

BC/22798
IB/80010



MARIA ELENA INFANTE VARGAS

ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL EM POPULAÇÕES DE *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA:CALLIPHORIDAE), DO ESTADO DE SÃO PAULO.

São Carlos
7 de Maio

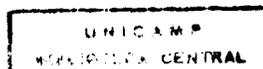
Tese apresentada para a obtenção do título de MESTRE junto ao Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Maria Elena Infante Vargas e aprovada pela Comissão Julgadora.

ORIENTADORA: Ana Maria Lima de Azeredo Espin

Campinas - S.P.

-1994-



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
V.	Im 3 a
Ex.	
TCMBO BC/	22798
PROC.	286194
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/10/94
N.º CPD	

em-00064735-5

A mis padres Jaime y Luisa, por cuidar con tanto esmero y dedicación de su jardín.

Por los incentivos siempre oportunos de superación.

Por el amor, la comprensión, el apoyo sin condiciones.....y por haber vivido estos años de nostalgia.

A Teresita, Cristina, Sergio, Camilo, Susan y Jaime, por haberme mostrado desde el principio el valor del amor y la amistad.....por compartir siempre penas y alegrías.

Dedico.

**A quem me ensina cada dia o valor da fé e da
esperança. A quem escuta, entende e espera.
A quem pode compreender a voz do amor...
por que ama, Célio Malachias.**

Estás em tudo que penso,
Estás em quanto imagino:
Estás no horizonte imenso,
Estás no grão pequenino.

Estás na ovelha que pasce,
Estás no rio que corre:
Estás em tudo que nasce,
Estás em tudo que morre.

Em tudo estás, nem repousas,
Ó ser tão mesmo e diverso!
Eras no início das coisas,
Serás no fim do universo.

Estás na alma e nos sentidos.
Estás no espírito, estás,
Na letra, e, os tempos cumpridos
No céu, no céu estarás.

Manuel Bandeira

AGRADECIMENTOS

A quem faz novas todas as coisas... nosso SENHOR JESUS CRISTO, por estar sempre ao meu lado pelo caminho.

A prof. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin, de quem nestes anos aprendi o entusiasmo pela ciência, pelo estímulo, apoio e compreensão. Verdaderamente, orientadora e amiga.

Ao prof. Dr. Crodowaldo Pavan, por ter-me aberto as portas do mundo científico no Brasil ao me receber como aluna, e pelas sugestões apresentadas durante a leitura da Tese.

A prof. Dra. Anete Pereira de Souza, pelos oportunos comentários e correções durante a leitura minuciosa da Tese.

Ao prof. Dr. André Luis Paranhos Perondini, pela boa disposição durante a correção da tese e pela significativa discussão da mesma.

Ao prof. Dr. Paulo Arruda, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - CBMEG, durante a realização do experimento de clonagem.

Ao prof. Dr. Adilson Leite, pela colaboração e importantes sugestões para a construção do banco genômico de DNAm de *C.hominivorax*.

A prof. Dra. Yoko Bomura Rosato, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de microorganismos - CBMEG, e pelo empréstimo solícito de alguns materiais requeridos para a clonagem.

Aos colegas e amigos Ana Cláudia Lessinger, Juliana Silveira do Valle, Luciano Scarpelli e Miguel de Oliveira, pela alegria de partilhar tantos momentos intra e extra laboratório, os quais através da convivência diária propiciaram apoio às dificuldades enfrentadas.

Aos colegas do Laboratório de Plantas: André L. Vettore de Oliveira, Silvia R. Turcinelli e Fernando Freitas; e as colegas do Laboratório de Microorganismos: Regina Baldini, Suzete Lanza Destefano e Georgia de Barros, pela prestatividade para responder minhas dúvidas e pela amizade.

Aos meus amigos da "Família de Casa", Nancy Sierra, Cláudia Guimarães, Ana Ribeiro Lobo, Edson Kemper, Eduardo Zagari, Guilherme Hartmman, Gonçalo A. de Souza Filho, Marcelo Brochi, Camilo Chaves, Beatrice Vasconcelo, Fagoni F. Calegario e Edson F. de Araújo, pela maravilha de aprender a viver em comunidade, por todas as ricas experiências vividas e pela grande amizade.

Aos amigos que ficaram no Chile, Juan Carlos Vilches, Lorena Salas, Patricia Estrada, Sonia Toledo, Maria Isabel Orrego, Ramón Navarro e Anita Tumayan, por todo o carinho, encorajamento e sua presença mesmo na distância.

A todos os amigos dos grupos de oração "Charolais" e "Louva a Deus", pela alegria de caminhar juntos na fé e por suas orações.

A Maria Tereza Marques Novo, Conceição Alves, José Olguín, Evandro J. Lima Rego e Nilda Montes pelo grande carinho e presença amiga sempre.

A Dra. Maria Cristina Arias, pelo companheirismo, paciência e amizade durante a estadia no nosso laboratório.

As prof. Dras. Cristine Hackel, Laura Maria Ottoboni, Maricilda Palandi de Mello e Helena Camarão, pelo contínuo estímulo na hora do cansaço e por suas palavras sempre oportunas.

A Nairlidia Salmi Hallais pelo contínuo apoio sem condições durante todo o desenvolvimento desta Tese, pela sua grande amizade e pela sua alegria contagiante.

A Rosângela A. Rodrigues pela sua grande dedicação, paciência, amizade e valioso apoio desde a minha chegada ao laboratório.

A Maria Salete do Couto Campos por ter me ensinado a mexer com a "mosca da bicheira", pela disponibilidade, carinho e amizade.

Ao Mário Constantino Filho pelo valioso auxílio durante as coletas de material no campo.

A Sandra L. Scarano, Tânia Zambon, Silvia Helena Clivelente e Terezinha do Valle pela atenciosa e oportuna prestatividade com que atenderam as minhas árduas solicitações no mestrado.

A Família Pero Ferreira: Sr. Antonio, D. Maria Helena, Marta Heloisa, Luis, Karen e Mariana por terem me acolhido como membro da família, fazendo sentir-me em casa.

A Família Malachias: D. Cida, Sandra e Cid pelo enorme carinho, acolhida e compreensão.

As crianças e mães da comunidade do Novo Parque Real em Barão Geraldo, por terem me mostrado a alegria de doar.

A todos os amigos e colegas que contribuíram para a realização desse trabalho e que não são mencionados aqui por questão de espaço, meu muito obrigada.

Aos meus queridos amigos e irmãos Marymar Gonçalves-Butruille, Antonio Francisco Ferreira Neto, José Andrés Yunes, Jorge Méndez e Germano Cord Neto por estarmos caminhando juntos, pelo grande carinho, pela unidade que há de perdurar...

A Universidade Estadual de Campinas, local onde foi realizado este trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

ABREVIACOES

A	Adenina
Ad	Adamantina
Amp	Amparo
AMPPD	3-(2' spiroadamantane)-4 methoxy-4- (3 phosphoriloxy) 3- (2-phenil -1,2 diotetane)
ATP	Adenosina trifosfato
BET	Brometo de Etídeo
Bo	Botucatu
C	Citosina
Ca	Caraguatatuba
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CsCl	Cloreto de Césio
DNA	Acido desoxiribonucleico
DNAmt	cido desoxiribonucleico mitocondrial
DNase I	Desoxiribonuclease I
DNApol I	DNA polimerase I
DEAE	Dietil aminoetil
EDTA	Etileno diamina tetraacetato
EGTA	Etileno glicol (b-aminoetil eter)
FLT	Freeze thaw lysate
g	unidade de aceleração gravitacional
G	Guanina
Hepes	N- (2- hidroxietil) piperazina - N' - 2(cido etano sulfúrico)
IPTG	Isopropil 1 -D- tiogalactosido
kpb	kilo base pair
LB	Luria Bertani
LBamp	Luria Bertani com ampicilina
LiCl	Cloreto de Lítio
MIM	Meio de isolamento mitocondrial
MLB	Mitochondrial Lysis Buffer
NBT	Nitro blue tetrazolium
RNA	Acido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism
SDS	Sodium Dodesyl Sulfate
SSC	Standar Sodium Citrate
SE	Sonicated Extract
T	Timina
TE	Tris EDTA
Tris	Tris (hydroxymetil) amino metano
U.V.	Ultra violeta
X-gal	5 bromo 4 cloro 3 indolyl β -galactopiranoside

ÍNDICE	n. da página
I. INTRODUÇÃO	1
a) Mífase e a <i>Cochliomyia hominivorax</i>	1
b) O DNA mitocondrial	5
c) Utilização do DNAMt	13
 II. OBJETIVOS	 18
 III. MATERIAIS E MÉTODOS	 19
1.0 MATERIAIS	19
2.0 MÉTODOS	20
2.1 Métodos de criação de <i>C. hominivorax</i>	20
2.2 Experimento de Isolinhagem	22
3.0 Análise do DNA mitocondrial	23
3.1 Extração total de ácido nucleico de <i>C. hominivorax</i>	23
3.2 Método para isolamento mitocondrial (M.I.M.)	24
3.3 Purificação do DNA mitocondrial	25
3.3a. Gradiente de Cloreto de Césio	25
3.3b. Diálise do DNA mitocondrial	26
3.4 Construção de sondas de DNA mitocondrial de <i>C. hominivorax</i>	 27
3.4.1. Construção de sonda utilizando DNAMt purificado	27
3.4.1a. Marcação com ³² P por "Nick Translation"	27
3.4.1b. Cromatografia por coluna de Sephadex	28
3.4.1c. Marcação com Digoxigenina por "Randon Primer"(Sonda fria)	 29
3.4.2. Construção de sonda utilizando DNAMt de <i>C. hominivorax</i> obtido por clonagem	 30
3.4.2.1. Clonagem em pGEM 3Z	33
3.4.2.1a. Isolamento do DNA plasmidial em larga escala	33

3.4.2.1b. Clonagem dos fragmentos	34
3.4.2.2. Clonagem em Bluescript SK (M13-)	38
3.4.2.2a. Excisão in vitro do plasmídeo	
Bluescript SK (M13-)	40
3.5. Análise do DNAMt com endonucleases de restrição	41
3.5.1. "Southern blot" e hibridização	42
3.5.2. Detecção da hibridização	43
3.5.2.1. Detecção da hibridização com ³² P	43
3.5.2.2. Detecção da hibridização com digoxigenina	43
3.5.2.2a. Revelação colorida com X-fosfato	43
3.5.2.2b. Revelação quimioluminescente com AMPPD	44
3.6. Análise da divergência de sequência do	
DNAMt interpopulações	44
IV. RESULTADOS	46
1.0. Métodos de criação de <i>C. hominivorax</i>	46
2.0. Métodos de extração do DNAMt	46
3.0. Experimentos de isolinhagem	48
4.0. Construção de sondas de DNAMt de <i>C. hominivorax</i>	48
4.1. DNAMt para a construção de sonda	48
4.2. Marcação das sondas	52
5.0. Clonagem dos fragmentos de DNAMt	54
5.1. Fragmentos derivados da digestão <i>Hind</i> III	54
5.2. Fragmentos derivados da digestão <i>Eco</i> RI	56
6.0. Análise do DNAMt com endonucleases de restrição	58
V. DISCUSSÃO	85
VI. CONCLUSÕES	103
RESUMO	106
SUMMARY	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

FIGURAS

n. da página

Figura 1	31
Figura 2	32
Figura 3	49
Figura 4	50
Figura 5	53
Figura 6	55
Figura 7	57
Figura 8	59
Figura 9 (a e b)	62
Figura 10 (a e b)	63
Figura 11 (a e b)	64
Figura 12 (a e b)	65
Figura 13	70
Figura 14	72
Figura 15	74
Figura 16	83

TABELAS

n. da página

Tabela 1	60
Tabela 2	66
Tabela 3	67
Tabela 4	77
Tabela 5	79
Tabela 6	81
Tabela 7	82

I. INTRODUÇÃO

a) Miíase e a *Cochliomyia hominivorax*

Dentre as pragas do gado bovino no Brasil, devemos destacar três pela sua grande importância econômica: carrapato (ácaros), berne (*Dermatobia hominis*) e bicheira (*Cochliomyia hominivorax*). O presente trabalho trata da análise de populações brasileiras (Estado de São Paulo) de *C. hominivorax*, a chamada mosca da bicheira que é considerada a principal responsável por miíase em vertebrados.

O termo miíase designa a infestação causada por larvas de dípteros que pelo menos por algum período durante o seu desenvolvimento se alimentam dos tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de suas substâncias corporais líquidas ou do alimento por ele ingerido. Entre as espécies de moscas causadoras de miíases, destacam-se às pertencentes à família Calliphoridae, que inclui dois grupos: o primeiro inclui moscas cujas larvas se alimentam e se desenvolvem em feridas recentes de animais vivos, causando miíase primária, e aquelas cujas larvas são invasoras de tecidos necrosados das feridas e/ou material orgânico em decomposição causando miíase secundária. No primeiro grupo, destaca-se a espécie *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1958). No Brasil, esta espécie é considerada a principal causadora de miíase em vertebrados silvestres e especialmente nos domésticos tais como bovinos (principal hospedeiro), suínos, ovinos e caprinos.

O ciclo de vida de *C. hominivorax* na natureza é de aproximadamente 18 a 20 dias. No oitavo dia após a emergência, as fêmeas fecundadas podem ovipor uma massa de ovos de cerca de 250 ovos (geralmente nas bordas de alguma ferida aberta). Após um período embrionário de aproximadamente 12 horas, as larvas emergem e imediatamente começam a se alimentar dos

tecidos dérmicos e subdérmicos da ferida. Após cinco dias de desenvolvimento as larvas atingem o terceiro estágio, saem da ferida e caem no solo, onde sofrem a muda pupal. O período de pupa dura em média 6 dias, seguido da emergência dos adultos. Com um período de cerca de oito dias de idade, as fêmeas podem ovipor completando o ciclo de vida da espécie.

A distribuição geográfica desta espécie é ampla e anteriormente compreendia a região Neártica da América do Norte, toda a América Central e América do Sul (Baumhover, 1966). Atualmente, a distribuição continental desta praga é inteiramente Neotropical devido a erradicação nos Estados Unidos e México, através da técnica de esterilização de insetos (Snow *et al.* 1985; Taylor *et al.* 1991; FAO, 1992). Porém, recentemente foi notificada a presença de *C.hominivorax* na Líbia a partir de 1988 (Beesley, 1990 e FAO, 1993). Esta foi a primeira vez que a presença deste ectoparasita foi registrada no continente africano e também fora das Américas. De acordo com pesquisadores do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, esta espécie de mosca atingiu a Líbia acidentalmente há cerca de 3 anos atrás, em decorrência do tráfico de animais domésticos provenientes da América do Sul. Até o momento a infestação por *C.hominivorax* está restrita a uma área de 20.000 Km² em torno de Trípoli (30 Km ao sul de Trípoli e 60 Km ao leste da divisa com Tunísia). Cerca de 2000 animais domésticos foram infestados além de 200 casos de miíase humana. Porém isto é apenas uma prévia do que poderá acontecer se *C.hominivorax* se espalhar para o resto da África e se introduzir na Europa, onde as consequências econômicas e sociais seriam devastadoras. Através de um convênio entre a FAO, IAEA, USDA e governo da Líbia, foi iniciado e está em andamento um projeto visando a erradicação pela técnica de insetos estéreis, cujo custo é da ordem de 80 milhões de dólares anuais.

Entidades ligadas ao comércio e aproveitamento do couro, avaliaram os prejuízos provocados por esta praga no ano de 1992. Com relação ao setor coureiro, de acordo com informações da Associação de Curtumes Brasileiros, em 1992 os prejuízos causados pela bicheira *C. hominivorax* e pelo berne *Dermatobia hominis*, tem acarretado à indústria nacional de calçados e artefatos de couro, uma perda entre 15% e 20% de cada peça de couro. A avaliação do setor coureiro aponta as práticas de manejo (marcação a ferro de forma inadequada, cortes no arame farpado e outras escoriações) como responsáveis por 60% dos defeitos do couro cru. Deste total 40% são provocados por estas pragas.

Traduzindo em cifras, esta perda representa prejuízos de US\$ 250 milhões na receita anual do setor primário (pecuaristas, frigoríficos e curtumes), colocando a produção de couro brasileiro numa situação de desvantagem em relação ao da Argentina e da Europa, que apresentam um rebanho bovino menor quando comparado ao do Brasil.

Segundo dados da Secretaria de Defesa Animal do Ministério de Agricultura, o berne, a bicheira e o carrapato infestam 90% do rebanho brasileiro. Os prejuízos na produção de carne leite e derivados do couro em decorrência destas pragas são extremamente altos.

Embora a mosca da bicheira tenha como principais hospedeiros os animais domésticos, o homem é também altamente suscetível ao ataque desta espécie. O próprio nome da espécie (*C. hominivorax*), descrita em 1858 por Coquerel, foi devido a ter sido registrada pela primeira vez causando mifase em um homem em Cayena, na Guiana Francesa. No Brasil, são frequentes e numerosos os casos de mifases humanas registrados (Fraiha *et al*, 1979).

Em 1937, Knippling foi o primeiro a propor um método de erradicação da mosca da bicheira através da liberação de moscas esterilizadas por radiação ionizante, método denominado de esterilização de machos. As primeiras tentativas de utilização do método foram conduzidas com êxito na ilha de Curaçao (Baumhover, 1966), onde foi possível erradicar *C. hominivorax*.

Embora, este método esteja sendo empregado com sucesso no México e em alguns países da América Central, parece não ser o mais indicado para as condições do Brasil, devido a grande extensão territorial, por ser um método caro e que depende, para o êxito das medidas de controle adotadas, da cooperação de países vizinhos que também apresentam esta praga.

Porém, paralelo ao sucesso obtido através do emprego desta técnica, foi verificado nos Estados Unidos e México uma redução da sua eficiência, junto com sucessivas e severas reinfestações da mosca da bicheira (Richardson *et al.* 1982a). A razão destas reinfestações foi atribuída ao fato da linhagem criada no laboratório, embora, aparentemente idêntica àquela da natureza, não competir com êxito durante o acasalamento, com a linhagem selvagem.

No Brasil, o método empregado no combate a esta praga é através do uso de inseticidas químicos. Com este método são gastos anualmente cerca de 50 milhões de dólares na importação de produtos químicos para combater estas infestações. Além de ser um método de custo elevado, devido a necessidade de aplicações freqüentes, não resolve a questão de prevenção das míases. Devido a aquisição de resistência genética da praga para alguns dos inseticidas utilizados no seu combate.

Do ponto de vista genético, baseado em estudos realizados a nível cariotípico, morfológico e de compatibilidade sexual em diferentes populações de *C. hominivorax*, foram obtidas interpretações divergentes. Richardson *et al.* (1982 a e b), sugerem isolamento sexual

entre algumas populações que apresentaram certa diferenciação morfológica e cariotípica, caracterizando *C.hominivorax* como um complexo de espécies crípticas. Ao contrário, as interpretações sobre a variabilidade cariotípica desta espécie dadas por McInnis (1981) sugerem que a variabilidade encontrada nesta espécie decorre de um polimorfismo cromossômico de uma única população intercruzante. No Brasil, Azeredo-Espin (1987) realizou um estudo abrangente em diversas populações brasileiras desta espécie, através de análise cariotípica, morfométrica e de compatibilidade sexual. Este trabalho sugere que *C.hominivorax* é um complexo biológico com grande variabilidade intra e interpopulacional em franco processo evolutivo.

Desta forma vemos que, o conhecimento que se deve ter a nível genético sobre esta praga da pecuária, poderá elucidar a extensão da variabilidade genética presente nas populações de *C.hominivorax* analisadas.

b) O DNA mitocondrial.

Uma questão importante a ser analisada quando se trabalha com organismos de qualquer espécie, é a verificação da extensão da variabilidade genética observada em populações naturais. Vários são os métodos que podem ser utilizados para se analisar esta variabilidade, envolvendo desde estudos de variação morfológica e comportamental até métodos mais sofisticados, que tem sido aperfeiçoados nas últimas décadas. Com efeito, os avanços na genética tem sido acelerados através da utilização de técnicas a nível molecular. Estes avanços trouxeram novas perspectivas ao estudo da biologia evolutiva, e hoje são numerosos os métodos empregados para estudos genéticos e evolutivos envolvendo diretamente os ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas e cromossomos. As informações sobre a variabilidade genética obtidas através do DNA, RNA e/ou

proteínas podem fornecer um conjunto de marcadores genéticos para examinar a estrutura genética de populações de uma espécie, ou mesmo estimar relações entre espécies correlacionadas.

A nível molecular os estudos envolvendo o DNA (nuclear e/ou mitocondrial) com endonucleases de restrição para análise da variabilidade genética intra e inter específica têm sido amplamente utilizados. Recentemente, estudos utilizando vários taxa de animais têm demonstrado que a análise do DNAmtocondrial (DNAm_t) é um método sensível para detectar a estrutura populacional de uma espécie e/ou espécies crípticas (Avise *et al.* 1983). Grande parte dos trabalhos que envolvem a análise do DNAm_t foram revisados por Wilson *et al.* (1985), Avise *et al.* (1987), Moritz *et al.* (1987), Avise *et al.* (1991) e Wostenholme (1992).

O DNA mitocondrial animal possui características fundamentais que o tornam muito importante para estudos evolutivos: é uma molécula distinta do DNA nuclear. Seu número de cópias haplóide e a transmissão geralmente maternal, sem recombinação (Brown, 1983), o tornam menos suscetível à homogeneização genética interpopulacional via fluxo gênico, e mais suscetível ao afinamento da população (Wilson *et al.* 1985). Uma outra característica do genoma mitocondrial, que torna sua análise vantajosa, é a de ser pequeno e simples quando comparado com o tamanho e a natureza complexa do genoma nuclear. Ele contém 17 kpb na maioria dos metazoários, isto quer dizer, cerca de 0,0001% do comprimento total do DNA nuclear de mamíferos (Avise *et al.* 1991). Em contraste com o DNA nuclear, o DNAm_t animal é uma molécula circular de dupla fita. Sua estrutura covalentemente fechada (Brown, 1983), é compacta, não apresentando introns, transposons, DNA repetitivo (exclusivamente na região "D-loop" ou A+T), pseudogenes ou sequências espaçadoras entre os genes. Assim, devido ao

reduzido número de mecanismos de variação disponíveis no genoma mitocondrial, sua evolução em seqüências de bases parece ocorrer de modo mais rápido, simples e direto que o genoma nuclear.

A maior parte dos RNAs mensageiros mitocondriais não apresentam seqüências 5' e 3' não traduzidas, isto é, começam com o codon de iniciação e terminam com o codon de término, sendo a cauda de poli A, adicionada pós transcricionalmente (Wallace, 1992). A organização dos genes, em geral, parece ser conservada. Por exemplo, a ordem gênica é idêntica em muitos mamíferos e anuros, mas difere da encontrada em *Drosophila* (Avisé *et al.* 1987) e *Apis mellifera* (Arias *et al.* 1990), que são por sua vez semelhantes entre si.

O conteúdo gênico desta molécula, consiste em 13 genes para RNAs mensageiros correspondentes à sub-unidades das enzimas que participam na cadeia de transporte de elétrons, no sistema de fosforilação oxidativa (Wallace, 1992), 2 genes para RNAs ribossomais (12S e 16S) e 22 genes para RNAs de transferência. Ao lado desses 37 genes, existe também em vertebrados e equinodermas a área conhecida como "D-loop" ou região controle com aproximadamente 800 pares de bases e que, em *Drosophila*, é denominada de região rica em A+T, e exerce o controle de replicação e transcrição. A replicação do DNAm animal é unidirecional e altamente assimétrica (Clayton, 1982). Em vertebrados, particularmente a maioria dos genes mitocondriais estão separados por RNAs de transferência, os quais agem como sinais para o processamento de transcritos policistrônicos (Ojala *et al.* 1980).

Embora a mitocôndria tenha seu próprio DNA, não é geneticamente autosuficiente, isto é, depende estruturalmente e funcionalmente do núcleo. Este determina a síntese de todas as enzimas requeridas para os processos de replicação, transcrição e tradução (Grivell, 1983). Os

ribossomos mitocondriais são constituídos pelos RNAs ribossomais 12S e 16S codificados pelo DNAm t e por proteínas nucleares.

Devido ao DNAm t exibir considerável variação intra e interpopulacional, este genoma tem demonstrado ser um marcador genético efetivo para analisar a estrutura de populações, padrão de variação geográfica e padrão de colonização de uma espécie (Avisé *et al.* 1987). Por exemplo, Sheppard *et al.* (1992) analisando o DNAm t com endonucleases de restrição, em populações naturais e de laboratório da mosca das frutas *Ceratit is capitata*, provenientes de Havai, Venezuela, Argentina, Califórnia e Guatemala, verificaram a existência de dois haplótipos mitocondriais entre todas as populações estudadas. O haplótipo observado na amostra do Havai não corresponde ao apresentado pela população da Califórnia fornecendo uma forte evidência de que a infestação na Califórnia não foi causada por *Ceratit is* provenientes do Havai.

A análise do DNAm t em populações do roedor *Peromyscus maniculatus* da América do Norte, revelou que esta espécie é estruturada em populações distintas, enquanto que a análise de alozimas não permitiu mostrar tal subdivisão (Avisé *et al.* 1979). Posteriormente, Aquadro e Avisé (1982), estudando esta mesma espécie de roedor, verificaram altos níveis de variação alozímica em populações de Colorado e Wyoming (USA). Surpreendentemente essas mesmas populações foram essencialmente idênticas ao nível do DNAm t (Lansman *et al.* 1983).

A divergência entre alozimas e DNAm t, pode ser o resultado de seleção diferencial sobre uma população que inicialmente possui uma bagagem genética similar, ou pela existência de diferenças fundamentais entre as filogenias materna e paterna. Os autores Lansman *et al.* (1983),

sugerem ainda que nas populações de *P. maniculatus* as fêmeas tenham sofrido afunilamento em maior intensidade que os machos. Uma outra possibilidade (Lansman *et al.* 1981), é que a dispersão sexual diferencial, poderia produzir uma contínua introdução de genes nucleares heterogêneos através da migração de machos nas populações que permanecem homogêneas com relação a um ancestral materno.

Estes estudos tem analisado, fundamentalmente, o DNAmT com endonucleases de restrição, técnica denominada de RFLP (do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism). Porém, uma outra abordagem evolutiva tem sido obtida através do sequenciamento completo ou de parte do genoma mitocondrial. A seqüência completa do DNAmT de 14 organismos já foi obtida; no roedor *Mus musculus* (Bibb *et al.* 1981), bovino e humano (Anderson *et al.* 1981 e 1982), em *Xenopus* (Roe *et al.* 1985), *Drosophila* (Clary & Wostenholme, 1984), nematóides (Okimoto *et al.* 1992) e outros, além de vários organismos dos quais já se tem dados da seqüência parcial do DNAmT. Estas análises tem fornecido importantes dados para se estabelecer comparações de seqüências entre organismos (revisão em Wostenholme, 1992).

Estudos envolvendo o DNAmT de uma grande diversidade de grupos animais tem revelado uma significativa variabilidade entre taxa, tanto na ordem gênica como no tamanho do genoma (Harrison, 1989).

A análise do genoma mitocondrial, em estudos evolutivos evidenciou também a existência neste genoma, de três tipos de mudanças: 1.- Substituição de bases; 2.- Variação no comprimento da molécula e 3.- Rearranjos de seqüência (revisão em Moritz *et al.* 1987).

A ocorrência do tipo 2 isto é, variação no tamanho da molécula, constitui uma evidência inequívoca de que no DNAm animal, ocorrem deleções e/ou adições de bases durante a evolução de algumas espécies de animais (Brown, 1983).

A maioria das células somáticas e oócitos maduros contém milhares de moléculas de DNAm portadoras da mesma informação genética (condição conhecida como homoplasmia). Porém, uma mutação ocorrida em alguma dessas moléculas de DNAm, pode gerar a condição de heteroplasmia, na qual dois ou mais genótipos mitocondriais coexistem dentro de um único indivíduo (Solignac *et al.* 1983; Rand *et al.* 1986; Avise *et al.* 1987; Rand & Harrison, 1989). Os indivíduos heteroplásmicos apresentam normalmente inserções e/ou deleções que aparecem confinadas quase que exclusivamente na região "D-loop" de replicação em vertebrados ou região rica em A+T em *Drosophila* e outros invertebrados, e nas regiões adjacentes não transcritas.

Em alguns casos, a variação de comprimento observada é devida a duplicação de pequenos segmentos no DNA. Deste modo, os vários tipos de DNAm podem ter diferente número de cópias dessas unidades repetidas (Rand & Harrison, 1986), associando-se muitas vezes esta heteroplasmia com variação de tamanho.

A heteroplasmia pode ser: 1.- de sítio de restrição ou 2.- de tamanho do genoma. Outros estados heteroplásmicos observados menos freqüentemente foram revisados em Solignac *et al.* 1987.

1) Heteroplasmia de sítio de restrição: Foi observada ocorrer em *Drosophila* (Hale & Singh, 1986), em peixes *Alosa sapidissima* (Bentzen *et al.* 1988) e *Engraulis encrasicolus* (Magoulas *et al.* 1993).

O DNAMt é herdado independentemente do genoma nuclear (Moritz *et al.* 1987) através do citoplasma do óvulo, e a progênie em geral apresenta, mitocôndrias do tipo materno. Na maioria dos metazoários o DNAMt é herdado maternalmente (Gyllenstein *et al.* 1985 e na revisão de Wostenholme, 1992). Porém, alguns trabalhos recentes tem relatado uma transmissão materna incompleta, devido a uma provável contribuição paterna (Laipis *et al.* 1988; Nigro, 1991). Em *Drosophila simulans*, a contribuição paterna foi atribuída a polimorfismo citoplasmático através de cruzamentos entre diferentes linhagens. Poucos casos de herança biparental tem sido descritos (Kondo *et al.* 1990; Hoeh *et al.* 1991; Magoulas *et al.* 1993). Em *Drosophila*, Kondo *et al.* (1990) verificaram a contribuição paterna na transmissão do DNAMt, utilizando sondas específicas do DNAMt paterno marcadas radioativamente com ³²P. Nos cruzamentos inter específicos, entre fêmeas de *D. simulans* e machos de *D. mauritania*, foi verificado que a proporção de DNAMt paterno por fertilização é de 0.1% nestas espécies.

Recentemente, Hoeh *et al.* (1991), estudando 150 indivíduos, de 16 populações do molusco *Mytilus edulis*, com 7 enzimas de restrição, verificaram um alto grau de polimorfismo e divergência da seqüência do DNAMt, decorrente de uma contribuição paterna. Baseado no padrão de restrição obtido, os autores sugeriram que nesta espécie a molécula de DNAMt é herdada biparentalmente. Estes dados foram corroborados com a análise citológica da fertilização de *M. edulis*. Evidências similares foram obtidas por Magoulas *et al.* (1993) no peixe *Engraulis encrasicolus*, onde, através da análise de sítios de clivagem com 7 endonucleases, foram identificados 3 indivíduos heteroplásmicos de um total de 435 examinados. Os indivíduos heteroplásmicos apresentavam dois tipos de moléculas de DNAMt altamente divergentes, que acumulavam grandes diferenças mutacionais. Esta heteroplasmia observada foi interpretada como

sendo devida a herança biparental do DNAm.

2) Em relação a heteroplasma decorrente da variação de tamanho da molécula de DNAm, tem sido descritos dois tipos (Bermingham *et al.* 1986): a) Heteroplasma de pequenos fragmentos, que envolvem de 1 a 10 pares de bases e que foi descrita em bovinos (Bermingham *et al.* 1986; Olivo *et al.* 1983) e no homem (Cann & Wilson, 1983). Na maioria dos casos ocorre variação do número de cópias de uma seqüência repetida em tandem na região controle ("D- Loop") de replicação; b) Heteroplasma envolvendo fragmentos de várias centenas de pares de bases e que foi descrito em *Drosophila mauritania* (Solignac *et al.* 1987) onde através da análise de isofêmeas foi detectado um fragmento adicional de 500 pb localizado na região A+T.

Em *Drosophila melanogaster*, Hale *et al.* (1986) descreveram uma diferença de tamanho de 1,1 kpb na região rica em A+T entre as moléculas heteroplásmicas sugerindo que as variantes de tamanho são geradas por duplicação. No peixe *Alosa sapidissima* (Bentzen *et al.* 1988), foi demonstrado através de experimento de mapeamento do DNAm que a variação do comprimento está localizada na região "D-Loop". Também neste caso, os autores sugerem que esta variação é devida a herança biparental.

Um outro exemplo de heteroplasma foi descrito para o coleóptero do gênero *Pissodes*, que apresenta um genoma mitocondrial que varia de 30 a 36 kpb (Boyce *et al.* 1989), devido a uma duplicação em tandem de 0,8 a 2,0 kpb, na região rica em A+T.

A heteroplasma estável pode ser mantida por um período variável nas populações (Clarck, 1988) por mutação, seleção, contribuição paterna ou pela combinação de alguns desses processos. Em *Drosophila melanogaster*, foi verificado que o estado heteroplásmico pode ser mantido por até 30 gerações (Solignac *et al.* 1987). Entretanto existem casos em que populações

de laboratório de *D.mauritania* e *D.simulans* retornaram à condição de homoplasma em 10 gerações (Kondo *et al.* 1990).

Ao mesmo tempo em que a heteroplasma propicia um aumento da variabilidade no genoma mitocondrial de uma espécie, esta variabilidade não é mantida devido ao fato de a heteroplasma ser um evento pouco comum e, na maioria das vezes, um estado transitório que pode ser perdido ao longo das gerações (Chapman *et al.* 1982).

Birmingham *et al.* (1986), discutem ainda, que dada a preponderância das substituições de bases sobre as mudanças decorrentes de adição e/ou deleção na evolução da molécula de DNAm, é surpreendente que na maioria das espécies onde foi observada a heteroplasma, esta esteja relacionada a variação de comprimento. Segundo estes autores, provavelmente isto acontece devido à metodologia utilizada para caracterizar a variação de tamanho: (extrações de DNA, digestão com enzimas de restrição, construção de sondas, hibridização etc). Por exemplo, o polimorfismo de tamanho altera simultaneamente os padrões de restrição para todas as endonucleases utilizadas. Ao contrário, as substituições de bases afetam um sítio particular de restrição (que pode não ser claramente definido devido a problemas de digestão parcial no gel). Apenas a análise molecular mais detalhada do DNAm, através de sequenciamento, pode fornecer maiores informações sobre heteroplasma de sítios de restrição.

C) Utilização do DNAm

Polimorfismo ao nível do DNAm por análise de seqüência e/ou análise de sítio de restrição foi detectado em rato, *Rattus norvegicus* (Brown & Des Rosiers, 1983), ouriço *S. pallidus* (Palumbi & Kessing, 1991), em anuros do gênero *Hyla* (Birmingham *et al.* 1986), em

peixes dos gêneros: *Amia* (Bermingham & Avise, 1986), *Cyprinodon* (Echelle & Dowling, 1992), *Lepomis* (Avise *et al.* 1984), *Galaxias* (Ovenden *et al.* 1993), *Acipenser* (Brown *et al.* 1983) e do gênero *Alosa* (Bentzen *et al.* 1988; 1989), no primata *Macaca mulata* (Melnick *et al.* 1993), na baleia *M. novaengliae* (Baker *et al.* 1990), nos cães "Jindo dogs" cão nativo da Coréia (Umenishi *et al.* 1993), nos marsupiais *Sminthopsis crassicaudata* (Hope *et al.* 1992), *Manis pentadactyla* (Zhang & Shi, 1991) e em gado do gênero *Bos* (Bhat *et al.* 1990).

Lamb & Avise (1992), analisando 53 indivíduos de populações da serpente *Malaclemys terrapin* utilizando 18 endonucleases, verificaram polimorfismo de tamanho, heteroplasmia, e um único sítio de restrição apareceu geograficamente informativo. Com apenas este sítio polimórfico foi possível demonstrar que esta espécie está subdividida em dois grupos um ao norte e outro ao sul da Flórida, região de Cabo Canaveral nos Estados Unidos.

Em *Ostertagia ostertagi*, que é um nematóide parasita de gado, foi analisada a variabilidade do DNAm_t utilizando 7 endonucleases (Blouin *et al.* 1992). A distribuição geográfica dos haplótipos individuais nas populações estudadas, revelou um alto grau de fluxo gênico nesta espécie.

Em alguns insetos as análises do DNAm_t tem contribuído fundamentalmente para conhecer a estrutura de população, padrão de colonização, dispersão e origem das populações de diversas ordens como por exemplo: Ortoptera, dos gêneros *Gryllus* (Harrison *et al.* 1987; Rand & Harrison, 1989) e *Melanoplus* (Chapco *et al.* 1992), Coleoptera do gênero *Leptinotarsa* (Azeredo Espin, 1991), Himenoptera *Apis mellifera* (Smith & Brown, 1990; Smith *et al.* 1991) e Lepidoptera do gênero *Papilius* (Sperling, 1993).

Entre os insetos, espécies de dípteros tem sido as mais analisadas em estudos genéticos utilizando o DNAm. Em mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles*, juntamente com estudos utilizando análise do RNA ribossomal e alozimas, verificou-se a utilidade do DNAm para detecção de espécies crípticas, e comprovou-se que vários subgrupos de *Aedes* (*A. albopictus* e *A. scutellaris*), que não exibem uma divergência morfológica significativa, podem ser diferenciadas através do DNAm (Mitchell *et al.* 1992; Kambhampati *et al.* 1992; Kambhampati & Karamjit, 1991; Cann *et al.* 1993).

Dentre os dípteros, espécies do género *Drosophila* são as que apresentam o DNAm mais amplamente estudado, a nível bioquímico, genético e populacional: (Goldring & Peacock, 1977; Hale & Beckenbach, 1985; Latorre *et al.* 1986; De Salle *et al.* 1986; De Salle *et al.* 1987a e 1987b; De Salle & Templeton, 1988; Afonso *et al.* 1990; Hale & Singh, 1991; De Salle & Templeton, 1992; Halliburton & Barker, 1993; Pissios & Scouras, 1993).

Latorre *et al.* (1986), em extenso estudo envolvendo amostras de *Drosophila suboscuro* do Velho e Novo Mundo, detectaram somente dois haplótipos mitocondriais para esta espécie nas Américas, sendo que nenhum deles foi detectado na África e somente um, em ilhas do Atlântico. No trabalho de Hale & Singh (1991), populações africanas de *Drosophila melanogaster* se apresentam altamente variáveis em contraste com populações do hemisfério ocidental, que são menos variáveis, sugerindo que estas populações africanas são mais recentes em seu povoamento. De Salle & Templeton (1992), nos seus estudos morfológicos, comportamentais e genéticos ao nível do DNAm em *Drosophila silvestris* (espécie originária do Havai), concluem que as moscas da parte norte da ilha são ancestrais, em relação às moscas da região sul, e sugerem portanto que a colonização ocorreu do norte para o sul.

Em contraste com a variabilidade do DNAm_t observada nestas três espécies de *Drosophila*, Halliburton & Barker (1993), analisando o DNAm_t de *Drosophila buzzatti*, espécie nativa da Argentina e do Brasil e introduzida na Austrália, não detectaram nenhuma variabilidade, nem de sítio de restrição, nem de tamanho. Todas as amostras analisadas apresentaram o mesmo padrão para as 12 endonucleases testadas. Os autores sugerem que estes resultados são decorrentes do afunilamento da população quando esta espécie colonizou a Austrália, hipótese que é consistente com os dados alozímicos e cromossômicos, onde somente poucos indivíduos teriam contribuído para fundar a população Australiana de *D. buzzatti*.

Em *Cochliomyia hominivorax* a análise do DNAm_t com endonucleases de restrição tem sido conduzida em populações geográficas dos Estados Unidos, México, Jamaica, Costa Rica e Guatemala (Roerhdanz & Johnson, 1988; Roerhdanz, 1989). Estas análises tem indicado uma significativa variabilidade interpopulacional. No trabalho de Roerhdanz & Johnson (1988), foram analisadas 6 populações de *C. hominivorax* do México, Jamaica e dos Estados Unidos, utilizando-se 15 endonucleases. A grande diversidade do DNAm_t dos indivíduos da Jamaica, sugere que essa população poderia ter-se separado das demais há milhões de anos e que poderia ter sido originada pela migração de indivíduos provenientes da América do Sul.

Roerhdanz (1989), analisou 30 linhagens de *C. hominivorax*, incluindo populações da América do Norte, Central, Costa Rica e Guatemala. De 15 enzimas de restrição que foram utilizadas, 11 enzimas revelaram polimorfismo. Foram obtidos 16 haplótipos e/ou genótipos mitocondriais. Dois destes haplótipos foram amplamente distribuídos nas populações (Sul e costa Oeste do México), os outros 14 haplótipos aparecem exclusivamente em algumas localidades.

A interpretação dada por Roerhdanz (1989), para explicar a variabilidade observada em *C.hominivorax*, é a de que em algumas localidades esta espécie contém uma substancial variabilidade genética, sugerindo um reduzido fluxo gênico interpopulacional, especialmente no México e na ilha de Jamaica. Os dados apresentados por Roerhdanz (1989) indicam que a variedade de genótipos mitocondriais pode ser utilizada como eficientes marcadores genéticos para caracterizar diferentes populações desta espécie.

Em trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório, foi verificado que *C.hominivorax* apresenta uma alta variabilidade cariotípica e morfométrica interpopulações (Azeredo Espin, 1987; Azeredo Espin, 1991; Azeredo Espin, 1992; Azeredo Espin *et al.* 1993 submetido, e Infante, M.E & Azeredo Espin, A.M.L. 1993). Estes resultados, associados aos obtidos por outros autores sugerem que *C. hominivorax* parece ser um complexo biológico em franco processo evolutivo.

No presente trabalho, através da análise via RFLP do DNAm_t de *C.hominivorax*, foram feitas interpretações sobre a variabilidade genética e as relações filogenéticas de populações desse inseto de quatro localidades do Estado de São Paulo.

II. OBJETIVOS:

A análise da variabilidade do DNAm_t, com endonucleases de restrição (RFLP), de populações de *Cochliomyia hominivorax* coletadas em diferentes localidades do Estado de São Paulo, foi conduzida com os seguintes objetivos:

A) Padronização de metodologia.

A1.- Padronizar as metodologias de extração, isolamento e análise do DNAm_t para esta espécie.

A2.- Testar diferentes métodos para a construção e marcação de sondas do DNAm_t.

A3.- Clonar o DNAm_t de *C. hominivorax* em vetores específicos para otimizar os métodos de análise, mapeamento e construção de banco genómico.

B) Análise populacional.

B4.- Verificar se há variabilidade genética a nível intra e interpopulacional.

B5.- Verificar se o DNAm_t pode ser utilizado como marcador genético para analisar estrutura de populações e/ou caracterizar populações desta espécie.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1.0 MATERIAIS

Neste trabalho, foram utilizados larvas, pupas e/ou adultos de amostras de populações naturais de *C. hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) coletados diretamente em animais infestados, em diferentes localidades do Estado de São Paulo.

As coletas foram realizadas entre maio de 1991 e abril de 1993 em fazendas de criação de gado de corte e/ou leitero (em Adamantina e Botucatu também foram analisados ovinos), nas seguintes localidades:

- a) Adamantina: 713 Km de Campinas, Fazendas "Jandaia" e "Fortuna", coleta em maio de 1992, onde foram analisados 47 indivíduos.
- b) Amparo: 61 Km de Campinas, "Fazenda Agropecuária Tuiuti", coleta em maio de 1991, onde foram analisados 46 indivíduos.
- c) Botucatu: 229 Km de Campinas, Fazenda "Porto Martins", coleta em abril de 1993, onde foram analisados 63 indivíduos.
- d) Caraguatatuba: 275 Km de Campinas, Fazenda "Serramar", coletas em junho de 1991 denominada (Ca-2) e fevereiro de 1992 denominada (Ca-4), onde foram analisados 249 indivíduos.

Para a análise do DNA mitocondrial foram testadas as diferentes fases do desenvolvimento de *C. hominivorax*.

2.0 MÉTODOS

2.1 Métodos de criação de *Cochliomyia hominivorax*.

Os métodos de criação e manutenção de *C.hominivorax* utilizados neste trabalho, foram descritos em detalhe por Azeredo Espin (1987).

Larvas foram coletadas no campo diretamente em feridas de animais (gado vacum, ovino ou equino) com mífases exposta. As larvas retiradas das lesões foram colocadas em caixas de plástico contendo serragem e sangue da própria ferida. Grupos de ovos localizados nos bordos das feridas foram coletados e colocados em placas de Petri contendo carne moída e sangue da ferida. O material assim obtido, foi transportado para o laboratório e manipulado como descrito a seguir. As larvas foram mantidas em caixas plásticas (20X15X8cm) contendo no seu interior placas de Petri com meio constituído de carne moída e sangue em proporções iguais. A carne moída utilizada para o meio foi, de preferência, o patinho. A escolha desta carne, deve-se ao fato de que, outros tipos de carne apresentam dois inconvenientes, que são graves para a sobrevivência das larvas; o excesso de gordura e fibras colágenas. Larvas de *C.hominivorax*, em condições de laboratório, consomem apenas o tecido muscular e não ingerem gordura ou fibras existentes na carne e estas ficam acumuladas no meio de cultura utilizado pelas larvas. Essa gordura e as fibras ficam presas na peneira de limpeza das larvas causando transtornos que matam as mesmas. Para evitar esses inconvenientes utilizou-se patinho moído, que é uma carne com baixo teor de gordura e fibras colágenas, permitindo assim um desenvolvimento mais homogêneo das larvas, menor mortalidade e um consumo

quase total do meio de cultura fornecido para as larvas. Os ovos foram colocados em placas de Petri de 5cm de diâmetro e neste recipiente, permaneceram durante o primeiro estágio larval. A placa de Petri com larvas e meio é colocada em uma caixa de plástico (20x15x8cm), que mantendo a umidade relativa alta, favorece o desenvolvimento larval e impede que as mesmas saiam do meio. Diariamente a dieta foi substituída por uma nova e, para isso, o meio contendo as larvas foi peneirado em água corrente de modo a retirar o meio velho deixando as larvas limpas. Estas, foram transferidas para uma placa de Petri de 15cm de diâmetro contendo meio novo e cerca de 150 larvas. Este procedimento foi repetido diariamente, durante sete a oito dias, período este que compreende o desenvolvimento larval. Após 7 dias no meio de cultura, as larvas deixavam a placa de Petri, caindo na serragem contida na caixa plástica, e aí transformavam-se em pupas. A serragem, com as pupas, foi transferida para caixas de plástico (15x15x10cm) e mantidas na câmara de criação climatizada (25°C, 70% de umidade e fotoperíodo de 12:12). Após a emergência dos adultos, estes foram transferidos para as gaiolas de criação (34x50x26cm).

O meio de alimentação dos adultos é constituído de uma mistura de leite em pó e açúcar, em proporções iguais e aproximadamente 10% de levedura de cerveja seca. Água foi fornecida em frascos de vidro de 1/2 litro, contendo em seu interior uma gaze mais longa que o comprimento do vidro, na qual as moscas podiam sugar, por capilaridade.

Na época de oviposição das fêmeas, (oito dias após a emergência), foi introduzida uma placa de Petri de 5cm de diâmetro na gaiola. A placa estava com meio de cultura

que já tinha sido utilizado por larvas. Este meio apresentava um odor característico que aparentemente estimulava as fêmeas maduras. No interior da placa e em contato com a carne, foi colocada uma resistência para aquecimento de aquário de 10w sob o comando de um termostato regulável de avanço térmico que foi adaptado para fornecer uma temperatura média de 35 a 42°C. Esta resistência foi envolvida por papel de alumínio, para dissipar o calor e facilitar a retirada dos ovos, que foram depositados em vários pontos do papel. Com este método, foi possível obter grandes quantidades de ovos, com os quais seguiu-se o procedimento já descrito. As pupas obtidas para a extração de DNA total e mitocondrial foram congeladas em Nitrogênio líquido ou no freezer à -70°C devidamente estocadas em frascos de vidro individuais e identificadas por localidade, ferida, data de coleta e hospedeiro, para análise posterior.

2.2 Experimento de Isolinagem.

Para a obtenção de DNA mitocondrial de descendentes de uma única fêmea, foram realizados cruzamentos individuais através do seguinte experimento: pupas de *C. hominivorax* da amostra de Caraguatatuba (linhagem Ca-1) foram individualizadas em tubos de vidro (7.0x2.0x2.5cm) tampados com algodão. Após a emergência, casais individuais foram separados em frascos de vidro (15X8,5X7,0cm) contendo no seu interior um frasco com água, outro com água e açúcar e uma placa de Petri contendo meio para adulto. Ao todo, foram montados 25 frascos com casais individuais mantidos por 8 a 10 dias até as fêmeas oviporem. Para estimular a oviposição, uma placa de Petri de 5cm de diâmetro contendo meio, foi aquecida, para obter uma temperatura de cerca

de 37°C, simulando uma ferida animal. O procedimento seguinte foi como descrito no ítem anterior.

3.0 Análise do DNA Mitocondrial.

Para a análise do DNA mitocondrial foram empregadas diferentes técnicas moleculares que serão descritas e apresentadas por ítems.

3.1 Extração total de ácido nucléico de *C. hominivorax*.

Os indivíduos na fase de larva, pupa e/ou adulto foram separados em 8 tubos corex siliconizados de 15ml contendo 1ml de uma solução tampão de homogenização (2M Tris, 5M NaCl, 50% sacarose, 0,5M EDTA, pH 7.5). Cada indivíduo foi homogeneizado com ajuda de macerador, em 1ml de tampão de lise contendo 2% de EDTA (2M Tris, SDS 10%, 0.5M EDTA, pH 9.0), seguido de incubação no gelo por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada tubo 2ml de fenol equilibrado em tampão Tris 2M pH 8.0, em seguida centrifugados por 10 minutos a 3.000g e o sobrenadante transferido para um novo tubo corex de 15ml. Foram adicionados 1ml de fenol e 1ml da solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Cada tubo foi centrifugado novamente por 10 minutos a 3.000g sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 2ml de clorofórmio:álcool isoamílico e novamente centrifugados como descrito. Ao sobrenadante final foi adicionado 1.5ml de TE (10mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), 150µl de NaOAc 3M e 9ml de etanol absoluto à -20°C, e incubado durante 45 minutos à -70°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugado à 11.000g

por 45 minutos a 4°C, e o "pellet" ressuscitado em 1ml de TE, 50µl de NaOAc e 2,75ml de etanol absoluto -20°C e precipitado novamente por 45 minutos a -70°C. Após a centrifugação, idêntica a anterior, o "pellet" de DNA foi ressuscitado em 200µl de TE e mantidos em tubos eppendorf a -20°C para ser analisado posteriormente, com endonucleases de restrição.

A concentração de DNA obtido através desta técnica foi verificada por ensaio, utilizando-se 20µl de DNA num minigel de agarose a 1% ou por determinação espectrofotométrica em comprimento de onda de 260 a 280 nm. O fator de diluição empregado foi de 120 (600 µl H₂O + 5 µl DNA).

3.2 Método para isolamento Mitocondrial (M.I.M.)

Aproximadamente 8 gramas de pupas de *C. hominivorax* que correspondem a cerca de 30 pupas, foram pesadas e distribuídas em 4 tubos de centrífuga mantidos no gelo (2 gramas por tubo), onde foi adicionado 10 ml de solução de M.I.M. para cada tubo (0.22M manitol, 0.9mM EDTA, 1mM EGTA, 2mM HEPES e 70mM sacarose, pH 7.4). O conteúdo de cada tubo foi transferido separadamente para um outro tubo de vidro e homogenizado com haste de teflon acoplado a um macerador elétrico. Em seguida os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C Beckman modelo J2-21 a 900g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para 4 tubos limpos e incubados no gelo. Ao "pellet" dos 4 tubos originais foi acrescentado mais 50ml de M.I.M. e centrifugados a 4°C e 900g por 10 minutos. Este sobrenadante foi transferido para 4 novos tubos e os 8 tubos foram centrifugados à 11.000g por 10 minutos a 4°C. O

"pellet" foi ressuspensionado em 1ml de solução de M.I.M. e o conteúdo de 4 tubos foi transferido para um tubo de vidro e homogenizado com um macerador de teflon manual, e em seguida transferido para um tubo de centrifuga. O mesmo procedimento foi realizado com os outros 4 tubos.

O "pellet" final foi centrifugado novamente por 10 minutos à 900g a 4°C e o sobrenadante foi transferido para 2 novos tubos e centrifugado à 11.000g por 10 minutos a 4°C, obtendo-se no final um "pellet" rico em mitocôndrias, que em seguida foi ressuspensionado em 1ml de M.L.B. (mitochondrial lysis buffer) (50mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH 8.0) para lisar as mitocôndrias.

O conteúdo dos dois tubos foi misturado e transferido para um tubo de centrifuga, onde foi adicionando S.D.S para uma concentração final de 1% e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se 1/5 da concentração final de CsCl.

O CsCl foi dissolvido na solução contendo S.D.S que permaneceu no gelo durante 15 minutos. Finalmente a solução foi centrifugada à 11.000g por 10 minutos para a obtenção de um sobrenadante final rico em DNA mitocondrial. Este foi transferido para um tubo de vidro e mantido à 4°C até proceder-se a etapa de purificação do DNAm.

3.3. Purificação do DNA mitocondrial.

3.3.a Gradiente de Cloreto de Césio.

O DNA mitocondrial, obtido pelo método de M.I.M., foi transferido para tubos de vidro para a quantificação do volume e cálculo da densidade utilizando-se um refratômetro. Em função do índice de refração, e com auxílio de uma tabela de densidade, obtém-se a quantidade de CsCl necessária para a obtenção de um gradiente.

Foram adicionados 100 μ l de Brometo de Etídeo, BET (solução padrão 10mg/ml), e o volume foi completado para 6.5ml com tampão de CsCl 1.6g/ml + TE. A amostra foi transferida cuidadosamente para tubos de ultracentrífuga de 16X76mm e o volume do tubo completado com óleo mineral, selados e centrifugados por 20 horas a 250.000g no rotor de ângulo fixo 80 TI a 20°C. Após a centrifugação os tubos foram retirados cuidadosamente para extrair a banda de DNA mitocondrial com o auxílio de uma lâmpada de U. V. e uma seringa de insulina com agulha que permite a retirada da banda. Para a obtenção de um DNAm_t altamente purificado, foi realizada uma segunda purificação em gradiente de CsCl. Para isto foi utilizado um tubo de ultracentrífuga de polialômero de 13X51mm, o volume da amostra foi completada para 3.5 ml com tampão de CsCl 1.6g/ml + TE pH 8.0, e BET. Após os tubos terem sido equilibrados, foram centrifugados na ultracentrífuga à 200.000g no rotor Beckman VTI 80 de ângulo fixo a 20°C, e a banda de DNA mitocondrial purificada foi extraída como descrito anteriormente. O DNAm_t obtido foi mantido a -20°C até ser dialisado.

3.3.b Diálise do DNA mitocondrial.

Uma vez obtido o DNA mitocondrial purificado através de dois gradientes em CsCl, o Brometo de Etídeo foi retirado da amostra por sucessivas extrações com igual volume de butanol-1 (máximo três vezes). O DNA mitocondrial foi em seguida dialisado para retirar o CsCl. Um volume de 100 μ l de DNAm_t foi dialisado utilizando-se filtros tipo VM de 0.05 μ m (Millipore) que foram colocados no interior de uma placa de Petri contendo 20ml de tampão TE pH 7.4 e mantidos por 20 minutos nesta solução. Uma vez

completada a diálise, o DNAMt foi transferido para um tubo eppendorf, em seguida, foi adicionado NaOAc 3M cujo volume foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula: $X = \text{volume da amostra} \times 0.3/3.3$, onde X= volume de NaOAc a ser adicionado. Em seguida o DNAMt foi precipitado em etanol -20°C, e incubado no freezer -70°C por 60 minutos. Após este período de incubação, o DNAMt foi centrifugado 12.000rpm por 30 minutos a 4°C na microcentrífuga e o "pellet" final liofilizado e ressuspenso em 50µl de TE pH 8.0. A concentração do DNAMt purificado, foi quantificada em espectrofotômetro.

3.4 Construção de Sondas de DNA Mitochondrial de *C. hominivorax*

3.4.1 Construção de Sonda Utilizando DNAMt Purificado

3.4.1.a Marcação com ³²P utilizando kit de "Nick Translation" (BRL)

Esta técnica utiliza as enzimas DNase I que digere o DNA e a DNA polimerase I obtida de *E. coli*. Esta última enzima, adiciona resíduos de nucleotídeos na extremidade hidroxila 3' quando uma das fitas de uma molécula de DNA dupla fita é aberta. Pela atividade exonucleásica 5'→ 3' esta enzima pode também remover nucleotídeos do extremo 5' do corte, substituindo por nucleotídeos marcados obtendo-se no final da reação DNAMt dupla fita marcado com ³²P (Sambrock et al, 1989).

Para marcar radioativamente foi utilizado cerca de 1µg de DNAMt de *C. hominivorax* purificado pelo método M.I.M. (ver item 3.2). Utilizou-se o kit de "Nick translation" da Bethesda Research Laboratories (BRL) seguindo as instruções dadas pelo fabricante.

Foram marcados separadamente: a) o DNA mitocondrial de *C.hominivorax*; b) o DNA de fago λ digerido com *HindIII* e o DNA de fago Φ X 174 digerido com *HaeIII*, utilizados como padrões marcadores de tamanho. Para cada reação de marcação do DNAm_t foram utilizados 20 μ l de DNAm_t (aprox. 1 μ g), 5 μ l de α dATP³², 10 μ l sol. A₁ (que contém dCTP, dGTP e dTTP) e 10 μ l de H₂O destilada, totalizando um volume de 45 μ l. Foi adicionado, ao tubo eppendorf, 5 μ l de (DNApolI/DNaseI) e incubado a 15°C por 1 hora. Em seguida, para interromper a reação de marcação foram adicionados 5 μ l de (300 mM Na₂ EDTA, pH 8.0).

3.4.1.b. Cromatografia por Coluna de Sephadex.

Para separação entre as moléculas do DNA mitocondrial efetivamente marcadas com ³²P daqueles precursores radioativos α dATP³² não incorporados durante a reação de "Nick Translation", a solução contendo DNAm_t, λ DNA e Φ X174 DNA foi submetida a cromatografia em coluna de Sephadex G-50 utilizando o seguinte procedimento: Em uma seringa de 1ml sem embolo foi adicionado uma pequena quantidade de lã de vidro bem apertada, preenchida com Sephadex G-50 equilibrado em 1XTEN Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0). A resina dentro da seringa foi desidratada por centrifugações sucessivas na microcentrífuga por 4 minutos à 12.000rpm à temperatura ambiente. Quando o volume da resina parcialmente desidratada atingiu 0.9ml foi aplicada a amostra em um volume total de 100 μ l (completados quando necessário com tampão 1XTEN). A coluna com material radioativo foi introduzida num tubo eppendorf e em seguida centrifugada 12.000rpm por 4 minutos à temperatura ambiente na microcentrífuga. A seringa contendo a coluna com nucleotídeos marcados não

incorporados foi cuidadosamente descartada em um vidro para material radioativo. O volume dos 3 tubos contendo sondas de DNAm_t e DNA de padrões de tamanho foi misturado e incorporado na solução de hibridização (6XSSC, 0,5% SDS, 10mM EDTA, 25% formamida) e mantidos no freezer -20°C até sua utilização. Os resultados foram revelados por autoradiografia.

3.4.1.c. Marcação com Digoxigenina por "Random Primer" (Sonda fria).

Na construção de sonda de DNAm_t de *C. hominivorax* foi testada também uma marcação não radioativa denominada "dig DNA labeling and detection Kit nonradioative" da Boehringer-Mannheim Biochemica, seguindo as instruções do fabricante.

Nesta técnica, uma mistura de hexanucleotídeos que servem como "primers", se ligam de maneira aleatória ao DNAm_t linearizado e desnaturado. O fragmento Klenow da enzima DNA polimerase I com sua atividade polimerásica 5' → 3' vai estendendo a fita de DNA através da incorporação de nucleotídeos, entre os quais o nucleotídeo marcado com digoxigenina dig-dUTP. A reação de incorporação é rápida e resulta na incorporação de um dig-dUTP a cada 20-25 nucleotídeos. Desta forma se obtém o DNA marcado, o qual pode ser detectado após hibridização por 2 métodos: (1) o filtro contendo o DNAm_t é hibridizado com a sonda marcada com dig-dUTP, é incubado com uma solução de anticorpo anti-digoxigenina conjugado com a enzima fosfatase alcalina. A detecção neste caso é quimioluminescente utilizando um substrato específico da fosfatase alcalina, o AMPPD, (nome comercial de: 3-(2-Spiroadamantane)-4-Methoxy-4-(3'-Phosphoryloxy)3-(2'-Phenyl-1,2-Dioxetane.) detectável por autoradiografia, ou (2) por reação colorida no

próprio filtro, onde é adicionado um substrato da fosfatase alcalina, o X-fosfato e um corante que detecta o produto da reação, o NBT (Nitro Blue Tetrazolium).

Para a marcação com digoxigenina, o DNAm foi digerido através da digestão com a enzima *HaeIII*. Após a extração da enzima com fenol:clorofórmio, o DNAm foi desnaturado por 10 minutos a 100°C, e a desnaturação interrompida no gelo. Para um volume de reação final de 20µl foram incorporados ao DNAm (600ng) e ao DNA dos padrões 2µl da mistura de "primer" (hexanucleotídeos), 2µl da mistura de dNTPs, dig- dUTP- dATP - dCTP, dGTP e 1µl de enzima Klenow. O volume foi completado com os respectivos DNAs e água destilada.

Após uma incubação de 37°C por 18 horas a reação foi interrompida por adição de 1µl de EDTA 2M pH 8.0 e o DNA precipitado com 2.5µl LiCl 4M e etanol (-20°C). O conteúdo dos tubos foi incorporado na solução de hibridização (5XSSC, 0.1% de sarcosyl 0.02% SDS e 2% de bloqueador + 50% de formamida), e a sonda obtida foi mantida a -20°C para posterior utilização. A sonda preparada por este método tem uma duração média de um ano à -20°C.

3.4.2 Construção de sonda utilizando DNA mt de *C. hominivorax* obtido por clonagem.

Com o objetivo de otimizar a produção de sonda de DNA mitocondrial de *C. hominivorax* através de clonagem, foram testados dois vetores plasmidiais: (1) o pGEM3Z (Promega) e (2) Bluescript SK (M13-) (Stratagene) contido no vetor de inserção λ ZAP. Esquemas destes vetores estão indicados nas figuras 1 e 2 .

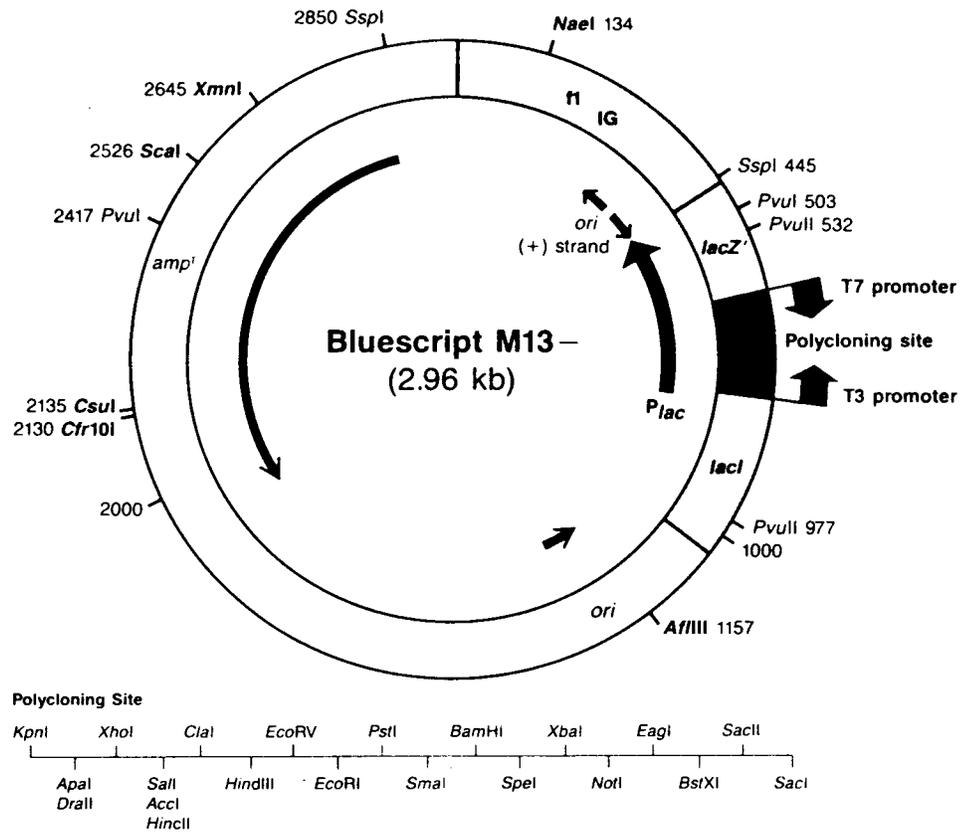


FIGURA 2. Mapa físico e genético do vetor Bluescript SK (M13-) utilizado para clonagem do DNAm_t de *C.hominivorax*, no sítio *EcoRI* (Sambrook et al, 1989).

3.4.2.1. Clonagem em pGEM 3Z.

Para realizar este experimento o plasmídeo pGEM 3Z (Promega) e a linhagem de *E. coli* DH5- α foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato do Laboratório de Bactérias do CBMEG - UNICAMP.

3.4.2.1.a. Isolamento do DNA plasmidial em larga escala.

Para a produção do plasmídeo pGEM 3Z inicialmente foi feito um pré-inóculo das células de *E. coli* contendo o plasmídeo, em 5ml de meio Luria Bertani (LB) constituído de; 1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, pH 7.4 e 10 μ l de ampicilina (solução padrão 50mg/ml). Este pré-inóculo foi incubado a 37°C durante a noite sob agitação de 300rpm. Para obter um crescimento em grande escala das bacterias, os 5ml iniciais de meio foram adicionados num Erlenmeyer contendo 300ml de meio Luria Bertani contendo ampicilina (LBamp). Este inóculo foi incubado à 37°C nas mesmas condições. O cultivo foi centrifugado à 7.500g por 10 minutos a 4°C. Ao pellet foi adicionado 4 ml de sol I contendo: 50 mM glicose, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-Cl, pH 8.0.

Uma vez ressuspensionado o "pellet" na solução I, este foi transferido para um tubo de 30ml de polipropileno e adicionado 1ml de solução de lisozima (25 μ g/ml) e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida acrescentou-se 10ml da solução II (0.2N NaOH, 1% SDS), e o tubo foi incubado por 10 minutos no gelo. Posteriormente adicionou-se 7.5 ml da solução III gelada (3M KOAc, pH 4.8, 1mM EDTA) e sob agitação as soluções foram misturadas e os tubos incubados novamente no gelo por 10

minutos. Como resultado desta etapa, formou-se um lisado nos tubos, constituído de DNA cromossômico, membranas e proteínas. Este lisado foi centrifugado à 11.000g por 20 minutos à 4°C sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo onde foi adicionado 0,6 volume de isopropanol e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugação, o "pellet" obtido foi lavado com etanol 70% centrifugado novamente como descrito anteriormente e ressuspendido em 4ml TE (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA), 0.4ml de BET (10 mg/ml) e 4.4g de CsCl. O índice de refração da solução foi medido e ajustado para 1.3520 aproximadamente, o tubo foi mantido no escuro durante 1 hora e posteriormente foi centrifugado por 7.500g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrífuga de polialômero de 13X51mm e centrifugado a 300.000g por 20 horas no rotor VTI 80 a 20°C. A banda correspondente ao DNA do plasmídeo foi visualizada através de luz Ultra Violeta (U.V) e extraída com o auxílio de uma seringa.

3.4.2.1.b. Clonagem dos fragmentos.

Aproximadamente 800ng do DNAm_t puro foi digerido com *Hind*III obtendo-se 4 fragmentos a saber: 6.8, 4.2, 4.0 e 0.6 kpb que correspondem ao genoma mitocondrial completo de *C. hominivorax*. O plasmídeo pGEM-3Z utilizado para a clonagem foi linearizado (aproximadamente 1µg) com *Hind*III, e defosforilado para evitar a recircularização do mesmo. Este último tratamento foi feito utilizando a enzima C.I.P. (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) seguindo as recomendações do fabricante (Biolab). Foi utilizado 0,1 unidade de C.I.P. por pmol do DNA. A digestão foi feita a 37°C por

1 hora e interrompida à 75°C por 10 minutos. A extração das enzimas (*EcoRI* e CIP) foi feita com fenol:clorofórmio (1:1). O DNA foi precipitado com 1/10 volumes de 3M NaOAc e 3 volumes de etanol absoluto à -70°C por 45 minutos.

Para a reação de ligação dos fragmentos de DNAm_t no plasmídeo pGEM 3Z utilizou-se a relação molar de 3:1 moléculas de inserto:vetor, segundo a seguinte fórmula: (Manual Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - CBMEG-UNICAMP, 1992).

$$\text{ng I} = \text{ng T} \times \text{rel} \times \text{pb I} / \text{rel} \times \text{pb I} \times \text{pb V}$$

$$\text{ng I} = \text{ng de inserto}$$

$$\text{ng T} = \text{ng de inserto} + \text{vetor}$$

$$\text{rel} = \text{relação molar inserto:vetor} = 3$$

$$\text{pb I} = \text{pares de bases inserto}$$

$$\text{pbV} = \text{pares de bases vetor}$$

Para um volume final de 20µl de reação de ligação foram utilizados: 155ng de mtDNA, 70 ng de pGEM 3Z, 4µl de tampão de ligação (66 mM Tris-Cl, 6.6 mM MgCl₂, 0.06 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7.4) 1µl da enzima T4 DNA ligase (Biolabs), e incubada em banho maria à 16 °C durante 15 horas .

Para transformação foram utilizados 100µl de células DH5-α de *E. coli*, em estado de competência, e 10µl da reação de ligação (plasmídeo contendo fragmentos de DNAm_t ligado). As células foram incubadas por 30 minutos no gelo, e logo submetidas a um rápido choque térmico à 42°C por 1 minuto e resfriadas novamente a 0°C por 1 minuto. Foi acrescentado 900µl de meio LBamp, e plaqueados 10, 20 e 50µl em placas contendo LB sólido (1.5% de ágar bacteriológico, 20µl de ampicilina (50mg/ml) e 30µl

de X-gal (40mg/ml), as placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Como controle foram utilizadas: a) células que passaram por todo o processo recebendo somente o vetor sem o inserto e b) células de *E.coli* sem vetor nem inserto.

As colônias transformadas (colônias brancas por α -complementação) foram identificadas e transferidas com o auxílio de um palito de dentes para tubos de ensaio, contendo 3 ml de LB amp. onde foram crescidas a 37°C a 300rpm durante a noite. Após 12 horas foi feita uma minipreparação de plasmídeos com o método alcalino.

Cerca de 1.5ml da cultura foram transferidos para tubos eppendorf e centrifugado à 12.000rpm por 30 segundos a temperatura ambiente, em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido para os 1.5ml de cultura que ficaram nos tubos de vidro. Em seguida foi adicionado ao "pellet" de células 300 μ l de TENS (10 mM Tris-Cl, 0,1N NaOH, 0,5 SDS, 1 mM EDTA, pH 8.0), 150 μ l de 3M NaOAc pH 5.2, e esta solução misturada no vortex. Seguiu-se a centrifugação à 12.000rpm, por 4 minutos a temperatura ambiente na microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 500 μ l de etanol gelado, misturando várias vezes por inversão, seguiu-se uma centrifugação à 12.000rpm por 4 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o pellet lavado com etanol 70%, centrifugado 5 minutos e ressuspendido em 50 μ l de TE mais 100 μ l de RNase (20 mg/ml).

Para verificar a presença dos insertos, alíquotas de 5 μ l do DNA obtido por miniprep foi digerido com *HindIII* e foi feito um gel de 1% de agarose .

Uma vez determinadas as colônias contendo os insertos de interesse, foi feito o isolamento do DNA plasmidial em larga escala por método Mid-prep utilizando 30ml da cultura de bactérias. Para a recuperação dos fragmentos de interesse foram utilizadas as técnicas de eletroeluição ou extração com papel DEAE-celulose (DE-81 Whatman). Para a recuperação de fragmentos maiores de 5kpb, a banda foi identificada no gel de agarose e extraído com um bisturi, e transferidas para um saquinho de diálise. Este foi fechado e submerso na cuba de eletroforese contendo 1XTAE (40mM Tris acetato, 1 mM EDTA pH 8.0). Foi aplicada uma corrente de 300 volts por 10 minutos para a eletroeluição do DNA da fatia do gel e aderência na parede do saquinho. A polaridade foi invertida na cuba durante 10 segundos. O conteúdo do saquinho (DNA eletroeluído) foi transferido para um tubo eppendorf precipitado e guardado. Para os fragmentos menores de 5kpb, a recuperação foi feita utilizando-se papel DEAE-celulose (DE81, Whatman) da seguinte forma; no gel corado com EtBr foi feita uma incisão exatamente na frente da banda de interesse e foi introduzido um papel DEAE-celulose do mesmo tamanho e aplicada uma corrente de 60 volts até a banda sair do gel e aderir-se ao papel, o que foi acompanhado por lâmpada U.V. Em seguida, o papel foi cuidadosamente removido com a ajuda de uma pinça e eluído em uma ponteira de 1ml contendo lã de vidro inserida num tubo eppendorf, com 800 μ l de tampão de eluição (20 mM Tris-Cl, 2 mM EDTA, 1.5 M NaCl, pH 8.0). O DNA eluído foi precipitado e ressuspendido para ser utilizado posteriormente. Alíquotas de 5 μ l foram usadas nas digestões com *Hind*III, de acordo com a transformação feita, para se certificar da presença dos insertos e identificar as colônias portadoras. Das colônias contendo os insertos foram feitos inóculos em LBamp, para

posteriormente serem armazenadas em glicerol (100 μ l da cultura + 900 μ l de glicerol) a -70°C.

Para a reação de marcação da sonda, foram utilizadas quantidades equimolares dos 4 clones (para um total de aproximadamente 1 μ g de DNA).

3.4.2.2. Clonagem em Bluescript SK (M13-).

O vetor λ ZAP (Stratagene) e as células de *E.coli*. XL1-Blue foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Adilson Leite do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do CBMEG -UNICAMP.

Para a construção de banco genômico no vetor Bluescript SK (M13-) contido no vetor de inserção λ ZAP: foram digeridos aproximadamente 0,5 μ g de DNAm_t puro com Eco RI. A enzima foi retirada por extração de fenol:clorofórmio.

No tubo eppendorf contendo o DNAm_t digerido com EcoRI foi adicionado 1 μ l de DNA de fago λ ZAP, seguiu-se a precipitação com 3M NaOAc pH 5.2 e etanol absoluto no freezer -70°C por 30 minutos.

O DNAm_t digerido com EcoRI mais o DNA do fago foram ressuspensos em 8 μ l em água destilada, 1 μ l de tampão de ligação, mais 1 μ l de T4 DNA ligase (Biolabs). Posteriormente foram adicionados os extratos de empacotamento para o DNA do fago, 4 μ l do extrato FLT (Freeze Thaw Lysate) e 15 μ l do extrato SE (Sonicated extract). O conteúdo do tubo foi misturado e incubado por duas horas à 22°C sendo este o tempo máximo para aumentar a eficiência do empacotamento.

Posteriormente foram adicionados 500 μ l de buffer S.M. de diluição de fago (50 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0,01% gelatina, pH 7.5).

Foram feitas 5 diluições do fago em S.M. a partir do tubo estoque e em seguida adicionados 100 μ l de *E. coli* XL1-blue incubados por 20 minutos a 37°C. Um volume de 10 μ l de cada tubo foi plaqueado em meio LB, contendo X-gal (40 mg/ml) e IPTG (30 mg/ml) e incubados durante a noite à 37°C. No dia seguinte verificou-se o número de placas líticas e lisogênicas. Onde foram selecionadas as placas onde a bactéria foi lisada (placa lítica).

Para a construção do banco genômico, foram preparados dois tubos estéreis de 18X100mm, um contendo uma diluição de 10⁻¹ de fago e o outro contendo solução de fago sem diluir. Os tubos receberam 100 μ l de *E. coli* da cepa XL1-Blue. As soluções de ambos os tubos foram plaqueadas em LB contendo Top-agar à 56 °C (0.7% de agarose em 10 mM de MgSO₄) e crescidas durante a noite à 37°C.

Adicionou-se 5ml de tampão de diluição de fago (S.M.) nas placas retiradas da estufa e manteve-se por 3 horas à 4°C. O tampão S.M. foi recolhido e guardado em tubo estéril. Adicionou-se mais 1ml de S.M. e 100 μ l de clorofórmio no tubo que em seguida foi centrifugado na microcentrífuga de mesa à 4.000rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. O sobrenadante recolhido, foi armazenado à 4°C. Este sobrenadante corresponde ao banco genômico de mtDNA de *C. hominivorax*. Para titulação deste banco genômico, foram feitas diluições seriadas, a partir do estoque do bacteriófago λ em S.M. De cada diluição feita até 10⁻⁷ foram utilizados 10 μ l mais 100 μ l de XL1-blue em tubos estéreis,

e plaqueadas em meio LB. O título do banco genômico de λ Zap foi de 6.3×10^9 pfu/ml. (unidades formadoras de placas de lise por ml).

3.4.2.2.a. Excisão in vivo do plasmídeo Bluescript SK (M13-).

Para a excisão in vivo do plasmídeo, 200 μ l de *E. coli* XL1-Blue foram ressuspensas em um tubo de polipropileno de 50ml e adicionou-se 200 μ l de lisado em SM, que corresponde a clones do banco genômico (λ ZAP/DNAmt) mais 2 μ l do fago helper R408 (simples fita).

O tubo foi incubado no "shaker" à 37°C e 100rpm por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 5ml do meio YT 2X (1% NaCl, 1% levedo, 1,6% triptona, pH 5.0) e o tubo foi incubado com agitação de 300rpm no shaker 37°C por 3 horas. Posteriormente o tubo foi aquecido a 70°C em banho- maria por 20 minutos para eliminar o fago helper. Em seguida, 1ml da solução do tubo foi transferida para um eppendorf e centrifugado na microcentrífuga a 10.000rpm por 1 minuto. Foram infectados 200 μ l de XL1-Blue com 10 μ l de sobrenadante do banco, plaqueados 50 μ l em LB amp. e incubados durante a noite a 37°C. As colônias recombinantes que cresceram em meio com ampicilina, correspondem as células XL1-Blue contendo o Bluescript SK (M13-) que carrega marca para ampicilina.

Foram feitas minipreparações dos plasmídeos para verificar a presença dos insertos, que correspondem a fragmentos de DNAmt digeridos com *EcoRI*. Uma vez selecionados os clones, foram empregadas as mesmas técnicas já descritas para crescimento em maior escala e recuperação dos insertos para a clonagem em pGEM 3Z.

Com o banco de DNA mitocondrial de *C. hominivorax* clonado em Bluescript SK (M13-) foram obtidos três dos quatro fragmentos *EcoRI* (3.5, 1.7 e 1.1kpb). Esses fragmentos estão sendo utilizados para construção de mapa de restrição do DNAm de esta espécie.

3.5 Análise do DNA mitocondrial com endonucleases de restrição.

Para a análise da variabilidade genética de populações de *C. hominivorax*, o DNA mitocondrial de *C. hominivorax* foi digerido utilizando 15 endonucleases de restrição que reconhecem de 4 a 6 pares de bases. As enzimas e os respectivos sítios de clivagem estão indicados a seguir: *ClaI* (AT/CGAT), *EcoRI* (G/AATTC), *EcoRV* (GAT/ATC), *HaeIII* (GG/CC), *HindIII* (A/AGCTT), *KpnI* (GGTAC/C), *MspI* (C/CGG), *PstI* (CTGCA/G), *PvuII* (CAG/CTG), *Sau96I* (G/GNCC), *SspI* (AAT/ATT), *SstI* (GAGCT/C), *TaqI* (T/CGA), *XbaI* (T/CTAGA) e *XhoI* (C/TCGAG).

As condições de digestão (concentração, tampão, tempo, temperatura) foram as recomendadas pelo fabricante GIBCO, BRL. Em cada gel, quatorze amostras de DNA total foram submetidas a digestão utilizando algumas das endonucleases em uma concentração de aproximadamente 2.5U/ μ g de DNA mais 1/10 do volume total da reação de tampão de digestão. A digestão foi feita utilizando-se 15 μ l de DNAm em TE (0.5 até 1.5 μ g). As reações foram interrompidas pela adição de 4 μ l de uma solução contendo; 25% de Ficoll, 0.5% de SDS, 0.1% de azul de bromofenol e 0.1% de xilenocianol.

Posteriormente as amostras foram transferidas para um gel onde foram testadas diferentes concentrações de agarose em tampão 1XTAE. A eletroforese foi conduzida sob uma voltagem de 20 volts a temperatura ambiente durante a noite. O gel foi corado com Brometo de Etídeo (2μ da solução padrão 10mg/ml) visualizados e fotografados com uma câmera Polaroid MP-4 com filme 667 através de um filtro laranja (Wratten 21 Kodak), em transiluminador U.V.

3.5.1. "Southern blot" e Hibridização.

Procedeu-se à transferência do gel por "Southern blot" como descrita em Sambrook et al. (1989), para posterior hibridização. Para isso, o gel foi desnaturado em 250ml de solução de desnaturação (50% 0,5M NaOH, 50% 1.5M NaCl) por 1 hora, transferido para 250ml de solução de neutralização (50% 1.5M NaCl, 50% 1M Tris pH 7.4) por duas horas. A transferência dos fragmentos do gel para o filtro de nitrocelulose (Sigma) ou Nylon Hybond-N (Amersham) foi feita em 10XSSC (75mM NaCl, 7.5mM Na citrato, pH 7.0) durante a noite. O filtro foi lavado em 6XSSC por 5 minutos a temperatura ambiente e secado na estufa 80°C por duas horas, para a fixação dos fragmentos de DNA.

Após esta etapa, quando a sonda era radioativa (^{32}P) os filtros foram incubados em solução de pré-hibridização contendo: 6XSSC, 0.5% de SDS, 10mM EDTA, 5X Denhardt's (1% de Ficoll 400, 1% de Polyvinilpyrrolidone e 1% de Albumina Sérica Bovina fração V), 25% de formamida deionizada. Quando foi utilizada sonda não radioativa a solução de pré-hibridização consistiu de: 5XSSC, 0.1% de Sarcosyl, 0.02% de SDS, 2% de bloqueador e 50% de formamida deionizada. Após a pré-hibridização,

a sonda previamente desnaturada foi adicionada na solução (sonda com ^{32}P ou com digoxigenina) e incubada durante a noite à 42°C, quando a solução contém formamida.

No caso de hibridização com sondas heterólogas, (DNAmT de *Cochliomyia macellaria* ou *Drosophila yakuba*), esta mesma solução sem formamida foi incubada à 68°C. Em seguida o filtro foi lavado primeiro em solução 2XSSC + 0.5% de SDS à temperatura ambiente e em uma segunda lavagem a 60°C (0,1 XSSC, 0,1% SDS).

3..5.2 Detecção da hibridização.

3.5.2.1. Detecção da hibridização com ^{32}P .

Para a detecção dos fragmentos de restrição, a membrana foi exposta a filme de raio-X Kodak XAR-5 ou Hyperfilm-MP (Amersham) em um "casette" provido de intensificador de fluorescência. O tempo de exposição depende de algumas variáveis tais como o tipo de sonda, tempo de uso, quantidade de DNA, sendo a duração média de aproximadamente 18 horas.

3.5.2.2. Detecção da hibridização com Digoxigenina.

A reação de detecção e revelação da hibridização quando utilizada sonda fria (Digoxigenina) foi feita através de dois procedimentos descritos a seguir:

3.5.2.2.a Revelação colorida com X-fosfato.

A membrana foi incubada no escuro com 10ml de solução de coloração; 40 μl de NBT (Nitro Blue Tetrazolium), 35 μl de X-fosfato e 10ml de tampão 3 (10mM tris-HCl, 0,1M NaCl, 10mM MgCl₂, p.H. 9.5). O X-fosfato é o substrato da enzima fosfatase

alcalina, que se encontra nas soluções da hibridização a frio; e o NBT, cora o produto da reação, apresentando um precipitado de cor azul que aparece onde localizado o DNA na própria membrana. O precipitado é formado após 15 minutos de incubação e posteriormente a membrana pode ser seca e guardada.

3.5.2.2.b. Revelação quimioluminiscente com AMPPD.

O AMPPD é um substrato quimioluminiscente da fosfatase alcalina, e o produto tem um estagio de emissão de luz que é obtido em 15 minutos. Para esta reação, o AMPPD foi diluído (1:100) em tampão 3. A membrana foi incubada em 10ml desta solução por 5 minutos, logo foi retirada da solução e incubada por 10 minutos à 37°C. Finalmente a membrana foi exposta a temperatura ambiente como descrito para hibridização radioativa, durante 30 minutos. As autoradiografias obtidas foram fotografados com filme T-MAX asa 100 Kodak para posterior análise.

3.6 Análise da divergência de sequência do DNAm interpopulações.

Com os haplótipos mitocondriais construídos a partir da análise com enzimas de restrição, foi feita uma matriz de presença/ausência de sítio de restrição, designando a presença de determinados sítios por 1 e a ausência por 0. Com a matriz obtida foi elaborado manualmente, um cladograma (Bermingham & Avise, 1986; Avise et al, 1987) utilizando o critério de parcimônia isto é, a seqüência que requer o menor número de mudanças evolutivas para que ocorra a interconversão de um haplótipo para outro.

A proporção de fragmentos de restrição em comum para cada par de haplótipos mitocondriais foi calculada utilizando a fórmula (21) de Nei & Li (1979): $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$, onde N_{xy} é o número de fragmentos em comum entre os dois haplótipos mitocondriais, N_x e N_y são o número de fragmentos para cada haplótipo separadamente. O índice da divergência da sequência nucleotídica entre os haplótipos (que é uma estimativa do número de substituições nucleotídicas por sítio), foi determinado utilizando a fórmula (8) de Nei & Li, 1979: $\delta = -(LnS)/r$, onde S corresponde ao mesmo valor de F (proporção de fragmentos de restrição em comum para cada par de haplótipos), e r corresponde ao número de nucleotídeos da sequência de reconhecimento de cada endonuclease utilizada. Os valores obtidos de F e δ , foram utilizados para estabelecer uma estimativa da diferenciação do DNAm de *C.hominivorax* nas diferentes populações analisadas.

IV. RESULTADOS

Para um melhor detalhamento dos resultados obtidos neste trabalho, estes serão apresentados por itens.

1.0 Métodos de criação de *C. hominivorax*.

Os métodos de criação, manutenção e manuseio de *C. hominivorax* em condições de laboratório utilizados neste estudo, foram os descritos em Azeredo-Espin, 1987. Algumas modificações foram necessárias para otimizar a manutenção destas populações em condições de laboratório.

Para a oviposição das fêmeas, os melhores resultados foram obtidos quando as fêmeas eram estimuladas nos dias 9 e 10 pós-emergência. Nos experimentos com isolinhagem, o casal se manteve por duas semanas na gaiola, e foi possível obter, em média, duas oviposições dentro de um período de 15 dias.

Na criação de larvas, foi fundamental a troca diária do meio de cultura, para evitar o ressecamento do meio. As larvas de uma placa de Petri dependendo do número de indivíduos (aproximadamente 1000), foram distribuídas em duas placas para diminuir a competição e facilitar o melhor desenvolvimento das larvas.

2.0 Métodos de extração do DNAm.

Para verificar a melhor fase do desenvolvimento de *C. hominivorax* (onde se obtêm uma melhor preparação de DNA mitocondrial), foram feitas extrações de DNA total durante as diferentes fases do desenvolvimento, isto é, ovos, larvas, pupas e adultos. As pupas foram

testadas com e sem casulo (pupário).

Os testes iniciais realizados com duas enzimas de restrição (*HindIII* e *EcoRI*) revelaram que a melhor fase para a extração de DNAm_t desta espécie é a de pupa com olho pigmentado. A vantagem em utilizar-se pupas reside na facilidade de manuseio e homogeneização dos tecidos, uma vez que nesta fase do desenvolvimento, o indivíduo apresenta os tecidos já diferenciados mas sem quitinização, portanto mais amolecidos e desta forma, uma maior quantidade de DNA é isolada.

O DNA proveniente de extração total de ácidos nucleicos de cada indivíduo é importante quando deseja-se analisar comparativamente a variabilidade do DNA mitocondrial intra e inter populacional. Desta forma obtém-se informações mais precisas sobre a condição de homo ou heteroplasmia, que podem ser ocultadas caso seja utilizado um "pool" de DNAm_t de um grupo de indivíduos.

Para a produção de sonda de DNAm_t, foi verificado que através do Meio de Isolamento de Mitocôndrias (MIM), cerca de 120 pupas vivas foram necessárias para a obtenção de cerca de 1 µg de DNAm_t. O DNAm_t de *C. hominivorax* proveniente de MIM, foi utilizado apenas para a produção de sondas que posteriormente eram marcadas com ³²P ou digoxigenina, cujos resultados serão descritos posteriormente.

Não foi possível visualizar alguns fragmentos menores que 2.0 kpb após coloração no gel com BET, obtidos em digestões de DNAm_t de um único indivíduo.

A hibridização dos fragmentos com a sonda homóloga de DNAm_t, radioativa (³²P) ou não radioativa (Digoxigenina) permitiu a detecção nas autoradiografias, dos fragmentos

de restrição, especialmente aqueles menores de 1000 pares de bases. Isto permitiu estimar os tamanhos desses fragmentos de restrição com maior precisão.

3.0 Experimento de Isolinagem.

O DNAm das pupas analisadas das progênes de isolinhagem (total de 40 indivíduos da F1), foi digerido com 7 enzimas de restrição, a saber: *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HindIII*, *MspI*, *PvuII* e *KpnI*. A digestão com estas enzimas não revelou variabilidade genética a nível do DNA mitocondrial, sendo que todos os indivíduos da F1 de uma única fêmea, apresentaram o mesmo padrão de restrição característico de cada uma das enzimas testadas, o que será descrito no item 5 de resultados. Destas 7 enzimas testadas, somente *KpnI* apresenta um único sítio de reconhecimento na seqüência do DNA mitocondrial desta espécie. As outras 6 enzimas isto é, *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HindIII*, *MspI* e *PvuII* digeriram o DNAm gerando 4 fragmentos de restrição (*EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*) e 5 fragmentos de restrição (*MspI*, *PvuII*), sendo que ao todo com estas 7 enzimas, foram obtidos 28 sítios de clivagem no genoma mitocondrial de *C.hominivorax*.

4.0 Construção de sondas de DNA mitocondrial de *C. hominivorax*.

4.1 DNA mitocondrial para construção de sonda.

Para construção de sonda de DNAm de *C.hominivorax* foram testados dois procedimentos: um deles utilizando DNA mitocondrial purificado obtido pela técnica de M.I.M. (meio de isolamento mitocondrial), (Figura 3), e outro utilizando DNA mitocondrial obtido por clonagem, (Figura 4).

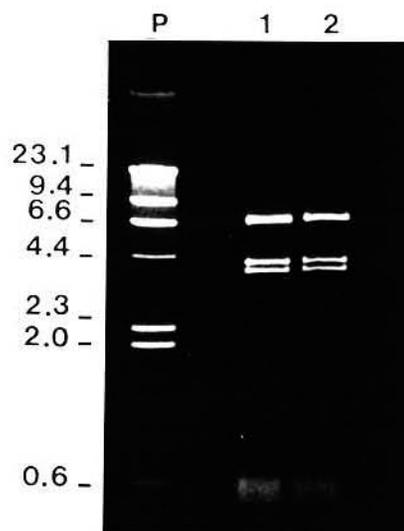


FIGURA 3. DNA mitocondrial purificado de *Cochliomyia hominivorax*, obtido através do método de isolamento mitocondrial (M.I.M.) digerido com enzima *Hind* III, em gel de agarose 1% e posteriormente corado com Brometo de Etídeo (colunas 1 e 2). O tamanho dos fragmentos estão indicados a esquerda em kpb (P) e correspondem ao marcador λ *Hind* III.

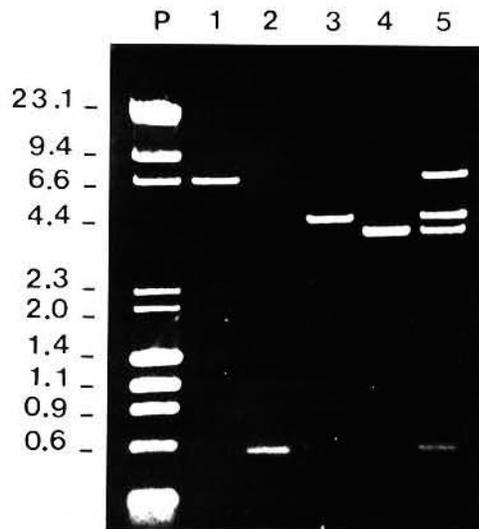


FIGURA 4. Fragmentos de DNA mitocondrial de *C.hominivorax* digeridos com a enzima *Hind* III, obtidos após clonagem no vetor pGEM-3Z. A digestão foi realizada em gel de agarose 1% e posteriormente corados com Brometo de Etídeo. Coluna 1, fragmento de 6.8 Kpb; coluna 2 fragmento de 0.6 Kpb; coluna 3, fragmento de 4.2 Kpb; coluna 4, fragmento de 4.0 Kpb e coluna 5 todos os fragmentos. Os tamanhos estão indicados à esquerda em kpb (P) e corresponde aos marcadores λ *Hind* III e ϕ X 174 *Hae* III.

Ambos os procedimentos, foram eficientes para produção de sonda de DNAm_t e detecção dos fragmentos de restrição. Entretanto, para a obtenção de 1 µg de DNAm_t através de MIM, mensalmente era necessária a criação de uma grande quantidade de pupas vivas e várias extrações de DNA (MIM) para a manutenção de um bom estoque de DNAm_t. Este procedimento além de dispendioso, envolvia um tempo maior para a obtenção dos resultados (cerca de 3 a 4 semanas).

Para otimizar a produção de sonda, o DNAm_t purificado de *C.hominivorax* foi clonado em vetores específicos.

Na construção de sonda utilizando DNAm_t clonado em vetores plasmidiais, existem duas vantagens básicas (Lansman et al, 1981); (1) os plasmídeos podem ser rapidamente purificados através de mini e midipreparação, e obtidas quantidades em miligramas para culturas de *E.coli* de tamanho médio. Isto quer dizer que este procedimento evita a necessidade de realizar sucessivas purificações de DNAm_t, que envolve obtenção em grande escala de larvas e pupas de *C.hominivorax* em condições de laboratório (com os respectivos cuidados de manutenção da população). (2) A outra vantagem de utilizar plasmídeos é que sua utilização, elimina a possibilidade de artefatos de técnicas resultantes da hibridização de sequências altamente repetidas do DNA nuclear.

4.2. Marcação das sondas.

Foram testadas duas técnicas de marcação de sonda, radioativa com ^{32}P por "nick translation" e não radioativa com digoxigenina por "random primed".

A reação de "nick translation" foi mais rápida e os autoradiogramas obtidos não apresentaram "back-ground". As desvantagens da utilização desta técnica são as seguintes: precisa-se no mínimo de cerca de 1 μg de DNA; a sonda perde sua atividade com a perda progressiva de radiação do ^{32}P , além dos riscos no manuseio e exposição de material radioativo.

Por estas razões foi testada a reação de marcação a frio, não radioativa por "random primed" utilizando digoxigenina, um composto derivado da planta *Digitalis purpurea*, cujas principais vantagens são: não ser radioativo, a quantidade de DNAm_t requerida ser baixa, podendo variar desde 10 ng até 3 μg , e a sonda pode ser utilizada durante um período de 1 ano, se armazenada a -20°C .

Além disso, verificou-se que através desta técnica foi possível detectar claramente nos autoradiogramas alguns fragmentos menores de 800 pares de bases e que não foram revelados tão nitidamente por sonda de ^{32}P . A desvantagem da técnica é o "back-ground" que é obtido nos autoradiogramas. Entretanto, este problema pode ser minimizado utilizando-se diferentes tempos de lavagem, e de concentrações das soluções de lavagem.

Devido as vantagens da marcação não radioativa, esta foi utilizada nos experimentos de rotina onde a análise de um grande número de autoradiogramas foi necessária para os estudos de variabilidade do DNAm_t intra e inter populações, (Figura 5).

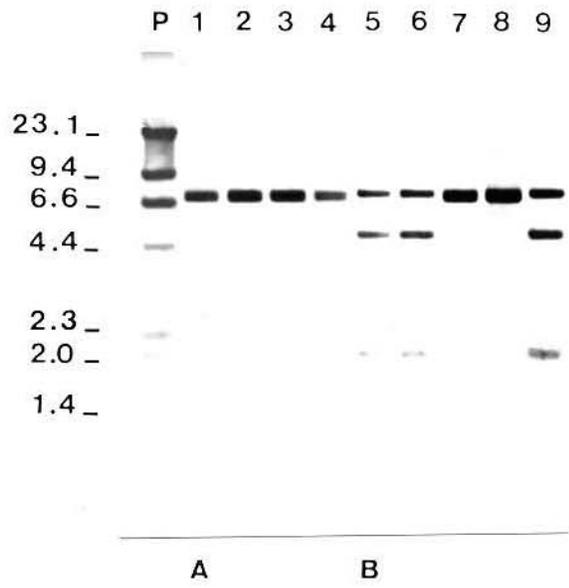


FIGURA 5. Autorradiograma de "Southern Blot" do DNAMt de *C. hominivorax* utilizando sonda de DNAMt marcada não radioativamente com digoxigenina-11-dUTP. A revelação das bandas foi feita na própria membrana utilizando X-fosfato e NBT (Nitro Blue Tetrazolium). No autorradiograma foi utilizada a enzima *Hae* III. Colunas 1 a 4, 7 e 8 padrão A, colunas 5, 6 e 9 padrão B, (P) λ *Hind* III e ϕ 174 *Hae* III.

5.0 Clonagem dos fragmentos de DNAm_t

A primeira tentativa de clonar o genoma mitocondrial de *C. hominivorax*, foi utilizando a molécula inteira de DNA (16.3 Kpb), apenas linearizada com as enzimas *Pst*I ou *Xba*I, e utilizando o plasmídeo pGEM 3Z e a cepa de *E. coli* DH5 α .

Nos primeiros testes, as bactérias *E. coli* transformadas apresentaram coloração branca em meio LB contendo X-gal, indicando assim possuírem o DNAm_t clonado. Porém as colônias quando analisadas não apresentavam o inserto, devido ao tamanho do DNAm_t de *C. hominivorax* (16.3 kpb). Por esta razão o DNAm_t foi digerido com outras enzimas que estavam presentes nas regiões do "polylinker" do plasmídeo, com o objetivo de clonar todos os fragmentos do mtDNA separadamente, e assim obter um banco genômico mitocondrial de *C. hominivorax*.

5.1. Fragmentos derivados da digestão *Hind*III.

Um dos padrões de restrição do mtDNA de *C. hominivorax* digerido com *Hind*III produz cinco fragmentos que ao todo correspondem ao tamanho do genoma mitocondrial a saber 6.8, 4.2, 4.0, 0.6 e 0.5 Kpb.

Os cinco fragmentos foram submetidos a clonagem no plasmídeo pGEM 3Z em cepas de *E. coli* DH5 α . Nas primeiras tentativas foram obtidas colônias transformantes que efetivamente apresentavam os insertos. Os fragmentos clonados foram recuperadas em preparações em grande escala, por eletroeluição ou com papel DEAE-celulosa segundo o tamanho dos mesmos. Para a construção da sonda foram utilizadas quantidades equimolares de todos os clones (Figura 6).

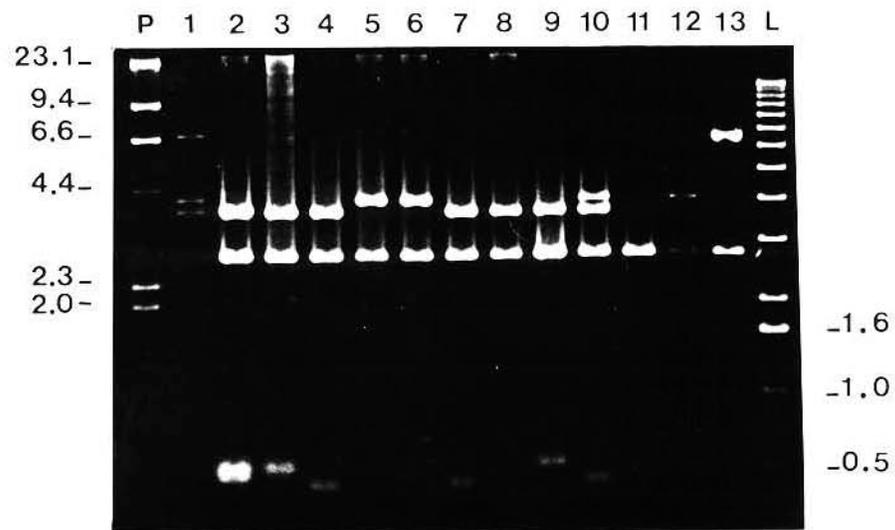


FIGURA 6. Gel de agarose corado com Brometo de Etídeo, indicando os clones de DNAMt de *Cochliomyia hominivorax* digeridos com *Hind* III, obtidos com o vetor pGEM-3Z. Coluna 1, DNAMt puro digerido com *Hind* III; colunas 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10, clones de 4.0 kpb incluindo os fragmentos de 0.5 e 0.6 kpb; colunas 5, 6, 10 e 12, clones de 4.2 kpb; coluna 13, clone de 6.8 kpb. Os tamanhos estão indicados em kpb (P) λ *Hind* III e ϕ X 174 *Hae* III, (L) Ladder 1 kpb.

5.2. Fragmentos derivados da digestão *EcoRI*.

Uma outra abordagem utilizada para otimizar a clonagem e ter o banco do genoma mitocondrial de *C.hominivorax* foi o emprego do vetor λ ZAP e fagemido Bluescript SK (M13-) (Sambrook et al, 1989).

O DNAm de *C.hominivorax* foi digerido com *EcoRI*, obtendo-se 4 fragmentos de 9.0, 3.5, 1.7 e 1.1 Kpb que também correspondem ao genoma mitocondrial de *C.hominivorax*. Os fragmentos não detectados nos autoradiogramas, não foram considerados. Isto por tratar-se de fragmentos muito pequenos, que provavelmente foram perdidos no gel.

Todas as colônias transformadas foram analisadas, sendo que apenas o fragmento maior de 9.0 Kpb não foi incorporado no vetor, sendo os outros 3 fragmentos clonados (Figura 7). Estes fragmentos estão sendo utilizados para construção do mapa de restrição.

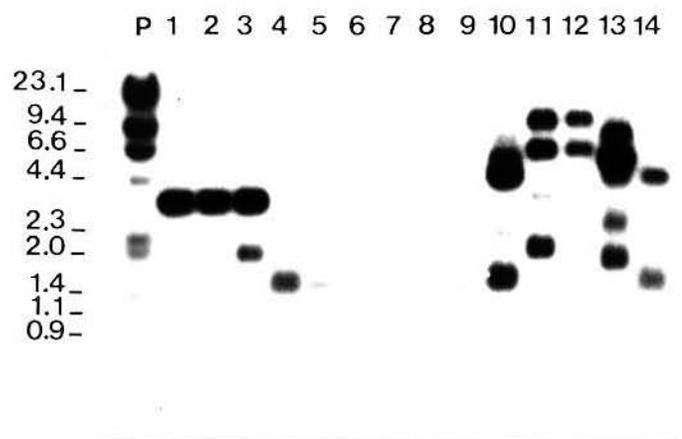


FIGURA 7. Autorradiograma de "Southern Blot" utilizando sonda homóloga dos clones de DNAm_t de *Cochliomyia hominivorax* digeridos com a enzima *Eco* RI. A clonagem dos fragmentos foi realizada no vetor Bluescript SK (M13-). Na figura estão indicados os clones do fragmento de 3.5 kpb, colunas 1, 2, 3 e 11; clones do fragmento de 1.5 kpb, colunas 3, 11 e 13 e clones do fragmento de 1.1 kpb; colunas 4, 5, 8, 9 e 14. Os outros fragmentos que aparecem no autorradiograma correspondem a digestões parciais. Os tamanhos dos fragmentos estão indicados à esquerda (P) λ *Hind* III e ϕ X 174 *Hae* III.

6.0 Análise do DNA mitocondrial com endonucleases de restrição

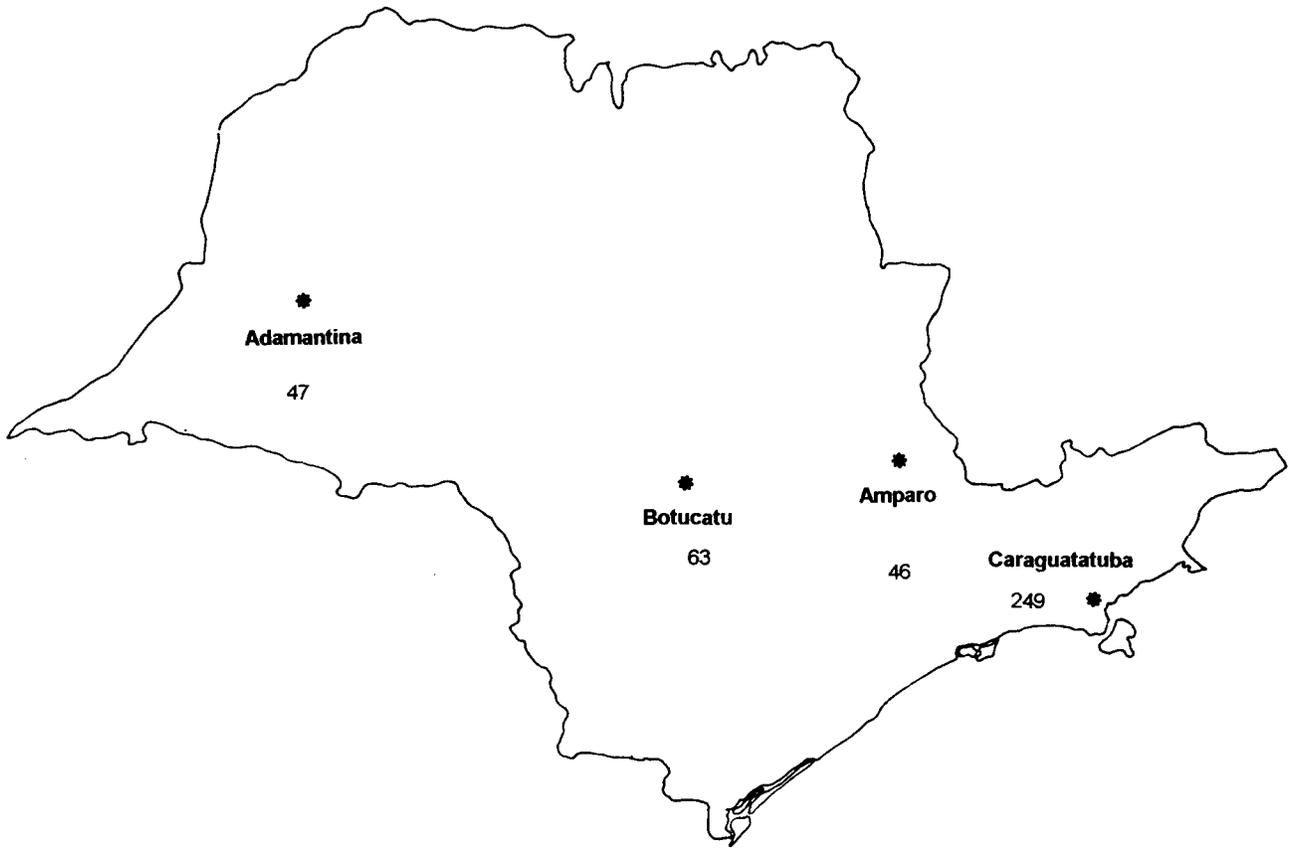
Foram testados diferentes tempos de incubação e digestão para as 15 enzimas descritas no item 3.5 de Material e Métodos. Foi verificado que a incubação por 3 horas a uma concentração de enzima de 2.5 U/ μ g de DNAMt foi necessária para evitar digestões parciais.

A concentração do gel de agarose, foi padronizada para 1%, sendo que quando foram utilizadas enzimas que produziram fragmentos menores que 1.0 Kpb a concentração do gel foi de 1.2 % onde, de acordo com Sambrook et al, 1989 permite uma melhor separação dos fragmentos menores.

Um total de 405 indivíduos de *C.hominivorax* provenientes de 4 localidades do Estado de São Paulo (Adamantina, Amparo, Botucatu e Caraguatatuba) foram utilizados para a análise do DNAMt com endonucleases de restrição. No mapa na figura 8, estão indicadas as localidades e o número de indivíduos amostrados.

Os sítios de reconhecimento para todas as 15 endonucleases utilizadas para analisar o DNAMt das populações de *C.hominivorax* neste trabalho, assim como o tamanho dos fragmentos produzidos estão indicados na tabela 1. O tamanho total da molécula de DNAMt desta espécie foi estimado em 16.3 Kpb.

Do total de 15 endonucleases testadas, 11 enzimas apresentaram cada uma um único padrão de restrição no DNAMt de *C.hominivorax*, 4 delas *KpnI*, *PstI*, *XbaI* e *XhoI*, reconhecem um único sítio de restrição e foram utilizadas para linearizar o DNAMt.



Localidade	Latitude G M S	Longitude G M S
Adamantina	21° 41' 07"	51° 04' 21"
Amparo	22° 42' 04"	46° 45' 52"
Botucatu	22° 53' 09"	48° 26' 04"
Caraguatatuba	23° 37' 13"	45° 24' 47"

FIGURA 8. Mapa do Estado de São Paulo mostrando as localidades onde foram realizadas as coletas de *Cochliomyia hominivorax*. Na tabela estão indicados a latitude e a longitude de cada localidade.

TABELA 1: Número e tamanho (pb) dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial de *Cochliomyia hominivorax* obtidos com endonucleases que apresentaram um único padrão.

Endonuclease	Número de sítios	Tamanho
<i>Cla</i> I	3	13.700 1.700 1.300
<i>Eco</i> RI	4	9.000 3.500 1.500 1.300
<i>Eco</i> RV	4	6.500 4.900 3.100 1.580
<i>Kpn</i> I	1	16.300
<i>Pst</i> I	1	16.300
<i>Sau</i> 96 I	5	6.100 4.900 2.100 1.600 1.075
<i>Sst</i> I	3	6.100 5.300 3.900
<i>Taq</i> I	4	3.800 2.500 1.300 800
<i>Xba</i> I	1	16.300
<i>Xho</i> I	1	16.300

Dentre as 15 endonucleases testadas nestas populações, 4 delas foram consideradas marcadores para caracterizar a variabilidade no DNAmT de *C.hominivorax*; *HaeIII* (Figura 9a e 9b), *HindIII* (Figuras 10a e 10b), *MspI* (Figuras 11a e 11b) e *PvuII* (Figuras 12a e 12b), tendo sido obtidos 5 padrões para *HaeIII*, 4 padrões para *HindIII*, 5 padrões para *MspI* e 3 padrões para *PvuII*.

A enzima que reconhece um maior número de sítios na molécula de DNAmT é *Sau96I* com 5 sítios de clivagem, todos eles visíveis no autoradiograma.

Cada um dos padrões obtidos com as 4 enzimas marcadoras (*HaeIII*, *HindIII*, *MspI* e *PvuII*) foi designado por letras em ordem alfabética, de acordo com a ordem em que estes foram sendo encontrados. A Tabela 2 indica os padrões assim como os tamanhos dos fragmentos obtidos com estas enzimas.

Com 3 das 4 enzimas isto é, *HaeIII*, *MspI* e *PvuII* foram obtidos padrões únicos e em apenas uma localidade. O padrão B de *HindIII*, foi encontrado exclusivamente em amostras de *C.hominivorax* coletadas em ovelhas na localidade de Botucatu. Os padrões C de *HaeIII* e *MspI* foram encontrados em Caraguatatuba (Ca-2), e o padrão D de *PvuII* foi encontrado somente em Caraguatatuba (Ca-4). A frequência de cada padrão nas diferentes localidades analisadas foi estimada e estão indicadas na Tabela 3.

Para as enzimas: *HaeIII*, *HindIII* e *PvuII* o padrão A de cada uma delas foi o mais freqüente em todas as amostras das populações analisadas. Para a enzima *MspI* o padrão B foi o mais freqüente nas amostras exceto para Adamantina, onde somente foi encontrado o padrão A.

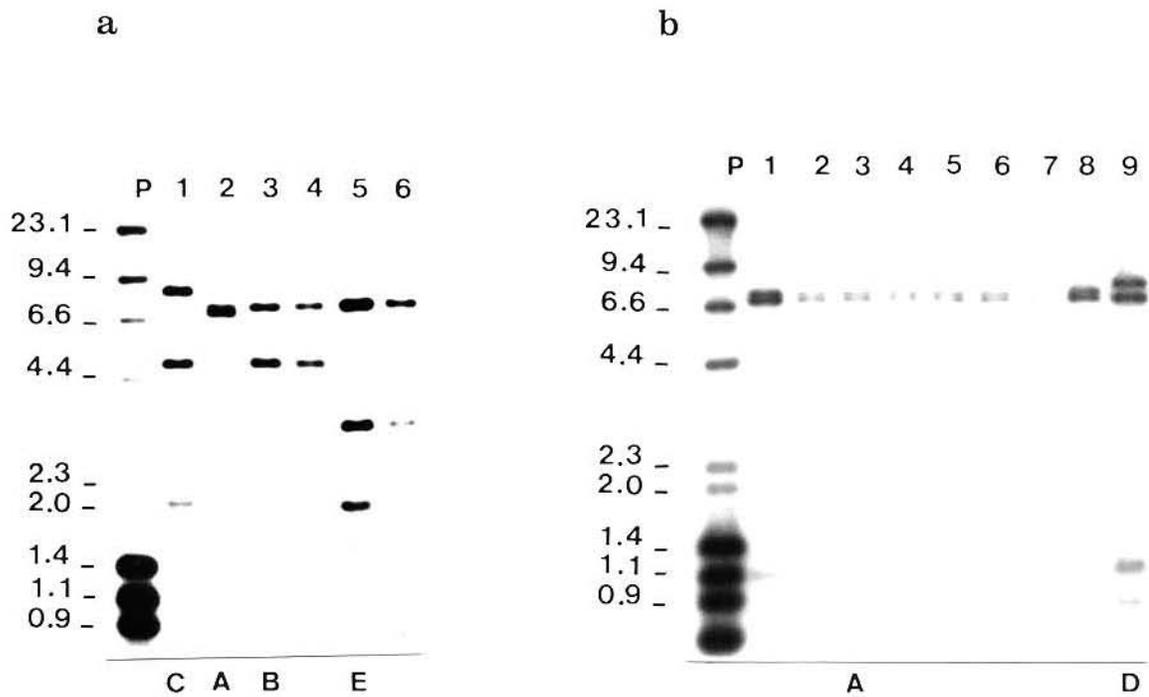


FIGURA 9. Autorradiograma de "Southern Blot" indicando a variação no DNA mitocondrial de *C. hominivorax*. As letras indicam os 5 padrões obtidos com a enzima *Hae* III. a) Coluna 1, padrão C; coluna 2, padrão A; colunas 3 e 4, padrão B; colunas 5 e 6, padrão E. b) Colunas 1 a 8, padrão A; coluna 9, padrão D. Os tamanhos dos fragmentos de restrição estão indicados à esquerda das figuras (P) λ *Hind* III e ϕ X 174 *Hae* III.

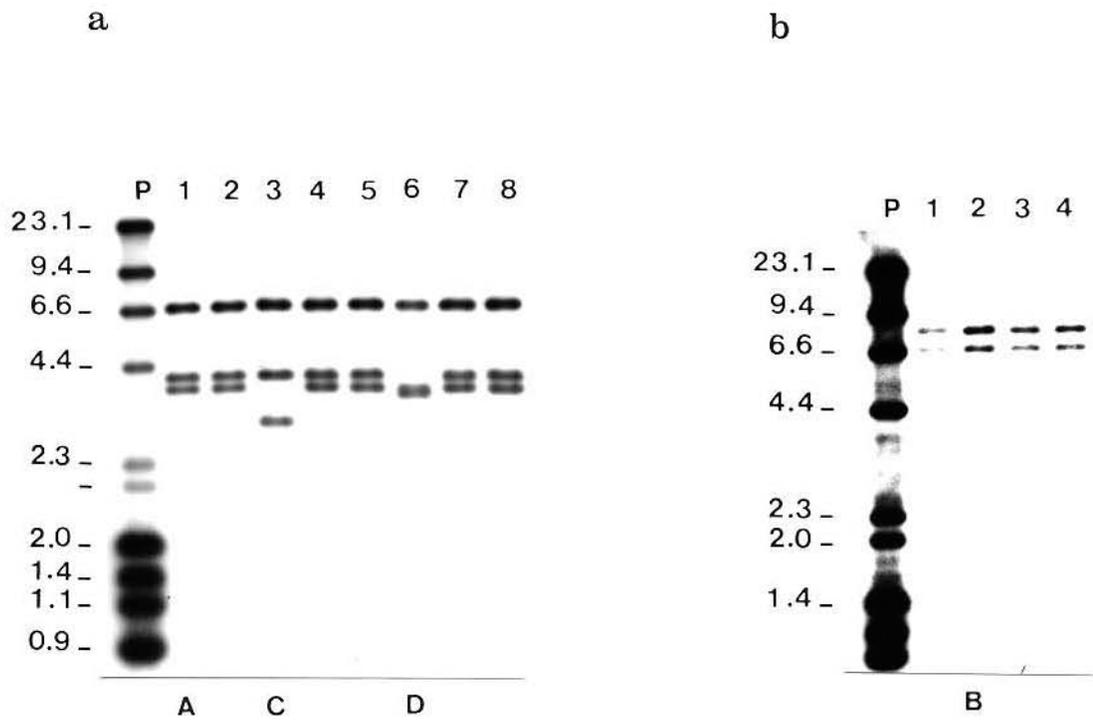


FIGURA 10. Autoradiogramas de "Southern Blot" indicando os padrões de fragmentos de restrição do DNAmt de *C. hominivorax*. As letras indicam os 4 padrões obtidos com a enzima *Hind* III. a) Colunas 1, 2, 4, 5, 7 e 8, padrão A; coluna 3, padrão C; coluna 6, padrão D. b) Colunas 1 a 4, padrão B observado unicamente em amostras coletadas em Botucatu. Os tamanhos dos fragmentos de restrição estão indicados à esquerda (P) λ *Hind* III e ϕ X 174 *Hae* III.

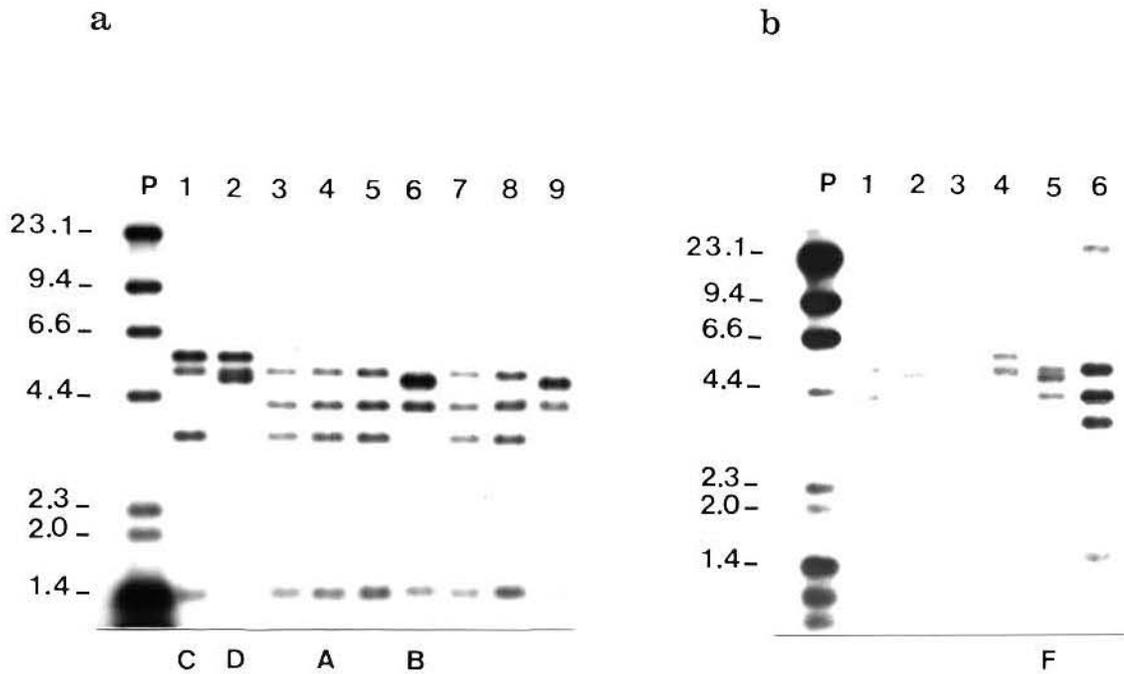


FIGURA 11. Autoradiogramas de "Southern Blot" indicando os padrões de fragmentos de restrição no DNAm_t de *C.hominivorax*. As letras indicam os 5 padrões obtidos com a enzima *Msp* I. a) Colunas 3, 4, 5, 7 e 8, padrão A; colunas 6 e 9, padrão B; coluna 1 padrão C; coluna 2, padrão D. b) coluna 5, padrão F; colunas 1 e 6, padrão A; coluna 2, padrão B; coluna 4, padrão D. Os tamanhos dos fragmentos de restrição estão indicados em kpb à esquerda das figuras (P). λ *Hind* III e ϕ X 174 *Hae* III.

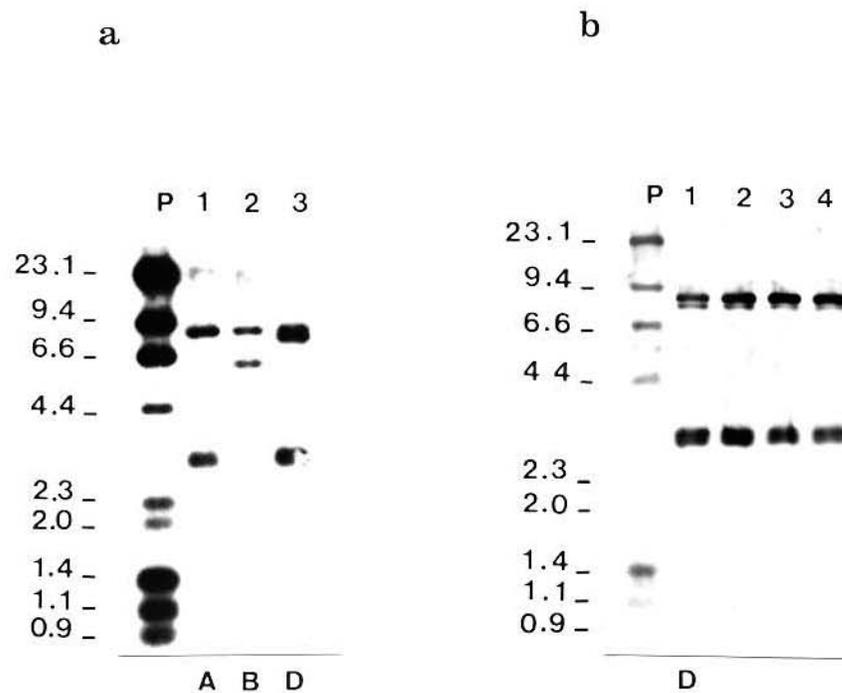


FIGURA 12. Autorradiogramas de "Southern Blot" indicando os padrões de fragmentos de restrição no DNAm_t de *C.hominivorax*. As letras indicam os 3 padrões obtidos com a enzima *Pvu* II. a) Coluna 1, padrão A; coluna 2, padrão B; coluna 3, padrão D. b) Colunas 1 a 4, padrão D. Os tamanhos dos fragmentos de restrição estão indicados à esquerda (P). λ *Hind* III e ϕ X 174 *Hae* III.

TABELA 2: Tamanho aproximado em kilobases dos fragmentos gerados por digestão do DNAm_t de *Cochliomyia hominivorax* com as endonucleases marcadoras. As letras designam os padrões observados com cada enzima.

Enzima e padrão	Sítio de clivagem	Tamanho dos fragmentos (Kpb)
<i>Hae</i> III	(GG/CC)	
A		7.5 - 7.0 - 1.0 - 0.8
B		7.5 - 4.8 - 2.0 - 1.1 - 0.8
C ²		8.0 - 4.8 - 2.0 - 0.8
D		8.0 - 7.0 - 1.0 - 0.8
E		7.5 - 3.0 - 2.0 - 1.8 - 1.0 - 0.8
<i>Hind</i> III	(A/AGCTT)	
A		6.6 - 4.2 - 3.8 - 0.6 - 0.5
B ¹		8.6 - 6.8 - 0.8
C		6.6 - 4.3 - 3.1 - 0.7 - 0.6
D		6.6 - 3.8 - 3.6 - 0.6
<i>Msp</i> I	(C/CGG)	
A		6.1 - 4.2 - 3.8 - 1.3 ³
B		5.0 - 4.7 - 4.2 - 1.3
C ⁴		6.1 - 5.2 - 3.8 - 1.3
D		6.1 - 5.2 - 4.9
F		5.2 - 5.0 - 3.8 - 1.3
<i>Pvu</i> II	(CAG/CTG)	
A		9.0 - 3.0 - 2.9 - 0.8 - 0.6
B		9.0 - 5.9 - 0.8 - 0.6
"D" ⁵		9.0 - 8.1 - 3.0 - 2.9 - 0.8 - 0.6

1. Padrão encontrado somente em Botucatu.

2 e 4. Padrões encontrados somente em Caraguatatuba (Ca-2).

3. Existem dois fragmentos aproximadamente do mesmo tamanho (1.3 Kpb) quando o DNAm_t de *Cochliomyia hominivorax* é digerido com *Msp* I (detectado por experimentos de dupla digestão).

5. Padrão encontrado somente em Caraguatatuba (Ca-4).

TABELA 3: Frequência dos padrões para cada enzima nas populações estudadas.

Enzima	Padrão	Localidade				
		Ad	Amp	Bot	Ca-2	Ca-4
<i>Hae</i> III	A	0.76	0.88	0.60	0.67	0.50
	B	0.17	0.12	0.37	0.27	0.44
	C				0.01	
	D	0.06			0.03	0.06
	E			0.02	0.01	
<i>Hind</i> III	A	1.00	1.00	0.72	0.90	0.86
	B			0.25		
	C				0.07	0.08
	D			0.03	0.02	0.12
<i>Msp</i> I	A	1.00	0.12	0.02	0.25	0.26
	B		0.88	0.81	0.53	0.55
	C				0.01	
	D			0.07	0.20	0.16
	F			0.08		0.02
<i>Pvu</i> II	A	1.00	1.00	1.00	0.87	0.90
	B				0.12	0.02
	D					0.07
		47	86	81	82	247

Ad = Adamantina

Amp = Amparo

Bot = Botucatu

Ca-2 = Caraguatatuba - 2 (amostra coletada no inverno).

Ca-4 = Caraguatatuba - 4 (amostra coletada no verão).

*Hind*III apresenta o padrão A como o mais freqüente, sendo o único observado em Adamantina e em Amparo. Para *Pvu*II o padrão A foi o predominante, sendo o único em Adamantina, Amparo e Botucatu. A amostra de Caraguatatuba coletada durante o inverno (Ca-2), apresentou ao todo 14 padrões para as 4 endonucleases; padrões A, B, C, D e E de *Hae*III; A, C e D de *Hind*III; A, B, C, e D de *Msp*I e A e B de *Pvu*II.

As amostras com maior grau de polimorfismo foram as de Caraguatatuba (Ca-2 e Ca-4). Nesta localidade foram coletadas duas amostras, uma durante o inverno (Ca-2) e outra durante o verão (Ca-4). Isto foi feito, com o objetivo de obter resultados preliminares sobre a possível variação sazonal do DNAmT na população de Caraguatatuba. Esta fazenda, apresenta um grande fluxo de gado provenientes de outras regiões, especialmente durante estas estações do ano para posterior comercialização. Na amostra coletada no verão (Ca-4), o grau de variabilidade foi maior, tendo sido observados os 5 padrões de restrição para a enzima *Hae*III, 3 dos 4 obtidos para *Hind*III, 4 dos 5 padrões da enzima *Msp*I e 2 padrões para *Pvu*II. Esta amostra apresentou 14 padrões dentre os 17 obtidos no total com estas 4 enzimas marcadoras em todas as populações analisadas.

Na localidade de Botucatu foram observados 11 padrões e em Amparo e Adamantina foram observados 6 padrões respectivamente, sendo 5 deles comuns a ambas as populações (Tabela 3). O maior número de padrões de restrição foi obtido com as endonucleases *Hae*III e *Msp*I.

Baseados nos padrões de restrição para as quatro enzimas marcadores, indicados na Tabela 2, foi possível estabelecer os prováveis eventos mutacionais que teriam dado origem aos diferentes padrões de restrição obtidos. Com estes dados foi possível também estabelecer a frequência que apresenta cada padrão nas diferentes amostras de populações de *C.hominivorax*.

O número total de sítios de restrição obtidos foram denominados por letras e números, para facilitar a compreensão dos eventos mutacionais de perda e/ou ganho de sítio de restrição que originaram os diferentes padrões para as quatro enzimas marcadoras no DNA mitocondrial de *C.hominivorax*, . Assim os 6 sítios para *HaeIII* foram denominados de H₁ a H₆, para *HindIII*, sítios I₁ a I₅, para *MspI*, sítios de M₁ a M₅ e para *PvuII* sítios P₁ a P₅. Os sítios assim como os tamanhos de cada fragmento para cada uma das quatro endonucleases marcadoras estão indicados na Figura 13.

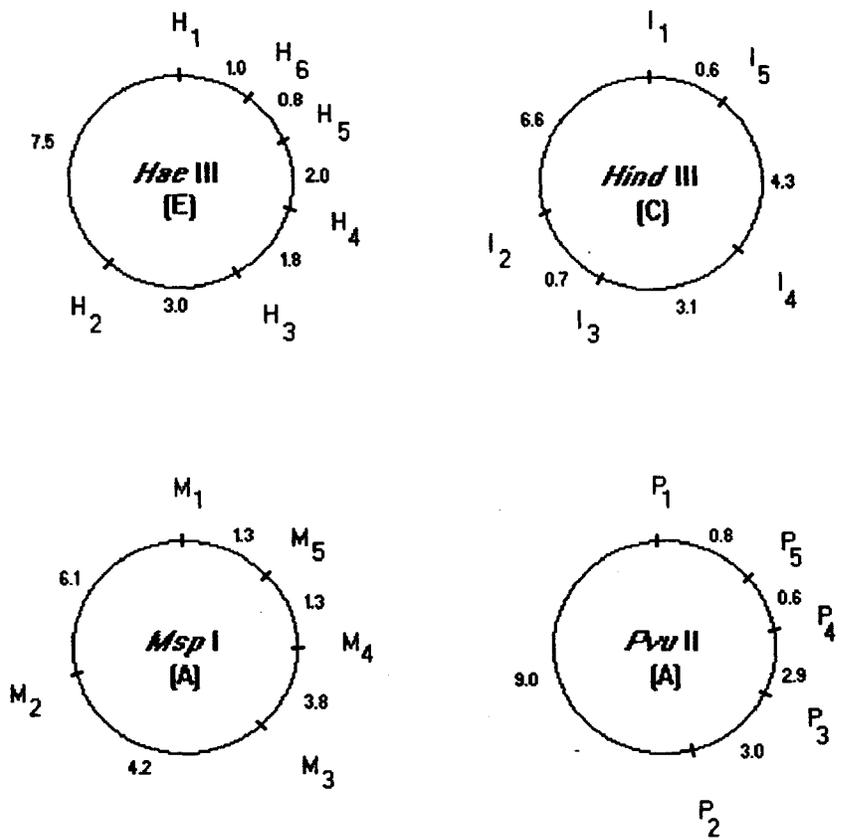


FIGURA 13. Diagrama representando o número total de sítios diagnósticos no genoma mitocondrial de *C. hominivorax*, para as quatro endonucleases de restrição marcadoras. Os sítios foram localizados de maneira aleatória e designados por letras; H para *Hae* III, I para *Hind* III, M para *Msp* I e P para *Pvu* II. Os tamanhos dos fragmentos produzidos por cada par de sítios, estão indicados em Kpb.

Os eventos mutacionais de perda e/ou ganho de sítios de restrição para os padrões obtidos com cada enzima, estão indicados nas Figuras 14 (a e b), e 15 (a e b). As linhas indicam a direção da perda de sítios, mas, não indicam necessariamente a direção da evolução.

Para *HaeIII* o padrão A pode ter surgido pela perda de um sítio no padrão B (sítio H₄) originando o fragmento de 7.0 kpb. Uma outra possibilidade é a do padrão A ter se originado pela perda dos sítios H₃ e H₄ no padrão E, produzindo o mesmo fragmento de 7.0 kpb. O padrão C pode ter se originado a partir de B, pela perda de um único sítio (sítio H₁), dando origem ao fragmento de 8.0 kpb. No caso do padrão D, este apresenta variabilidade de tamanho da molécula, e por isso não pode ser explicada exclusivamente por perda e/ou ganho dos sítios H₃ e H₄ no padrão E ou no padrão B. O diagrama que representa os prováveis eventos mutacionais esta indicado na Figura 14a.

O padrão C de *HindIII* aparece relacionado com os outros três padrões: A, B e D. Os padrões A e B teriam se originado por variabilidade no comprimento da molécula, e o padrão D teria sido originado pela perda de um único sítio (sítio I₃) no padrão C, originando o fragmento de 3.8 kpb. Os dois padrões resultantes com os mesmos sítios de restrição apresentam variabilidade no comprimento da molécula. O padrão B teria sido originado pela perda de dois sítios de restrição (sítios I₄ e I₅). O padrão intermediário, isto é, a perda de um único sítio não foi observado nas populações analisadas. Estas etapas estão indicadas na Figura 14b.

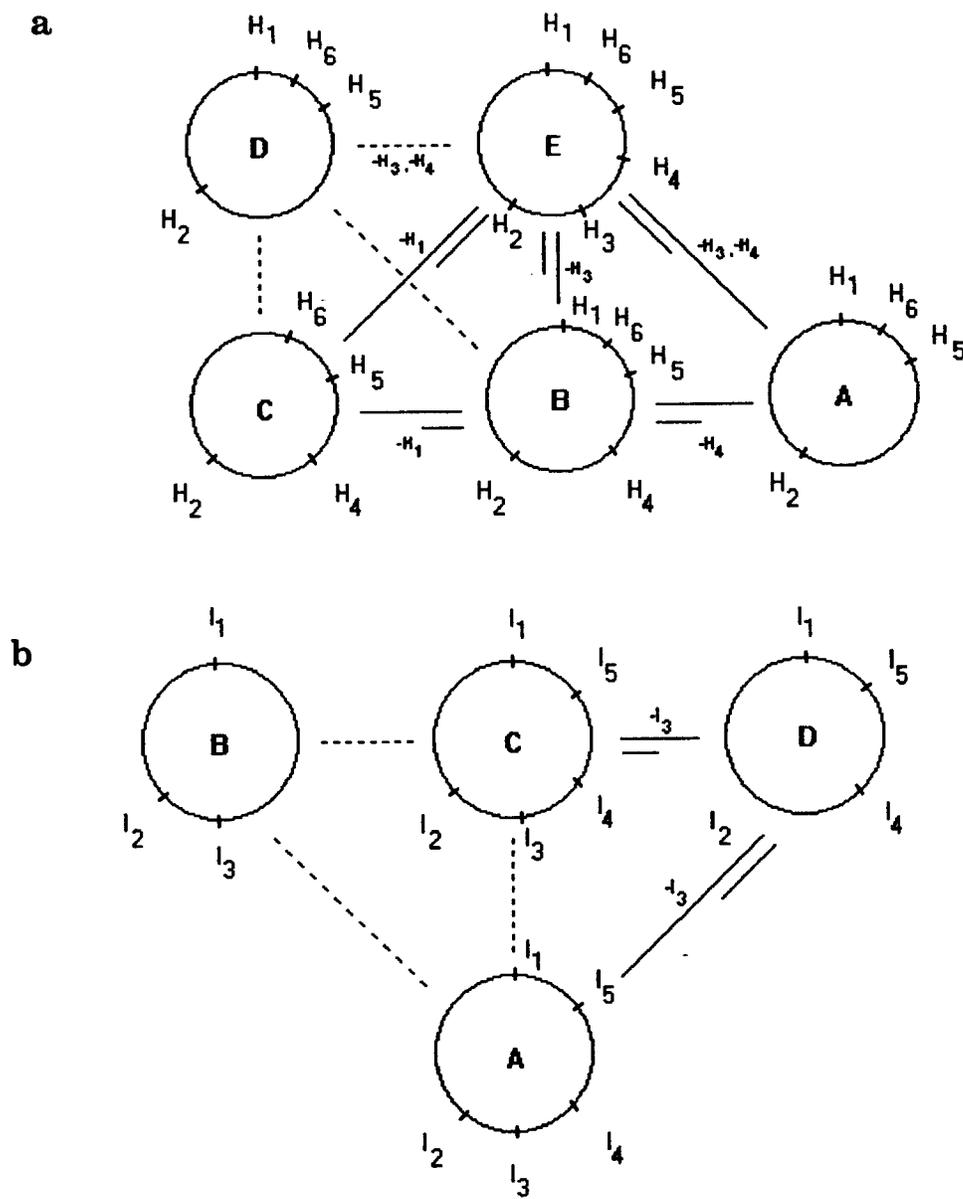


FIGURA 14. Diagrama dos padrões obtidos com as enzimas a) *Hae* III e b) *Hind* III no genoma mitocondrial de *C. hominivorax*, onde estão indicados os eventos de perda e/ou ganho de sítios. Os sítios foram marcados aleatoriamente.

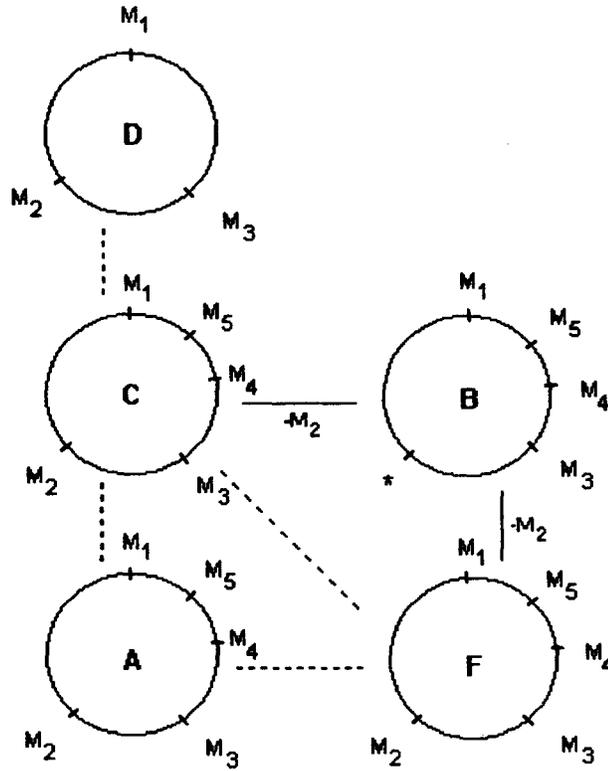
 evento de perda de sítio simples
 evento de perda e/ou ganho de mais de um sítio, ou variação de comprimento
 evento de ganho de sítio simples

Os cinco padrões observados para o DNA mitocondrial de *C.hominivorax* quando digerido com a enzima *MspI* se relacionam tanto por eventos de perda e/ou ganho de sítios de restrição (substituição de bases), quanto pela variação de tamanho da molécula (padrões C e F). No padrão B, foi verificado a perda do sítio M_2 , o qual teria sido originado pela perda deste sítio no padrão C, ou no padrão F. Os passos estão representados na Figura 15a.

Para a enzima *PvuII*, o padrão A poderia ter originado os outros dois padrões: B e D. O padrão B teria sido produzido pela perda de um único sítio (sítio P_3) originando o fragmento de 5.9 kpb, (Figura 15b). O padrão D teria surgido por eventos que produzem variação no tamanho da molécula, ou corresponde a um caso de heteroplasmia.

A análise dos diferentes padrões produzidos com cada uma das quatro enzimas, revelam um possível caso de heteroplasmia (isto é, a presença de mais de um tipo de DNAm_t em células de um mesmo indivíduo). Normalmente os indivíduos heteroplásmicos apresentam inserções e/ou deleções de pequenos segmentos de DNA. O número de cópias destas unidades repetidas, determina a variação de tamanho da molécula de DNAm_t. Utilizando a enzima *PvuII* na amostra de Caraguatatuba coletada no verão (Ca-4), foram observados 17 indivíduos apresentando o padrão D, encontrado exclusivamente nesta população e sendo muito maior (21.7 kpb) quando comparado ao tamanho estimado para o DNAm_t de *C.hominivorax* (16.3 kpb). As amostras de DNAm_t que apresentaram este padrão D para *PvuII*, não apresentaram diferenças de tamanho visíveis quando digeridas com as outras enzimas marcadoras. As possíveis causas da heteroplasmia de tamanho observada com a enzima *PvuII* serão discutidas posteriormente.

a



b

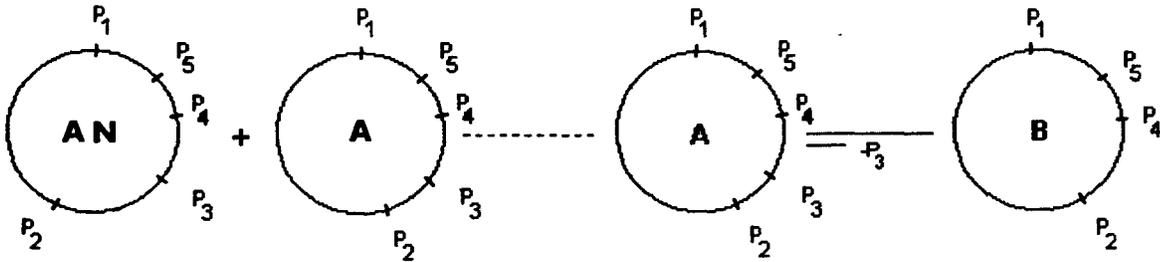


FIGURA 15. Diagrama dos padrões obtidos com as enzimas a) *Msp* I e b) *Pvu* II no genoma mitocondrial de *C. hominivorax*, onde estão indicados os eventos de perda e/ou ganho de sítios. Os sítios foram marcados aleatoriamente.

Obs. O padrão B (*) de *Msp* I apresenta mais um sítio que não foi definido por tratar-se de variabilidade de tamanho.

- evento de perda de sítio simples
- - - - - evento de perda e/ou ganho e mais de um sítio
- evento de ganho de sítio simples

AN : padrão encontrado na América do Norte (Roehrdanz, 1989).

Os padrões de restrição do DNAm_t de *C.hominivorax* obtidos para as enzimas *HaeIII*, *HindIII*, *MspI* e *PvuII*, foram combinados para produzir o haplótipo mitocondrial. Através da análise de 405 indivíduos utilizando estas enzimas nas 4 populações analisadas foram detectados 15 haplótipos mitocondriais, os quais estão indicados na tabela 4.

Nos haplótipos mitocondriais obtidos para os 405 indivíduos de *C.hominivorax*, não foram detectados os padrões : C e E de *HaeIII*, C de *HindIII* e C de *MspI*. Estes padrões foram encontrados em amostras de *C.hominivorax* provenientes de outras populações (Alfenas e Poconé) analisadas no nosso laboratório (Azeredo Espin, 1993; Azeredo Espin et al, submetido). Neste trabalho, foram considerados esses padrões, por corresponderem aos tipos intermediários entre os que foram detectados nas populações analisadas, para explicar as mudanças entre os haplótipos por perda e/ou ganho de sítio de restrição.

O haplótipo mais freqüente em todas as populações é o 2 (AABA) e foi encontrado em 44% (n=178) dos indivíduos analisados, seguido do haplótipo 1 (BAAA) encontrado em 11% (n=45) indivíduos. Os haplótipos 2 (AABA) e 11 (BABA) foram os mais amplamente distribuídos, tendo sido encontrados em todas as amostras de populações analisadas. O haplótipo 4 (ABBA) é exclusivo de Botucatu, o 3 (AABB) foi observado somente em Ca-2. Os haplótipos mitocondriais: 14 (AABD), 10 (ADBA), 15 (BAAD), 12 (BAFA) e 13 (BDBA) foram únicos para Ca-4.

A população que apresentou uma maior variabilidade no DNA mitocondrial de *C. hominivorax* foi Caraguatatuba (Ca-2 e Ca-4), com 14 haplótipos mitocondriais sendo 7 únicos para esta localidade. Em Botucatu foram encontrados 7, e em Adamantina e Amparo 3 haplótipos, tendo em comum os haplótipos 1 (AABA) e 10 (BABA).

TABELA 4: Número de indivíduos com os haplótipos mitocondriais obtidos com 4 endonucleases de restrição (*HaeIII*, *HindIII*, *MspI* e *PvuII*)¹ em *Cochliomyia hominivorax* nas populações analisadas.

Haplótipos mitocondriais	POPULAÇÕES					Total
	Ad	Amp	Bot	Ca-2	Ca-4	
1) BAAA	-	6	2	11	26	45
2) AABA	35	39	20	22	62	178
3) AABB	-	-	-	6	-	6
4) ABBA	-	-	29	-	-	29
5) AAFA	-	-	6	-	1	7
6) BADA	-	-	2	1	7	10
7) DABA	3	-	-	2	5	10
8) AADA	-	-	3	6	23	32
9) BDAA	-	-	-	2	14	16
10)ADBA	-	-	-	-	5	5
11)BABA	9	1	1	2	29	42
12)BAFA	-	-	-	-	4	4
13)BDDBA	-	-	-	-	4	4
14)AABD	-	-	-	-	8	8
15)BAAD	-	-	-	-	9	9
	47	46	63	52	197	405

1. Os haplótipos mitocondriais foram elaborados a partir dos padrões de restrição obtidos para os quatro marcadores genéticos (*Hae III*, *Hind III*, *Msp I* e *Pvu II*) da seguinte forma: a primeira letra do haplótipo mitocondrial, corresponde ao padrão apresentado por indivíduos para a enzima *Hae III*, a segunda letra para *Hind III*, terceira e quarta letras correspondem aos padrões obtidos para as enzimas *Msp I* e *Pvu II* respectivamente, sempre na mesma ordem.

Para verificar se a amostra de larvas coletadas numa mesma ferida era proveniente da postura de uma única fêmea ou devido a infestações múltiplas (oviposição de mais de uma fêmea), foram analisadas amostras de DNAm_t de pupas (uma média de 22 larvas por ferida). As larvas foram coletadas em nove feridas de animais diferentes (ao todo 9 bois) na localidade de Caraguatatuba durante o inverno, amostra que foi denominada de Ca-4. A escolha desta localidade para esta análise, foi em decorrência da maior variabilidade no DNAm_t encontrada nas diferentes amostras de Caraguatatuba (Ca-2 e Ca-4). As larvas foram coletadas no campo e mantidas no laboratório até a fase de pupa, onde foram congeladas no freezer -70°C.

Na Tabela 5 estão indicadas as frequências para os 14 haplótipos obtidos nas nove feridas analisadas em diferentes animais. Das 22 pupas analisadas por ferida, foram observados em média 5 haplótipos. Sendo o haplótipo 10 ((BABA) o mais freqüente em 8 das 9 feridas analisadas. Os haplótipos 2 (AABA), 5 (AAFA), 9 (BAAD) e 13 (BDAA) foram encontrados cada um deles, exclusivamente nas feridas III, VII, IX e V respectivamente, indicando claramente que mais de uma fêmea ovipõe numa mesma ferida.

TABELA 5: Frequência dos haplótipos mitocondriais de *Cochliomyia hominivorax* da população de Caraguatatuba (Ca-4) provenientes de diferentes feridas de gado bovino.

Haplótipo mitocondrial	FERIDAS								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
1) BAAA	0.41	0.47	-	0.03	0.07	-	-	-	0.17
2) AABA	0.29	0.42	-	0.24	-	-	0.58	0.69	0.04
3) AABB	-	-	0.27	-	-	-	-	-	-
5) AAFA	-	-	-	-	-	-	0.10	-	-
6) BADA	-	-	0.03	-	-	0.14	0.05	-	0.13
7) DABA	-	-	-	-	-	0.36	0.05	-	-
8) AADA	0.06	0.08	0.47	-	-	0.28	0.05	-	-
9) BDAA	-	-	-	-	0.87	-	-	-	-
10)ADBA	-	-	0.10	0.07	-	-	-	-	-
11)BABA	0.18	0.03	0.03	0.52	0.07	0.21	0.16	-	0.13
12)BAFA	-	-	0.07	0.07	-	-	-	-	-
13)BDDBA	0.06	-	0.03	0.03	-	-	-	-	-
14)AABD	-	-	-	-	-	-	-	0.31	0.13
15)BAAD	-	-	-	-	-	-	-	-	0.39
N=199	17	36	30	29	15	14	19	16	23

Utilizando 10 haplótipos (Tabela 6), foi construída uma matriz de presença/ausência de sítios de restrição. Estes 10 haplótipos foram escolhidos por representar exclusivamente mudanças de sítio de restrição. Os haplótipos 5, 7, 12, 14 e 15 não foram considerados na matriz por corresponder a variação de tamanho da molécula de DNAMt. Para a construção da matriz, o número total de sítios de restrição observado para cada uma das enzimas marcadoras, isto é, os que deram origem aos diferentes padrões, foram considerados.

Do total de 21 sítios polimórficos no DNAMt de *C. hominivorax* obtidos com estas 4 enzimas, 8 sítios demonstraram ser diagnósticos para detectar variabilidade do DNAMt de *C. hominivorax*.

Foi calculada a proporção de fragmentos comuns (F) e a divergência da sequência nucleotídica (δ), (Nei & Li, 1979), entre os 15 haplótipos mitocondriais de *C. hominivorax*. Na Tabela 7 são apresentados os valores obtidos, o valor de (F) variou de 0,565 até 0,921; e o valor de (δ) variou de 0.006 até 0.065.

Baseado na matriz de presença/ausência de sítios de restrição para 10 haplótipos mitocondriais e nos valores obtidos para a divergência da sequência (δ) do DNAMt de *C. hominivorax*, foi elaborado manualmente, um cladograma de parcimônia relacionando todos estes haplótipos considerando o menor número de eventos mutacionais para ocorrer a interconversão de um padrão para outro (Figura 16).

TABELA 6. Matriz de presença/ausência de sítios de restrição de 10 haplótipos mitocondriais* obtidos com as 4 endonucleases marcadoras, indicando os 8 sítios diagnósticos para detectar variabilidade no genoma mitocondrial de *C. hominivorax*.

	HaeIII		HaeIII		HaeIII		HaeIII		HaeIII		HaeIII		HaeIII		HaeIII		HaeIII		HaeIII	
	HaeIII	HindIII	MspI	PvuII	H ₄	I ₃	I ₄	I ₅	M ₂	M ₄	M ₅	P ₄	MspI	M ₄	M ₅	P ₄	MspI	M ₄	M ₅	P ₄
1)	B	A	A	A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2)	A	A	B	A	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
3)	A	A	B	B	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
4)	A	B	B	A	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
6)	B	A	D	A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
8)	A	A	D	A	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
9)	B	D	A	A	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10)	A	D	B	A	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
11)	B	A	B	A	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
13)	B	D	B	A	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1

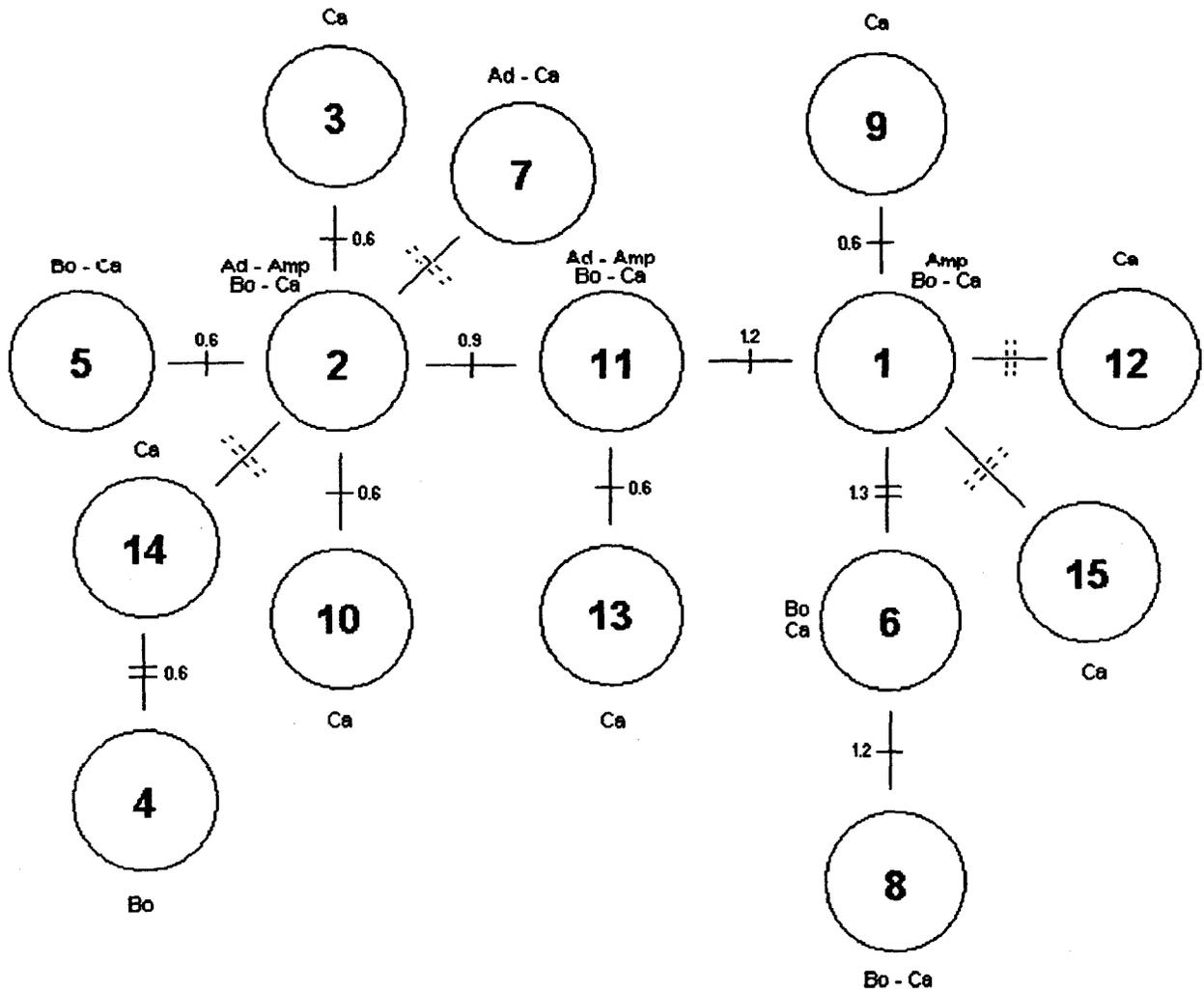
* Os haplótipos 5 (AAFA), 7 (DABA), 12 (BAFA), 14 (AABD) e 15 (BAAD) não foram considerados na matriz por corresponder a variabilidade de comprimento da molécula de DNA mitocondrial de *C. hominivorax*. As letras em negrito, indicam para cada haplótipo o padrão que representa variabilidade de tamanho.

TABELA 7. Estimativa da divergência da sequência nucleotídica (δ) e da proporção de fragmentos parilhados (F), entre 15 haplótipos mitocondriais de *Cochliomyia hominivorax**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-	0.025	0.030	0.033	0.009	0.013	0.025	0.028	0.006	0.030	0.012	-	0.018	0.034	-
2	0.815	-	0.006	0.018	0.006	0.056	-	0.037	0.030	0.006	0.009	0.025	0.015	-	0.024
3	0.736	0.921	-	0.019	0.019	0.062	0.006	0.043	0.039	0.014	0.015	0.030	0.023	0.006	0.030
4	0.615	0.888	0.794	-	0.022	0.065	0.009	0.046	0.037	0.012	0.018	0.033	0.021	0.006	0.030
5	0.921	0.944	0.809	0.777	-	0.040	0.013	0.028	0.018	0.022	0.025	0.009	0.028	0.027	0.009
6	0.888	0.676	0.597	0.565	0.735	-	0.056	0.012	0.028	0.062	0.031	0.022	0.038	0.056	0.022
7	0.815	-	0.921	0.888	0.888	0.676	-	0.037	0.030	0.006	0.009	0.025	0.015	-	0.024 δ
8	0.794	0.750	0.671	0.638	0.794	0.900	0.750	-	0.047	0.043	0.056	0.040	0.062	0.040	0.040
9	0.921	0.736	0.649	0.668	0.809	0.754	0.736	0.656	-	0.025	0.018	0.006	0.012	0.030	0.006
10	0.736	0.921	0.833	0.852	0.777	0.597	0.921	0.671	0.815	-	0.015	0.030	0.009	0.006	0.030
11	0.900	0.921	0.842	0.809	0.815	0.777	0.921	0.674	0.821	0.842	-	0.012	0.006	0.009	0.012
12	-	0.815	0.736	0.704	0.921	0.833	0.815	0.735	0.921	0.736	0.900	-	0.012	0.024	-
13	0.821	0.842	0.754	0.773	0.760	0.698	0.842	0.597	0.900	0.921	0.921	0.821	-	0.015	0.018
14	0.763	-	0.921	0.921	0.888	0.676	-	0.735	0.736	0.921	0.921	0.815	0.842	-	0.024
15	-	0.815	0.736	0.736	0.921	0.833	0.815	0.735	0.921	0.736	0.900	-	0.812	0.815	-

F

* Os valores indicados abaixo da diagonal correspondem à proporção de fragmentos em comum para cada par de haplótipos mitocondriais; os valores que estão acima da diagonal correspondem ao índice da divergência da sequência nucleotídica. Os dois valores (F e δ) foram calculados utilizando as fórmulas 21 e 8 respectivamente de Nei & Li (1979).



Ad = Adamantina
 Amp = Amparo
 Bo = Botucatu
 Ca = Caraguatatuba

FIGURA 16. Cladograma obtido a partir da matriz de presença/ausência de sítios de restrição, dos 15 haplótipos mitocondriais observados nas 4 populações de *C. hominivorax* analisadas. As linhas entre as ramificações, indicam as prováveis mudanças de sítios de restrição entre os haplótipos. As linhas segmentadas entre os haplotipos (14 e 2), (7 e 2), (15 e 1) e (12 e 1) indicam somente variabilidade de tamanho na molécula de DNAm desta espécie. O número entre cada par de haplótipos indica o valor da divergência da sequência nucleotídica (δ) Nei & Li (1979).

No cladograma estão indicadas as prováveis relações e mudanças de sítio de restrição entre os 15 haplótipos mitocondriais descritos para as populações de *Cochliomyia hominivorax* do Estado de São Paulo analisadas.

O cladograma indica que quase todos os haplótipos estão associados aos haplótipos 1 e 2. O haplótipo 2 aparece associado diretamente por somente uma mudança de sítio a outros 4 haplótipos (haplótipos 5, 3, 10 e 11), e também associado por variabilidade de tamanho aos haplótipos 7 e 14. O haplótipo 1 está relacionado por uma mudança de sítio com dois outros haplótipos (9 e 11) e por duas mudanças de sítio com o haplótipo 6. Este haplótipo está associado por variabilidade de tamanho aos haplótipos 12 e 15. O haplótipo 4 exclusivo de Botucatu aparece relacionado por 2 mudanças de sítios ao haplótipo 14 de Caraguatatuba.

V. DISCUSSÃO.

Parece ser realmente um fato que o polimorfismo mitocondrial mesmo dentro de uma mesma linhagem, é acentuadamente maior em dípteros que em outros grupos animais. Neste aspecto, os resultados obtidos neste trabalho, indicam um alto grau de polimorfismo no DNAm_t de *C.hominivorax*. Na revisão de Avise (1983), se enfatiza o fato que entre populações, é comum detectar altos graus de polimorfismos associados a diferenciação geográfica.

A detecção de polimorfismo dentro de uma população pode indicar parentesco entre as linhagens maternas. Porém, de acordo com Moritz *et al.* (1987) essas inferências sobre as linhagens maternas, devem ser aplicadas considerando-se demes isolados, devido ao fato de que a migração dos indivíduos de uma população pode criar falsas indicações de parentesco.

A utilização de DNA total de *C.hominivorax*, (obtido pelo método de extração simples), para análise individual em gel de agarose, necessita alguns cuidados especiais. O DNA obtido corresponde a uma mistura de DNA genômico, e DNA mitocondrial. Desta forma, as bandas coradas com Brometo de Etídeo e visualizadas no gel de agarose após a digestão do DNA total com endonucleases de restrição, podem não corresponder ao DNAm_t. Considerar todas as bandas obtidas nos géis corados com Brometo de Etídeo como correspondente ao DNAm_t de uma população, pode levar a uma interpretação errada da variabilidade nesta molécula. Para solucionar este problema é necessário obter DNAm_t purificado para construção de uma sonda de DNA mitocondrial, a qual servirá para detectar as bandas correspondentes somente ao DNAm_t após hibridização.

Para a purificação do DNAm_t, sabe-se que esta molécula é tecnicamente fácil de ser isolada por apresentar um alto número de cópias por célula e poder ser separada do genoma nuclear (o genoma nuclear e o genoma mitocondrial possuem diferentes coeficientes de sedimentação, o qual permite a separação destas duas moléculas em gradiente de CsCl).

A máxima pureza do DNAm_t para análise através de RFLP, é obtida utilizando gradientes de equilíbrio de CsCl. Esta purificação serve para eliminar qualquer contaminante do DNAm_t pelo DNA nuclear, RNA, proteínas e sais. Neste estudo o DNAm_t de *C.hominivorax* purificado por gradiente de CsCl foi submetido a um rebandeamento para garantir um alto grau de pureza. As amostras de DNAm_t obtidas através desta técnica apresentaram um excelente grau de pureza.

Verificamos que a utilização do DNAm_t de *C.hominivorax* obtido por clonagem, para a construção de sonda tanto radioativa quanto não radioativa, aumenta a eficiência da técnica de análise do DNAm_t por duas razões (Lansman et al, 1981); 1.-reduz o tempo requerido para obter uma quantidade de DNAm_t apropriada para marcação (aprox. 1µg), e 2.-elimina a possibilidade de artefatos de técnicas resultantes da hibridização de sequências altamente repetidas do DNA nuclear.

O fato de não ter sido possível clonar a molécula de DNAm_t inteira linearizada com as enzimas *Xba*I ou *Pst*I (aprox. 16.3 kpb) no plasmídeo pGEM-3Z (2.7 kpb), pode ser explicada como sendo devido a problemas durante a replicação das colônias contendo o plasmídeo mais o inserto. A presença de um DNA plasmidial tão grande (aprox. 19.0 kpb) deve ter causado uma desestabilização das moléculas durante o crescimento das células, sugerindo que o inserto e/ou o plasmídeo possam ter sido eliminados. Uma outra

possibilidade é a incapacidade do plasmídeo de comportar um inserto tão grande. Uma situação semelhante pode ter ocorrido com relação ao fragmento de 0.9 kpb derivado da digestão com *EcoRI* cuja clonagem não foi possível no fagemido BluescriptSK M13- (aprox. 3.0 kpb).

O tamanho do DNAm_t de *C.hominivorax* foi estimado em aproximadamente 16.3 kpb, tamanho que é característico da maioria dos metazoários incluindo insetos (Brown, 1983). Este tamanho é intermediário entre o estimado para algumas espécies de *Drosophila* que varia de 15.7 a 19.5 kpb (Fauron & Wostenholme, 1976), e difere em aproximadamente 300 pares de bases do tamanho descrito para populações de *C.hominivorax* do México e América Central, onde foi estimado em 16.0 kpb (Roehrdanz, 1989).

A técnica empregada para detectar variabilidade do DNAm_t, através de RFLP, demonstrou ser muito eficiente para obter informações sobre a natureza e a extensão das diferenças entre as sequências do DNAm_t entre as populações de *C.hominivorax* analisadas. Embora, essas informações possam não corresponder à evolução de sequências específicas, é possível estabelecer inferências em relação à estrutura de populações de *C.hominivorax*. A sensibilidade do RFLP é manifestada não somente ao nível interespecífico (De Salle et al, 1986) mas também na comparação entre indivíduos de uma mesma espécie, como verificado entre as populações geográficas de *C.hominivorax* analisadas.

A análise do DNAm_t de *C. hominivorax* utilizando esta técnica, RFLP, com 15 endonucleases, revelou 48 sítios detectáveis em gel de agarose, para 11 endonucleases que se apresentaram monomórficas e 4 endonucleases polimórficas.

Para as 4 enzimas polimórficas, isto é, as endonucleases marcadoras (*HaeIII*, *HindIII*, *MspI*, e *PvuII*), foram detectados 15 haplótipos mitocondriais nas 4 localidades estudadas (Amparo, Adamantina, Botucatu e Caraguatatuba). Estes resultados são de um modo geral semelhantes aos obtidos por Roehrdanz (1989), com relação a variabilidade do DNAm de *C.hominivorax*, onde foram obtidos 16 haplótipos mitocondriais em 30 diferentes amostras de populações provenientes da América do Norte e da América Central. Porém, foram encontradas diferenças em relação aos padrões obtidos para as endonucleases testadas em ambos os trabalhos.

Para a enzima *HaeIII*, cinco padrões foram observados nas populações do Estado de São Paulo, os quais foram denominados de: A, B, C, D e E enquanto nas populações do México e América Central foram descritos quatro padrões : A, B, C e D. Os padrões A,B e C das populações de São Paulo correspondem respectivamente aos padrões B, A e C do México e América Central analisadas por Roehrdanz (1989). Dois novos padrões (D e E), foram descritos neste estudo para populações brasileiras desta espécie.

Para a enzima *HindIII* foram descritos quatro padrões para as populações de São Paulo: A, B, C e D; e seis para as populações do México e América Central: A, B, C, D, E e F. Verificou-se que três padrões das populações de *C. hominivorax* do Estado de São Paulo (A, C e D), correspondem aos padrões (A, D e E) nas populações de *C.hominivorax* das Américas do Norte e Central. O padrão B, não foi observado para as amostras do México e América Central. Este padrão nas amostras brasileiras analisadas fornece informações importantes: a) foi um padrão observado somente em amostras de Botucatu. b) foi encontrado exclusivamente em larvas de *C. hominivorax* coletadas em feridas de ovelha,

não tendo sido observado nas amostras coletadas em bovinos dessa mesma localidade.

A presença do padrão B para a enzima *Hind*III exclusivamente em amostras de Botucatu (como a de outros haplótipos únicos em outras localidades) poderia indicar que existem diferentes linhagens maternas responsáveis pela manutenção da população nas amostras analisadas. Por outro lado, existe a hipótese (referência em Blouin et al, 1992), que algumas espécies de ectoparasitas apresentam populações caracterizadas localmente que podem começar a se endocruzar, originando desta forma, populações de parasitas diferenciadas entre espécies de hospedeiros ou entre regiões geográficas, tornando a relação hospedeiro-parasita mais específica e/ou preferencial.

A ocorrência do padrão (B) para *Hind*III em 29 indivíduos de *C.hominivorax* coletados em ovelha na localidade de Botucatu, o qual não foi observado em amostras coletadas em bovinos em nenhuma das 4 localidades, incluindo Botucatu, sugere que provavelmente pode estar havendo uma preferência de hospedeiro. Esta hipótese é corroborada por duas observações; 1.- as larvas foram coletadas em diferentes feridas em ovelhas, descartando desta forma a possibilidade de oviposição de uma única fêmea e 2.- os indivíduos provenientes de bovinos de Botucatu, apresentaram quase que na sua totalidade o haplótipo 2, que foi o mais freqüente em todas as populações analisadas neste trabalho.

Esta observação sugere que deve existir alguma vantagem evolutiva e/ou adaptativa dos indivíduos portadores de um determinado haplótipo mitocondrial, em parasitar preferencialmente um determinado hospedeiro. Esta interpretação é conflitante com a afirmação de que variantes intraespecíficos do DNAm_t são considerados seletivamente neutros (Moritz et al, 1987; Hale & Singh, 1991). A teoria da neutralidade das variações ao

nível do DNAMt, se fundamenta na extrema importância que apresentam os produtos dos genes mitocondriais, os quais são essenciais para o processo de fosforilação oxidativa. Isto implica numa restrição funcional devido à importância desses genes para a sobrevivência do organismo. Em contraste, algumas análises de substituições no DNAMt de *Drosophila*, tem se mostrado inconsistentes com a hipótese de estrita neutralidade da variabilidade no DNAMt (Clary & Wostenholme, 1985). Através da análise da dinâmica da evolução das seqüências do DNAMt de alguns mamíferos (referência em De Salle & Templeton, 1988) foi determinado que uma considerável porção da molécula de DNAMt está sob forte pressão seletiva. Desta forma, para verificar se existe alguma relação entre os genótipos mitocondriais de *C. hominivorax* e o tipo de hospedeiro, se faz necessário analisar o DNAMt de um maior número de indivíduos desta espécie coletados em diferentes hospedeiros (suínos, eqüinos, bovinos, caprinos e ovinos), de uma mesma como também de diferentes localidades.

Para a enzima *MspI* cinco padrões foram observados nas populações do estado de São Paulo: A, B, C, D e F; e cinco nas populações do México e América Central: A, B, C, D e E. Dois padrões das populações brasileiras (B e D) correspondem aos estudados por Roehrdanz (1989), (A e B). Outros três novos haplótipos foram obtidos no nosso estudo (A, C e F), os quais pelos tamanhos dos fragmentos de restrição, se apresentam altamente divergentes dos haplótipos descritos para as populações de *C. hominivorax* do México e América Central.

Em todos os padrões gerados pela digestão com a enzima *MspI*, observou-se um tamanho mitocondrial menor (aproximadamente 15.5 kpb) que o estimado para o genoma mitocondrial de *C.hominivorax* (aprox. 16.3 kpb). Este fato pode ocorrer devido à existência de vários sítios de reconhecimento da enzima situados muito próximos no genoma mitocondrial de *C.hominivorax*. Isto poderia gerar fragmentos muito pequenos não detectáveis em gel de agarose, os quais por essa razão podem não ter sido visualizados e/ou perdidos.

Para a enzima *PvuII* neste trabalho foram descritos três padrões: A, B e "D", sendo que nenhum deles corresponde aos padrões descritos para populações do México e da América Central: A e B.

No trabalho de Roehrdanz (1989), também foi verificado polimorfismo no DNAm_t com as enzimas *SstI*, *EcoRV* e *Sau96I*, enzimas que foram testadas no nosso estudo e que se apresentaram monomórficas para as populações do Estado de São Paulo analisadas. O haplótipo "D" de *PvuII* nas populações de Caraguatatuba, apresenta um tamanho muito maior (aprox. 21.7 kpb) do que o tamanho estimado para o DNAm_t (16.3 kpb), o que sugere a existência de dois tipos de DNAm_t no mesmo indivíduo. Esta variação de tamanho que foi observada em 17 indivíduos, unicamente em amostras de Caraguatatuba, provavelmente deve ter se originado por heteroplasmia de tamanho. A heteroplasmia como foi descrito no item I Introdução deste trabalho, corresponde a linhagens de células que possuem dois tipos de DNAm_t, o tipo original materno e uma outra variante.

Nos estudos de Roehrdanz (1989) em *C.hominivorax* não foram observadas variações de tamanho maiores que 0.5 kpb. Roehrdanz não atribui os resultados obtidos à heteroplasma de tamanho, mesmo sendo esta, a forma mais comum de heteroplasma, isto é, a que envolve várias centenas de pares de bases, (Bermingham *et al.* 1986).

No trabalho de Roehrdanz (1989), para a análise do DNAMt foram utilizados grupos de larvas coletados em feridas individuais, como representando a postura de uma única fêmea. Porém, baseado nos resultados obtidos através da análise do DNAMt individual de larvas coletadas em nove feridas de animais diferentes (22 indivíduos por ferida, na amostra Ca-4, ver Tabela 5), foi verificado que mais de uma fêmea com haplótipos mitocondriais diferentes, frequentemente pode ovipor numa mesma ferida. Desta forma, a análise do DNAMt empregando mais de um indivíduo, mesmo proveniente de uma mesma ferida interfere e impede a detecção de heteroplasma.

Como no nosso trabalho, todas as extrações do DNAMt foram individuais, tem-se uma forte evidência de que a variação de tamanho observada seja devida a heteroplasma do DNAMt desta espécie.

A variação de tamanho na molécula de DNAMt muitas vezes é mais fácil de se detectar que a substituição de bases, por ser evidente para alguns padrões de restrição no gel de agarose, onde a probabilidade de detectar uma simples mudança de sítio é menor.

Para explicar a grande diferença de tamanho no DNAMt de *C.hominivorax*, duas hipóteses podem ser sugeridas: 1) devido a duplicação de algum fragmento repetido na região A+T. Este fato tem sido demonstrado ocorrer em algumas espécies de *Drosophila* (Solignac *et al.* 1983; Bermingham *et al.* 1986; Hale *et al.* 1986) e em três espécies de coleópteros do

gênero *Pissodes* (Boyce *et al.* 1989); 2) devido a herança biparental no DNAm. Esta segunda hipótese, é reforçada pelo fato de que, o padrão dos indivíduos heteroplásmicos ("D"), correspondem a dois dos padrões observados individualmente em duas populações: padrão A, observado em Caraguatatuba e o outro, observado somente em amostras da América do Norte (Roehrdanz, 1989). Embora, estes dados sejam preliminares, parece mais provável que a causa da heteroplasmia observada seja decorrente desta segunda hipótese.

Para analisar a relação entre cada um dos padrões obtidos com as 4 enzimas de restrição marcadoras, foram estabelecidos os eventos de ganho e/ou perda de sítio de restrição entre eles. Foi utilizado o critério de parcimônia onde se considera o menor número de mudanças possíveis entre um padrão e outro, dando prioridade as perdas de sítio já que, segundo Templeton (1983), os eventos de perda de sítio de restrição são mais prováveis de acontecer durante a evolução que os eventos de ganho de sítio.

Cada sítio de reconhecimento de uma determinada enzima, pode ser considerada como um caráter tendo dois estágios, presença e/ou ausência de um determinado padrão (Harrison, 1989), fornecendo dados apropriados para se estabelecer relações filogenéticas. Baseado nos sítios de restrição variáveis obtidos para cada haplótipo mitocondrial, foi possível construir uma matriz de presença/ausência de sítio de restrição para todos os sítios representativos das endonucleases testadas.

Dos 8 sítios indicadores da variabilidade para as 4 endonucleases empregadas neste estudo, verifica-se a ocorrência de mutação em alguns deles. Sítios que estão presentes em quase a totalidade dos haplótipos mitocondriais, e ausentes em um único haplótipo mitocondrial, poderiam ter sido originados por alguma mutação, produzindo perda e/ou

ganho de sítios de restrição.

Um outro processo observado freqüentemente no genoma mitocondrial animal (Avice et al, 1987), é a homoplasia, onde um determinado sítio parece ligar ("on") e desligar ("off") repetidamente durante a evolução. Homoplasia, para alguns sítios de restrição revelados com a enzima *HaeIII* (Roerhdanz, 1989), foi observada em populações de *C.hominivorax* do México e América Central. Nas populações brasileiras analisadas neste trabalho, não foi detectada homoplasia, para *HaeIII* e/ou as demais enzimas que produziram padrões de restrição diferentes.

A homoplasia no DNAm_t é atribuída a substituição de bases recorrente em alguns sítios, principalmente transições (A-G, T-C), (Aquadro & Greenberg, 1983). Este tipo de substituição parece diferir em *Drosophila* (Clary & Wostenholme, 1985) na qual a taxa de transversões (principalmente A-T) é maior ou igual à taxa de transições.

Observou-se elevada taxa de substituições de bases no DNAm_t nas populações de *C.hominivorax* analisadas, baseado nos diferentes padrões de restrição obtidos via RFLP. Segundo Brown (1983), ela poderia ser também explicada por alguma deficiência nos sistemas de reparo, principalmente na atividade de "revisão editorial" da DNA polimerase, que tem como função duplicar o DNA mitocondrial. Este sistema de reparo, quando está funcionando normalmente, elimina principalmente transições, as quais termodinamicamente são mais prováveis de acontecer durante a replicação (De Salle et al, 1987). Assim, estas deficiências no sistema de reparo, poderiam explicar a maior taxa de mutação no DNAm_t em relação ao DNA nuclear em várias espécies de animais (Moritz et al, 1987).

As mudanças evolutivas nos sítios de restrição podem ser inferidas a partir dos diferentes padrões obtidos e juntamente com a construção de um cladograma, pode-se traçar a provável sequência de interconversão dos diferentes haplótipos mitocondriais, Figuras 14 (a, b) e 15 (a, b).

Por vários critérios, o haplótipo mitocondrial 2 (AABA) é um provável candidato para ser o haplótipo ancestral dentro das populações de *C. hominivorax* analisadas do Estado de São Paulo, pelas seguintes razões; a) É o haplótipo mais frequente, ocorrendo em 44% do total das populações analisadas; b) É o haplótipo que apresenta uma maior distribuição geográfica, aparecendo em todas as localidades (Amparo, Adamantina, Botucatu e Caraguatatuba) e c) Devido a sua posição central no cladograma, este haplótipo se relaciona diretamente por apenas uma mudança de sítio, a 4 outros haplótipos mitocondriais obtidos para *C. hominivorax* (Figura 16).

Esta interpretação parece ser a mais provável, uma vez que, o segundo haplótipo mais freqüente foi observado em apenas 11% do total das populações amostradas. Este haplótipo difere do mais freqüente (haplótipo 2), por duas mudanças de sítio de restrição (sítio H₄ para *HaeIII* e sítio M₂ para *MspI*).

Baseado na distribuição dos haplótipos nas populações analisadas, foi verificado que os haplótipos 2 e 11 ocorrem em todas as localidades, seguido do haplótipo 1 que somente não ocorre em Adamantina. Dentre os haplótipos observados, 9 foram únicos para uma determinada localidade [haplótipo 4 (ABBA) em Botucatu e haplótipos 3 (AABB), 9 (BDAA), 10 (ADBA), 12 (BAFA), 13 (BDDBA), 14 (AABD) e 15 (BAAD) em Caraguatatuba]. Nas localidades onde ocorre mais de um haplótipo, sempre um é o mais

freqüente (AABA= Ad, Amp e Ca e ABBA = Bo), sugerindo que estes haplótipos estejam se fixando e/ou correspondam a haplótipos das populações locais.

Entretanto na localidade de Caraguatatuba, foi observada uma alta variabilidade e heterogeneidade de haplótipos entre as amostras coletadas durante o verão (13 haplótipos) e outono (8 haplótipos).

O grande número de haplótipos e a heterogeneidade na distribuição dos mesmos observados nesta localidade, nos leva as seguintes interpretações; a) diferentes linhagens maternas estão contribuindo para a manutenção da população local; b) redução da população devido a disponibilidade de hospedeiro e/ou mudanças climáticas entre o outono e o verão; c) migração de moscas, via vôo, de uma localidade para outra e/ou migração "passiva" via transporte de animais com miíase de uma região para outra.

Foi verificado através da análise de 225 indivíduos, que a freqüência dos 14 haplótipos observados em Caraguatatuba variam, sendo três, 1 (BAAA), 2 (AABA) e 11 (BABA), os mais freqüentes. Além disso, nove destes 14 haplótipos foram observados em mais do que uma localidade e apareceram apenas em poucos indivíduos, em Caraguatatuba. Estes resultados sugerem que, o alto polimorfismo observado deve corresponder a migração ou introdução de fêmeas de outras localidades para Caraguatatuba.

Associado a esta interpretação, está o fato de que as coletas em Caraguatatuba foram realizadas em uma fazenda de criação e engorda, que apresenta um grande fluxo de gado especialmente durante determinadas épocas do ano (entre verão e outono) para engorda e posterior comercialização. Segundo registros da Fazenda Serramar, onde foram obtidas as amostras de *C. hominivorax*, esta comercialização envolve animais (gado vacum),

provenientes de fazendas localizadas na região Centro-Oeste e Sudeste do Brasil.

Esta situação pode possivelmente ser a causa de introduções periódicas de fêmeas com diferentes haplótipos mitocondriais oriundas de outras localidades e regiões do Brasil, como é sugerido por Azeredo Espin (1993), e Azeredo Espin *et al.*, (submetido para publicação). Uma vez que, em ambas as amostras coletadas nesta localidade (Ca-2 e Ca-4) apresentam como haplótipos predominantes o 1 (BAAA) e o 2 (AABA), pode-se sugerir que estes sejam os representantes da população local. Segundo Krafur *et al.* (1979), a distribuição de *C. hominivorax* é altamente agregada e segue uma distribuição localizada quando há disponibilidade de hospedeiro e condições climáticas favoráveis. No entanto, a interferência humana na comercialização de animais domésticos, contribui para que *C. hominivorax* seja considerada uma espécie colonizadora. Evidências experimentais demonstram a capacidade migratória de *C. hominivorax* especialmente de fêmeas adultas, porém somente em pequenas distâncias, especialmente associado à escassez de hospedeiro e condições climáticas adversas.

Para explicar a alta variabilidade no DNAm de *C. hominivorax* em Caraguatatuba, os resultados indicam que, a interpretação mais provável é a de migração via transporte de animais infestados de outras regiões do Brasil para esta localidade, especialmente em determinadas épocas do ano. Os resultados obtidos anteriormente (Azeredo Espin, 1987) através da análise morfométrica em duas amostras de Caraguatatuba indicaram similaridade com populações de outras localidades do Estado de São Paulo e região Centro-Oeste (Mato Grosso), mas puderam ser discriminadas de populações de outras regiões do Sudeste, como também do Nordeste e Sul do Brasil. Porém, somente uma análise mais detalhada,

envolvendo um maior número de amostras e o estabelecimento de transectos inter regiões, além da análise de outros parâmetros biológicos, poderá elucidar melhor esta interpretação.

Em contraste com a alta variabilidade verificada em Caraguatatuba, as amostras de Adamantina e Amparo apresentaram apenas 3 haplótipos cada uma, sendo o haplótipo 2 (AABA) o mais freqüente em ambas as populações de *C. hominivorax*, o que sugere que este seja o haplótipo local em ambas as populações.

Exceto para Botucatu, os haplótipos únicos observados em Amparo e Adamantina ocorrem também em Caraguatatuba.

Dentro das 5 categorias teóricas para filogenias intraespecíficas descritas na revisão de Avise *et al.* (1987), associando-se o grau de divergência dos genótipos mitocondriais entre diferentes populações, nós sugerimos que as populações de *C. hominivorax* analisadas neste trabalho, exceto para a localidade de Caraguatatuba, estejam incluídas na IV categoria. Nessa categoria, os indivíduos apresentam um padrão de divergência genética com uma ampla distribuição geográfica, isto é, os haplótipos mitocondriais parecem não estar geograficamente localizados devido a uma interação recente através de ausência de barreiras geográficas interlocalidades. Porém, a população de Caraguatatuba poderia estar incluída em outra categoria, denominada categoria II (descontinuidade genética no DNAm não associada com separação geográfica). Roerhdanz (1989), inclui nesta mesma categoria as populações de *C. hominivorax* que foram analisadas na América do Norte, especialmente a coleção de Chetumal no México. Esta categoria, segundo Avise *et al.* (1987), pode ocorrer quando há um contato entre populações de localidades e haplótipos diferentes. Para a localidade de Caraguatatuba, esta interpretação parece ser mais provável do que a possibilidade de uma

grande divergência de uma população local.

Os valores obtidos no número de substituições nucleotídicas por sítio (δ), o qual é uma estimativa da diversidade da sequência (δ) do genoma mitocondrial de *C.hominivorax*, indicaram valores mais altos que os obtidos para populações desta espécie provenientes do México e América Central (Roehrdanz & Johnson, 1988). Nestas duas localidades o (δ) variou de 0.001 a 0.027, com uma média de $\delta=0.011$. Porém, para as populações analisadas neste estudo o valor de δ , variou de 0.006 até 0.065 com um valor médio de 0.024 .

Os valores obtidos para F nestas populações variaram de 0.690 a 0.980, com um valor médio de $F = 0.870$, enquanto que para as populações brasileiras, variou de 0.565 a 0.921, com um valor médio de $F = 0.809$. Estes dados divergentes, sugerem uma possível subdivisão das populações de *C.hominivorax* analisadas ao longo de sua ampla distribuição geográfica. Neste aspecto, é importante destacar que as análises do DNAm da população de *C.hominivorax* que foi introduzida na Líbia, não revelou novos padrões mitocondriais para as enzimas testadas com relação aos observados nas populações, até o momento analisadas no Brasil, México e América Central. Entretanto, um novo haplótipo mitocondrial foi descrito para esta população, e que não corresponde a nenhum dos que foram observados nas populações brasileiras analisadas e também nas da América Central e México. Esta observação sugere que a origem da amostra de *C.hominivorax* que foi introduzida na Líbia, permanece ainda desconhecida.

Os dois haplótipos mais comuns observados em todas as localidades analisadas (genótipos 1 e 2), apresentam um valor de divergência de sequência de $\delta = 0.025$. O terceiro haplótipo mais freqüente 11(BABA) difere desses dois (1 e 2) em $\delta = 0.012$ e $\delta =$

0.009 respectivamente e por uma (1) mudança de sítio de restrição de cada um desses haplótipos mitocondriais. Estes resultados nos permite interpretar a estrutura do cladograma obtido a partir da matriz de presença/ausência de sítio de restrição. Através desta análise, é possível inferir a origem do haplótipo 11 a partir do haplótipo 2, e sugerir que os haplótipos 1 e 2 correspondem a duas linhagens maternas diferentes que contribuíram para originar estas populações de *C.hominivorax*.

O maior número de substituições nucleotídicas $\delta = 0.065$, foi observada entre os haplótipos 13 (BDDBA) e 8 (AADA). O alto valor obtido para δ foi devido a grande divergência entre os padrões das enzimas *HaeIII* (B e A), *HindIII* (D e A) e *MspI* (B e D).

A matriz de presença/ausência de sítio de restrição, revelou que dois pares de haplótipos [4 (ABBA) e 14 (AABD)] e os haplótipos [6 (BADA) e 1 (BAAA)], se relacionam entre si por duas mudanças de sítio de restrição, apresentando valores para a divergência da seqüência de $\delta = 0.013$ e $\delta = 0.006$ respectivamente. Estes valores e as localidades onde foram encontrados (Caraguatatuba e Botucatu), sugere que devem existir haplótipos intermediários entre estes e que não foram detectados nas amostras analisadas.

Os resultados da diversidade de seqüência nucleotídica obtidos neste trabalho, se enquadram aos valores estimados para diferenciação intraespecífica de seqüência em outras espécies de animais, localizando-se em um intervalo de $\delta = 0.004$ (0.4%) até $\delta = 0.04$ (4%) (ref. em Roerhdanz & Johnson, 1988). Valores acima de $\delta = 4\%$, foram obtidos para algumas espécies de dípteros: *Drosophila sp* $\delta = 4.9\%$ (De Salle *et al.* 1986), *Glossina morsitans* $\delta = 11.1\%$ (Trick & Dover, 1984).

O valor da divergência de sequência nucleotídica ($\delta = 2.4\%$) obtido para as populações de *C.hominivorax* do Estado de São Paulo analisadas, tem importantes implicações para a genética de populações desta espécie. Na literatura, a maioria dos exemplos sobre alta variabilidade intraespecífica do DNAm estão associados com diferenças entre biótipos, raças ou subespécies (Chapco *et al.* 1992). Por exemplo em *Drosophila simulans* o valor de $\delta = 1.97\%$ é atribuído a diferenças entre três raças citoplasmáticas isoladas espacialmente (Baba-Aïsa *et al.* 1988).

Em *C. hominivorax* o valor da divergência da sequência nucleotídica $\delta = 2.5\%$ entre populações da Ilha de Jamaica e populações continentais (México e Estados Unidos) indica que, estas populações começaram sua divergência a pelo menos 1 milhão de anos atrás. Em contraste, as populações continentais apresentam uma baixa variabilidade ($\delta = 1.1\%$) atribuída a um provável afunilamento da população (Roehrdanz & Johnson, 1988). Os autores sugerem neste trabalho que, uma vez que *C. hominivorax* é encontrada nas áreas tropicais e sub-tropicais da América Central e da América do Sul, é provável que a população de *C.hominivorax* da Jamaica, tenha sido colonizada por moscas provenientes da América do Sul, e que provavelmente estas populações estejam mais estreitamente relacionadas.

Comparando-se os padrões de restrição obtidos para as amostras da Jamaica com os das populações brasileiras, foi verificado o mesmo padrão para 3 enzimas; *HaeIII* (padrão B), *HindIII* (padrão D) e *MspI* (padrãoB) além dos mesmos padrões para as enzimas que não foram variáveis; *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *SstI*, *XbaI*, *XhoI* e *Sau96I*.

Embora o haplótipo BDB, não tenha sido observado nas populações brasileiras que foram analisadas até o momento, a detecção destes padrões indicam que a provável origem das populações da Jamaica, seja de alguma região da América do Sul. Somente uma amostragem de um maior número de populações envolvendo inclusive amostras de outros países da América do Sul, poderá elucidar esta interpretação.

Em *C.hominivorax*, como em *Drosophila melanogaster*, em contraste com a alta capacidade de dispersão quer natural ou através de seus hospedeiros, a análise conduzida neste trabalho demonstrou uma divergência de sequência nucleotídica média de $\delta = 0.024$, indicando que algumas das populações analisadas são diferenciadas para variantes do DNAm. O cladograma obtido sugere que as populações de *C.hominivorax* analisadas se originaram de uma única linhagem evolutiva (haplótipo 2). No entanto, a alta variabilidade no DNAm, como demonstrada pela distribuição e ocorrência de um grande número de haplótipos, nos leva a interpretar que nessa espécie, existem diferentes linhagens maternas responsáveis pela manutenção de populações locais. Estes resultados indicam ainda que, populações de *C. hominivorax* apresentam-se subdivididas geograficamente em decorrência de um reduzido fluxo gênico interpopulações. Essa interpretação é mais evidente quando se compara os haplótipos obtidos para as populações de *C. hominivorax* amostradas da América do Norte, América Central, Líbia e Brasil. A abordagem utilizada neste trabalho, envolvendo a análise do DNAm com endonucleases de restrição, demonstrou ser muito eficiente para a obtenção de marcadores genéticos, a nível molecular, capazes de caracterizar a variabilidade genética, como também eventos evolutivos recentes tais como introduções e fluxo gênico interpopulações desta importante praga da pecuária.

VI. CONCLUSÕES

1. Nos testes empregando as diferentes fases do desenvolvimento de *Cochliomyia hominivorax* para a análise do DNAm, foi verificado que a melhor fase para realizar extrações do DNAm é a fase de pupa.
2. Nos experimentos de clonagem, verificou-se que a utilização do vetor pGEM3Z foi mais eficiente para a clonagem do DNA mitocondrial de *Cochliomyia hominivorax* do que o vetor Bluescript SK (M13-).
3. A clonagem do DNAm no vetor pGEM3Z permitiu a otimização da produção de sondas a serem empregadas nos testes de hibridização. Esta clonagem possibilitou a construção de um banco genômico para posterior análise de genes específicos do genoma mitocondrial.
4. Dentre as 15 endonucleases de restrição utilizadas para a análise do DNAm em quatro populações de *C. hominivorax* amostradas do Estado de São Paulo, foi verificado que quatro (*HaeIII*, *HindIII*, *MspI* e *PvuII*) foram marcadoras para detectar variabilidade. Baseado nos padrões de restrição obtidos para estas enzimas, foram caracterizados 15 haplótipos mitocondriais. Este método demonstrou ser muito eficiente para a obtenção de marcadores genéticos para caracterizar eventos evolutivos recentes tais como, introduções e fluxo gênico interpopulações desta espécie.

5. A grande variabilidade do DNAm_t de *C.hominivorax* apresentada nas amostras de Caraguatatuba em relação as outras três amostras, é muito provável ser devido a constante introdução de gado infestado de outras regiões do país para esta localidade.

6. O cladograma utilizando o critério de parcimônia, indicou que os 15 haplótipos mitocondriais estão associados por eventos de perdas e/ou ganhos de sítios de restrição. Baseado no cladograma obtido, o haplótipo 2 (AABA) é o provável candidato a haplótipo ancestral entre as populações de *C. hominivorax* analisadas devido a sua ampla distribuição, alta frequência e ocupar uma posição central relacionando-se a seis outros haplótipos mitocondriais.

7. O cladograma obtido sugere que as populações de *C. hominivorax* analisadas se originaram de uma única linhagem evolutiva e que, devido a um reduzido fluxo gênico, como demonstrado pela distribuição e ocorrência de um grande número de haplótipos, apresentam subdivisão geográfica. Esta interpretação é ainda mais evidente quando se compara os resultados obtidos para o DNAm_t de populações desta espécie da América do Norte, Central e as amostras brasileiras analisadas neste trabalho.

8. Entre os 15 haplótipos mitocondriais, os valores obtidos para divergência de sequência de nucleotídeos (δ) variou de 0.006 a 0.065 e a proporção de fragmentos comuns (F) variou de 0.565 a 0.921. Estes valores foram diferentes dos obtidos para populações de *C. hominivorax* da América do Norte e América Central (δ = 0.001 - 0.027 e F= 0.690 - 0.980).

9. Entre os 15 haplótipos mitocondriais, os valores obtidos para divergência de sequência de nucleotídeos (δ) variou de 0.006 a 0.065 e a proporção de fragmentos comuns (F) variou de 0.565 a 0.921. Estes valores foram diferentes dos obtidos para populações de *C. hominivorax* da América do Norte e América Central ($\delta = 0.001 - 0.027$ e $F = 0.690 - 0.980$).

10. A ocorrência de heteroplasmia para o DNAMt, foi detectada em alguns indivíduos da população de Caraguatatuba (padrão "D" de *PvuII*). A causa provável da heteroplasmia parece ser devido a adição ou deleção de pequenos fragmentos. Porém, para confirmar esta interpretação, análises envolvendo mapeamento e sequenciamento do DNAMt necessitam ser conduzidas.

11. Baseado na similaridade dos padrões obtidos para as enzimas testadas em *C. hominivorax* da Ilha da Jamaica e das populações brasileiras analisadas, sugere-se que a provável origem da população desta ilha, seja de alguma região da América do Sul.

12. Ao lado da capacidade de dispersão de *C. hominivorax* quer natural ou através de seus hospedeiros, a análise conduzida neste trabalho tem demonstrado que, algumas das populações analisadas, podem ser diferenciadas para variantes do DNAMt.

13. Os resultados obtidos demonstraram que, a análise do DNAMt com endonucleases de restrição, é um método eficiente para obtenção de marcadores genéticos, a nível molecular, para caracterização da variabilidade e estrutura genética de populações desta importante praga da pecuária.

RESUMO.

Cochliomyia hominivorax (Coquerel, 1858), (Diptera:Calliphoridae), conhecida pelo nome de "mosca da bicheira", é considerada no Brasil, uma das principais moscas causadoras de miíases em vertebrados vivos silvestres e especialmente domésticos. Esta espécie é um ectoparasita de grande importância econômica, pelos graves prejuízos que causa à pecuária.

Apresenta uma ampla distribuição geográfica na região Neotropical, sendo que recentemente (1988), foi registrada pela primeira vez na África do Norte (Líbia).

Por ser uma espécie praga com alta capacidade adaptativa, manifestada pela:- grande número de hospedeiros;- ampla distribuição geográfica;- habilidade em se adaptar a novos ambientes, uma das questões importantes a ser analisada, é a extensão da variabilidade genética em populações naturais.

Ao nível molecular, estudos em vários grupos animais tem demonstrado que a análise do DNA mitocondrial com endonucleases de restrição é um método eficiente para se obter marcadores genéticos, e informações sobre estrutura genética de populações, devido a características tais como: herança predominantemente materna, ausência de recombinação e alta taxa de mutação em determinadas regiões da molécula.

Neste trabalho, a análise da variabilidade genética do DNA mitocondrial com endonucleases de restrição foi conduzida em quatro amostras de populações de *C. hominivorax* do Estado de São Paulo, com o objetivo de analisar a variabilidade genética inter e intra populações.

Através da análise do DNAmt com 15 endonucleases de restrição em 405 indivíduos foi verificado que quatro endonucleases de restrição (*HaeIII*, *HindIII*, *MspI* e *PvuII*) foram

eficiência com o vetor pGM3Z.

Através da análise do DNAm_t com 15 endonucleases de restrição em 405 indivíduos foi verificado que quatro endonucleases de restrição (*Hae*III, *Hind*III, *Msp*I e *Pvu*II) foram marcadoras para detectar a variabilidade no DNAm_t nas amostras de populações analisadas neste trabalho. A ocorrência de heteroplasmia para o DNAm_t, foi detectada apenas em amostras da população de Caraguatatuba, sendo a causa atribuída a uma provável adição ou deleção. O cálculo da sequência de divergência nucleotídica entre os haplótipos (δ), variou em um intervalo de $\delta=0.006$ a $\delta= 0.065$, tendo sido obtido um valor médio de $\delta=0.024$, indicando que algumas das populações analisadas são diferenciadas para variantes do DNAm_t.

O cladograma obtido, sugere que as populações de *C. hominivorax* analisadas se originaram de uma única linhagem evolutiva (haplótipo 2). Porém, a alta variabilidade no DNAm_t, como demonstrada pela distribuição e ocorrência de um grande número de haplótipos, nos leva a interpretar que, nesta espécie, existem também diferentes linhagens maternas responsáveis pela manutenção de populações locais. Estes resultados sugerem ainda que, algumas das populações desta espécie estão relacionadas por um reduzido fluxo gênico, provavelmente por isolamento pela distância, porém, com alguma dispersão via hospedeiro. Essa interpretação é mais evidente quando se compara os resultados obtidos para as populações de *C. hominivorax* das Américas, Central e do Norte, Líbia e Brasil.

Os resultados obtidos neste trabalho, forneceram importantes dados complementares aos já existentes sobre a biologia de *C. hominivorax* e além disso, abriram novas perspectivas de estudo desta importante praga da pecuária.

SUMMARY

The primary screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), causes invasive myiasis in warm blood vertebrates, particularly livestock, in South, Central and North America. Human myiasis has been extensively reported in South America.

The historical geographic distribution of *C. hominivorax* in the New World extends from Southern U.S to Argentina. The present continental distribution of this fly is entirely Neotropical because of the eradication from the Nearctic region. Recently, screwworm flies from the New World was recorded outside the American continent for the first time infesting wounds in livestock animals in Lybia (North Africa).

In Brazil, the screwworm fly is one of the most devastating insect pest as it infest open wound of man and warm blooded vertebrates, causing severe myiasis, and great profit losses for cattle breeders.

The basic knowledge of the genetic variability and evolution within a species is a necessary information to understand the structure and evolution of populations. In the case of insect populations, a genetic marker that is ideally suited to address these and related issues is mitochondrial DNA (mtDNA). Owing to features such as almost strictly maternal mode of inheritance, non recombinational transmission and rapid rate of sequence evolution, is the molecule of choice both, for studies of intraspecific sequence divergence and for constructing gene trees within and among species.

In this study, the restriction site analysis of mitochondrial DNA and the estimate nucleotide sequence divergence in mtDNA of four geographic populations of *C. hominivorax* from São Paulo State (Brazil), is presented to examine the genetic variability and to provide

a basis to understand the population structure of *C. hominivorax*.

The survey revealed that four (*HaeIII*, *HindIII*, *MspI* and *PvuII*) out of fifteen enzymes used were suitable to detect mtDNA variation among all populations. Based on the fragment patterns obtained for these four enzyme, a total of fifteen haplotypes in combination were detected among the 405 individuals representing four locations.

Estimates of mtDNA sequence divergence (δ) between haplotypes ranged from $\delta = 0.006$ to 0.065 (with an average of $\delta = 0.024$) suggest local differentiation of mtDNA in some populations. A cladistic analysis of the geographical distribution among the observed haplotypes suggest that the sampled populations belongs to a single evolutionary lineage with populations interconnected by reduced gene flow.

Taken as a whole, in spite of the dispersal capacity of *C. hominivorax* and the movement of livestock among regions, the analysis conducted in Brazil, North and Central Americas demonstrated that this species are structured with respect to mtDNA variation at a geographic level.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Afonso, J.M; Volz, A; Hernandez, M; Ruttkay, H; Gonzalez, M; Larruga, J.M; Cabrera, V.M. & Sperlich, D. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in old world populations of *Drosophila suboscuro*. Mol. Biol. Evol. 7(2): 123-142, 1990.
- Anderson, S; Bankier, A.T; Barrel, B.G; de Bruijn, M.H.L; Coulson, A.R; Drouin, J; Eperon, I.C; Nierlich, D.P; Roe, B.A; Sanger, F; Schreier, P.H; Smith, A.J.H; Staden, R; & Young, I.C. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 290: 457-465, 1981.
- Anderson, S; de Bruijn, M.H.L; Coulson, A.R; Eperon, I.C; Sanger, F. & Young, I.C. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA, conserved features of the mammalian mitochondrial genome. J. Mol. Biol. 156: 683-717, 1982.
- Aquadro, C.F. & Avise, J.C. An assesment of "hidden" heterogeneity within electromorphs at three enzyme loci in deer mice. Genetics. 102: 269-284, 1982.
- Aquadro, C.F. & Greenberg, B.D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequence from seven individuals. Genetics. 103: 287-312, 1983.
- Arias, M.C; Soares, A.E.E. & Nobrega, F.G. Improvements to the mitochondrial restriction maps for Italian and Africanized honey bees. Brazil. J. Genetics. 13: 5501-507, 1990.
- Avise, J.C. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetics findings on mitochondrial DNA. Ann. Rev. Genet. 25: 45-69, 1991.
- Avise, J.C; Arnold, J; Martin Ball, R; Bermingham, E; Lamb, T; Neigel, J.E; Reeb, C.A. & Saunders, N.C. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 489-522, 1987.
- Avise, J.C; Bermingham, E; Kessler, L.G. & Saunders, N.C. Characterization of mitochondrial DNA variability in a hibrid swarm between subspecies of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. Evolution. 38(5): 931-941, 1984.
- Avise, J.C. & Lansman, R.A. Polimorphysm of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In: Evolution of genes and proteins. Edited by M. Nei & R.K. Koehn. pp: 147-164, 1983.
- Avise, J.C; Smith, M.M. & Selander R.K. Biochemical polimorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. VII geographic differentiation in members of the *truei* and *maniculatus* species groups. J. mammal. 60: 177-192, 1979.

- Azeredo Espin, A.M.L. Análise Cariotípica, Morfométrica e de Compatibilidade Sexual, Em Linhagens Brasileiras de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae). Tese de Doutorado, Universidade de Campinas, 149p, 1987.
- Azeredo Espin, A.M.L. Análise do DNA mitocondrial de populações brasileiras de *C.hominivorax*. Supplement, S.B.G. 15 : 504. 1991.
- Azeredo Espin, A.M.L. Genetic variation in mitochondrial DNA of geographic populations of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae). Ann. Entom. Soc. Am. 5 : 155-156, 1992.
- Azeredo Espin, A.M.L; Infante, M.E. & Matioli, S.R. Mitochondrial DNA variation in populations of screwworm fly, *C. hominivorax* (Diptera:Calliphoridae). 1993 Submetido.
- Azeredo Espin, A.M.L; Schoereder, R.F.W; Huettel, M.D. & Sheppard, W.S. Mitochondrial DNA variation in geographic populations of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera:Chrysomelidae). Experientia. 47: 483-485, 1991.
- Azeredo Espin, A.M.L. Mitochondrial DNA variability in geographic populations of screwworm fly from Brazil. International Atomic Energy Agency, p. 161-165, 1993.
- Baba-Aïsa, F; Solignac, M; Dennebouy, N. & David, J.R. Mitochondrial DNA variability in *Drosophila simulans*: quasi absence of polymorphism within each of the three cytoplasmic races. Heredity. 61: 419-426, 1988.
- Baker, C.S; Palumbi, S.R; Lambertsen, R.H; Weinrich, M.T; Calambokidis, J. & O'Brien, S.J. Influence of seasonal migration on geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. Nature. 344: 238-240, 1990.
- Baumhower, A.H. Erradication of the Screwworm fly. The journal of American Medical Association.196: 240-248, 1966.
- Bentzen, P; Brown, G.G. & Legget, W.C. Mitochondrial DNA polymorphism, population structure and life history variation in American Shad, *Alosa sapidissima*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 1446-1454, 1989.
- Bentzen, P; Legget, W.C. & Brown, G.G. Length and restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of American shad, *Alosa sapidissima*. Genetics. 118: 509-518, 1988.
- Bermingham, E. & Avise, J.C. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. Genetics. 113: 939-965, 1986.
- Bermingham, E; Lamb, T. & Avise, J.C. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. The Journal of Heredity. 77: 249-252, 1986.

- Bhat, P.P; Mishra, B.R. & Bhat, P.N. Polymorphism of mitochondrial DNA (mtDNA) in cattle and buffaloes. *Biochemical Genetics*. 28: 311-318, 1990.
- Bibb, M.J; Van Etten, R.A; Wrigth, C.T; Walberg, M.W. & Clayton, D.A. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*. 26: 167-180, 1981.
- Blouin, M.S; Dame, J.B; Tarrant, C.A. & Courtney, C.H. Unusual population genetics of a parasite nematode mtDNA variation within and among populations. *Evolution*. 46(2): 470-476, 1989.
- Boyce, T.M; Wick, Z. & Aquadro, C.H.F. Mitochondrial DNA in the Bark Weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*. 123: 825-836, 1989.
- Brown, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: *Evolution of genes and proteins*. Edited by M. Nei and R. Koehn. Sunderland Sinauer.pp: 62-88, 1983.
- Brown, G.G. & Des Rosiers, L.J. Rat mitochondrial DNA polymorphism: sequence analysis of a hypervariable site for insertion/deletions. *Nucleic Acids Research*. 11(19):6699-6708,1983.
- Brown, W.M. , George , M. Jr., & Wilson, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76:1967-1971, 1979.
- Brown, G.G & Simpson, M.V. Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 3246-3250, 1982.
- Cann, J; Cockburn, A.F. & Mitchell, S.E. Population differentiation of the malaria vector *Anopheles aquasalis* using mitochondrial DNA. *The Journal of Heredity*. pp248-253, 1993.
- Cann, R.L & Wilson, A.C. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics*. 104: 699-711, 1983.
- Chapco, W; Kelln, R.A. & Mcfadgen. D.A. Intraspecific mitochondrial DNA variation in the migratory grasshopper, *Melanophus sanguinipes*. *Heredity*. 69: 547-557, 1992.
- Chapman, R.W; Stephens, J.C; Lansman, .A & Avise, J.C. Models of mitochondrial DNA transmission genetics and evolution in higher eukaryotes. *Genet. Res. Camb*. 40:41-57, 1982.
- Clarck, A.G. Deterministic theory of heteroplasmy. *Evolution*. 42(3): 621-626, 1988.

- Clary, D.O. & Wostenholme, D.R. The *Drosophila* mitochondrial genome. In: Oxford Surveys on Eukariotic genes. Vol.1. McLean N. Ed. Oxford University Press. pp:1-35, 1984.
- Clary, D.O. & Wostenholme, D.R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba* : nucleotide sequence, gene organization and genetic code. J. Mol. Evol. 22: 252-271, 1985.
- Clayton, D.A. Replication of animal mitochondrial DNA. Cell. 28: 693-705, 1982.
- De Salle, R; Freedman, T; Prager, E.M. & Wilson, A.C. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. J. Mol. Evol. 26: 157-164, 1987a.
- De Salle, R. & Templeton, A. Founder effects and the rate of mitochondrial DNA evolution in Hawaiian *Drosophila*. Evolution.42(5): 1076-1084,1988.
- De Salle, R. & Templeton, A. The mtDNA genealogy of closely related *Drosophila silvestris*. Journal of Heredity. 83: 211-216, 1992.
- De Salle, R; Templeton, A; Mori, I; Pletscher, S. & Johnston, J.S. Temporal and spatial heterogeneity of mtDNA polymorphism in natural populations of *Drosophila mercatorum*.Genetics. 116: 215-223, 1987b.
- De Salle, R; Val giddings, L. & Kaneshiro, K.Y. Mitochondrial DNA variability in natural populations of Hawaiian *Drosophila* II. Genetic and phylogenetic relationships of natural populations of *D. silvestris* and *D. heteroneura*. Heredity. 56: 87-96, 1986.
- Echelle, A.A. & Dowling, T.E. Mitochondrial DNA variation and evolution of the Death Valley pupfishes (*Cyprinodon,Cyprinodontidae*). Evolution. 46(1): 193-206, 1992.
- Fauron, C. M-R. & Wostenholme, D.R. Estructural heterogeneity of mitochondrial DNA molecules within the genus *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 3623-3627, 1976.
- Food and Agriculture organization of the united nations, FAO. 1993. The new world screwworm eradication program, North Africa 1988-1992, pp 192.
- Fraiha, H; Azevedo, J.B.C & Azevedo, J.V.C. Myiases in man in Amazonia -1. Gingival myiases by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera:Calliphoridae). Rev. Fundação SESP. 24:31-34, 1979.
- Goldring, E.S. & Peacock, W.J. Intramolecular heterogeneity of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. The Journal of Cell Biology. 73: 279-286, 1977.

- Grivel, L.A. ADN mitochondrial. *Investigación y Ciencia*. Mayo, pp: 72-83,1983.
- Gyllestein, U; Wharton, D. & Wilson, A.C. Maternal inheritance of mitochondrial DNA during back crossing of two species of mice. *The journal of heredity*. 76: 321-324, 1985.
- Hale, L.R. & Beckenbach, A.T. Mitochondrial DNA variation in *Drosophila pseudoobscura* and related species in Pacific Northwest populations. *Cann. J. Genet. Cytol.* 27: 357-364, 1985.
- Hale, L.R. & Singh, R. Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 8813-8817, 1986.
- Hale, L.R. & Singh, R. A comprehensive study of genic variation of natural populations of *Drosophila melanogaster*. IV Mitochondrial DNA variation and the role of history v/s selection in the genetic structure of geographic populations. *Genetics*. 129: 103-117, 1991.
- Halliburton, R. & Barker, J.S.F. Lack of mitochondrial DNA variation in Australian *Drosophila buzzatti*. *Mol. Biol. Evol.* 10(2): 484-487, 1993.
- Harrison, R.G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Tree*. 4: 6-11,1989.
- Harrison, R.G; Rand, D.M. & Wheeler, W.C. Mitochondrial DNA variation in field crickets across a narrow hybrid zone. *Mol. Biol. Evol.* 4(2): 144-158, 1987.
- Hoeh, W.R; Blackley, K.H. & Brown, W.M. Heteroplasmy suggest limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science*. 251: 1488-1489, 1991.
- Hope, R; Bennett, H; Chesson, C. & Cooper, S. Restriction fragment length variants in the marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. *Biochemical Genetics*. 30: 361-370, 1992.
- Infante, M.E & Azeredo Espin, A.M.L. RFLP analysis of mitochondrial DNA among populations of *C. hominivorax*. *Anais XXII. SBBq*, p 35, 1993.
- Kambhampati, S. & Rai, K.S. Variation in mitochondrial DNA of *Aedes* species(Diptera:Culicidae). *Evolution*. 45(1): 120-129, 1991.
- Kambhampati, S; Rai, K.S.& Verleye,D.M. Frequencies of mitochondrial DNA haplotypes in laboratory cage populations of the mosquito, *Aedes albopictus*. *Genetics*. 132: 205-209, 1992.
- Knipling, E.F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entom.* 30: 29-39, 1937.

- Kondo, R; Satta, Y; Matsuura, E.T; Ishiwa, H; Takahata, N. & Chigusa, S.I. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics*. 126: 657-663, 1990.
- Krafsur, E.S; Hightower, B.G. & Leira, L. A longitudinal study of Screwworm population *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae) in northern Veracruz, Mexico. *J. Med. Entomol.* 16: 470-481, 1979.
- Laipis, P.J; Van de Walle, M.J. & Hauswirth, W.M. Unequal partitioning of bovine mitochondrial genotypes among siblings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 8107-8110, 1988.
- Lamb, T. & Avise, J.C. Molecular and population genetic aspects of mitochondrial DNA variability in the Diamond back terrapin, *Malaclemys terrapin*. *Journal of heredity*. 83: 262-269, 1992.
- Lansman, R.A; Avise, J.C; Aquadro C.H; Shapira, J.F. & Daniel,S.W. Extensive genetic variation in mitochondrial DNA's among geographic populations of the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. *Evolution*. 37(1): 1-16, 1983.
- Lansman, R.A; Shade, R.O; Shapira, J.F. & Avise, J.C. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequences relatedness in natural populations. III Techniques and potential applications. *J. Mol. Evol.* 17: 214-226, 1981.
- Latorre, A; Moya, A. & Ayala, F.J. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 8649-8653,1986.
- Magoulas, A. & Zouros, E. Restriction site heteroplasmy in Anchovy, *Engraulis encrasicolus* indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*10(2): 319-325, 1993.
- McInnis, D.O. Cytogenetics of a local population of the Screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, from northeastern Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 74: 582-589, 1981.
- Melnick, D.J; Hoelzer, G.A; Absher, R. & Ashley, M.V. mtDNA diversity in *Rhesus* monkeys reveals overestimates of divergence time and parphyly with neighboring species. *Mol. Biol. Evol.* 10(2): 282-295, 1993.
- Mitchell, S.E; Narang, S.K; Cockburn, A.F; Seawright, J.A. & Goldenthal, M. Mitochondrial and ribosomal DNA variation among members of the *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera:Culicidae) species complex. *Genome*. 35: 939-950,1992.

- Moritz, C. & Brown, W.M. Tandem duplication in animal mitochondrial DNA's: variation in incidence and gene content among lizards. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7183-7187, 1987.
- Moritz, C; Dowling, T.E. & Brown, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292, 1987.
- Nei, M & Li, W-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 7(10): 5269-5273, 1979.
- Nigro, I. The effect of heteroplasmy on cytoplasmic incompatibility in transplasmic lines of *Drosophila simulans*, showing a complete replacement of the mitochondrial DNA. *Heredity.* 66: 41-45, 1991.
- Ojala, D; Merckel, C; Gelfand, R. & Attardi, G. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell.* 22: 393--403, 1980.
- Okimoto, R; Macfarlane, J.L; Clary, D.O. & Wostenholme, D.R. The mitochondrial genomes of two nematodes *Caenorhabditis elegans* e *Ascaris suum*. *Genetics.* 130: 471-498, 1992.
- Olivo, P.D; Van de Walle, M.J; Laipis, P.J. & Hauswirth, W.W. Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial D-loop. *Nature.* 306: 400-402, 1983.
- Ovenden, J.R; White, R.W.G. & Adams, M. Mitochondrial and allozyme genetics of two Tasmanian galaxiids, *Galaxias auratus* and *G. tanycephalus*, (Pisces:Galaxiidae) with restriction lacustrine distribution. *Heredity.* 70: 223-230, 1993.
- Palumbi, S.R. & Kessing, B.D. Population biology of the trans arctic exchange: mtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins. *Evolution.* 45(8): 1790-1805, 1991.
- Pissios, P. & Scouras, Z.G. Mitochondrial DNA evolution in the montium-species subgroup of *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 10(2): 375-382, 1993.
- Rand, D.M. & Harrison, R.G. Mitochondrial DNA transmission genetics in cricket. *Genetics* 114: 955-970, 1986.
- Rand, D.M. & Harrison, R.G. Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. *Genetics.* 121: 551-569, 1989.
- Richardson, R.H; Ellison, J.R. & Averhoff, W.W. Autocidal control of Screwworm in North America. *Science.* 215: 361-370, 1982a.

- Richardson, R.H; Ellison, J.R. & Averhoff, W.W. Matting types in Screwworm populations? Reply. *Science*. 218: 1143-1145, 1982b.
- Roe, B.A; Ma D.P; Wilson, R.K. & Wong, J.H.F. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* 260: 9759-9774, 1985.
- Roerhdanz, R.L. & Johnson, D.A. Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *J. Med. Entomol.* 25(2): 136-141, 1988.
- Roerhdanz, R.L. Intraespecific genetic variability in mitochondrial DNA of the Screwworm fly (*C. hominivorax*). *Biochemical Genetics*. 27: 551-569, 1989.
- Sambrook, J; Fritsch, E.F & Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sheppard, W.S; Steck, G.J. & McPheron, B.A. Geographic populations of the medfly may be differentiated by mitochondrial DNA variation. *Experientia*. 48: 1010-1013, 1992.
- Smith, D.R & Brown, W.M. REstriction endonuclease cleavage site and length polymorphism in mitochondrial DNA of *Apis mellifera mellifera* and *A. m. carnica*. (Hymenoptera:Apidae). *Ann. Entomol.Soc. Am.* 83: 81-88, 1990
- Smith, D.R; Palopoli, M.F; Taylor, B.R; Garney, L; Cornuet, J.M; Solignac, M. & Brown, W.M. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish Honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*. 82: 96-100,1991.
- Snow, J.W; Whitten, C.J; Salinas, A; Ferrer, J. & Sudlow, W.H. The Screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae), in central America and proposed plans for its eradication south the darien gap in Panama. *J. Med. Entomol.* 22(4): 353-360, 1985.
- Solignac, M; Générmont, M; Monnerot, M. & Mounolou, J.C. *Drosophila* mitochondrial genetics. Evolution of heteroplasmy through germ line cell division. *Genetics*. 117: 687-696, 1987.
- Solignac, M; Monnerot, M. & Mounolou, J.C. Mitochondrial heteroplasmy in *Drosophila mauritania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*80: 6944-6946, 1983.
- Sperling, F.A.H. Mitochondrial DNA variation and Haldane's rule in the *Papilio glaucus* and *P. troilus* species groups. *Heredity*. 71: 227-233, 1993.

- Taylor, D.B; Hammack, L. & Roerhdanz, R.L. Reproductive compatibility and mitochondrial DNA restriction site analysis of new world Screwworm fly *C. hominivorax* from north Africa and central America. *Medical and Veterinary Entomology*. 5: 145-151, 1991.
- Templeton, A.R. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and apes. *Evolution*. 37: 221-244, 1983.
- Trick, M. & Dover G.A. Genetic relationships between subspecies of the tsetse fly *Glossina morsitans* inferred from variation in mitochondrial DNA sequences. *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 692-697, 1984.
- Umenishi, F; Han, B.K. & Ikemoto, S. Mitochondrial DNA polymorphism in jindo dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 55(2): 313-317, 1993.
- Wallace, D.C. Diseases of the mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 1175-1212, 1992.
- Wilson, A.C; Cann, R.L; Carr, S.M; George, M; Gyllenstein, U.B; Helm-Bychowsky, K.M; Higuchi, R.G; Palumbi, S.R; Prager, L.M; Sage, R.D. & Stoneking, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26: 375-400, 1985.
- Wostenholme, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International review of cytology*. 41: 173-210, 1992.
- Zhang, Y.P. & Shi, L.M. Genetic diversity in the chinese pangolin (*Manis pentadactyla*): Inferred from restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. *Biochemical Genetics*. 29: 501-508, 1991.