UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Aline Coelho da Rosa

"ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A MOSCA-DOS-CHIFRES,

Haematobia irritans (LINNAEUS, 1758)".

| Este exemplar come | sponde à redação final |
|-----------------------------------|------------------------|
| da teşe detendida Allini Calhi | pelo(a) candidato (a) |
| e aprovada pela Co | missão Julgadora. |

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

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

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Lessinger

Campinas, SP, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

| R71i | Rosa, Aline Coelho da Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para a mosca-dos-chifres, <i>Haematobia irritans</i> (Linnaeus, 1758) – Diptera: Muscidae / Aline Coleho da Rosa. – Campinas, SP: [s.n.], 2007. |
|------|--|
| | Orientadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. |
| | Microssatélites (Genética). Mosca-do-chifre. Genética de populações. Marcadores genéticos. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. |

Título em inglês: Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the horn fly, *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae).

Palavras-chave em inglês: Microsatellites (Genetics); Horn fly; Population genetics; Genetic markers.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Maria Imaculada Zucchi, Marco Antônio Del Lama.

Data da defesa: 31/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 31 de agosto de 2007

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi

Prof. Dr. Marco Antônio Del Lama

Profa! Dra. Anete Pereira de Souza

Profa. Dra. Rosana V. Brondani

Assinatura ochi Assinatura

Mario

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Dedicatória

Dedico a duas pessoas que sempre me deram total apoio e confiança para chegar até aqui, pelo exemplo dado, por serem minha referência, pelo incentivo, pelo Amor incondicional, paciência quando eu queria estudar em casa, apoio nos momentos tensos, que renunciaram a alguns confortos para que eu pudesse ter o melhor sempre: PAI e MÃE, eu amo vocês!

"Com o vento frio percebo: Semanas e semanas Sem ouvir insetos."

Paulo Franchetti

"A persistência é o caminho do êxito".

Charles Chaplin

"Para que haja um vencedor, o time deve ter um sentimento de unidade; cada jogador deve colocar o time acima glória pessoal".

Paul Bear Bryant

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o meu mestrado e à FAPESP por financiar os projetos do laboratório, o que possibilitou o desenvolvimento do projeto.

À Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin por me incorporar ao seu grupo de pesquisa, pela ajuda nas mudanças de estratégia para que este trabalho possa ter sido realizado. Pela oportunidade de participar do curso de Construção de Bibliotecas Enriquecidas em Microssatélites e que eu pudesse iniciar o projeto de meu mestrado. Também pelas valorosas correções desta tese.

À Dra. Ana Claúdia Lessinger por acreditar em mim desde o início, pelo subprojeto do PROFIX que foi o motivo de minha vinda ao lab. Obrigada pelas longas conversas, por me ensinar a valorizar cada resultado, pelas correções de trabalhos científicos. E pelo apoio em questões pessoais também...

A Dra. Tatiana por toda orientação quanto à metodologia que utilizamos neste projeto, por me fazer ver que as padronizações das reações não eram tão triviais, pelas excelentes sugestões nas correções de trabalhos.

Aos membros de minha qualificação, pré-banca pelas sugestões ao meu trabalho e aos membros da banca.

À Rosângela, por todas as instruções técnicas, de qualquer etapa de qualquer experimento que eu tenha realizado, pois incrivelmente ela é totipotente! Por me ajudar – e como – no andamento do meu projeto e pelo companheirismo no lab.

A todos do laboratório de Genética Animal, sem exceção, agradeço pela companhia no tanto nos experimentos como nos momentos de descontração, por manterem o ambiente do lab sempre saudável, prazeroso e inteligente. Agradeço a

vii

solidariedade e força que me deram em um dado momento em que problemas particulares me desnortearam.

Agradeço à Mari Lyra pelas primeiras instruções no lab, quando iríamos fazer alguns "southerns" e por ter sido sempre tão receptiva, amiga, pelos conselhos acadêmicos, pela companhia dentro e fora do lab, pelos apoios - que não foram poucos! Por me fazer ver que "não ter resultados" em alguns experimentos é também um resultado.

À Pri, Mari Loura, Bárbara, Norma pelo companheirismo e pela parceria no lab de microssatélites, pela sua amizade e todos os bons momentos que passamos, pela força nos momentos difíceis ou complicados. Renato pela amizade e me passar tranquilidade com seu jeito calmo e por me ajudar na formatação da tese... À Lissiene, grande companheira de lab, capoeira, por todos os momentos dentro e fora do lab e nas aulas de genética. À Karina, pelo exemplo de pesquisadora, pelos papos acadêmicos, pessoais e pela paciência com várias questões que lhe fiz. Ao Pablo, por sua amizade e por praticar espanhol do Uruguai comigo! Ao Jaú, Paloci, Pedro pelo ótimo convívio no lab. À amiga de longa data Sofia, pelo nosso trabalho juntas, pela sua presença nos diversos momentos e, até hoje, tão generosa e paciente. À Crica que me ensinou a extrair DNA pelo método de fenol-clorofórmio. À Ana Carolina e Lu Hatadani pelo excelente convívio e pelas conversas científicas e outras descontraídas! Túlio, pelas discussões sobre a nossa Haematobia, pela boa companhia e pela paciência com minhas inúmeras perguntas. À Lê, por trabalharmos juntas e, dessa forma, ter contribuído para meu trabalho. Johnny, amizade tão importante, pelos momentos "nonsense", pelo pela sua companheirismo, apoio e amizade!

Pela coleta que meu irmão e sua querida esposa – René e Lu – fizeram na Bahia e que eu utilizei neste trabalho. A eles um grande obrigado pela força que sempre me dão!

Ao meu pequeno Brenno por tudo o que trouxe à minha vida com sua chegada à família. A todos os integrantes da minha família, que não entendem muito bem o meu trabalho, mas que apóiam totalmente! Aos meus pais um outro grande "muito obrigada" por serem referência para mim, pelo apoio, compreensão.

Aos meus amigos de infância e aos amigos do Cotuca que permanecem presentes em minha vida. Aos meus amigos da Fundação que são parte da minha trajetória profissional, especialmente o Dani, Aline e Josi. Por terem sido grandes exemplos para mim durante a minha graduação: Ana Paula Uetanabaro por tudo o que me ensinou, lições de lab e lições de vida, Cleber, Fernandinha, Takeshi, pela sua amizade e por me ensinar muitas coisas sobre a vida! À Dra. Valéria, Dra. Fabiana, Dr. Gilson e Dra. Suzete por terem sido meus primeiros mestres e me aceitarem em seu lab e terem me dado a oportunidade de aprender muito sobre biologia molecular e microbiologia.

Aos meus amigos de graduação pelo companheirismo, momentos de estudo, momentos engraçados, baladas, pela empatia, pela generosidade e coração aberto, olhos nos olhos e abraços apertados: Lu, Marcel, Tomizawa, Fabinho, Fabião, Ivan e Cris, Lívia, Claudinha, Waka, Aglécio e Joseane, Fabiano, Fernando, Chima e Miguel.

Aos demais colegas de graduação, de outras turmas, de baladas pelo IB e UNICAMP... especialmente ao Gabriel.

ix

Aos meus professores de graduação, por vários exemplos dados, que contribuíram para o que sou hoje.

Aos professores do colégio, especialmente a Ana Lourdes, por me incentivar a prestar Biologia na UNICAMP.

À Rita, que muito contribuiu para que eu pudesse melhorar meus pensamentos e atitudes e encarar de forma diferente situações complicadas... pela sua luz e energia que ajuda a todos...

Ao Beavis, pelo carinho.

Muito obrigada!

Índice

| Ficha Catalográfica | ii |
|--|-----|
| BANCA EXAMINADORA | iii |
| Dedicatória | iv |
| Agradecimentos | vii |
| Índice | xi |
| Resumo | 1 |
| Abstract | 3 |
| Introdução | 5 |
| A mosca-dos-chifres | 5 |
| Importância no cenário econômico brasileiro | |
| Características biológicas da mosca-dos-chifres | 6 |
| Distribuição geográfica da Mosca-dos-chifres | |
| Contexto da investigação científica da mosca-dos-chifres | |
| Marcadores Microssatélites | |
| Δ cesso ao nolimorfismo de microssatélites | |
| Uso dos marcadoras microssatálitas am díntaros | 10 |
| Objetivos | 20 |
| | |
| Metodologia | 21 |
| Amostras de Haematobia irritans | 21 |
| Extração e Digestão do DNA Genômico | |
| Ligação de Adantadores | 21 |
| Pré-amplificação dos fragmentos ligados aos adaptadores. | |
| Amplificação dos fragmentos selecionados via PCR | |
| Clonagem dos fragmentos | |
| Amplificação dos insertos clonados | 24 |
| Sequenciamento, análise das sequências e desenvolvimento de "primers" | 26 |
| Detecção e caracterização do polimorfismo dos locos de microssatélites | 27 |
| Análises dos dados de microssatélites | 28 |
| Resultados | 29 |
| Construção da biblioteca genômica | 29 |
| Seleção de "primers" e otimização das reações de PCR | |
| Discussão | |
| Isolamento e caracterização de locos de microssatélites | |
| Considerações Finais | |
| | |

| Referências Bibliográficas | 47 |
|----------------------------|----|
| | |
| Anexo | 67 |

Resumo

Este trabalho consiste na construção de uma biblioteca genômica enriquecida em microssatélites e na caracterização de dez locos polimórficos para a espécie *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), popularmente conhecida como mosca-dos-chifres, um ectoparasita de grande importância econômica para a pecuária de diversos países, principalmente no Brasil.

A biblioteca genômica enriquecida em microssatélites teve um rendimento de 67% considerando-se o número de microsatélites (contendo mais de 7 repetições em série) caracterizados em um total de 109 sequências analisadas. Um rendimento de 22% foi encontrado referente à obtenção de 16 locos potencialmente informativos. Dos microssatélites identificados nesta análise, 85% possuíam motivos (CA)_n e apenas 12% apresentaram motivos (GA)_n, apesar da biblioteca ter sido enriquecida para ambos os motivos.

Neste projeto, dez locos polimórficos de microssatélites foram descritos para a espécie *H. irritans*. Destes, oito locos apresentaram motivos dinucleotídeos, sendo cinco motivos (CA)_n e três motivos (GA)_n, além da identificação de um loco com motivo trinucleotídeo (CAA)₇ e um tetranucleotídeo (CCGT)₆.

Entre os dez locos polimórficos, o número de alelos por loco variou entre dois e oito, tendo uma média de quatro alelos por loco, considerados um número baixo quando comparado com outras espécies de dípteros. As heterozigosidades esperada e observada apresentaram um intervalo de 0,1421-0,7702 e 0,1500-0,6750, respectivamente. Os valores de heterozigosidade também foram considerados baixos, sendo inferiores a 0,5 em pelo menos três locos. Após correção seqüencial de Bonferroni, oito locos não apresentaram desvios significativos pelo esperado por Hardy-Weinberg, bem como não foi verificado desequilíbrio de ligação entre os pares de locos.

A caracterização destes marcadores microssatélites polimórficos, é potencialmente informativa para elucidar questões evolutivas envolvendo *H. irritans* como a compreensão da dinâmica populacional e estrutura genética desta espécie. A análise deste marcador molecular poderá orientar projetos de manejo e controle da mosca-dos-chifres.

Abstract

The aim of this work was the construction of a genomic microsatelliteenriched library for the species *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), commonly known as "horn fly", an ectoparasite of great economic importance world-wide, and particularly in Brazil. Here we describe ten polymorphic microsatellite loci isolated from this species.

From a complete set of 109 sequences analised, 67% contained microsatellites regions (considering sequences with more than 7 repeats). The analysis of these sequences resulted in the identification of 16 potentially informative microsatellites loci (an efficience of 22%). Regarding the composition of the microsatellites sequenced retrived in this process, 85% have $(CA)_n$ motifs and only 12% have $(GA)_n$ motifs, despite enrichment on both.

From the ten polymorphic microsatellite loci isolated from *H. irritans*, 8 have dinucleotide motifs (5 (CA)_n and 3 (GA)_n), one was a trinucleotide motif (CAA)₇ and one was a tetranucleotide motif (CCGT)₆. The number of alleles per locus ranged from two to eight, with an average of four alleles per locus. This number of alleles was considered low if compared with other dipterans studies. The expected and observed heterozigosities ranged from 0,1421 to 0,7702 and 0,1500 to 0,6750, respectively. Heterozigosity values were considered low. In this analysis, at least three loci presented heterozigosity values under 0,5. After sequential Bonferroni correction, significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was found for 2 loci. No linkage disequilibrium was observed between pairs of loci after correction for multiple tests. The characterization of these polymorphic microsatellites markers is potentially informative to investigate evolutionary questions regarding *H. irritans* populations by providing fundamental insights into population dynamics and genetic structure. Further projects on horn flies control and management could also benefit from this molecular marker analysis.

Introdução

A mosca-dos-chifres

Importância no cenário econômico brasileiro

O Brasil é o país com maior rebanho bovino comercial, com uma estimativa de aproximadamente 207,2 milhões de cabeças de gado (dados Produção da Pecuária Municipal – PPM – 2005). Na figura 1, temos a participação do Brasil no mercado internacional, que apresenta uma crescente quantidade de carne exportada entre 1990 e 2005 e o seu faturamento em milhões de dólares.



Figura 1. Gráfico da evolução das exportações brasileiras de carne em 15 anos – de 1990 até 2005. (Dados da ABIEC, relatório 2005). mil ton eq. carcaça = em mil toneladas em equivalente carcaça (peso total da carcaça).

Nesse contexto, a preocupação com a questão médico-veterinária dos animais é estratégica. Entre as espécies que parasitam o gado, e que vêm causando grande impacto na produção de carne, leite e couro, destaca-se a espécie *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), conhecida como mosca-dos-chifres, considerada um dos ectoparasitas mais importantes da pecuária (Byford *et al.*,1992).

Características biológicas da mosca-dos-chifres

Este pequeno díptero, cujo tamanho varia de 3 a 5 mm, tem um ciclo de vida rápido, que pode ser observado na figura 2. O indivíduo de *H. irritans* passa toda sua vida adulta, que compreende de três a sete semanas, sobre o gado, em constante atividade hematófaga. A fêmea apenas deixa o animal para ovipositar em fezes frescas do próprio gado (Honer *et al.*, 1993). O número médio de ovos por postura é em torno de 10 e 15, sendo que, ao longo de seu ciclo, cada fêmea pode colocar um total de 300 a 400 ovos. Em condições ótimas de temperatura e umidade no bolo fecal, as larvas eclodem em 24h e se alimentam nas fezes do bovino. Após três dias, as larvas se transformam em pupa. Em seis dias, um indivíduo adulto emerge e passa a parasitar o gado constantemente (Campbell & Thomas, 1992).

O ciclo-de-vida da mosca-dos-chifres é dependente de fatores climáticos. Períodos de alta infestação seguem um padrão geral caracterizado por altas temperaturas e chuvas moderadas, tendo picos no início e no fim do período das águas. A população da mosca-dos-chifres decresce nas épocas de seca, baixas temperaturas ou nos períodos prolongados de chuvas (Barros, 2001). Nos períodos de condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento e reprodução – como período de baixas temperaturas, principalmente em países de clima temperado - a mosca pode entrar em diapausa (Mendes & Linhares, 1999).



Figura 2. Ciclo-de-vida da mosca-dos-chifres.

Os danos causados por esta espécie vêm do seu hábito hematófago e pela constante infestação, pois pode se alimentar do sangue do animal até 38 vezes em um mesmo dia (Harris *et al.*, 1974; Honer, 1990). Em períodos de alta infestação, pode-se observar até 500 moscas por animal.

A irritação causada pela picada das moscas compromete a alimentação e a digestão no animal parasitado, diminuindo a sua produtividade. Prejuízos econômicos ocorrem em virtude das conseqüências do estresse, como o comprometimento no ganho de peso, diminuição da produção leiteira e danos associados à perfuração do couro animal, o que causa a depreciação deste devido à baixa qualidade para industrialização (Byford *et al.*, 1992; Honer, 1990).

Distribuição geográfica da Mosca-dos-chifres

A mosca-dos-chifres, atualmente, apresenta ampla distribuição geográfica, abrangendo a Europa, Ásia, África setentrional e toda América até as regiões centrais da Argentina (Guglielmone *et al.*, 1997). No sul da Ásia, ilhas do Pacífico e Oceania há o registro da ocorrência de uma subespécie, *H. irritans exigua* (De Meijere), a mosca-dos-búfalos.

Apesar do impacto desta espécie como ectoparasita da pecuária, pouco se conhece sobre o processo de introdução de *H. irritans* e seu estabelecimento em diferentes regiões do Brasil. Especula-se que esta espécie tenha sido introduzida em 1885 (Riley, 1889) no leste dos Estados Unidos a partir de embarcações provenientes da Europa. Sugere-se que ela tenha se dispersado ao longo do continente Americano, e ingressado no América do Sul pela Colômbia. Foi primeiramente descrita no norte do Brasil, em Roraima, no ano 1978 (Valério & Guimarães, 1983) e se dissipou pelo país rapidamente, bem como por quase todo o continente sul-americano, devido, principalmente, aos climas tropical e subtropical favoráveis ao seu ciclo e à presença abundante de hospedeiros (Mendes & Linhares, 1999).

Além disso, é conhecida a ocorrência de outros pontos de introdução de rebanhos de gado na América durante os diversos processos de colonização européia. O intenso fluxo de animais entre colônias espanholas na América (Rouse, 1977) poderia ter contribuído no processo de introdução desta espécie. Esta questão pode ser investigada através da análise da variabilidade genética de *H*. *irritans* associada a registros históricos de movimentos colonizadores. Neste aspecto a caracterização de marcadores moleculares informativos é fundamental.

Contexto da investigação científica da mosca-dos-chifres

Dados atuais (agosto, 2007) sobre estudos moleculares em *H. irritans*, obtidos através de um levantamento no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), revelam que existem aproximadamente 313 registros para seqüências nucleotídicas desta espécie, mas nenhum relacionado à determinação de microssatélites. De modo geral, estes registros descrevem seqüências relativas à estrutura do genoma mitocondrial, transposases, pseudogenes e rRNAs nucleares; além de regiões gênicas vinculadas à codificação e regulação das esterases.

Os registros sobre H. irritans encontrados no PubMed descrevem 177 artigos, tratando principalmente da seleção de resistência a inseticidas, métodos de controle, características do ciclo biológico e metodologias para otimizar a criação desta espécie em laboratório. Com relação a estudos de marcadores moleculares, estes têm contribuído pouco para o acesso da variabilidade genética desta espécie. A análise preliminar de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism) do genoma mitocondrial de cinco populações brasileiras, incluindo amostras do Uruguai, não detectou polimorfismos (Sofia Galdames, comunicação pessoal). Porém, o uso de marcadores RAPD ("Randomly Amplified Polymorphic DNA") em H. irritans (Castiglione & Bicudo, 2005) sugere estruturação genética de algumas populações brasileiras da mosca-dos-chifres. Divergências entre marcadores moleculares diferentes promovem a busca por outros marcadores que possuam maior poder de resolução para detectar variabilidade genética nesta espécie e que sejam informativos na caracterização de processos evolutivos associados a H. irritans. Marcadores que detectam muita variabilidade genética geralmente são pouco informativos para elucidar questões evolutivas muito antigas, entretanto, podem contribuir na análise de processos históricos recentes pela análise da estrutura genética de populações desta espécie.

9

A figura 3 ilustra o contexto atual com relação à caracterização de microssatélites em espécies de moscas de importância médico-veterinária, incluindo espécies da família Muscidae, *Stomoxys calcitrans* (Gilles *et al.*, 2004), *S. niger niger* (Gilles *et al.*, 2005) e *Musca domestica* (Chakrabarti *et al.*, 2004; Endsley *et al.*, 2002). Outros parasitas da pecuária também estão representados, incluindo membros das famílias Calliphoridae, Scatophagidae e Glossinidae. Este cenário demonstra que os estudos envolvendo a caracterização de marcadores microssatélites são abordagens estratégicas com relação ao estudo de ectoparasitas e potencialmente informativos para detectar variabilidade genética nestas espécies.



Figura 3. Gráfico que representa o número de locos de microssatélites (eixo Y) identificados em nove espécies de dípteros de importância médicoveterinária (eixo X): Stomoxys calcitrans (Gilles et al., 2004), Stomoxys niger niger (Gilles et al., 2005), Musca domestica (Chakrabarti et al., 2004; Endsley et al., 2002), Cochliomyia hominivorax (Torres et al., 2004; Torres & Azeredo-Espin, 2005), Lucilia illustris e Lucilia sericata (Florin & Gyllenstrand, 2002), Scatophaga stercoraria (Watts et al., 2005), Glossina morsitans e Glossina palidipes (Ouma et al., 2003), Glossina palpalis (Solano et al., 1998).

Devido às singularidades encontradas na biologia desta espécie e ao "status" adquirido como parasita da pecuária, *H. irritans* tornou-se um importante material de investigação científica tanto do ponto de vista acadêmico de pesquisa básica, como do ponto de vista aplicado da pecuária. O desenvolvimento de "primers" para acessar regiões de microssatélites no genoma de *H. irritans* e a caracterização de locos polimórficos poderá fornecer informações importantes para estudos de estrutura de populações e diversidade genética que poderão responder às questões acerca da introdução da espécie *H. irritans* na América do Sul e elucidar outros aspectos evolutivos da espécie.

Marcadores Microssatélites

As primeiras seqüências repetitivas de DNA a serem descobertas no genoma de eucariotos foram chamados de DNA satélite ou VNTRs ("Variable Number of Tandem Repeats") (Jarne & Lagoda, 1996). Esta descoberta foi resultado da separação do DNA genômico em gradientes de densidade por ultracentrifugação, utilizando-se solução de Cloreto de Césio (CsCl₂). Regiões com muitas repetições apresentam composição de bases distinta de regiões não-repetitivas, ou seja, apresentam conteúdo G+C que difere significativamente do restante do genoma. Tais seqüências altamente repetidas podem ser separadas do DNA principal pela diferença de coeficientes de sedimentação em um gradiente submetido a ultracentrifugação. Dessa forma, foi observado que, além da banda principal de DNA, havia bandas secundárias, que foram chamadas de DNA satélite. Locos de DNA satélite podem ser constituídos de até vários milhares de pares de base e estão presentes na heterocromatina, principalmente na região do centrômero (Tautz, 1989; 1993). Descobertas subseqüentes dividiram os então chamados VNTR em classes de acordo com seu tamanho: minissatélites e microssatélites. Os primeiros foram isolados em meados da década de 1980, são regiões repetitivas menores que os DNA satélites e possuem mais de 15 unidades de repetição. Já os microssatélites, também chamados de "Simple Sequence Repeats" (SSRs) ou "Short Tandem Repeats"(STRs), foram isolados no final da mesma década e são regiões de DNA com mais de sete unidades de repetição, possuindo normalmente de 20 a 100 pares de base de comprimento, sendo constituídos de pequenos segmentos de até 6 nucleotídeos repetidos *in tandem* (Murray, 1996).

O polimorfismo entre diferentes alelos ocorre devido a variações no número de unidades repetidas geradas por mutações que, em microssatélites, ocorrem a uma taxa muito maior que a registrada em DNA não repetitivo.

Microssatélites são chamados de di-, tri- ou tetranucleotídeos de acordo com o tipo de motivo repetido.

Entre os motivos de repetições encontrados em regiões de microssatélites, os dinucleotídeos são os elementos mais amplamente utilizados em genética de populações por apresentar maior polimorfismo e serem mais abundantes no genoma de metazoários, o que os torna altamente informativos para análises de

12

variabilidade genética. De um modo geral, observa-se que, em insetos, há predomínio das repetições do tipo CA (Katti *et al.*, 2001). Os motivos trinucleotídeos encontrados são freqüentemente inseridos em éxons devido à manutenção do quadro de leitura do gene apesar da ocorrência de mutações. Os motivos tetranucleotídeos mais comuns são elementos GATA e GACA, cuja densidade varia de acordo com a espécie analisada. Geralmente estas estruturas encontram-se como motivos interrompidos ou compostos (Jarne & Lagoda, 1996). Comparando-se o genoma de animais e o de plantas, temos que a abundância neste é maior e os microssatélites mais freqüentes são mononucleotídeos (AG) n, (AT) n e trinucleotídeos (TAT)n (Grover & Sharma, 2007; Lagercrantz *et al.*, 1993; Morgante & Olivieri, 1993).

Acesso ao polimorfismo de microssatélites

Os polimorfismos de microssatélites são identificados e analisados através de amplificação via PCR da região contendo o microssatélite, como pode ser observado na figura 4. Os sítios de hibridização dos "primers" (ou iniciadores) localizam-se nas regiões flanqueadoras da região-alvo. Em seguida, os produtos da amplificação são separados em eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (Parker *et al.*, 1998) para identificação dos tamanhos dos alelos amplificados.

Algumas características atribuem aos microssatélites vantagens sobre outros marcadores moleculares. Dentre estas características podem ser destacadas; (1) os microssatélites são altamente polimórficos e específicos para um loco no genoma; (2) são tipicamente codominantes e multi-alélicos, com uma alta heterozigosidade esperada; (3) estão densamente distribuídos no genoma de eucariotos; (4) necessidade de uma pequena quantidade de DNA-molde (10 a 100 ng) para as amplificações; (5) sua interpretação é relativamente simples, podendo ser analisados por uma reação de PCR, sendo que seus alelos podem ser determinados com alta precisão e reprodutibilidade; (6) em muitos casos apresenta transferibilidade.



Figura 4. Esquema do acesso *in vitro* de locos de microssatélites indicando (setas) os "primers" hibridizados nas regiões flanqueadoras (extremidades 5') para amplificação do alelo.

Estas características fazem dos microssatélites marcadores amplamente utilizados para determinar relações de parentesco, em investigações foreneses, estudos de mapeamento, diagnóstico de doenças genéticas, biologia da conservação e em genética de populações (Jarne & Lagoda, 1996; Chambers & MacAvoy, 2000).

A abundante e crescente utilização deste marcador em análises de variabilidade genética se deve ao elevado grau de polimorfismo comumente observado nos locos de microssatélites em populações naturais (Jarne & Lagoda, 1996).

Pela abundância no genoma e altas taxas de mutação, um número suficiente de eventos mutacionais podem ser observados em populações divergentes em um curto período de tempo, favorecendo a análise de aspectos histórico-geográficos, como migração e mistura de populações diferentes.

Mesmo com todas estas vantagens mencionadas, os microssatélites também apresentam algumas limitações, tais como; (1) O custo inicial de desenvolvimento de uma biblioteca genômica enriquecida em microssatélites e o tempo consumido são altos; (2) Erros de genotipagem podem ocorrer e consistem, principalmente, na amplificação de bandas-fantasma ("stuttering patterns"), amplificação preferencial de alelos menores ("large alleles dropout") e a ocorrência de alelos nulos; (3) A homoplasia pode vir a subestimar a divergência genética.

Os erros de genotipagem podem ser causados pela identificação errônea da banda do microssatélite e diminuem a heterozigosidade observada, aumentando o nível de endocruzamento aparente nos locos afetados e desviando as freqüências alélicas e genotípicas. A deficiência de heterozigotos pode ser indício de erros de genotipagem que podem ser potencialmente detectados por ferramentas estatísticas (Paetkau, 2003), particularmente quando identificados em poucos locos (Gomes *et al.*, 1999).

As bandas-fantasmas são conseqüências de "slippage" da *Taq* polimerase durante as reações de amplificação *in vitro* e são bandas com tamanho geralmente menor que o tamanho original do alelo (Jones *et al.*, 1997; van Oosterhout *et al.*, 2004).

Os alelos nulos são resultado de mutações de ponto nas regiões flanqueadoras dos microssatélites complementares aos oligonucleotídeos sintéticos. Um dos alelos (ou ambos) não é amplificado por falha na etapa de hibridização dos primers.

Uma das limitações destes marcadores se deve ao fato de não existir um modelo de mutação único e amplamente aceito, o que muita vezes gera controvérsias com relação à decisão sobre o modelo de mutação a ser adotado.

No modelo mais aceito, a maioria das alterações em locos de microssatélites ocorre devido a erros de pareamento durante a replicação (Levinson & Gutman, 1987; Hancock, 1990; e Strauss, 1999).

15

A replicação do DNA é um processo complexo, cuja fidelidade é dependente de alguns fatores: i) da DNA polimerase; ii) da ação das enzimas com atividade exonuclease, que removem bases mal pareadas inseridas erroneamente durante a replicação; iii) do sistema de reparo de pareamento errôneo, que é um reparo pósreplicacional (do inglês "mismatch repair system").

O principal processo mutacional que pode ser responsável pelas altas taxas de polimorfismo encontradas em microssatélites é o deslizamento da DNA polimerase na replicação do DNA (do inglês "DNA replication slippage" ou simplesmente "slippage") que pode ser observado na figura 5.

Este tipo de mutação pode ser corrigido por mecanismos de reparo de bases pareadas erroneamente ("mismatch repair"), porém, a instabilidade dos microssatélites se deve à deficiência neste sistema de reparo, ou seja, há falhas no reconhecimento das mutações e sua correção.

O processo se inicia quando, na replicação, a DNA polimerase se desliga do complexo de replicação, forçando a dissociação das duas fitas de DNA. Para reiniciar a replicação, as duas fitas devem ser re-associadas. Mutações são geradas quando a re-associação entre as cadeias é incorreta, resultando em uma ou mais repetições não pareadas. Este erro vai gerar uma diminuição ou aumento do comprimento dos microssatélites, dependendo da fita em que ocorrer as repetições não-pareadas. Deste modo, o erro pode levar a uma diminuição do comprimento dos microssatélites (quando as repetições não pareadas estão na fita-molde) ou a um aumento (quando as repetições não pareadas estão na fita nascente) (Figura 5).

16



Figura 5. Esquema representativo do modelo de "slippage" para a origem de novos alelos de microssatélites. Durante a replicação, ao passar por regiões repetitivas, a polimerase interrompe seu funcionamento e se dissocia da fita nascente. Como conseqüência a extremidade 3' da fita nascente se separa da fita-molde (I-b e II-f). O realinhamento destas cadeias pode se dar corretamente, ou como é comum em regiões repetidas em série, pode se dar de forma incorreta de duas formas: i) A fita nascente (em azul) pode se re-hibridizar à fita complementar (em vermelho) de modo que forme uma alça (c) e, após, término da replicação, haja mais unidades de repetições (d). ii) Ainda, a fita nascente pode se ligar à fita molde sendo que nesta é formada uma alça (g) e resultar em uma diminuição do número de repetições (h) após a replicação. Esquema baseado em Ellegren (2004).

Outro processo que pode explicar as taxas de mutação dos microssatélites seria a recombinação entre moléculas de DNA. O "crossing-over" desigual ocorre entre moléculas de DNA desalinhadas durante a meiose, que gera a deleção de uma unidade repetida em uma molécula e sua inserção em outra. Tal processo seria mais comum em seqüências repetitivas longas e explicaria mudanças drásticas de variação de tamanho do alelo. Porém, este não é considerado o principal modelo de evolução dos microssatélites (Stephan & Cho, 1994).

Kruglyak *et al.* (1998) sugeriram que a distribuição de microssatélites obedeceria a um balanço entre ocorrências de "slippage" e de mutações de ponto. Neste balanço, as mutações geradas por "slippage" ocorrem randomicamente, e a freqüência deste evento pode variar de acordo com o número de repetições no motivo de determinado alelo, o tipo das repetições (di-, tri-, tetranucleotídeos) e sua composição nucleotídica. Assim, os alelos cresceriam em tamanho até que uma mutação de ponto interrompa uma seqüência perfeita e a transforme em dois microssatélites menores. A mutação de ponto seria o primeiro passo no processo de "morte" dos microssatélites por converter longas repetições em série em pequenas repetições curtas. Este balanço entre mutações de ponto e a ocorrência de "slippage" pode explicar os diferentes comprimentos de alelos e sua distribuição no genoma de muitos organismos.

A abundância e o grau de polimorfismo encontrado em regiões de microssatélites variam consideravelmente de acordo com o táxon analisado (Zhang, 2004), mesmo considerando-se espécies próximas. O uso de "primers" heterólogos (desenvolvidos a partir de uma espécie e utilizados para amplificar microssatélites em outra espécie) é possível e comumente utilizado em alguns organismos como em bicho-da-seda (Prasad *et al.*, 2005), *Chrysocyon brachyurus* e *Cerdocyon thous* (Rodrigues *et al.*, 2006), *Bison bonasus* (Roth *et al.*, 2006) e mosca-das-frutas do gênero *Ceratitis* (Baliraine *et al.*, 2003), entre outras. Porém, "primers" heterólogos nem sempre são eficientes, pois os locos podem não ser amplificados ou, se amplificados, podem apresentar um único alelo, ou seja, não apresentam o mesmo grau de polimorfismo caracterizado na espécie focal. Isto pode ocorrer devido a variações nas regiões flanqueadoras dos microssatélites, que podem comprometer a etapa de hibridização dos "primers" durante o processo de amplificação.

Uso dos marcadores microssatélites em dípteros

Entre dípteros, os microssatélites têm sido utilizados para estudos de genética de populações em várias espécies, entre elas, as mosca-das-frutas dos gêneros Drosophila (Schiffer et al., 2007; Mirol et al., 2007; Schofl & Schlotterer, 2006; Schafer et al, 2006; Agis & Scholötterer, 2001; Noor et al., 2000; 2001) e Ceratitis (Meixner et al., 2002; Bonizzoni et al., 2002, 2000; Baliraine et al., 2004), Musca domestica (Krafsur et al., 2005) e em espécies-vetores de doenças, principalmente os mosquitos dos gêneros Culex (Venkatesan et al., 2007; Fonseca et al., 2004; 2000), Anopheles (Slotman et al., 2007, Temu & Yan, 2005; Kayondo et al., 2005; Cohuet et al., 2004; Temu et al., 2004; Pinto et al., 2002; Norris et al., 2001; Donelly et al., 2001; Simard et al., 2000) e Aedes (Huber et al., 2002; Ravel et al., 2002, 2001), assim como em moscas dos gêneros Glossina (Ouma et al., 2007, 2006, 2003; Krafsur et al., 2002; Krafsur, 2002; Krafsur et al., 2001; Solano et al., 2000) e Simulium (Dumas et al., 1998). Além de inúmeros estudos associados à caracterização de "primers" de microssatélites como descrito para as espécies Stomoxys calcitrans (Gilles et al., 2004), Stomoxys niger niger (Gilles et al., 2005), Musca domestica (Chakrabarti et al., 2004; Endsley et al., 2002), Cochliomyia hominivorax (Torres et al., 2004; Torres & Azeredo-Espin, 2005), Lucilia illustris e Lucilia sericata (Florin & Gyllenstrand, 2002), Scatophaga stercoraria (Watts et al., 2005), Glossina morsitans e Glossina palidipes (Ouma et al., 2006, 2003), Glossina palpalis (Solano et al., 1998).

Para *H. irritans*, apesar de sua grande importância econômica e veterinária nas Américas, poucos são os estudos genéticos conduzidos nesta espécie e nenhum envolvendo a caracterização e utilização de marcadores microssatélites.

Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi o isolamento e a caracterização de marcadores microssatélites polimórficos para *H. irritans*.

Os objetivos específicos foram:

- Construção de uma biblioteca enriquecida em microssatélites do genoma nuclear de *H. irritans;*

- Identificação e seleção de "primers" específicos para as regiões flanqueadoras dos microssatélites;

- Padronização de reações de PCR para amplificação dos locos de microssatélites;

- Avaliação do potencial de polimorfismos dos locos isolados em H. irritans;

Metodologia

Amostras de Haematobia irritans

Para a construção da biblioteca de microssatélites, foram utilizados 10 indivíduos adultos de *H. irritans* de cada localidade, sendo provenientes de coletas realizadas diretamente em animais infestados em Paso Muñoz/Uruguai e Caraguatatuba/SP/Brasil. Estas amostras foram armazenados a -70°C no Laboratório de Genética Animal, UNICAMP.

Para a padronização inicial das condições de amplificação foram utilizados três indivíduos, sendo dois de Candiba/BA e um de Caraguatatuba/SP.

Para a avaliação de polimorfismos foram analisados 40 indivíduos de *H*. *irritans*, sendo 20 coletados em Candiba/BA e 20 coletados em Caraguatatuba/SP. O DNA genômico destas amostras foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio (Infante-Vargas & Azeredo-Espin, 1995) adaptado para microcentrífuga.

Extração e Digestão do DNA Genômico

O DNA genômico foi isolado a partir de 20 indivíduos adultos de *H. irritans* provenientes do Uruguai e de Caraguatatuba utilizando-se o kit "Puregene™ DNA Purification System" (Gentra Systems), de acordo com instruções do fabricante. O DNA genômico foi quantificado em gel de agarose 0,8% tendo como padrão de peso molecular o marcador "λ DNA/*Hin*d III Fragments" (Invitrogen) e armazenado a -20°C.

A obtenção da biblioteca genômica enriquecida em regiões microssatélites de repetições CA e CT foi realizada utilizando-se protocolos descritos por Billotte *et al.* (1999) adaptados por Torres & Azeredo-Espin (2005). Após a extração do DNA foram feitas diluições das amostras nas proporções 1:10 e 1:20 para a subseqüente visualização em gel de agarose 1%. Neste, foram aplicados 10 μ L das diluições e, como padrão de peso molecular, foram aplicados 250 ng e 125 ng de " λ DNA/*Hin*d III Fragments" (0,5 μ g/ μ L). Foi estimada uma concentração de 1 μ g/ μ L para a amostra de DNA de *H. irritans*.

Num volume final de 100 μ L com 4 mM de espermidina foram acrescentados 6 μ g do DNA, e 50 U da endonuclease de restrição *Rsa*I. A incubação foi feita a 37°C durante aproximadamente 16 horas (figura 6-B).

Os fragmentos gerados (figura 6-C) foram visualizados em gel de agarose 1,2% após corrida a 60 V e corado com brometo de etídeo por 20 minutos.

Ligação de Adaptadores

Num volume final de 50 μ L foram adicionados 6 μ L de DNA digerido, 4U de T4 DNA ligase, 0,4 μ M de cada um dos adaptadores Rsa21 (5[°] CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA 3[°]) e Rsa25 (5[°] TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG 3[°]). Após 2h a 20°C no termociclador, os adaptadores se ligaram às extremidades abruptas do DNA.

Pré-amplificação dos fragmentos ligados aos adaptadores

Esses fragmentos ligados aos adaptadores foram, posteriormente, préamplificados a fim de aumentar a quantidade de material e garantir que a ligação tenha ocorrido na etapa anterior. Esta amplificação foi realizada utilizando-se 5µL da ligação, 3U de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP e 0,4 µM do adaptador Rsa21 como "primer". O seguinte ciclo foi utilizado: 95°C por 4 min, seguido de 20 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, a extensão final foi de 72°C por 8 min.

Após verificação da amplificação em gel de agarose, os produtos da préamplificação foram purificados com o kit "Quiaquick PCR purification kit" (Quiagen), conforme instruções do fabricante.

O processo de enriqueciemento foi realizado através da hibridização de oligonucleotídeos marcados com biotina complementares às seqüências repetitivas AG e AC. Nesta etapa foi utilizado o kit de esferas magnéticas "Strept Magne Sphere 0,6 mL" (Promega). As esferas magnéticas foram lavadas com solução SSC 0,5X ("Standard Saline Citrate" - solução estoque 20X com composição 3 M Cloreto de sódio; 0,3 M Citrato de sódio).

O DNA purificado foi diluído na proporção 1:5 e incubado a 95°C por 15 minutos para promover sua desnaturação.

O enriquecimento com as duas sondas complementares às seqüências repetitivas AG e AC (50 μ M) previamente marcados com biotina, foram adicionados à solução de DNA ligado a adaptadores. Os fragmentos ligados às sondas marcadas com biotina foram recuperados através do uso das esferas magnetizadas recobertas com estreptavidina ("Streptavidin Magne Sphere" -Promega) que foram atraídas por um imã posicionado lateralmente ao tubo em um suporte (Promega). As esferas hibridizadas aos fragmentos de interesse foram ressuspendidas em solução de SSC 0,1X e magnetizadas por 30 s.

23

Amplificação dos fragmentos selecionados via PCR

Estes fragmentos recuperados que devem conter microssatélites foram amplificados por PCR para gerar mais fragmentos, utilizando "primer" Rsa21 complementar às seqüências dos adaptadores e as seguintes condições: 95°C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 94°C por 40s, 60°C por 1 min e 72°C por 2 min, e uma extensão final de 72°C por 5 min.

Clonagem dos fragmentos

Dos produtos desta amplificação, 6 μ L foram ligados a 1 μ L do vetor de clonagem "pGEM-T Easy Vector Systems" (Promega) (figura 6-G) e transformados em células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue através de choque químico com tampão de transformação (KCl 1M, CaCl₂.2H₂O 0,3 M, MgCl₂ 2M e 10% de PEG 6000), adaptado de Sambrock et al 1989. Em seguida, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (50 mg/mL), 60 μ L de IPTG e 60 μ L de X-Gal. As placas foram incubadas invertidas por 18 horas em estufa para crescimento de colônias a 37°C.

Amplificação dos insertos clonados

Com os objetivos de identificar os clones contendo microssatélites e verificar a eficiência do procedimento de enriquecimento e clonagem, realizou-se uma reação de PCR com DNA do clone em cultura permanente, usando 0,5 μ M do adaptador *Rsa*21 como "primer" e a programação do termociclador: 95°C por 4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 45s e 72°C por 1 min e 30 s, e extensão final de 72°C por 8 min.


Figura 6. Esquema da metodologia empregada para a construção da biblioteca de microssatélites de *H. irritans* (A-G), seqüenciamento dos insertos clonados (I), desenho de "primers" (J), otimização das amplificações e verificação de polimorfismo (L-N).

Seqüenciamento, análise das seqüências e desenvolvimento de "primers"

Os clones recombinantes foram selecionados e o DNA plasmidial foi extraído através de minipreparação alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), (figura 7-H). A presença de inserto foi verificada através da digestão dos plasmídios com a endonuclease de restrição *Eco*R I.

Em seguida, os insertos clonados foram seqüenciados no seqüenciador ABI377 utilizando-se aproximadamente 250 ng de DNA, os "primers" universais M13 direto (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3') e M13 reverso (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'), conforme instruções do kit "Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v. 3.1" (Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação foram: um ciclo inicial de 96°C por 1 min e 30 s, 40 ciclos de 96°C por 12 s, 50°C por 6 s e 60°C por 4 s. A reação foi purificada utilizando-se o "kit" QIAquick (Quiagen).

As seqüências foram visualizadas no programa Chromas 2.21 (Technelysium pty Ltd) e alinhadas utilizando-se os programas ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e CodonCode Aligner (CodonCode Co.) para verificação de redundância entre elas.

Os pares de "primers" complementares às seqüências flanqueadoras das regiões de microssatélites foram desenvolvidos utilizando-se o programa Primer3 (Rozen *et al.*, 2000). Foram considerados: um tamanho de 18 a 20 nucleotídeos, uma temperatura de fusão entre 45 a 60°C (diferença de no máximo 2°C entre os oligonucleotídeos de cada par), a presença de C ou G na extremidade 3' em ambos os "primers" do par, um produto de amplificação com tamanho entre 100 a 250 pb e uma composição de C+G superior a 40%.

Uma vez definidos os "primers", as condições iniciais de amplificação foram conforme descrito em Torres *et al.* (2004) e otimizadas para cada par de "primers". As temperaturas de hibridização dos "primers" estão descritas na tabela 2.

Detecção e caracterização do polimorfismo dos locos de microssatélites

As regiões de microssatélites foram amplificadas em termociclador PTC-100 (MJ Research) incluindo um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos contendo uma etapa de desnaturação de 94°C por 45 s; uma etapa de hibridização de "primers" cuja temperatura variou entre 45 e 65°C por 45 s e uma última etapa de extensão a 72°C por 45 s. O ciclo final incluiu uma extensão a 72°C por 30 min. As reações de PCR continham de 5 a 10 ng de DNA, 10 mM Tris-HCl – pH 8,3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl2, 0.5 mg/mL de albumina bovina sérica (BSA), 250 µM de cada dNTP, 0.6 µM de cada oligonucleotídeo e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

Para verificação da reação, os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida 10% sem uréia em cuba modelo V-16 (Gibco BRL/Life Technologies) e tampão TBE 1% (Tris-Borato-EDTA). A visualização foi feita através de coloração com nitrato de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994).

Após esta avaliação preliminar da eficiência da reação, os produtos amplificados foram analisados em gel de acrilamida 6% desnaturante: os produtos de PCR foram acrescidos de tampão de corrida eletroforética desnaturante (10 mM NaOH, 0,05% xilenocianol p/v, 0,05% azul de bromofenol p/v, 10 mM EDTA em solução de formamida) e, em seguida, desnaturados em termociclador PTC-100 por 5 min a 96°C e mantidos em gelo. A eletroforese do gel de acrilamida 6% desnaturante (com 7 M de uréia) foi realizada em aparato de seqüenciamento manual Modelo SA (GibcoBRL Sequencing System – Life Technologies), utilizando tampão TBE 1X com temperatura controlada a 50°C e 45W de potência. Anteriormente à aplicação das amostras, o gel de poliacrilamida foi submetido a uma pré-corrida 55W a 50° por até 2 horas.

Após a coloração e secagem ao ar livre, o gel foi fotografado em câmera digital. A análise dos produtos de PCR foi realizada diretamente no gel seco. Os tamanhos dos alelos foram estimados através da comparação com o tamanho do alelo clonado (controle positivo) e o padrão de peso molecular "DNA Ladder" 10 pb (Invitrogen).

Análises dos dados de microssatélites

Para cada loco de microssatélite, foram estimados o tamanho médio dos produtos de PCR, o número de alelos por loco, a heterozigosidade observada e a esperada. A heterozigosidade esperada não enviesada (Nei, 1978) foi calculada através da seguinte fórmula:

$$H = n/(n-1) [1-(\Sigma q i^2)],$$

Onde n é o número de alelos e qi é a freqüência do alelo na população.

Cada loco foi testado para verificar desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando testes implementares no programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995).

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados através do teste exato de Guo & Thompson (1992) calculados através do algoritmo implementado no programa GENEPOP - versão 1.2 (Raymond & Rousset, 1995), sendo os níveis estatísticos de significância ajustados através de uma correção seqüencial de Bonferroni (Rice, 1989). A correção de Bonferroni é um ajuste estatístico de dados para múltiplas comparações que tem sido amplamente utilizado e tem como conseqüência a redução do erro de tipo I (concluir que são diferentes quando são iguais) por aumentar o valor do *alpha* (α). Uma forma simples de realizar este ajuste, é dividindo o *alpha* aceitável (α =0,05) pelo número de comparações que queremos fazer (n). Logo, para qualquer comparação ser considerada significativa, o valor de P obtido deveria ser menor que valor de P corrigido e não 0,05, quando não se usa a correção. Este ajuste torna mais difíceis as chances de se encontrar um resultado significativo, e diminui a chance de se fazer um erro de tipo I por aumentar os níveis de aceitabilidade.

Resultados

Construção da biblioteca genômica

A eficiência de recuperação de microssatélites da biblioteca genômica de *H*. *irritans* foi verificada através de um alinhamento das seqüências no programa CodonCode Aligner (CodonCode Co.). A ocorrência de redundância, ou seja, a presença de múltiplas seqüências de um mesmo loco foi identificada pela análise do alinhamento das seqüências de microssatélites.

A figura 7 contém um esquema que resume os resultados obtidos através desta análise. Do total de 109 insertos seqüenciados, 103 continham microssatélites. Destes, 73 possuíam microssatélites com mais que sete repetições em série. Das seqüências selecionadas, foram utilizadas 16 para análise e seleção de "primers" para amplificação da região de microssatélites. Pode-se observar que a

eficiência do enriquecimento da biblioteca foi de 67% e a eficiência para identificação de locos de microssatélites potencialmente informativos foi de 22%.



Figura 7. Esquema que demonstra o aproveitamento das seqüências até resultar no número de locos que foram caracterizados neste trabalho.

Em relação aos motivos encontrados nas seqüências que continham microssatélites, a figura 7 ilustra proporções encontradas: 85% dos microssatélites continham motivo $(CA)_n$, os outros 15% continham motivos $(GA)_n$, entre outros, sendo um trinucleotídeo e dois tetranucleotídeos.



Figura 8. Gráfico que demonstra as proporções dos motivos de microssatélites no total de seqüências.

Seleção de "primers" e otimização das reações de PCR

Dezoito pares de "primers" (nomeados como *HI*01 a *HI*18) foram selecionados com base nas regiões flanqueadoras dos microssatélites e avaliados quanto à eficiência de amplificação durante a padronização das condições de PCR.

Dois pares de "primers" foram retirados da análise por que representavam o mesmo loco. Não foi possível padronizar eficientemente a amplificação dos locos HI01 e HI11, portanto estas regiões não foram analisadas (tabela 1). Três locos foram considerados monomórficos:

HI12: (CA)₈, com "primers" D: AAACCACGTGTGCACTTC e R:
 CTTGCAATAGCGAGATCAG, condições de padronização: Ta= 62°C e 1,2 mM
 MgCl₂ e tamanho do alelo de 135 pb.

- *HI*15: (CA)₁₀, com "primers" D: ATACGCTGCTCTTCTTGC e R: CGTATTTCTTTCAATTTTGC, com as mesmas condições de padronização e tamanho do alelo de 151 pb.

- *HI*18: (CA)₁₀, com "primers" D: AACTGAAGCATGCCAAAC e R: AGTGATGGGGGATGTTGTG, mesmas condições dos locos acima e tamanho do alelo de 205 pb.

| Loco | Motivo repetitivo | Seqüência dos "primers" (5'– 3') | | | |
|--------------|--|-------------------------------------|--|--|--|
| <i>HI</i> 01 | (CA) ₁₇ | D: CTACGCATAGAGTCATCATC | | | |
| | | R: CTTTATTACATTGATCGTATGC | | | |
| <i>HI</i> 02 | (CT) ₄ (CA) ₁₀ | D: CTACGCATAGAGTCATCATC | | | |
| | | R: GGCATTTCATTACTGTTTC | | | |
| <i>HI</i> 04 | (GA) ₂₄ | D: GACAGCTCAGCCATCTCG | | | |
| | | R:TCTTGCTTACGCGTGGAC | | | |
| <i>HI</i> 06 | (CA) ₈ | D: TTACGCATAGAGTCATCATC | | | |
| | | R: GGCATTTCATTACTGTTTC | | | |
| <i>HI</i> 11 | (AG) ₈ D: GCGCTGTAAATTCAG R: CCTCAAACATATGTC | D: GCGCTGTAAATTCACCAAG | | | |
| | | R: CCTCAAACATATGTCCTTCG | | | |

Tabela 1: Relação dos locos excluídos das análises por não terem tido êxito na padronização.

Os locos HI01, HI02 e HI06 (tabela 1) referem-se a um Θ mesmo loco. Devido a esta redundância e à dificuldade de padronização dos mesmos, eles foram removidos da análise.

Dentre as dificuldades encontradas no processo de amplificação do conjunto de 40 amostras de *H. irritans* para identificação de polimorfismos, a ausência de amplificação dos alelos de um dado loco ocorreu na análise de alguns indivíduos. O loco *HI*04 (tabela 1) não foi amplificado para mais da metade das amostras e, portanto, foi excluído das análises. Após análise deste loco no programa Microchecker (Van Oosterhout *et al.*, 2004), foi constatada a possibilidade de alelos nulos neste loco, o que é sugerido pelo excesso de homozigotos verificado. Para os locos *HI*05, *HI*16 e *HI*17 não geraram produtos de PCR para, respectivamente, um, dois e cinco indivíduos. Estes locos, entretanto, não foram excluídos das análises (tabela 2), pois o número de amostras que não apresentaram alelos de microssatélite foi baixo em relação ao loco *HI*04. Além disso, esses três locos foram testados no Microchecker e não foi considerada presença de alelos nulos.

Após a otimização das reações de amplificação, foi avaliado o grau de polimorfismo para os locos *HI*03, *HI*05, *HI*07, *HI*08, *HI*09, *HI*10, *HI*13, *HI*14, *HI*16 e *HI*17, conforme pode ser observado na tabela 2.

Para os locos em que foram verificados polimorfismos, foi determinado o número de alelos por loco, o intervalo de tamanho dos alelos, a freqüência de alelos observados (tabelas 2 e 3). Foram calculadas a heterozigosidade observada e a heterozigosidade esperada, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, como descrito na tabela 3.

O número de alelos por loco variou entre 2 e 8, sendo uma média de 4 alelos por loco. A heterozigosidade observada variou entre 0,1500 e 0,6750 e a heterozigosidade esperada foi de 0,1421 a 0,7702 (tabela 3).

Quanto ao teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, os valores P estão associados à hipótese nula ("união aleatória dos gametas") e nível de significância α =0,05.

Os locos HI03, HI05, HI07, HI08, HI09, HI10, HI13, HI14, após correção seqüencial de Bonferroni (Rice, 1989), admitem que estes valores estão dentro do

esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os locos *H1*16 e *H1*17 possuem desvios significativos do equilíbrio esperado de Hardy-Weinberg. . Estes locos foram analisados quanto ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando-se as populações de Candiba/BA e Caraguatatuba/SP separadamente. Desta forma, o loco *H1*16 possui os valores de P iguais a zero para ambas as populações geográficas. Já o loco *H1*17, possui os valores de P iguais a 1,0000 (Candiba/BA) e 0,0782 (Caraguatatuba/SP). Portanto, quando consideradas duas populações, o loco *H1*17 está em equilíbrio de Hardy-Weinberg e o loco *H1*16 mantém-se em desvio pelo esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Podemos observar baixa variabilidade genética nos locos *HI*03, *HI*07 e *HI*09, com valores de heterozigosidade inferiores a 0,5 (tabela 2).

| | Loco | Número de Acesso Genbank | Motivo repetitivo | Ta [MgCl ₂] | Seqüência dos "primers" Cl ₂ (5'- 3') | | Ia |
|---|--------------|--------------------------------|----------------------|-------------------------------|---|---|-------------|
| _ | <i>HI</i> 03 | EF629377 | (CCGT) ₆ | 60°C 1,2mM | D: TCTATCTCCGTCGCCATC R: GCTTGTTTCGTTCGGAAG | 3 | 206- 222 |
| | H105 | EF629378 | (GA) ₂₃ | 60°C 1,2 mM | D: CACACCCACACAGTGG R: CGCGATCCTCAATTCAAC | 8 | 136- 176 |
| | <i>HI</i> 07 | EF629379 | (CA)9 | 62°C 1,2 mM | D: GCAACCGTGGAGGAGTAG R: GGCTCTTTGAAGATGAGTTG | 3 | 210- 218 |
| | <i>HI</i> 08 | EF629380 | (AG)9 | 62°C 1,2 mM | D: AAAACACCCCATCATTGC R: CCTTTGGTTCTGTTGTCTGG | 4 | 168- 173 |
| | <i>HI</i> 09 | EF629381 | (AC) ₈ | 58°C 1,5 mM | D: CTTGTGCCAACATTTTTC R: CAGCTACACTGAATTTATGG | 2 | 156- 158 |
| | <i>HI</i> 10 | EF629382 | (AC)9 | 56°C 1,5 mM | D: GGTTTCACATTATGTTTGG R: CCCGTTTTATGGTAGACAC | 3 | 204- 212 |
| | <i>HI</i> 13 | EF629383 | (CA) ₈ | 56°C 1,5 mM | D:TGTTGAGAAGGAACATCAAC R:TGACAATCTTCGTTTGTTTG | 4 | 182- 192 |
| | <i>HI</i> 14 | EF629384 | (CAA) ₇ | 58°C 1,5 mM | D: CAACTGCAATCAATCAATC R: TGAAAAATCTCTTGTGTTTC | 4 | 204- 214 |
| | <i>HI</i> 16 | EF629385 | (CA) ₈ | 62°C 1,5 mM | D: CGTCTTAAAGGCAACACC R: CTCAGACATCCTGCATCC | 5 | 206- 214 |
| _ | <i>HI</i> 17 | EF629386 | (AG)9 | 58°C 1,5 mM | D: CCATTTCTGGTGGTTGAG R: TCCCCATACGAAATAAACC | 4 | 144- 154 |

Tabela 2. Caracterização dos locos de microssatélites, condições de otimização e análise polimorfismo.

| Lagas | Freqüência | Ца | Цо | Valor P | | |
|-------------|------------|-----------|-------------|---------|--|--|
| LUCUS | alélica | пе | по | | | |
| | 1-0,0625 | | 0,1500 | | | |
| <i>HI03</i> | 2-0,0125 | 0,1421 | | 1,0000 | | |
| | 3-0,9250 | | | | | |
| | 1-0,3974 | | | | | |
| | 2-0,2308 | | | | | |
| | 3-0,0385 | | | | | |
| UI05 | 4-0,0128 | 0.7702 | 0 5807 | 0.0304 | | |
| птоз | 5-0,0897 | 0,7702 | 0,3897 | 0,0304 | | |
| | 6-0,0897 | | | | | |
| | 7-0,0513 | | | | | |
| | 8-0,0897 | | | | | |
| | 1-0,2875 | | 0,4250 | | | |
| <i>HI07</i> | 2-0,6500 | 0,4972 | | 0,2769 | | |
| | 3-0,0625 | | | | | |
| | 1-0,5375 | | 0,6750 | | | |
| 11100 | 2-0,1875 | 0 6 4 1 1 | | 0 1721 | | |
| птио | 3-0,0875 | 0,0411 | | 0,1731 | | |
| | 4-0,1875 | | | | | |
| 11100 | 1-0,2000 | 0 2241 | 0.2500 | 0 1612 | | |
| 11109 | 2-0,8000 | 0,3241 | 0,2300 | 0,1012 | | |
| | 1-0,5750 | | 0,6000 | | | |
| <i>HI10</i> | 2-0,1750 | 0,5835 | | 0,2223 | | |
| | 3-0,2500 | | | | | |
| | 1-0,1875 | | 0,6750 | | | |
| H113 | 2-0,2375 | 0 68 13 | | 0.0815 | | |
| 11115 | 3-0,4750 | 0,0015 | | 0,0815 | | |
| | 4-0,1000 | | . <u></u> . | | | |
| | 1-0,1625 | | 0,6500 | | | |
| HI14 | 2-0,5000 | 0.6402 | | 0 0740 | | |
| 11117 | 3-0,3000 | 0,0402 | | 0,7747 | | |
| | 4-0,0375 | | | | | |
| | 1-0,3816 | | | | | |
| | 2-0,3684 | | | | | |
| H116 | 4-0,0132 | 0,6402 | 0,1579 | 0,0000* | | |
| | 5-0,0263 | | | | | |
| | 3-0,2105 | | | | | |
| | 1-0,3143 | | 0.4000 | | | |
| HI17 | 2-0,0857 | 0 5586 | | 0 0223* | | |
| 1111/ | 3-0,0143 | 0,5500 | 0,4000 | 0,0223 | | |
| | 4-0,5857 | | | | | |

Tabela 3. Caracterização dos locos polimórficos em H. irritans.

N_a= Número de alelos por loco; I_a= intervalo de tamanho de alelos; H_o= heterozigosidade observada; H_e= heterozigosidade esperada. Valor P = teste que verifica a compatibilidade dos dados. Testes exatos para desequilíbrio de ligação foram realizados entre pares de locos (tabela 4). Para este teste, a hipótese nula (Ho) testada foi "genótipos de um loco são independentes dos genótipos de outros locos". Valores de P menores que 0,05 significam que os locos estão em desequilíbrio de ligação. Na tabela 4, testes exatos pelo método de Fisher avaliaram o desequilíbrio de ligação. Para estes cálculos o algoritmo utilizado foi o método da cadeia de Markov ("Dememorization number"= 1000; "number of batches"= 100; "Number of iterations per batch"= 1000). A cadeia de Markov estima o valor exato de P desses testes e gera uma distribuição da probabilidade exata sobre a hipótese nula, que não é afetada por alelos raros ou de pequeno tamanho amostral, baseado em Raymond & Rousset (1995).

Os valores P foram ajustados pela correção seqüencial de Bonferroni. Neste caso (tabela 4), temos 45 comparações par a par e mantivemos α =0,05 de nível de significância. Dividimos α pelo número de testes (n=45) e tivemos um valor de P corrigido igual a 0,0011111. Logo, para qualquer comparação ser considerada significativa, o valor de P obtido deveria ser menor que valor de P corrigido e não 0,05, quando não se usa a correção. Não foi verificado desequilíbrio de ligação entre os pares de locos.

| | H105 | HI07 | H I 0 8 | H109 | HI10 | HI13 | HI14 | HI16 | HI17 |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| H103 | 0,332 0,0014 | 0,675 0,0029 | 0,917 0,0071 | 1,000 0,050 | 0,065 0,0012 | 0,525 0,0019 | 0,454 0,0016 | 0,012* 0,001 | 0,529 0,0021 |
| H105 | - | 0,857 0,005 | 0,114 0,0013 | 0,953 0,010 | 0,441 0,0015 | 0,045* 0,001 | 0,971 0,0125 | 0,743 0,0036 | 0,236 0,0013 |
| HI07 | - | - | 0,992 0,0250 | 0,698 0,0031 | 0,649 0,0028 | 0,476 0,0017 | 0,764 0,0038 | 0,570 0,0023 | 0,607 0,0024 |
| H108 | - | - | - | 0,644 0,0026 | 0,698 0,0033 | 0,389 0,0015 | 0,780 0,0042 | 0,922 0,0083 | 0,558 0,0022 |
| H109 | - | - | - | - | 0,262 0,0014 | 0,865 0,0062 | 0,470 0,0016 | 0,527 0,0020 | 0,474 0,0017 |
| HI10 | - | - | - | - | - | 0,619 0,0025 | 0,855 0,0045 | $0,024* \\ 0,001$ | $0,040*\ 0,001$ |
| HI13 | - | - | - | - | - | - | 0,975 0,0167 | 0,861 0,0055 | 0,002* 0,001 |
| HI14 | - | - | - | - | - | - | - | 0,238 0,0013 | 0,482 0,0018 |
| HI16 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,492 0,0018 |

Tabela 4. Testes exatos para verificação do desequilíbrio de ligação para cada par de loco (método de Fisher).

Para cada par de locos, o valor superior corresponde ao **valor de P** e o valor inferior, ao de **valor de P corrigido**; * indica que o valor de P é menor que 0,05.

Discussão

Isolamento e caracterização de locos de microssatélites

A construção da biblioteca enriquecida em microssatélites é particularmente importante para a mosca-dos-chifres, uma vez que os estudos sobre variabilidade genética em *H. irritans* utilizando marcadores moleculares (isozimas, seqüências de DNAmt, RAPD) acessam baixo grau de variabilidade genética em populações brasileiras desta espécie (Castiglioni-Ruiz *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, *in press*; Castiglioni & Campos Bicudo, 2005). Os marcadores microssatélites são potencialmente importantes para análises genéticas da mosca-dos-chifres. Entretanto, por não haver locos de microssatélites caracterizados para esta espécie no GeneBank, este trabalho é pioneiro para *H. irritans* e, a partir dele, será possível realizar futuramente, uma ampla análise da variabilidade genética e da estrutura de populações naturais deste ectoparasita utilizando estes marcadores.

Com esta estratégia de isolamento, pôde-se observar uma eficiência de enriquecimento de 67% e uma eficiência para obtenção de "primers" de 22%, que corresponde a 16 locos isolados. Este número poderia ser maior se não houvesse sido encontrada redundância entre seqüências.

A ocorrência de um nível basal de redundância é esperada de acordo com a técnica de construção da biblioteca genômica, devido a artefatos de técnica produzidos na etapa de pré-amplificação que ocorre após a ligação dos adaptadores e na etapa de amplificação após a seleção dos fragmentos marcados com biotina (Zane *et al.*, 2002). Porém, uma alta taxa de redundância pode estar associada a aspectos intrínsecos da evolução molecular do genoma desta espécie. A presença de elementos móveis que promovem a dispersão do DNA repetitivo juntamente com suas regiões flanqueadoras foi descrita para Lepidoptera (Zhang, 2004) e sugerida para explicar a origem da redundância observada. Embora seja uma possibilidade, neste trabalho, não foi investigada a presença destes elementos.

Apesar de a biblioteca ter sido enriquecida tanto para motivos CA quanto para motivos GA, este último obteve uma representatividade de apenas 12% contra 87% do primeiro motivo de microssatélies. Isto concorda com os dados de outras espécies, que apresentam que os motivos (CA)_n são predominantes em insetos (Katti *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2004; Torres & Azeredo-Espin, 2005, 2007).

O número de alelos determinado através da observação direta dos géis foi baixo, variando de 2 a 8, com uma média de 5 alelos por loco. Muitas análises similares em número de locos e de indivíduos em outras espécies de dípteros revelaram médias mais altas ou similares como, por exemplo, 8,5 em Musca domestica (Endsley et al., 2002), 9,5 em Anopheles sacharovi (Guillemin et al., 2003), 8,2 em Scathophaga stercoraria (Garner et al., 2000), 6,9 e 7,9 em Cochliomyia hominivorax (Torres et al., 2004; Torres & Azeredo-Espin, 2005 respectivamente), 5,7 em Chrysom ya albiceps (Torres & Azeredo-Espin, no prelo), 5,5 em Lutzomyia longipalpis (Watts et al., 2002), 5,2 em Drosophila melanogaster (England et al., 1996), 4,6 em Lucilia ilustres e 3,5 em Lucilia sericata (Florin & Gyllenstrand, 2002) e 3,4 em Ceratitis capitata (Casey & Burnell, 2001). Uma das prováveis explicações para o número baixo de alelos por loco observado em H. irritans poderia ser o fato de esta espécie ter sido introduzida no Brasil, e que poderia estar associada a uma variabilidade genética reduzida devido a fatores históricos de efeito gargalo seguido de uma expansão populacional e de dispersão ao longo do continente. O número baixo de alelos também foi observado para outras espécies de dípteros introduzidas, como por exemplo, C. capitata (Casey & Burnell, 2001) e Stomoxys calcitrans (Gilles et al., 2004). Porém, esta intrepretação somente poderá ser comprovada futuramente, considerando várias populações de *H. irritans* ao longo da sua distribuição geográfica.

Neste trabalho, para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi possível verificar que os valores de P foram maiores que 0,05 para todos os dez locos polimórficos, exceto *HI*16 e *HI*17 (tabela 3). Isto indica que apenas estes dois locos não estão dentro dos valores esperados pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Estes desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados nos locos *HI*16 e *HI*17 possivelmente estão relacionados à ocorrência de alelos nulos, que resultam de mutações nos sítios de hibridização dos "primers" nas regiões flanqueadoras dos microssatélites. Assim, estas regiões não são conservadas com relação ao conjunto de amostras analisado. A ocorrência de alelos nulos pode comprometer a amplificação de loco afetado e, conseqüentemente, sua aplicação em estudos de genética de populações, sendo que sua presença pode levar à interpretação de que está ocorrendo uma diminuição (ou mesmo ausência) de heterozigotos para um dado loco. A análise de desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg permite a detecção de excesso de homozigotos que pode indicar este fenômeno, ou seja, a presença de alelos nulos.

Entretanto, analisar se os locos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg implica em algumas questões biológicas desta espécie. Os desvios significativos deste teste podem ser explicados por (1) tamanho amostral pequeno, (2) acasalamentos não aleatórios, (3) efeitos de migração, (4) mutação e seleção.

1- No caso da análise com 40 indivíduos, o número de indivíduos analisado é consideravelmente adequado, apesar de representar amostras de duas regiões

geográficas (Candiba/BA e Caraguatatuba/SP) e não duas populações conhecidamente distintas. Todavia, como a mosca-dos-chifres é uma espécie introduzida, a redução da variabilidade genética pode ser considerada devido a fatores históricos de efeito gargalo e subseqüente deriva genética, de acordo com valores apresentados anteriormente para outras espécies de dípteros introduzidos.

2- Em relação a acasalamentos não aleatórios, os processos demográficos e sistemas de acasalamento submetidos a fenômenos como o Efeito Wahlund (subdivisão populacional por isolamento) e endocruzamento também causam déficit de heterozigotos. Porém, neste caso, todos os locos analisados devem apresentar o mesmo padrão de ocorrência de déficit de heterozigotos, o que não ocorreu.

3- No Brasil, a circulação de animais de rebanho é alta entre propriedades rurais de regiões diferentes. Isto pode vir a acarretar uma migração passiva das moscas-dos-chifres através dos animais infestados. Além desta possibilidade, as moscas-dos-chifres são capazes voar por longas distâncias em busca de hospedeiros (Byford *et al.*, 1987; Sheppard, 1994). Esta possibilidade precisa ser avaliada quando for produzido um estudo populacional amplo.

4- No caso de mutação e seleção, os microssatélites são marcadores seletivamente neutros, mas podem estar associados a outros genes que estariam sob pressão de seleção. Como o uso de inseticidas no Brasil tem sido feito de forma indiscriminada, os indivíduos de *H. irritans* podem estar sendo selecionados quanto a genes associados a resistência genética.

Os resultados deste trabalho sugerem a presença de alelos nulos, uma vez que o fenômeno de déficit de heterozigotos não ocorre de forma generalizada, mas caracteriza apenas alguns poucos locos (*HI*16 e *HI*17). Um indício de que pode se tratar de alelos nulos seria que a ocorrência de desvios significativos normalmente afeta um pequeno conjunto de locos. Mas os resultados podem estar conjunturalmente relacionados à pressão de seleção e ao histórico de introdução da espécie *H. irritans* neste continente, o que também explica a baixa riqueza alélica.

Os testes de desequilíbrio de ligação realizados pelo GENEPOP calcularam valores de P menores que 0,05 para os locos marcados com asterisco (*) na tabela 4, o que indicaria que estes estão em desequilíbrio de ligação. Porém, após a correção seqüencial de Bonferroni (Rice, 1989), esta ligação entre tais locos não foi confirmada.

Embora o objetivo deste projeto tenha sido a construção e caracterização da biblioteca enriquecida em microssatélites para *H. irritans*, somente um estudo populacional nesta espécie poderá testar as hipóteses levantadas a partir da caracterização destes marcadores.

Considerações Finais

Apesar da grande importância econômica e veterinária da mosca-dos-chifres no cenário mundial devido ao seu hábito parasita, poucos estudos genéticos foram conduzidos para abordar aspectos da estrutura genética de populações desta espécie. Análises de isozimas, seqüências de DNAmt e RAPD em *H. irritans* indicam baixo grau de variabilidade genética em populações brasileiras desta espécie (Castiglioni-Ruiz *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, *in press*; Castiglioni & Campos Bicudo, 2005). Uma hipótese possível é que isto seja conseqüência de um efeito gargalo ocorrido durante a introdução desta espécie no continente americano. Neste cenário, a introdução da espécie teria sido um evento único.

Os resultados deste trabalho determinaram 10 locos polimórficos, com baixa riqueza alélica e baixos valores de heterozigosidade. A ocorrência de polimorfismo indica que estes marcadores foram eficientes para revelar variabilidade genética a partir deste conjunto de amostras representativo de duas populações brasileiras da mosca-dos-chifres.

Este projeto possibilitou de forma pioneira para *H. irritans* a ampliação do acesso aos estudos sobre variabilidade genética desta espécie através do isolamento e caracterização de marcadores microssatélites.

Estudos populacionais baseados em uma amostragem mais ampla e representativa, incluindo amostras da América do Norte e Central e de outras regiões da América do Sul, poderão contribuir no esclarecimento dos padrões

históricos da introdução desta mosca na América a partir da aplicação dos marcadores microssatélites caracterizados neste trabalho.

Referências Bibliográficas

- ABIEC Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, Relátorio 2005 (http://www.abiec.com.br/estatisticas/13.pdf).
- Agis, M., Schlötterer, C. (2001). Microsatellite variation in natural Drosophila melanogaster populations from New South Wales (Australia) and Tasmania. Molecular Ecology, 10 (5): 1197-1205.
- Aquadro, C.F. (1998). The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in Drosophila melanogaster. Molecular Biology and Evolution, 15 (12): 1751-1760.
- Bachtrog, D., Agis, M., Imhof, M., Schlotterer, C. (2000). Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs - Evidence from Drosophila melanogaster. Molecular Biology and Evolution, 17 (9): 1277-1285.
- Baliraine, F.N., Bonizzoni, M., Guglielmino, C.R., Osir, E.O., Lux, S.A., Mulaa, F.J., Gomulski, L.M., Zheng, L., Quilici, S., Gasperi, G., Malacrida, A.R. (2004).
 Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitis rosa* and *Ceratitis fasciventris* (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology*, 13: 683-695.
- **Barros,** T. (2001). Dynamics of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) infestation on Nelore Cattle in the Pantanal, Brazil. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(4): 445-450.

- **Billote**, N., Lagoda, P.J.L., Risterucci, A-M, Baurens, F-C. (1999). Microsatelliteenriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54: 277-288.
- Bonizzoni, M., Katsoyannos, B.I., Marguerie, R., Guglielmino, C.R., Gasperi, G.,
 Malacrida, A. and Chapman, T. (2002). Microsatellite analysis reveals
 remating by wild Mediterranean fruit fly females, Ceratitis capitata. *Molecular Ecology*, 11 (10): 1915–1921.
- Bonizzoni, M., Malacrida, A.R., Guglielmino, C.R., Gomulski, L.M., Gasperi, G., Zheng, L. (2000). Microsatellite polymorphism in the Mediterranean fruit fly, Ceratitis capitata. *Insect Molecular Biology*, 9(3):251-61.
- Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Huhne, J., Rolf, B. (1998). Mutation rate in human microsatellites: Influence of the structure and length of the tandem repeat. *American Journal of Human Genetics*, 62 (6): 1408-1415.
- **Byford**, R.L., Craig, M.E., Crosby, B.L. (1992). A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *Journal of Animal Science*, 70 (2): 597-602.
- **Byford**, R.L., Lockwood, J.A., Smith, S.M., Sparks, T.C., Luther, D.G. (1987). Insecticide mixtures as an approach to the management of pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 80: 111-116.
- **Calabrese**, P.P., Durrett, R.T., Aquadro, C.F. (2001). Dynamics of microsatellite divergence under stepwise mutation and proportional slippage/point mutation models. *Genetics*, 159 (2): 839-852.

- **Campbell**, J.B. & Thomas, G.D. (1992). The History, biology, economics and control of the horn fly, *Haematobia irritans*. *Agri-Practice*, v.13, n.4.
- Casey, D.G., Burnell, A.M. (2001). The isolation of microsatellite loci in the Mediterranean fruitfly Ceratitis capitata (Diptera : Tephritidae) using a biotin/streptavidin enrichment technique. *Molecular Ecology Notes*, 1 (3): 120-122.
- **Castiglioni**, L., Bicudo, H.E.M.D. (2005). Molecular characterization and relatedness of *Haematobia irritans* (horn fly) populations, by RAPD-PCR *Genetica*, 124 (1): 11-21.

Castiglioni-Ruiz, L., BICUDO, H.E.M.C.; CERON, C.R. Esterase patterns in four Brazilian populations of Haematobia irritans. *Cytobios*, 90: 81-94.

- **Chambers**, G.K., MacAvoy, E.S. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, B126, 455–476.
- Chakrabarti, S., Kambhampati, S., Grace, T., Zurek, L. (2004). Characterization of microsatellite loci of the house fly, *Musca domestica*. *Molecular Ecology Notes* 4: 728-730.
- Chakrabarty, R., Kimmel, M., Stivers, D.N., Davison, L.J., Deka, R. (1997). Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellites loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 94: 1041-1046.

- **Cohuet**, A., Dia, I., Simard, F., Raymond, M., Fontenille, D. (2004). Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data. *Insect Molecular Biology*, 13 (3): 251-258.
- **Crow**, J.F. (1993). How much do we know about spontaneous human mutationrates. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 21 (2): 122-129.
- **Donnelly**, M.J., Licht, M.C., Lehmann, T. (2001). Evidence for recent population expansion in the evolutionary history of the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Molecular Biology and Evolution*. 18(7): 1353-64.
- **Donnelly**, M.J., Townson, H. (2000). Evidence for extensive genetic differentiation among populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Eastern Africa. *Insect Molecular Biology*. 9(4): 357-367.
- Dumas, V., Herder, S., Bebba, A., Cadoux-Barnabe, C., Bellec, C., Cuny, G. (1998). Polymorphic microsatellites in *Simulium damnosum* s.l. and their use for differentiating two savannah populations: implications for epidemiological studies. *Genome*, 41 (2): 154-161.
- Ellegren, H. (2000). Heterogeneous mutation processes in human microsatellites DNA sequences. *Nature Genetics*, 24: 400-402.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews. Genetics*, 5: 435-445.

- Endsley, M.A., Baker, M.D., Krafsur, E.S. (2002). Microsatellite loci in the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera : Muscidae). *Molecular Ecology Notes*, 2 (1): 72-74.
- **England,** P.R., Briscoe, D.A., Frankham, R. (1996). Microsatellite polymorphisms in a wild population of Drosophila melanogaster. *Genetical Research*, 67 (3): 285-290.
- Florin, A.B. & Gyllenstrand, N. (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the blowflies *Lucilia illustris* and *Lucilia sericata*. *Molecular Ecology Notes*, 2 (2): 113-116.
- Fonseca, D.M., Keyghobadi, N., Malcolm, C.A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., Fleischer, R.C., Wilkerson, R.C. (2004). Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science*, 303(5663):1535-1538.
- Fonseca, D.M., LaPointe, D.A., Fleischer, R.C. (2000). Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. *Molecular Ecology*, 9 (11): 1803-1814.
- Garner, T.W.J., Brinkmann, H., Gerlach, G., Meyer, A., Ward, P.I., Sporri, M., Hosken, D.J. (2000). Polymorphic DNA microsatellites identified in the yellow dung fly (Scathophaga stercoraria). *Molecular Ecology*, 9 (12): 2207-2208.
- Gilles, J., Litrico, I., Sourrouille, P., Duvallet, G. (2004). Microsatellite DNA markers for the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae). *Molecular Ecology Notes*, 4 (4): 635-637.

- Gilles, J., Litricot, I., Duvallet, G. (2005). Microsatellite loci in the stable fly, *Stomoxys niger niger* (Diptera : Muscidae) on La Reunion Island. *Molecular Ecology Notes*, 5 (1): 93-95.
- Goldstein, D.B. & Shlötterer, C. (1999). Microsatellites: Evolution and Aplications. Oxford University. Press Oxford.
- Goldstein, D.B., Clark, A.G. (1995). Microsatellite variation in north-american populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, 23 (19): 3882-3886.
- Gomes, I., Collins, A., Lonjou, C., Thomas, N. S., Wilkinson, J. (1999). Hardy-Weinberg quality control. *Annals of Human Genetics*, 63: 535–538.
- Grover, A., Sharma, P. C. (2007). Microsatellite motifs with moderate GC content are clustered around genes on Arabidopsis thaliana chromosome 2. In Silico Biology 7, 0021 (2007); © 2007, Bioinformation Systems e.V.
- Guglielmone, A.A.; Anziani, O.S., Mangold, A.J., Giorgi, R.E., Volpogni, M.M., Flores, S.G. (1997). Seasonal variation of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in a recently infested region of central Argentina. *Bulletin of Entomological Research*, London, v.87, p.55-59.
- Guillemin, M.L., Severini, C., Berthomieu, A., Raymond, M., Weill, M. (2003). Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector Anopheles sacharovi. *Moleculat Ecology Notes*, 3 (3): 338-340.

- Guo, S.W., Thompson, E.A. (1992). Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hancock, J.M., Dover, G.A. (1990). Compensatory slippage in the evolution of ribosomal RNA genes. Nucleic Acids Research, 18: 5949-5954.
- Harris, R.L., Miller, J.A., Frazar, E.D. (1974). Hornflies and stableflies feeding activity. *Annual Entomology Society of America*, 67: 891-8944.
- Honer, M.R. Bianchin, I. & Gomes, A. (1991). A mosca-dos-chifres: história,
 biologia e controle. *Documentos 45, Embrapa-CNPGC*, Campo Grande, MS.
 34p.
- Honer, M.R. (1990). *H. irritans* ecologia, importância, e controle no Brasil. Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, 7p. (Resumo Seminário Datilografado).
- Huber, K., Le Loan, L., Hoang, T.H., Hoang, T.H., Ravel, S., Rodhain, F., Failloux,
 A.B. (2002). Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho
 Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. *Molecular Ecology*,11
 (9): 1629-1635.
- Hutter, C.M., Schug, M.D., Aquadro, C.F. (1998). Microsatellite variation in Drosophila melanogaster and Drosophila simulans: a reciprocal test of the ascertainment bias hypotesis. Molecular Ecology and Evolution. 15: 1620-1638.

- Infante-Vargas, M.E., Espin, A.M.L. (1995). Genetic-variability in mitochondrial-DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil, *Biochemical Genetics*, 33 (7-8): 237-256.
- Irvin, S.D., Wetterstrand, K.A., Hutter, C.M., Aquadro, C.F. (1998). Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *Drosophila simulans*: Evidence for founder effects in new world populations. *Genetics*, 150 (2): 777-790.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11 (10): 424-429.
- Jin, L., Macaubas, C., Hallmayer, J., Kimura, A., Mignot, E. (1996). Mutation rates varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 93: 15285-15288.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., Karp, A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3 (5): 381-390.
- Katti, M.V., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S. (2001). Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (7): 1161-1167.

- Kayondo, J.K., Mukwaya, L.G., Stump, A., Michel, A.P., Coulibaly, M.B., Besansky,
 N.J., Collins, F.H. (2005). Genetic structure of *Anopheles gambiae*populations on islands in northwestern Lake Victoria, Uganda. *Malaria Journal*, 9;4:59.
- **Krafsur**, E.S. (2002).Population structure of the tsetse fly *Glossina pallidipes* estimated by allozyme, microsatellite and mitochondrial gene diversities. *Insect Molecular Biology*, 11 (1): 37-45.
- Krafsur, E.S., Cummings, M.A., Endsley, M.A., Marquez, J.G., Nason, J.D. (2005). Geographic differentiation in the house fly estimated by microsatellite and mitochondrial variation. *Journal of Heredity*, 96 (5): 502-512.
- Krafsur, E.S., Endsley, M.A. (2002). Microsatellite diversities and gene flow in the tsetse fly, *Glossina morsitans* s.l. *Medical and Veterinary Entomology*, 16 (3): 292-300.
- Krafsur, E.S., Endsley, M.A., Wohlford, D.L., Griffiths, N.T., Allsopp, R. (2001). Genetic differentiation of *Glossina morsitans* centralis populations. *Insect Molecular Biology*, 10 (4): 387-395.
- Kruglyak, S., Durrett, R., Schug, M. D., Aquadro, C. F. (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95: 10774-10778.

- Kunz, S.E., Murrel, K.D., Lambert, G., James, L.F., Terrill, C.E. (1991). Estimated losses of livestock to pests, In D. Pimentel [ed.], CRC Handbook of Pest Management in Agriculture, vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 69-98.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants. *Nucleic Acids Research*, 21: 1111-1115.
- Lanzaro, G.C., Toure, Y.T., Carnahan, J., Zheng, L.B., Dolo, G., Traore, S., Petrarca, V., Vernick, K.D., Taylor, C.E. (1998). Complexities in the genetic structure of Anopheles gambiae populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95 (24): 14260-14265.
- Lanzaro, G.C., Zheng, L., Toure, Y.T., Traore, S.F., Kafatos, F.C., Vernick, K.D. (1995). Microsatellite DNA and isozyme variability in a west-african population of *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 4 (2): 105-112.
- Levinson, G., Gutman, G.A. (1987). Slipped-strand mispairing a major mechanism for dna-sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (3): 203-221.
- Mendes, J., Linhares, A.X. (1999). Diapause, pupation sites and parasitism of the horn fly, *Haematobia irritans*, in south-eastern Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, 13 (2): 185-190.
- Meixner, M. D., McPheron, B. A., Silva, J. G., Gasparich, G. E., Sheppard, S. (2002). TheMediterraneanfruitßyin California: evidence for multiple

introductions and persistent populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. Molecular Ecology, 11: 891-899.

- Mirol, P.M., Schafer, M.A., Orsini, L., Routtu, J., Schlotterer, C., Hoikkala, A., Butlin, R.K. (2007). Phylogeographic patterns in Drosophila montana. *Molecular Ecology*, 16(5): 1085-1097.
- Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, 3(1):175-182.
- Murray, B.W. (1996). The Estimation of Genetic Distance and Population Substructure from Microsatellite allele frequency data. Available from: helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html
- **Nei**, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583–590.
- Noor, M.A.F., Pascual, M., Smith, K.R. (2000). Genetic variation in the spread of Drosophila subobscura from a nonequilibrium population. Evolution, 54 (2): 696-703.
- Noor, M.A.F., Schug, M.D., Aquadro, C.F. (2000). Microsatellite variation in populations of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. *Genetical Research*, 75 (1): 25-35.
- Norris, D.E., Shurtleff, A.C., Toure, Y.T., Lanzaro, G.C. (2001). Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of

Anopheles gambiae s.s. (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, 38 (2): 336-340.

- Oliveira, M.T. ; Azeredo-ESPIN, A. M. L. ; Lessinger, A. C. (2007) . The Mitochondrial DNA Control Region of Muscidae Flies: Evolution and Structural Conservation in a Dipteran Context. Journal of Molecular Evolution, 64, 519-527.
- **Oliveira**, M.T., Da Rosa, A.C., Azeredo-Espin, A.M.L., Lessinger, A.C. (2006). Improving access to the control region and tRNA gene clusters of Dipteran mitochondrial DNA. *Journal of Medical Entomology*, 43 (3): 636-639.
- Oliveira, M.T., De Azeredo-Espin, A.M.L., Lessinger, A.C. (2005). Evolutionary and structural analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene from *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) mitochondrial DNA. DNA Sequence, 16 (2): 156-160.
- **Ouma,** J.O., Marquez, J.G., Krafsur, E.S. (2007). Patterns of genetic diversity and differentiation in the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* Westwood populations in East and southern Africa. *Genetica*, 130(2): 139-151.
- **Ouma**, J.O., Marquez, J.G., Krafsur, E.S. (2006). New polymorphic microsatellites in *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae) and their cross-amplification in other tsetse fly taxa. *Biochemical Genetics*, 44 (9-10): 471-477.

- **Ouma**, J.O., Cummings, M.A., Jones, K.C., Krafsur, E.S. (2003). Characterization of microsatellite markers in the tsetse fly, *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae). *Molecular Ecology Notes*, 3 (3): 450-453.
- Paetkau, D. (2003). An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. Molecular Ecology 12:1375–1387.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C., Fuerst, P.A. (1998). What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Molecular Ecology*, 79 (2): 361-382.
- Pinto, J., Donnelly, M.J., Sousa, C.A., Gil, V., Ferreira, C., Elissa, N., Do Rosario, V.E., Charlwood, J.D. (2002). Genetic structure of *Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae) in Sao Tome and Principe (West Africa): implications for malaria control. *Molecular Ecology*, 11 (10): 2183-2187.
- Prasad, M.D., Muthulakshmi, M., Madhu. M., Archak, S., Mita, K., Nagaraju, J.. (2005). Survey and analysis of microsatellites in the silkworm, Bombyx mori: frequency, distribution, mutations, marker potential and their conservation in heterologous species. *Genetics*, 169(1): 197-214.
- PPM, Produção Pecuária Municipal, http:// www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia =759
- Ravel, S., Herve, J.P., Diarrassouba, S., Kone, A., Cuny, G. (2002). Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae)

from Cote d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouake. *Acta Tropica*, 82 (1): 39-49.

- Ravel, S., Monteny, N., Olmos, D.V., Verdugo, J.E., Cuny, G. (2001). A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. *Acta Tropica*, 78 (3): 241-250.
- **Raymond**, M.L. and Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation *Evolution*, 49: 1280-1283.
- Rice, W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. Evolution, 43: 223-225.
- **Riley**, C.V. The horn-fly. *Insect Life*, 2: 93-103, 1889.
- Rodrigues, F.M., Telles, M.P., Resende, L.V., Soares, T.N., Diniz-Filho, J.A., Jacomo, A.T., Silveira, L. (2006). Transferability of short tandem repeat markers for two wild Canid species inhabiting the Brazilian Cerrado. *Genetic Molecular Research*, 5(4): 846-50.
- Roth, T., Pfeiffer, I., Weising, K., Brenig, B. (2006). Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of European bison (*Bison* bonasus). Journal of Animal Breeding Genetic, 123(6): 406-409.
- Rouse, John E. 1977 The Criollo: Spanish Cattle in the Americas. Norman: University of Oklahoma Press.
- Rozen, S. & Skaletsky, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics*

Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.; Hrsg. (1989). Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Habour Laboratory Press, New York.
- Sanguinetti, C.J., Neto, E.D., Simpson, A.J.G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17 (5): 914.
- Schafer, M.A., Orsini, L., McAllister, B.F., Schlotterer, C. (2006). Patterns of microsatellite variation through a transition zone of a chromosomal cline in Drosophila americana. Heredity. 97 (4): 291-295.
- Schlötterer, C. & Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research. 20: 211-215.
- Schlötterer, C., Ritter, R., Harr, B. Brem, G. (1998). High mutation rates of a long microsatellites allele in *Drosophila melanogaster* proveides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1269-1274.
- Schiffer, M., Kennington, W.J., Hoffmann, A.A., Blacket, M.J. (2007). Lack of genetic structure among ecologically adapted populations of an Australian rainforest *Drosophila* species as indicated by microsatellite markers and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, 16(8): 1687-1700.
- Schofl, G. and Schlotterer, C. (2004). Patterns of Microsatellite Variability Among X Chromosomes and Autosomes Indicate a High Frequency of Beneficial Mutations in Non-African D. simulans. *Molecular Biology Evolution*, 21(7): 1384 1390.
- Schug, M.D., Mackay, T.F.C., Aquadro, C.F. (1997). Low mutation rates of microsatellites in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, 15: 99-102.
- Schug, M.D., Hutter, C.M., Wetterstrand, K.A., Gaudette, M.S., Mackay, T.F.C., Aquadro, C.F. (1998). The mutation rates of di-, tri-, and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 15(12): 1751-1760.
- Shearman, D.C.A., Gilchrist, A.S., Crisafulli, D., Graham, G., Lange, C. (2006). Microsatellite markers for the pest fuit fly, *Bactrocera papayae* (Diptera: Tephritidae) and other *Bactrocera* species. *Molecular Ecology Notes*, 6: 4-7.
- Sheppard, D. C. (1994). Dispersal of wild-captured, marked horn flies (Diptera: Muscidae). Environmental Entomology, 23: 29-34.
- Shinde, D., Lai, Y.L., Sun, F.Z., Arnheim, N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. Nucleic Acids Research, 1(3): 974-980.
- Shriver, M.D., Jin, L., Chakraborty, R., Boerwinkle, E. (1993). A novel measure of genetic-distance for highly polymorphic tandem repeat loci. American Journal of Human Genetics, 53 (3): 860-860 Suppl. S.

- Simard, F., Lehmann, T., Lemasson, J.J., Diatta, M., Fontenille, D. (2000). Persistence of Anopheles arabiensis during the severe dry season conditions in Senegal: an indirect approach using microsatellite loci. Insect Molecular Biology, 9 (5): 467-479.
- Slotman, M.A., Tripet, F., Cornel, A.J., Meneses, C.R., Lee, Y., Reimer, L.J., Thiemann, T.C., Fondjo, E., Fofaza, A., Traore, S.F., Lanzaro, G.C. (2007). Evidence for subdivision within the M molecular form of Anopheles gambiae. Molecular Ecology, 16(3): 639-649.
- Solano, P., de La Rocque, S., de Meeus, T., Cuny, G., Duvallet, G., Cuisance, D. (2000). Microsatellite DNA markers reveal genetic differentiation among populations of *Glossina palpalis gambiensis* collected in the agro-pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. *Insect Molecular Biology*, 9 (4): 433-439.
- Solano, P., Duvallet, G., Dumas, V., Cuisance, D., Cuny, G., Toure, S.M. (1998).
 Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* gambiensis (Diptera: Glossinidae). Annals of the New York Academy of Sciences, 849: 39-43.
- Stephan, W. & Cho, S. (1994). Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics*, 136(1): 333-341.
- Strauss, B. S. (1999). Frameshift mutation, microsatellites and mismatch repair. Mutation Research, 437:195-203.

- Tautz, D. (1993). Notes on definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *In:* Pena, D.J., Chakraborty, R., Epplen, T.J., Jeffreys, A.J. (eds.). DNA fingerprinting: State of the Science. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 21-28.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic dna markers. *Nucleic Acids Research* 17 (16): 6463-6471.
- Temu, E.A. & Yan, G. (2005). Microsatellite and mitochondrial genetic differentiation of Anopheles arabiensis (Diptera: Culicidae) from western Kenya, the Great Rift Valley, and coastal Kenya. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 73(4): 726-733.
- Temu, E.A., Hunt, R.H., Coetzee, M. (2004). Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity in the malaria vector mosquito Anopheles funestus (Diptera: Culicidae) in east and southern Africa. Acta Tropica, 90(1):39-49.
- **Thompson**, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Torres, T.T., Brondani, R.P.V., Garcia, J.E., Azeredo-Espin, A.M.L. (2004). Isolation and characterization of microsatellite markers in the new world screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera : Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes* 4 (2): 182-184.

- Torres, T.T., Azeredo-Espin, A.M.L. (2005). Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes*, 5 (4): 815-817.
- Torres, T.T., Azeredo-Espin, A.M.L. (2007). Characterization of polymorphic microsatellite markers for the blowfly *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes*, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01926.x.
- Valério, J.R.; Guimarães, J.R. (1983). Sobre a ocorrência de uma nova praga, Haematobia irritans (L.) (Diptera, Muscidae) no Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, São Paulo, 417-418.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535–538.
- Venkatesan, M., Westbrook, C.J., Hauer, M.C., Rasgon, J.L. (2007). Evidence for a Population Expansion in the West Nile Virus Vector *Culex tarsalis*. Molecular Biology and Evolution, 24 (5):1208-1218
- Watts, P.C., Daly, D., Kayani, A., Culver, F.A., Kelly, V.M., Parker, G.A., Kemp, S.J. (2005). Trinucleotide microsatellite loci in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* (Diptera: Scathophagidae). *Molecular Ecology Notes*, 5 (1): 30-32.

- Watts, P.C., Boyland, E., Noyes, H.A., Maingon, R., Kemp, S.J. (2002). Polymorphic dinucleotide microsatellite loci in the sandfly Lutzomyia longipalpis (Diptera : Phlebotominae). *Molecular Ecology Notes*, 2 (1): 62-64.
- Weber, J.L., Wong, C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human* Molecular Genetics, 2 (8): 1123-1128.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- **Zhang**, D.X. (2004). Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends in Ecology and Evolution*, 19:507–509.

Anexo

A seguir está apresentado um artigo científico decorrente deste trabalho e aborda o isolamento de locos de microssatélites, as padronizações das reações para os pares de "primers" desenvolvidos e as caracterizações dos locos polimórficos para a espécie *H. Irritans*, submetido para publicação na *Molecular Ecology Notes* (código de acesso 07/444).

Resumo

A mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), é um ectoparasita de rebanhos que tem causado um grande impacto negativo no setor pecuário em todo o mundo. Neste trabalho, descrevemos dez locos polimórficos isolados de *H. irritans*. O número de alelos encontrado variou de dois a oito por loco e a heterozigosidade esperada de 0,1421 a 0,7702. Estes locos são potencialmente úteis para caracterização genética em fina-escala para populações de mosca-dos-chifres e fornecem informações fundamentais para o manejo desta espécie e para implementação de programas de controle.

Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae)

ALINE COELHO DA ROSA, ANA CLÁUDIA LESSINGER, ANA MARIA LIMA DE AZEREDO-ESPIN AND TATIANA TEIXEIRA TORRES

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

Abstract

The horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), is a cosmopolitan livestock pest that has caused a great negative impact on the animal production sector throughout the world. Here, we describe ten polymorphic microsatellite loci isolated from *H. irritans*. The number of alleles found ranged from two to eight per locus and the expected heterozigosity from 0.1421 to 0.7702. These loci are potentially useful for the fine-scale genetic characterization of horn fly populations and provide fundamental information for pest management and planning of control programs.

Keywords: Molecular markers, Population genetics, livestock pests, insect pest control

The horn fly, Haematobia irritans L. (Diptera: Muscidae), is one of the major ectoparasites of herds. This pest represents a serious threat to cattle breeding in many countries where it is an important economical activity. Severe economic losses result from the reduction of cattle weight and milk production, due to blood-sucking habit of adult flies and from the longterm investments in insecticides and other insect-control methods. The horn fly is distributed worldwide, except for Australia and Southern Asia, where the buffalo fly (H. irritans exigua) is found instead. Current research on horn flies has focused on the basis of resistance to insecticides (Byford et al. 1999), on the molecular characterization of specific mitochondrial DNA regions and conserved primers (Oliveira et al. 2005; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., in press) and on a preliminary survey of polymorphisms by the analysis of RAPD markers (Castiglioni & Campos Bicudo 2005). However, despite its importance as a livestock pest and its great economic impact, no study aiming the finescale characterization of populations has been conducted so far. In order to address this issue, we developed a set of microsatellite markers as a part of a broader project that studies different aspects of H. irritans genetics.

Cloning and characterization of microsatellite sequences followed procedures described by Torres and Azeredo-Espin (2005). Briefly, genomic DNA was extracted using the "PuregeneTM DNA Purification System" kit (Gentra Systems) and digested with *Rsa* I. Blunt-ended DNA fragments were linked to specific

oligonucleotide adapters. The library enrichment was performed using dinucleotide (CA/GT and CT/GA) biotin-labelled microsatellite oligoprobes and streptavidin-coated magnetic beads. The sequence of cloned inserts was obtained using an ABI PRISM Terminator Cycle sequencing kit and an ABI 377 Automated Sequencer (Applied Biosystems, CA).

Out of 109 analyzed sequences, 73 contained a microsatellite with more than seven repeats. From these, a total of 16 were used to design primer pairs complementary to sequences flanking the microsatellites with the PRIMER 3 software (Rozen & Skaletsky 1998).

Polymorphism was assessed using 40 individuals of H. irritans from two sampling sites in Brazil, Candiba/BA and Caraguatatuba/SP. DNA was extracted using the phenol-chloroform method described by Infante-Vargas and Azeredo-Espin (1995). PCR amplifications were carried out using 10 ng of DNA sample in 13 µL reactions containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.5 mg of BSA/mL, 20 µM of each dNTP, 0.6 nM of each primer, and 1 U of Taq polymerase (Invitrogen) and DNA different concentrations of MgCl₂, as shown in table 1. PCR amplifications were performed using a PTC-100 thermal cycler (MJ Research), with an initial denaturation of 3 min at 96°C, 35 cycles of 94°C for 45 s, a primer-specific annealing temperature for 45 s (Table 1), and 72 °C for 45 s followed by a final elongation at 72 °C for 30 min. The PCR products were

| Fable 1. Genetic characterization of the | e polymorphic | c microsatellite | loci isolated from H. irritans. |
|---|---------------|------------------|---------------------------------|
|---|---------------|------------------|---------------------------------|

| Locus | Genbank accession no. | Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$ | T _a (°C) [MgCl ₂] | No. of individuals scored | Repeat motif in the cloned allele | Size of the cloned allele (bp) | Allele size range (bp) | No. of alleles | Ho | H_E |
|-------|--------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------------|---|--------------------------------------|------------------------------|----------------|--------|---------|
| HI03 | EF629377 | F: TCTATCTCCGTCGCCATC | 60°C | 40 | (CCGT) ₆ | 222 | 206-222 | 3 | 0.1500 | 0.1421 |
| | | R: GCTTGTTTCGTTCGGAAG | 1.2mM | | | | | | | |
| HI05 | EF629378 | F: CACACCCACACAGTGG | 60°C | 39 | (GA) ₂₃ | 164 | 136-176 | 8 | 0.5897 | 0.7702 |
| | | R: CGCGATCCTCAATTCAAC | 1.2 mM | | | | | | | |
| HI07 | EF629379 | F: GCAACCGTGGAGGAGTAG | 62°C | 40 | (CA) ₉ | 214 | 210-218 | 3 | 0.4250 | 0.4972 |
| | | R: GGCTCTTTGAAGATGAGTTG | 1.2 mM | | | | | | | |
| HI08 | EF629380 | F: AAAACACCCCATCATTGC | 62°C | 40 | (AG) ₉ | 171 | 168-173 | 4 | 0.6750 | 0.6411 |
| | | R: CCTTTGGTTCTGTTGTCTGG | 1.2 mM | | | | | | | |
| HI09 | EF629381 | F: CTTGTGCCAACATTTTTC | 58°C | 40 | (AC) ₈ | 158 | 156-158 | 2 | 0,2500 | 0,3241 |
| | | R: CAGCTACACTGAATTTATGG | 1.5 mM | | | | | | | |
| HI10 | EF629382 | F: GGTTTCACATTATGTTTGG | 56°C | 40 | (AC) ₉ | 146 | 204-212 | 3 | 0.6000 | 0.5835 |
| | | R: CCCGTTTTATGGTAGACAC | 1.5 mM | | | | | | | |
| HI13 | EF629383 | F:TGTTGAGAAGGAACATCAAC | 56°C | 40 | $(CA)_8$ | 184 | 182-192 | 4 | 0.6750 | 0.6813 |
| | | R:TGACAATCTTCGTTTGTTTG | 1.5 mM | | | | | | | |
| HI14 | EF629384 | F: CAACTGCAATCAATCAATC | 58°C | 40 | (CAA) ₇ | 208 | 204-214 | 4 | 0.6500 | 0.6402 |
| | | R: TGAAAAATCTCTTGTGTTTC | 1.5 mM | | | | | | | |
| HI16 | EF629385 | F: CGTCTTAAAGGCAACACC | 62°C | 38 | $(CA)_8$ | 206 | 206-214 | 5 | 0.1579 | 0.6402* |
| | | R: CTCAGACATCCTGCATCC | 1.5 mM | | | | | | | |
| HI17 | EF629386 | F: CCATTTCTGGTGGTTGAG | 58°C | 35 | (AG) ₉ | 240 | 144-154 | 4 | 0.4000 | 0.5586* |
| | | R: TCCCCATACGAAATAAACC | 1.5 mM | | | | | | | |

 T_a = Annealing temperature; [MgCl₂] = Magnesium chloride concentration; H_O = observed heterozygosity; H_E = expected heterozygosity.

analyzed on denaturing 6% polyacrylamide sequencing gels followed by silver staining using methods of Creste *et al.* (2001).

Polymorphism was assessed using 40 individuals of H. irritans from two sampling sites in Brazil, Candiba/BA and Caraguatatuba/SP. DNA was extracted using the phenol-chloroform method described by Infante-Vargas and Azeredo-Espin (1995). PCR amplifications were carried out using 10 ng of DNA sample in 13 µL reactions containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.5 mg of BSA/mL, 20 µM of each dNTP, 0.6 nM of each primer, and 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen) and different concentrations of MgCl₂, as shown in table 1. PCR amplifications were performed using a PTC-100 thermal cycler (MJ Research), with an initial denaturation of 3 min at 96°C, 35 cycles of 94°C for 45 s, a primer-specific annealing temperature for 45 s (Table 1), and 72 °C for 45 s followed by a final elongation at 72 °C for 30 min. The PCR products were analyzed on denaturing 6% polyacrylamide sequencing gels followed by silver staining using methods of Creste et al. (2001). Eleven from the 16 loci analyzed were polymorphic (Table 1). Each polymorphic locus was tested for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium expectations using exact tests implemented in GENEPOP (Raymond & Rousset 1995). Genotypic disequilibrium between pairs of loci was also calculated using GENEPOP. *P*-values for multiple tests were corrected using the sequential Bonferroni procedure (Rice 1989).

The number of alleles per locus ranged from two to eight, with an average of four alleles per locus. The observed heterozygosity ranged from 0.1500 to 0.6750, with a mean value of 0.4125, and the expected heterozygosity from 0.1421 to 0.7702 (mean 0.4562). This low level of genetic variability may reflect the bottleneck effect associated with the introduction of this species in the American continent. Alternatively, insecticides used against H. irritans could be implicated in selection pressure imposed by widespread use. After sequencial Bonferroni correction, significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was found for H116 and H117. These significant heterozygous deficits may have been caused by the presence of null alleles at these loci. No linkage disequilibrium was observed between pairs of loci after correction for multiple tests.

The 10 microsatellite loci described here are potentially useful for the characterization of *H. irritans*

populations by providing fundamental insights into population dynamics and genetic structure. This will be of particular interest to generate the baseline data for the planning and implementation of pest control programs.

Acknowledgments

We thank Rosangela Rodrigues and Alessandra Staffocker for technical assistance. This work was supported by grants to AMLAE from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant 03/01456-9 and 05/55033-4). ACR was supported by CNPq (grant 131093/2005-3).

References

- Byford RL, Craig ME, DeRouen SM, Kimball MD, Morrison DG, Wyatt WE, Foil LD (1999) Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). International Journal of Parasitology, 29(1), 125-135.
- Castiglioni L, de Campos Bicudo HE (2005) Molecular characterization and relatedness of *Haematobia irritans* (horn fly) populations, by RAPD-PCR. Genetica, 124(1), 11-21.
- Castro E, Gil A, Solari MA, Farias NA (2005) Validation of a subjective counting method for a horn flies (*Haematobia irritans irritans*) (Diptera: Muscidae) population in a cattle herd. Veterinary Parasitology, 5, 133(4), 363-367.
- Creste S, Neto AT, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Molecular Biology Reporter, 19 (4), 299-306.
- Infante-Vargas, ME & Azeredo-Espin, AML (1995) Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochiomyia hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), from Brazil. Biochimical Genetics, 33, 737-756.

- Oliveira MT ; Azeredo-ESPIN, AML; LESSINGER, AC. (2007). The Mitochondrial DNA Control Region of Muscidae Flies: Evolution and Structural Conservation in a Dipteran Context. Journal of Molecular Evolution, 64, 519-527.
- Oliveira MT, Da Rosa AC, Azeredo-Espin AML, Lessinger, A.C. (2006). Improving access to the control region and tRNA gene clusters of Dipteran mitochondrial DNA. *Journal of Medical Entomology*, 43 (3): 636-639.
- Oliveira MT, de Azeredo-Espin AM, Lessinger AC (2005) Evolutionary and structural analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene from *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) mitochondrial DNA. DNA Sequence, 16(2), 156-60.
- Raymond M, Rousset F (1995). GENEPOP (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. Journal of Heredity, 86 (3), 248-249.
- Rozen S & Skaletsky HJ (1998) PRIMER 3. Code available at: http://frodo.wi.mit.edu/ cgibin/primer3/primer3_www.cgi
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution, 43, 223-225.Torres TT, Azeredo-Espin AML (2005) Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Molecular Ecology Notes, **5**, 815-817.
- Torres TT, Azeredo-Espin AML (2005). Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes*, 5 (4): 815-817.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de mestrado intitulada "Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para a moscados-chifres, Haematobia irritans (Linnaeus, 1758)(Diptera: Muscidae)".

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

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

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal

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

Aline Collho de Pora Aline Coelho da Rosa

Ana Maria Lima de Azeredo-Espin - Orientadora

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

| (𝔅) Deferio | do ()Indeferido | |
|-------------|----------------------|-----------|
| Nome: | Prancelo Menos | n |
| Função: | Presidente da CIPSIC | D / CBMEG |