putoria* digerido com enzimas de restrição. E=Eco RI, H=Hind III, P=Pst I, S=Sal I, Bg=Bgl II, Sm=Sma I, E/H=Eco RI/Hind III, E/P=Eco RI/Pst I, P/H=Pst I/Hind III, S/P=Sal I/Pst I, Bg/H=Bgl II/Hind III e Sm/H=Sma I/Hind III.



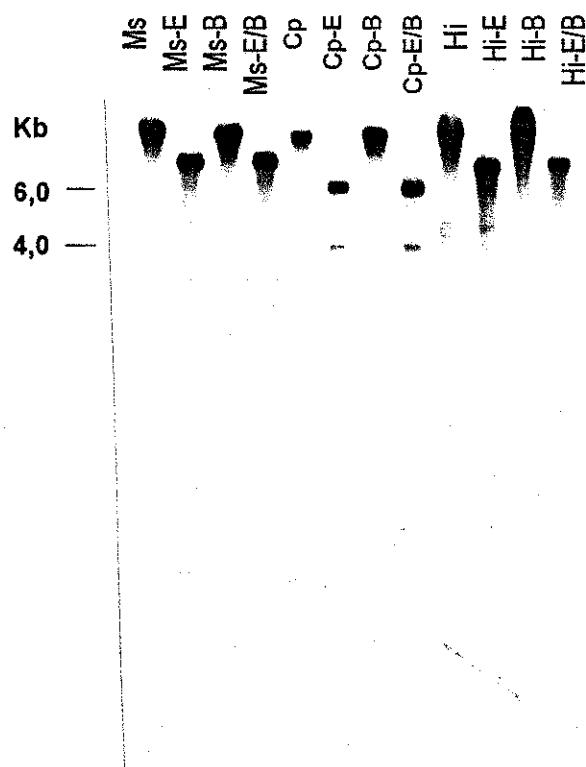


Figura 13 - Hibridização da sonda não-radioativa de pDm 238 com os DNAs genômicos de *M. stabulans* (M.s.), *C. putoria* (C.p.) e *H. irritans* (H.i.) íntegros e digeridos com enzimas de restrição. E=Eco RI, B=Bam HI e E/B=Eco RI/Bam HI.

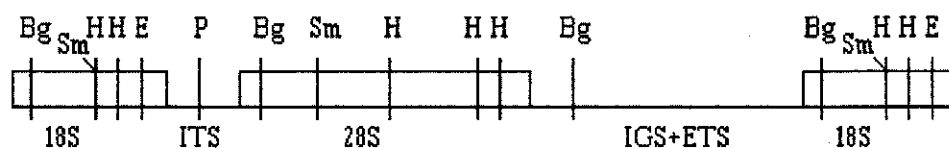
Tabela III. Tamanhos estimados em Kb dos fragmentos de rDNA de *C. putoria* hibridizados com as sondas pDm 238, pcHi 18, HM 123 e HM 456.

Enzimas de restrição	pDm 238	pc Hi 18	HM 123	HM 456
Eco RI	6,0/4,0	6,0/4,0	6,0	6,0/4,0
Hind III	6,2/4,5/0,29	6,2/4,5/0,29	6,2/4,5	6,2/4,5/0,29
Bam HI	>23,6	>23,6	>23,6	>23,6
Pst I	11,0	11,0	11,0	11,0
Sal I	11,0-21,0	11,0/21,0	11,0-21,0	11,0-21,0
Bgl II	6,5/4,5	6,5/4,5	6,5/4,5	6,5/4,5
Sma I	8,0/3,0	8,0/3,0	8,0/3,0	8,0/3,0
Eco RI/Hind III	4,2/3,4/2,6/0,31/0,3	4,2/3,4/0,31/0,3	4,2	3,4/2,6/0,31/0,3
Eco RI/Bam HI	6,0/4,0	6,0/4,0	6,0/4,0	6,0/4,0
Eco RI/Pst I	5,8/4,0/0,8	5,8/4,0/0,8	5,8/0,8	5,8/4,0
Pst I/Hind III	6,2/3,4/1,1/0,29	6,2/1,1/0,29	6,2/3,4/1,1	6,2/1,1/0,29
Sal I/Pst I	11,0	11,0	11,0	11,0
Bgl II/Hind III	6,1/3,3/1,2/0,9/0,29	6,1/3,3/0,9/0,29	6,1/3,3/1,2	6,1/3,3/0,9/0,29
Sma I/Hind III	6,5/2,7/2,2/0,29	6,5/2,7/0,29	6,5/2,2	6,5/2,7/0,29

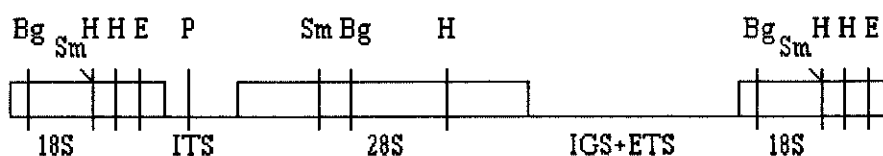
4.2.2. Comparação entre os mapas de restrição

Com os resultados apresentados nas figuras 10 a 13 e tabelas I a III foram construídos os mapas de restrição representados na figura 14.

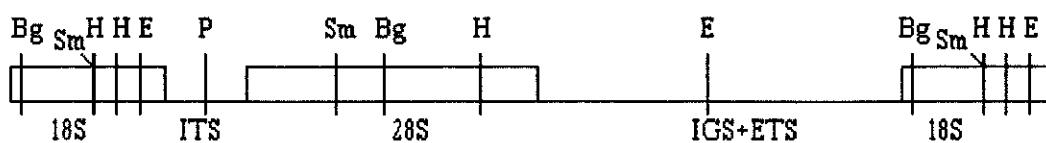
a.)



b.)



c.)



1 Kb

Figura 14- Mapas de restrição do rDNA das espécies *H. irritans* (a), *M. stabulans* (b) e *C. putoria* (c). E=Eco RI, H=Hind III, P=Pst I, Bg=Bgl II e Sm=Sma I.

O comprimento aproximado dos genes rRNA 18S e 28S foi estimado baseado em informações existentes na literatura para outros dípteros, uma vez que estes não variam significativamente entre os insetos (BECKINGHAM, 1982). Assim, o tamanho estimado foi de 1,9Kb para o gene rRNA 18S e 3,6Kb para o 28S (WELLAUER & DAWID, 1977; DEGELMANN *et al.*, 1979; SCHMIDT *et al.*, 1982; PARK & FALLON, 1990). Para a região espaçadora transcrita interna (ITS) o tamanho estimado foi 0,9Kb para *H. irritans* e *M. stabulans* e 1,0Kb para *C. putoria*, pois esta região entre os eucariotos varia de 0,2 até 1,3Kb (SCHMIDT *et al.*, 1982; PASKEWITZ *et al.*, 1993).

A região IGS das três espécies estudadas foi estimada em cerca de 3,4; 2,6 e 4,5Kb por subtração do valor total do tamanho da unidade para *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria*, respectivamente, embora essa região possa sofrer variações.

Nas três espécies estudadas foi localizado um único sítio Pst I na região transcrita interna e um sítio Eco RI conservado na extremidade 3'da região codificadora 18S. Outras características comuns às três espécies foram a presença de um fragmento em torno de 300pb, originado da clivagem de dois sítios Hind III na região codificadora 18S e a presença de um sítio Hind III na região codificadora 28S, bem como o tamanho do fragmento Eco RI/Hind III de 300pb presente no 18S. As três espécies apresentam dois sítios Bgl II, sendo que um sítio está contido na extremidade 5'da região codificadora 18S e o outro localizado na região codificadora 28S. Em relação aos sítios Sma I, as três espécies também possuem um sítio em cada uma das regiões codificadoras, sendo que o sítio presente na região 18S está muito próximo ou quase coincidente com um sítio Hind III.

A espécie *H. irritans*, além de apresentar um sítio Hind III na região 28S comum às outras duas espécies, apresenta dois outros sítios Hind III distantes quase 300pb entre si na extremidade desta região. Outra característica incomum desta espécie diz respeito à posição do sítio Bgl II que encontra-se próximo a extremidade da região 28S, o que não ocorre com as outras duas espécies. Um sítio Bgl II na região IGS foi encontrado apenas em *H. irritans*.

A espécie *C. putoria* contém um sítio Eco RI na região IGS, além de apresentar um sítio Eco RI na região 18S como as demais espécies.

4.2.3. Especificidades dos mapas

a) *H. irritans*

A digestão do DNA genômico de *H. irritans* com a enzima Bgl II produziu dois fragmentos que somados perfazem um valor menor que o tamanho da unidade de repetição. Neste caso, é provável que exista um outro fragmento de aproximadamente 3Kb que não hibridiza com as sondas ou que coincide com a outra banda (Figura 10, Tabela I). Na digestão dupla Bgl II/Hind III e hibridização com a sonda pDm 238 foi detectado um fragmento de 3,2Kb, que não se encaixa no mapa, pois o esperado seria um fragmento de 2,9Kb. Nesta mesma digestão e hibridização com a sonda HM 456 que abrange o IGS, é possível observar além do fragmento de 3,2Kb, um fragmento de 2,9Kb (Figura 10d). Isto confirma a presença de dois fragmentos de tamanhos próximos, sendo que um deles localiza-se na região IGS.

O DNA desta espécie digerido com Sma I apresentou um fragmento de 9,8Kb, que corresponde ao tamanho da unidade de repetição. Na digestão Sma I/Hind III foi detectado um fragmento de 3,5Kb, com as sondas HM 123 e pcHi 18. Como um fragmento deste mesmo tamanho aparece na digestão com Hind III, poderia ser o mesmo fragmento se considerarmos que a clivagem nos sítios Sma I não ocorreu por estarem metilados. Nesta mesma digestão outro fragmento adicional em torno de 2,0Kb foi detectado com a sonda HM123 (Figura 10c). Na digestão com Hind III, um fragmento de 4,3Kb foi visualizado apenas com a sonda HM 123, provavelmente devido à presença de inserção. Na digestão com Pst I/Hind III e detecção com a sonda HM 123, foi detectado um fragmento adicional de 3,5Kb (Figura 10c).

Quando o DNA genômico de *H. irritans* foi digerido com Eco RI e Eco RI/Pst I e hibridizado com a sonda homóloga pcHi 18, apareceram fragmentos adicionais (Figura 10b) contendo sinais fracos de hibridização que possivelmente estão relacionados à heterogeneidade da região IGS. Fragmentos adicionais visualizados em filme de raio X sem ter os tamanhos estimados também foram detectados pela sonda heteróloga HM 123 (Figura 10c).

b) *M. stabulans*

Após digestão com Hind III e hibridização com as sondas pDm 238 e HM 456 foi detectado um fragmento adicional de 9,0Kb que corresponde ao tamanho da unidade de repetição (Figura 11a,d, Tabela II). Isto possivelmente se deve à digestão incompleta, pois detectou-se um fragmento de 4,9Kb e desapareceu um fragmento com cerca de 300pb que estava presente em filtros anteriores hibridizados com a mesma sonda. O fragmento de quase 300pb foi detectado com a sonda pcHi 18. Na digestão com Bgl II também surgiu um fragmento adicional de 8,5Kb. Na digestão Bgl II/Hind III apareceu um fragmento de 4,0Kb cujo tamanho é maior do que o fragmento de 3,8Kb presente no mapa de restrição (Figura 11). Um fragmento de 8,0Kb foi encontrado na digestão com Sma I, sendo que na montagem do mapa este fragmento não encaixa, pois tem tamanho acima do esperado, que deveria ser 6,2Kb. Nas digestões com Sma I/Hind III e hibridização com as sondas pDm 238 e HM 123 detectou-se um fragmento de 2,2Kb, que também apresenta tamanho superior ao esperado no mapa que deveria ser de 1,6Kb (Figura 11a,c). Nesta mesma digestão também apareceu um fragmento de 4,8Kb que hibridizou com as quatro sondas. Os fragmentos adicionais de 2,9 e 7,5Kb encontrados na digestão Sma I/Hind III com a sonda HM 123 apresentavam sinais fracos de hibridização (Figura 11c).

c) *C. putoria*

Na digestão com Eco RI apareceram dois fragmentos de 6,0 e 4,0Kb que somados perfazem um valor menor que o tamanho da unidade de repetição.

Nas digestões com Sma I e com Bgl II apareceu, com todas as sondas, um fragmento de 11,0Kb que corresponde ao tamanho da unidade de repetição (Figura 12, Tabela III). Nesta mesma digestão e hibridização com a sonda pcHi 18 apareceu uma banda difusa, não se podendo distinguir nitidamente os fragmentos de 11,0 e 8,0Kb. Na hibridização com a sonda pDm 238, em algumas das digestões simples ou duplas, também foram detectados alguns fragmentos adicionais com sinais fracos (Figura 12a). Em relação à digestão Sma I/Hind III e hibridização com as sondas pDm 238 e HM 123 apareceu um fragmento adicional de 2,2Kb,

Na digestão Bgl II/Hind III apareceu um fragmento de 6,1Kb que também não encaixa no mapa. O mesmo ocorre na digestão dupla Eco RI/Pst I em que apareceu um fragmento de 5,8Kb que é menor que o fragmento 6,2Kb . Na digestão Eco RI/Hind III e hibridização com as sondas pDm 238 e HM 456 foi detectado uma banda difusa, o que dificulta saber o tamanho exato, em torno de 2,8Kb, que é um valor superior ao esperado no mapa (2,6Kb) (Figura 12a,d).

5. DISCUSSÃO

5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO rDNA NAS TRÊS ESPÉCIES

A análise de restrição dos DNAs genômicos de *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria* permitiu estimar os tamanhos das unidades de repetição dos rDNAs dessas espécies. Para *H. irritans* e *M. stabulans* uma única banda com tamanhos de 9,8 e 9,0Kb, respectivamente, foi obtida após digestão com Pst I e Eco RI. Para *C. putoria* apareceu uma única banda, com tamanho de 11Kb, para Pst I e duas bandas para Eco RI. O comprimento da unidade de repetição em diferentes espécies de insetos varia de menos de 10Kb para mais de 20Kb dependendo do comprimento da região IGS e da presença de inserção dentro da região codificadora 28S (BECKINGHAM, 1982).

GALE & CRAMPTON (1989) verificaram que quando o DNA genômico do mosquito *Aedes aegypti* é clivado com as enzimas de restrição Eco RI e Pst I e hibridizado com pDm 238 produziu duas bandas de 7,2 e 1,8Kb. Quando este DNA é clivado com Hind III forma-se uma única banda de 9,0Kb. Baseados nestes dados, aqueles pesquisadores afirmaram que o tamanho do cístron de rDNA desta espécie é 9,0Kb.

Em *Chironomus tentans*, a digestão de DNA genômico com Eco RI revelou dois fragmentos de 0,95 e 7,5Kb e com a enzima Hind III e Pst I gerou um fragmento de 8,4Kb. Clones de rDNA de *Chironomus tepperi* digeridos com as enzimas Eco RI e Hind III também produziram um fragmento de 8,4Kb, o que levou os autores a concluir que aquele era o tamanho do cístron (DEGELMANN *et al.*, 1979; ISRAELEWSKI & SCHMIDT, 1982). A digestão do rDNA da subespécie *Chironomus thummi piger* com Eco RI gera um fragmento de 9,0Kb que corresponde ao tamanho da unidade de rDNA (ISRAELEWSKI & SCHMIDT, 1982).

Após digestão com a enzima Sal I foi detectada uma banda difusa de alto peso molecular, nas três espécies estudadas, sendo que, os tamanhos mínimo e máximo da banda correspondem, respectivamente, ao comprimento da unidade e ao dobro do tamanho da

unidade de repetição de cada espécie. Resultado semelhante foi observado por GALE & CRAMPTON (1989) quando o DNA genômico de *Aedes aegypti* foi digerido com esta enzima. No entanto, a digestão dupla Sal I/Pst I, nas três espécies estudadas mostrou o mesmo padrão daquele encontrado com a digestão Pst I. Há várias possibilidades para explicar este resultado: 1) parte do rDNA destas espécies poderia conter inserção dentro da região 28S onde um sítio Sal I poderia estar presente que é o que ocorre no rDNA de *D. melanogaster* e *D. hydei* (DAWID *et al.*, 1978; KUNZ *et al.*, 1981) ou devido à subrepetições no IGS como foi verificado na subespécie *C. th. thummi* (ISRAELEWSKI & SCHMIDT, 1982); 2) a presença de um sítio Sal I muito próximo ao sítio Pst I, não sendo detectado pelas sondas utilizadas, o que é improvável considerando que o rDNA de *C. erythrocephala*, espécie relacionada às deste estudo, apresenta um sítio Sal I na região ETS, (BECKINGHAM & WHITE, 1980), *A. gambiae*, em que o sítio Sal I está contido na região IGS (BLACK *et al.*, 1989) e, *A. albopictus* que contém sítio Sal I na extremidade 3' da região 28S (PASKEWITZ *et al.*, 1993) e, 3) a presença de sítios metilados em algumas unidades de repetição (CTGCA↓G - Pst I; G↓TCGAC - Sal I) e, assim, haveria digestão incompleta. MADEN & TARTOF (1974) demonstraram a presença de sequências metiladas nas regiões codificadoras 18S e 28S do rDNA de *D. melanogaster*.

O DNA genômico de *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria*, apresentou uma única banda Bam HI de alto peso molecular e por estar fora da curva padrão, não foi possível estimar o tamanho com precisão. Em relação à digestão dupla Eco RI/Bam HI, foi detectado um fragmento com o mesmo padrão obtido na digestão com Eco RI. Assim, é possível supor que não exista sítio Bam HI no rDNA destas espécies, ou que exista apenas em inserções.

A presença de sítio Bam HI no rDNA de insetos foi demonstrado anteriormente apenas em unidades contendo inserções, em *D. melanogaster* (DAWID *et al.*, 1978) e em *Calliphora erythrocephala* (BECKINGHAM & WHITE, 1980). Como a maioria das unidades de repetição de rDNA de *C. erythrocephala* não é composta por inserções, BECKINGHAM (1981) mostrou que a maior parte do rDNA permanece com um tamanho extrapolado (>40Kb) depois da digestão com Bam HI. No entanto, quando o rDNA contendo inserção é digerido com essa enzima aparece um sítio de restrição dentro deste.

Neste estudo também foi possível observar que quando o rDNA com inserção é digerido com esta enzima algumas vezes encontrou-se um segundo fragmento de 10,4Kb e foi postulado que 50% dos cístrons contêm um sítio adicional Bam HI, que estaria localizado na região IGS + ETS, próximo ao sítio Sal I.

Os mapas das unidades de repetição das três espécies estudadas apresentam muitas similaridades entre si e com outras espécies como, *D. melanogaster* e *C. erythrocephala* (Figura 15). Assim, observou-se um alto nível de conservação para a maioria dos sítios de restrição, especialmente dentro das regiões codificadoras.

O sítio Pst I localiza-se na região transcrita interna (ITS) do rDNA de *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria*. Trata-se de um sítio conservado evolutivamente entre os dípteros. Isto ocorre também, em *C. erythrocephala* (BECKINGHAM & WHITE, 1980), *D. melanogaster* (DAWID et al., 1978), *Chironomus sancticaroli*, *C. thummi* e *C. tentans* (MOREIRA et al., 1992) e também em várias espécies de *Anopheles* como *A. hermsi*, *A. freeborni*, *A. quadrimaculatus*, *A. albimanus* e *A. gambiae* (COLLINS et al., 1990).

Situação semelhante é observada com relação à presença do sítio Eco RI na extremidade 3' do gene 18S nas espécies *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria*. Este sítio conservado evolutivamente tem sido descrito em uma variedade de dípteros como *D. melanogaster*, *C. erythrocephala*, *A. albopictus* e *A. aegypti* (GLOVER & HOGNESS, 1977; BECKINGHAM & WHITE, 1980; GALE & CRAMPTON, 1989; FALLON et al., 1991).

Em *C. putoria*, no entanto, a enzima Eco RI produziu dois fragmentos de 6,0 e de 4,0Kb revelando assim, a presença de um outro sítio além daquele conservado. Dois sítios de restrição para a enzima Eco RI foram também encontrados em outras espécies, porém suas localizações nem sempre coincidem. Em *A. albopictus*, estes sítios encontram-se em extremidades opostas dentro da região 18S e em *Anopheles gambiae*, um sítio localiza-se próximo à extremidade 5' da região 18S, ou seja na ETS e o outro na extremidade 3' da região codificadora 28S (BLACK et al., 1989; PASKEWITZ et al., 1993). Em *C. Putoria*, um sítio Eco RI é conservado evolutivamente localizando-se na extremidade 3' do gene 18S, como na maioria dos dípteros e o outro sítio localiza-se dentro da região IGS diferentemente daqueles dípteros que possuem dois sítios.

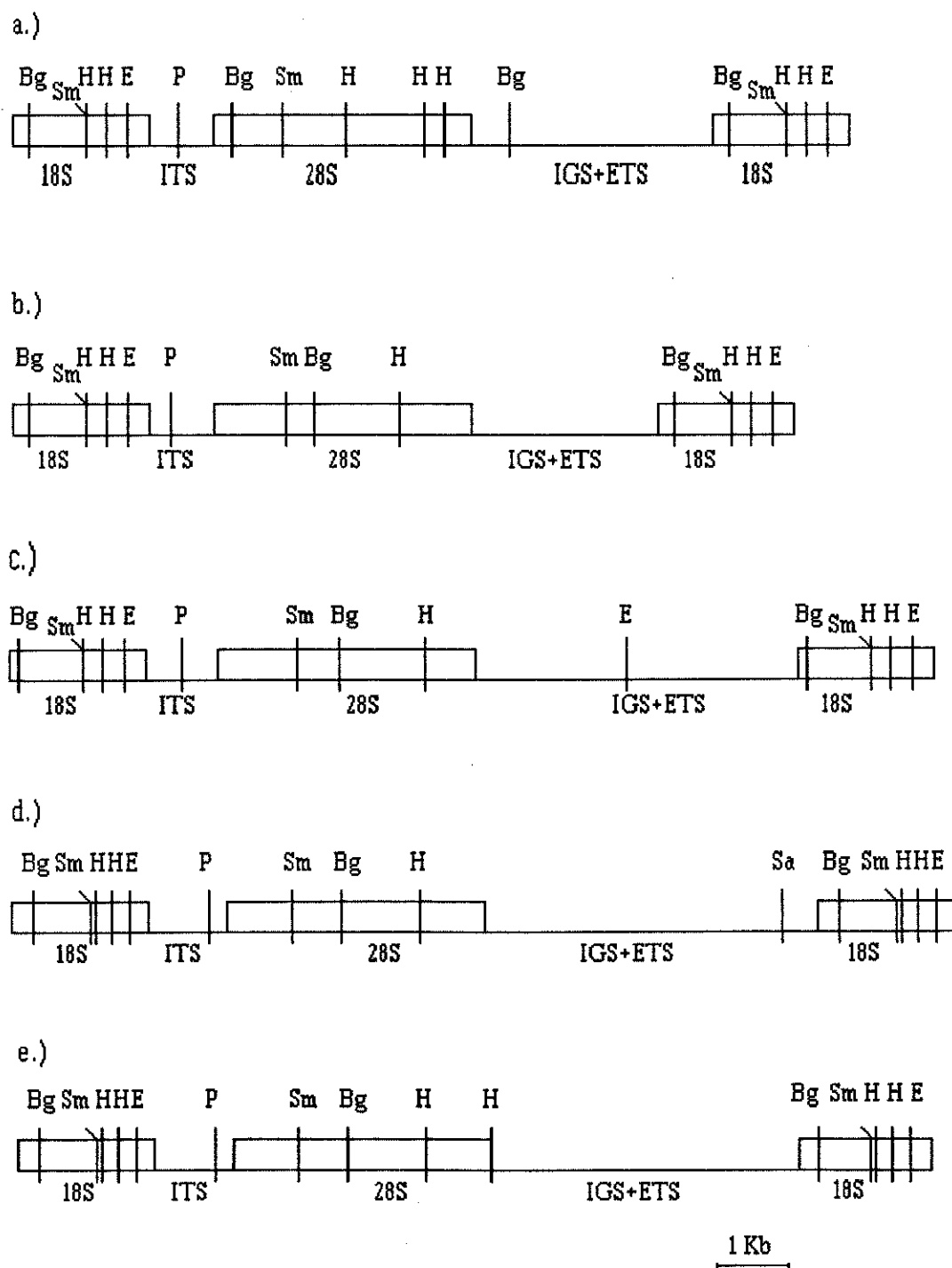


Figura 15- Comparação dos mapas de restrição do rDNA de *H. irritans*(a), *M. stabulans*(b), *C. putoria*(c), *C. erythrocephala* (d) e *D. melanogaster* (e) (Beckingham & White, 1980). Ba = Bam HI, Bg = Bgl II, E = Eco RI, H = Hind III, K = Kpn I, P = Pst I, Sa = Sal I e Sm = Sma I.

As três espécies estudadas mostraram o mesmo padrão com relação à localização de dois sítios Hind III dentro da região codificadora 18S, que estão distantes entre si cerca de 300pb. Um fragmento Hind III com este tamanho também foi encontrado em outras espécies como *D. melanogaster* e *C. erythrocephala* (DAWID *et al.*, 1978; BECKINGHAM & WHITE, 1980). As três espécies apresentaram também em comum um sítio Hind III na região 28S, porém a espécie *H. irritans*, além deste, apresentou dois sítios adicionais na extremidade 3' da região codificadora 28S, sendo que a distância entre os mesmos é de cerca de 300pb. A distância entre um destes sítios Hind III adicionais e o outro sítio Hind III, conservado, presente na região 28S nesta espécie é de 1,1Kb. Uma distância semelhante entre dois sítios Hind III presentes na região 28S foi verificado apenas em *D. melanogaster* (GLOVER & HOGNESS, 1977).

Em *M. stabulans*, após digestão com Hind III e hibridização com as sondas pDm 238 e HM 456, foi detectado, além dos fragmentos de 4,6, 4,2 e 0,29Kb um fragmento de 9,0Kb que corresponde ao tamanho da unidade de repetição para esta espécie. Isto possivelmente se deve ao fato de ter ocorrido digestão incompleta, pois também foi detectado um fragmento de 4,9Kb não observado em hibridizações anteriores e também não apareceu um fragmento de cerca de 300pb detectado em outros filmes.

A distância em torno de 300pb entre os sítios Hind III e Eco RI presentes no gene 18S em *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria* também parece ser uma característica conservada. Esta mesma distância entre estes dois sítios foi encontrada na região codificadora 18S de *D. melanogaster* e *C. erythrocephala* (DAWID *et al.*, 1978; BECKINGHAM & WHITE, 1980).

A digestão do DNA genômico das três espécies, com a enzima Sma I produziu dois fragmentos, sendo o menor entre 2,8 e 3Kb, e o maior entre 6,9 e 8,0Kb. O fragmento maior contém parte das regiões codificadoras 18S e 28S e a região IGS. TARTOF & DAWID (1976) mostraram que a digestão do DNA genômico de *D. melanogaster*, com a enzima Sma I, produziu no rDNA do cromossomo Y dois fragmentos de 8,5 e 2,8Kb, os quais hibridizaram com RNAs 18S e 28S.

A localização dos dois sítios Sma I nos rDNAs de *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria* está de acordo com o observado nas espécies *D. melanogaster* e *C. erythrocephala*

(TARTOF & DAWID, 1976; BECKINGHAM, 1981). O sítio Sma I localizado na região 18S ou coincide ou está muito próximo de um sítio Hind III. Nas subespécies *C. th. thummi* e *C. th. piger*, um único sítio Sma I foi localizado na região 28S (ISRAELEWSKI & SCHMIDT, 1982; SCHMIDT *et al.*, 1982).

A localização dos dois sítios Bgl II nos rDNAs de *M. stabulans* e *C. putoria* também está de acordo com o encontrado nas espécies *D. melanogaster*, *C. erythrocephala* e *A. gambiae* (DAWID *et al.*, 1978; BECKINGHAM & WHITE, 1980; PASKEWITZ *et al.*, 1993). No entanto, no rDNA de *H. irritans*, foram detectados três sítios Bgl II em regiões distintas em relação àquelas espécies. Na espécie *A. albopictus* existem também três sítios Bgl II, sendo que um sítio está presente no gene 18S e os outros dois estão contidos no gene 28S (BLACK *et al.*, 1989)

5.2. PARTICULARIDADES

Alguns fragmentos adicionais com tamanhos não estimados e contendo sinais fracos de hibridização foram detectados em *H. irritans* após digestão do DNA com Eco RI e Eco RI/Pst I e hibridização com a sonda homóloga pcHi 18, que provavelmente está relacionado com a heterogeneidade da região IGS. Com a sonda HM123, fragmentos adicionais também foram detectados nesta espécie. Como esta sonda abrange a região do gene 28S, uma possível explicação para estes fragmentos seria a heterogeneidade da região IGS e/ou a presença de inserção. Fragmentos adicionais foram encontrados em *C. putoria* após digestão com Eco RI e Eco RI/Hind III e hibridização com a sonda pDm 238. Assim, também em *C. putoria*, a detecção de fragmentos menores ou maiores do que os esperados nos mapas pode estar relacionado à heterogeneidade da unidade de repetição ou mesmo devido à impossibilidade de localização exata do sítio Eco RI dentro do IGS. Estas possibilidades são bastantes plausíveis, se considerarmos que maioria dos dípteros até hoje estudados, apresenta heterogeneidade nas unidades de repetição devido, especialmente, às inserções.

O rDNA presente no cromossomo X de *Drosophila melanogaster* apresenta um único sítio para a enzima Eco RI no gene rRNA 18S dando, no entanto, origem à

segmentos de 11Kb e 17Kb, cada um contendo unidade de repetição inteira, enquanto que o rDNA do cromossomo Y contém apenas 11Kb. O fragmento de 17Kb contém uma unidade de rDNA com inserção tipo I, de 5Kb, dentro do gene rRNA 28S. Algumas unidades de repetição, no entanto, contêm sítios Eco RI adicionais, normalmente nas inserções tipo II resultando em fragmentos menores que 11Kb (7.5 e 5.5Kb) (TARTOF & DAWID, 1976; WELLAUER & DAWID, 1977; WELLAUER *et al.*, 1978). Estes fragmentos menores são produtos de dois sítios Eco RI que ocorrem apenas em 10 - 20% das unidades de repetição de rDNA. Estes sítios estão localizados dentro da inserção e da região intergênica (IGS) próximo à extremidade do gene 28S (WELLAUER & DAWID, 1977). Além disso, a heterogeneidade no comprimento da unidade de repetição de rDNA de *D. melanogaster*, após digestão do rDNA com a enzima Eco RI é explicada também por variação no número de subrepetições dentro do IGS. As várias combinações, de inserções e subrepetições dentro do IGS, resultam em muitas classes de comprimento das unidades de repetição conduzindo, desta maneira, a uma banda muito difusa entre 11 e 17Kb.

BECKINGHAM & WHITE (1980) analisaram o rDNA de *C. erythrocephala*, um díptero da mesma subordem (Cyclorrhapha) que *D. melanogaster*, e observaram que a organização do cistron de rDNA destas duas espécies é notavelmente similar. O DNA total de *C. erythrocephala* clivado com Eco RI, Sal I e PstI, hibridizado com sondas que juntas contêm as regiões codificadoras para os genes 18S e 28S (pKBs 41 e 42), apresenta dois fragmentos de 11,6 e 13,1Kb, revelando que o rDNA sem inserção possui duas classes de comprimento. Porém, existe somente um sítio para cada uma destas enzimas dentro de cada classe de rDNA sem inserção. Assim também, o DNA digerido com Hind III apresenta dois fragmentos de 4,5Kb e 7,0Kb a partir do cistron de 11,6Kb. No entanto pode ocorrer que em vez de um fragmento de 7,0Kb (que possui as regiões IGS e ETS) apareça um variante de 8,2Kb, demonstrando assim que a unidade de repetição de rDNA de 13,1 Kb sem inserção é proveniente da variação no número de subrepetições na região IGS (BECKINGHAM, 1981).

Em *H. irritans*, a enzima Bgl II produziu dois fragmentos de 3,9 e 3,0Kb que somados apresenta um valor menor que o tamanho da unidade de repetição. Supôs-se, portanto, que provavelmente exista um sítio Bgl II na região IGS. Assim, uma explicação

para este resultado seria a sobreposição de dois fragmentos na banda de aproximadamente 3Kb ou a não detecção de um fragmento presente na região IGS.

Em *C. thummi*, a enzima Hind III produz dois fragmentos, um de 5,8Kb que hibridiza com a sonda que possui a região 28S e outro de 2,1Kb que hibridiza com a sonda 18S. A soma destes fragmentos é menor que 9,0 (7,9Kb), assim, segundo estes autores, o terceiro fragmento Hind III não detectado deve encontrar-se na região intergênica.

A unidade de repetição de *C. sancticaroli* digerido com Eco RI e hibridizado com sonda pDm 238 apresentou um fragmento de 8,5Kb, sendo que a digestão com Hind III mostrou apenas um fragmento de 7.4Kb. MOREIRA e colaboradores (1992) sugeriram que o fragmento de 1,1Kb não foi observado devido à falta de homologia da sonda por estar o fragmento na região intergênica.

No caso da digestão com a enzima Sma I, tanto em *H. irritans* quanto em *C. putoria*, foram detectados fragmentos correspondentes ao tamanho da unidade de repetição. A explicação para este fato tanto pode ser a heterogeneidade de tamanho da unidade, como a possibilidade de não ter ocorrido digestão completa devido à presença de sítios metilados em algumas das unidades de repetição. A possibilidade de ocorrer sítios metilados também poderia estar relacionada à presença de uma banda difusa entre 6,1 e 11Kb encontrada em *C. putoria*, após digestão com Sma I e hibridização com pcHi 18 e com a presença de um fragmento de 3,5Kb em *H. irritans* detectado pelas sondas pcHi 18 e HM 123.

A presença de sítios metilados em algumas unidades de repetição de *M. stabulans* poderia ser responsável pelo aparecimento de um fragmento Sma I de 8,0Kb detectado por todas as sondas, sendo este maior do que o fragmento presente no mapa de restrição (6,2Kb), de um fragmento Sma I/Hind III de 2,2Kb detectado pelas sondas pDm 238 e HM 123 e de um fragmento de 4,8Kb revelado por todas as sondas utilizadas, uma vez que Sma I não reconhece sítios metilados. Em *D. melanogaster* foi verificada a presença de sítios metilados nas regiões codificadoras (MADEN & TARTOF, 1974).

A presença de inserções e subrepetições no rDNA dos muscúdeos estudados deverá ser verificada posteriormente através de clonagem e utilização de outras sondas específicas para a detecção destas variações.

6. CONCLUSÕES

1. Os tamanhos estimados das unidades de repetição de rDNA sem inserção das espécies *H. irritans*, *M. stabulans* e *C. putoria* são, respectivamente, 9,8; 9,0 e 11,0Kb. Estes valores encontram-se dentro do esperado, considerando dados encontrados na literatura para rDNA de dípteros.

2. A maioria dos sítios de restrição do rDNA nas três espécies, é conservada em número e localização e também coincidem com *C. erythrocephala*, espécie da família Calliphoridae, e *D. melanogaster* (Drosophilidae). Os sítios conservados são: Eco RI na extremidade 3' do gene 18S, Pst I na região ITS, dois sítios para as enzimas Bgl II e para Sma I e dois sítios Hind III no gene 18S.

3. A espécie *C. putoria* difere de *H. irritans* e *M. stabulans* pela presença de um sítio Eco RI na região intergênica. *H. irritans* apresenta dois sítios Hind III muito próximos na extremidade da região codificadora 28S, e um sítio Bgl II na região intergênica, os quais não são encontrados nas outras duas espécies. Além disso, o outro sítio Bgl II, presente na região 28S, encontra-se mais próximo da extremidade 5' em *H. irritans* do que nas outras espécies.

4. A presença de fragmentos adicionais, bandas difusas e fragmentos que não se encaixaram no mapa de restrição, indicam heterogeneidade no comprimento de alguns fragmentos nas três espécies. Isto se deve, provavelmente, à variação na região IGS ou à presença de inserções dentro da região 28S, à semelhança do que ocorre em outros dípteros.

5. As enzimas Eco RI, Hind III e Bgl II permitem diagnosticar cada uma das espécies estudadas devido ao padrão de bandas que apresentam.

6. Os mapas de restrição de *C. putoria* e *C. erythrocephala*, que pertencem à família Calliphoridae, são mais semelhantes entre si do que *H. irritans* e *M. stabulans*, da família Muscidae.

7. O mapa de restrição permite conhecer a estrutura básica do rDNA o que facilitará estudos posteriores de clonagem e sequenciamento de bases e poderá servir, somado ao estudo em outras espécies, para estudos filogenéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDRIDGE, G. D. & FALLON, A. M. Primary structure of the ribosomal DNA intergenic spacer from the mosquito, *Aedes albopictus*. **DNA and Cell Biol.** 11(1): 51-59, 1992.
- BEACH, R. F. MILLS, D. & COLLINS, F. H. Structure of ribosomal DNA in *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.** 82(5):641-648, 1989.
- BECKINGHAM, K. & WHITE, R. The ribosomal DNA of *Calliphora erythrocephala*; an analysis of hybrid plasmids containing ribosomal DNA. **J. Mol. Biol.** 137:349-373, 1980.
- BECKINGHAM, K. The ribosomal DNA of *Calliphora erythrocephala*. The cistron classes of total genomic DNA. **J. Mol. Biol.** 149:141-169, 1981.
- BECKINGHAM, K. **INSECT rDNA IN: THE CELL NUCLEUS.** H. Busch e L. Rothblum.(eds.), Academic Press, New York, vol X, pp: 205-269, 1982.
- BIRBOIN, H. C. & DOLY, J. A. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl. Acid. Res.** 7:1513-1522, 1979.
- BLACK, W. C. MCLAIN, D. K. & RAI, K. S. Patterns of variation in the rDNA cistron within and among world populations of a mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). **Genetics** 121:539-550, 1989.
- BOTCHAN, P. REEDER, R. H. & DAWID, I. B. Restriction analysis of the nontranscribed spacers of *Xenopus laevis* ribosomal DNA. **Cell** 11:599-607, 1977.

- BROWN, D. D. WENSIK, P. C. & JORDAN, E. A. Comparison of the ribosomal DNAs of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. **J. Mol. Biol.** **63**:57-73, 1972.
- COEN, E. STRACHAN, T. & DOVER, G. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone genes families in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. **J. Mol. Biol.** **158**:17-35, 1982a.
- COEN, E. THODAY, J. M. & DOVER, G. Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. **Nature** **295**:564-568, 1982b.
- COEN, E. & DOVER, G. A. Multiple Pol I initiation sequences in rDNA spacers of *Drosophila melanogaster*. **Nucl. Acid. Res.** **10**(21):7017-7026, 1982.
- COLLINS, F. H. MENDEZ, M. A. RASMUSSEN, M. O. MEHAFFEY, P. C. BESANSKY, N. J. & FINNERTY, V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **37**(1):37-41, 1987.
- COLLINS, F. H. PORTER, C. H. & COPE, S. E. Comparison of rDNA and mtDNA in the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **42**(5):417-423, 1990.
- CROSS, N. C. P. & DOVER, G. A. A novel arrangement of sequence elements surrounding the rDNA promoter and its spacer duplications in *Tsetse* species. **J. Mol. Biol.** **195**:63-74, 1987a.
- CROSS, N. C. P. & DOVER, G. A. *Tsetse* fly rDNA: an analysis of structure and sequence. **Nucl. Acids. Res.** **15**(1):15-30, 1987b.

- DAWID, I. B. WELLAUER, P. K. & LONG, E. O. Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster*. I. Isolation and characterization of cloned fragments. **J. Mol. Biol.** **126**:749-768, 1978.
- DEGELMANN, A. ROYER, H-D. & HOLLENBERG, C. P. The organization of the ribosomal RNA genes of *Chironomus tentans* and some closely related species. **Chromosoma** **71**:263-281, 1979.
- DE WINTER, R. F. J. & MOSS, T. Spacer promotor are essential for efficient enhancement of *X. laevis* ribosomal transcription. **Cell** **44**: 313-318, 1986.
- DOVER, G. A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature** **299**:111-117, 1982.
- DOVER, G. A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends in Genet.** **2**:159-165, 1986.
- FALLON, A. M., BLAHNIK, R. J., BALDRIDGE, G. D., & Park, Y-J. Ribosomal DNA structure in *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae) and their cell lines. **J. Med. Entomol.** **28**(5): 637-644, 1991.
- FEDEROFF, N. V. On spacer. **Cell** **16**:697-710, 1979.
- FILES, J. M. & HIRSH, D. Ribosomal DNA of *Caenorhabditis elegans*. **J. Mol. Biol.** **149**:223-240, 1981.
- FUTUYMA, D. J. **BIOLOGIA EVOLUTIVA** : trad. de Mario de Vivo, SBG/CNPq, 2º. ed., cap 15 pp:487-496, 1992.
- GALE, K. & CRAMPTON, J. The ribosomal genes of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Eur. J. Biochem.** **185**: 311-317, 1989.

- GLOVER, D. M. & HOGNESS, D. S. A novel arrangement of the 18S and 28S sequences in a repeating unit of *D. melanogaster* rDNA. **Cell** 10:167-176, 1977.
- GRANETT, P. & HANSENS, E. Further observations on the effect of biting fly control on milk production on cattle. **J. Econ. Entomol.** 50:332-336, 1957.
- GREENBERG, B. **FLIES AND DISEASE**. Ecology, classification and biotic associations. Princeton University Press. Princeton. vol I cap 3 pp:57-75, New Jersey, 1971.
- GUIMARÃES, J. H. PRADO, A. P. & LINHARES, A. X. Three newly introduced blow fly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Rev. bras. Ent.** 22(1):53-60, 1978.
- GUIMARÃES, J. H. PRADO, A. P. & BURALLI, G. M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Rev. bras. Ent.** 23(4): 245-255, 1979.
- HARRIS, R. L. MILLER, J. A. & FRAZAR, E. D. Horn flies and stable flies: feeding activity. **Ann. Entomol. Soc. Amer.** 67:891-894, 1974.
- HARVEY, T. L. & LAUNCHBAUGH, J. L. Effect of horn flies on behavior of cattle. **J. Econ. Entomol.** 75:25-27, 1982.
- HAYWARD, D. C. & GLOVER, D. M. The promoters and spacers in the rDNAs of the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. **Gene** 77: 271-285, 1989.
- HEWITT, C. G. **HOUSE FLIES AND HOW THEY SPREAD DISEASE**. Cambridge University Press. Cambridge. pp:49-51, 1912.
- HILLIS, D. M. & DAVIS, S. K. Evolution of ribosomal DNA: fifty million years of recorded history in the frog genus *Rana*. **Evolution** 40(6):1275-1288, 1986.

- HILLIS, D. M. & DAVIS, S. K. Evolution of the 28S ribosomal RNA gene in anurans: regions of variability and their phylogenetic implications. **Mol. Biol. Evol.** 4(2):117-125, 1987.
- ISRAELEWSKI, N. & SCHMIDT, E. R. Spacer size heterogeneity in ribosomal DNA of *Chironomus thummi* is due to a 120bp repeat homologous to a predominantly centromeric repeated sequence. **Nucl. Acid. Res.** 10(23):7689-7701, 1982.
- JAMES, M. T. The flies that cause myiasis in man. **Misc. Pub. U. S. Dept. Agr.** 631:1-175, 1947.
- JORDAN, B. R. JOURDAN, R. & JACQ, B. Later steps in the maturation of *Drosophila* 26S ribosomal RNA: generation of 5.8S and 2S RNAs by cleavages occurring in the cytoplasm. **J. Mol. Biol.** 101:85-105, 1976.
- JORDAN, B. R. & GLOVER, D. M. 5.8S and 2S rDNA is located in the transcribed spacer region between the 18S and 26S rRNA genes in *Drosophila melanogaster*. **FEBS. LETTERS.** 78(2):271-274, 1977.
- KAMBHAMPATI, S. & RAI, K. S. Temporal variation in the ribosomal DNA nontranscribed spacer of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Genome** 34:293-297, 1990.
- KERREBROCK, A. W. SRIVASTAVA, R. GERBI, S. A. Isolation and characterization of ribosomal DNA variants from *Sciara coprophila*. **J. Mol. Biol.** 210: 1-13, 1989.
- KUNZ, W. PETERSEN, G. RENKAWITZ-POHL, R. GLATZER, K. H. & SCHAFFER, M. Distribution of spacer length classes and the intervening sequence among different nucleolus organizers in *Drosophila hydei*. **Chromosoma** 83:145-158, 1981.

- LANCASTER, J. L. & MEISH, M. V. **ARTHROPODS IN LIVESTOCK AND POULTRY PRODUCTION**. Ellis Horwood Limited, England, 1st (ed), pp: 90-103, 1986.
- LAURENCE, B. R. Old world blow flies in the new world. **Parasitol. Today** 2(3):77-78, 1986.
- LI, W-H. & GRAUR, D. **EVOLUTION**.. Sinauer Associates, publishers, cap 6 pp: 162-169, Massachusetts, 1991.
- LIMA, M. L. P. S. & LUZ, E. Espécies exóticas de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) como veiculadoras de enterobactérias patogênicas em Curitiba, PR Brasil. **Acta. Biol. Par., Curitiba**, 20(1,2,3,4):61-83, 1991.
- LINHARES, A. X. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev. bras. Ent.** 25(3): 189-215, 1981.
- LONG, E. O. & DAWID, I. B. Expression of ribosomal DNA insertions in *Drosophila melanogaster*. **Cell** 18:1185-1196, 1979.
- LONG, E. O. & DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Biochem.** 49:727-764, 1980.
- LUPOLI, R. IRWIN, M. E. & VOSSBRINCK, C. R. A ribosomal DNA probe to distinguish populations of *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera: Aphididae). **Ann. App. Biol.** 117:3-8, 1990.
- MADEN, B. E. H. & TARTOF, K. Nature of the ribosomal RNA transcribed from the X and Y chromosomes of *Drosophila melanogaster*. **J. Mol. Biol.** 90: 51-64, 1974.
- MAEDA, N. & SMITHIES, O. The evolution of multigene families: human haptoglobin genes. **Ann. Rev. Genet.** 20:81-108, 1986.

- MARCHIONDO, A. A. Biology, economic effect and control of the horn fly. **Animal Health and Nutrition**. May/June, pp:6-10, 1987.
- MCLAIN, D. K. & COLLINS, F. H. Structure of rDNA in the mosquito *Anopheles gambiae* and rDNA sequence variation within and between species of the *A. gambiae* complex. **Heredity** **62**: 233-242, 1989.
- MEUNIER-ROTIVAL, M. CORTADAS, J. MACAYA, G. & BERNADI, G. Isolation and organization of cell ribosomal DNA. **Nucl. Acids. Res.** **6**(6), 1979.
- MOREIRA, M. A. M. SILVA, L. A. F. BEZERRA, J. P. & LEONCINI, O. Analysis of the rDNA of *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae). **Rev. bras. Genet.** **15**(4):821-829, 1992.
- MORGAN, N. O. Autecology of the adult horn fly *Haemaobia irritans* (L) (Diptera: Muscidae). **Ecology** **45**(4):728-736, 1964.
- OHTA, T. & DOVER, G. A. Population genetics of multigene families that are dispersed into two or more chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **80**:4079-4083, 1983.
- PALMER, W. A. & BAY, D. E. Moisture content of the during pupa as a factor in the survival of larval stages of the horn fly *Haematobia irritans* (L). **Protec. Ecol** **4**:353-359, 1982.
- PARK, Y-J. & FALLON, A. M. Mosquito ribosomal RNA genes: characterization of gene structure and evidence for changes in copy number during development. **Insect Biochem.** **20**(1): 1-11, 1990.
- PASKEWITZ, S. M. WESSON, D. M. & COLLINS, F. H. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. **Insect Mol. Biol.** **2**(4): 247-257, 1993.

- PELLEGRINI, M. MANNING, J. & DAVIDSON, N. Sequence arrangement of the rDNA of *Drosophila melanogaster*. *Cell* **10**:213-224, 1977.
- PERRY, R. P. Processing of RNA. *Ann. Rev. Biochem.* **45**:605-629, 1976.
- PORTER, C. H. & COLLINS, F. H. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**(2):271-279, 1991.
- PRADO, A. P. & GUIMARÃES, J. H. Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera, Calliphoridae). *Rev. bras. Ent.* **26**(3/4): 225-231, 1982.
- QUEIROZ, S. M. P. & CARVALHO, C. J. B. Chave Pictória e descrições de larvas de terceiro instar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae) em vazadouros de resíduos domésticos em Curitiba, Paraná. *An. Soc. Entomol. Brasil*, **16**(2), 1987.
- RAE, P. M. M. BARNETT, T. & MURTF, V. L. Nontranscribed spacers in *Drosophila* ribosomal DNA. *Chromosoma* **82**:637-655, 1981.
- REEDER, R. H. Regulatory elements of the generic ribosomal gene. *Current Opinion in Cell Biology* **1**:466-474, 1989.
- RENKAWITZ-POHL, R. GLATZER, K. & H. KUNZ, W. Characterization of cloned ribosomal DNA from *Drosophila hydei*. *Nucl. Acids. Res.* **8**(20):4593-4611, 1980.
- RITOSSA, F. M. & SPIEGELMAN, S. Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **53**:737-745, 1965.

- ROIHA, H. MILLER, J.R. WOODS, L. E. & GLOVER, D. M. Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *D. melanogaster*. **Nature** 290(30):749-753, 1981.
- SAMBROOK, J. FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual** CSHL Press, New York, 1989.
- SCHAEFER, J. & SCHMIDT, E. R. Different repetition frequencies of a 120 base-pair DNA-element and its arrangement in *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. **Chromosoma** 84:61-66, 1981.
- SCHAFER, M. WYMAN, A. R. & WHITE, R. Length variation in the non-transcribed spacer of *Calliphora erythrocephala* ribosomal DNA is due to a 350 base-pair repeat. **J. Mol. Biol.** 146: 179-199, 1981.
- SCHLOTTERER, C. HAUSER, M-T. HAESLER & A. TAUTZ, D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** 11(3):513-522, 1994.
- SCHMIDT, E. R. The development of a 120 base pair repetitive DNA sequence in *Chironomus thummi* is correlated to the duplication of defined chromosomal segments. **FEBS LETTERS** 129(1): 21-24, 1981.
- SCHMIDT, E. R. GODWIN, E. A. KEYL, H-G. & ISRAELEWSKI, N. Cloning and analysis of ribosomal DNA of *Chironomus thummi piger* and *Chironomus thummi thummi*. **Chromosoma** 87:389-407, 1982.
- SHINE, J. & DALGARNO, L. Occurrence of heat-dissociable ribosomal RNA in insects: the presence of three polynucleotide chains in 26S RNA from cultured *Aedes aegypti* cells. **J. Mol. Biol.** 75:57-72, 1973.

- SILVA, L. A. F. MOREIRA, M. A. M. BEZERRA, J. P. TOVAR, F. J. ALMEIDA, C. A. S. MENEZES, R. A. & LEONCINI, O. Analysis of rDNA variation in the genus *Didelphis* (Marsupialia). **Rev. bras. Genet.** **18**(1): 37-42, 1995.
- SMITH, G. P. Unequal crossover and the evolution of multigene families. **Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.** **38**: 507-513, 1973.
- SMITH, G. P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science** **191**:528-535, 1976.
- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** **98**:503-517, 1975.
- SYTSMA, K. & SCHAAL, B. A. Ribosomal DNA variation within and among individuals of *Lisianthus* (*Gentianaceae*) populations. **Pl. Syst. Evol.** **170**:97-106, 1990.
- TARTOF, K. D. Unequal mitotic sister chromatid exchange and disproportionate replication as mechanisms regulating ribosomal RNA gene redundancy. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** **38**: 491-500, 1974.
- TARTOF, K. D. & DAWID, I. B. Similarities and differences in the structure of X and Y chromosome rRNA genes of *Drosophila*. **Nature** **263**(2): 27-30, 1976.
- TARTOF, K. D. Evolution of transcribed and spacer sequences in the ribosomal RNA genes of *Drosophila*. **Cell** **17**: 607-614, 1979.
- TAUTZ, D. TAUTZ, C. WEBB, D. & DOVER, G. A. Evolutionary divergence of promoters and spacers in the rDNA family of four *Drosophila* species. **J. Mol. Biol.** **195**: 525-542, 1987.
- VALÉRIO, J. R. & GUIMARÃES, J. H. Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae). **Rev. bras. Zool.** **1**:417-418, 1983.

- WELLAUER, P. K. & DAWID, I. B. The structural organization of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster*. **Cell** 10: 193-212, 1977.
- WELLAUER, P. K. DAWID, I. B. & TARTOF, K. D. X and Y chromosomal ribosomal DNA of *Drosophila*: comparison of spacers and insertions. **Cell** 14:269-278, 1978.
- WHITE, R. L. & HOGNESS, D. S. R loop mapping of the 18S and 28S sequences in the long and short repeating units of *Drosophila melanogaster* rDNA. **Cell** 10:177-192, 1977.
- WILLIAMS, R. E. HALL, R. D. BROCE, A. B. & SCHOOL, P. J. **LIVESTOCK ENTOMOLOGY** John Wiley & Sons pp: 25-257, New York, 1984.
- WILLIAMS, S. M. DESALLE, R. & STROBECK, C. Homogenization of geographical variants at the nontranscribed spacer of rDNA in *Drosophila mercatorum*. **Mol. Biol. Evol.** 2(4):338-346, 1985.
- WILLIAMS, S. M. FURNIER, G. R. FUOG, E. & STROBECK, C. Evolution of the ribosomal DNA spacers of *Drosophila melanogaster*: different patterns of variation on X and Y chromosomes. **Genetics** 116:225-232, 1987.
- WILLIAMS, S. M. & ROBBINS, L. G. Molecular genetic analysis of *Drosophila* rDNA arrays. **Trends in Genet.** 8(10):335-340, 1992.
- WILSON, G. N. KNOLLER, M. & SZURA L. L. SCHMICKEL, R. D. Individual and evolutionary variation of primate ribosomal DNA transcription initiation regions. **Mol. Biol. Evol.** 1(3):221-237, 1984.
- ZUMPT, F. **MYIASIS IN MAN AND ANIMALS IN THE OLD WORLD.** Butterworths, London, pp:2-96, 1965.