

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 corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Aline Coelho da Rosa</i> e aprovada pela Comissão 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	<p>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.</p> <p>Orientadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Microssatélites (Genética). 2. Mosca-do-chifre. 3. Genética de populações. 4. Marcadores genéticos. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------------	--

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.

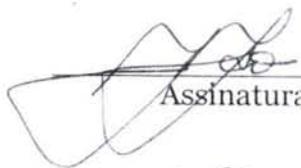
Data da defesa: 31/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 31 de agosto de 2007

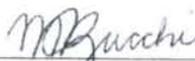
BANCA EXAMINADORA

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



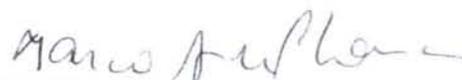
Assinatura

Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi



Assinatura

Prof. Dr. Marco Antônio Del Lama



Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

Profa. Dra. Rosana V. Brondani

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 Microsatélites e que eu pudesse iniciar o projeto de meu mestrado. Também pelas valorosas correções desta tese.

À Dra. Ana Cláudia Lessinger por acreditar em mim desde o início, pelo sub-projeto 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...

À 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

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

Agradeço à Mari Lyra pelas primeiras instruções no lab, quando iríamos fazer alguns “southern” 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 tranqüilidade 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, pela sua amizade tão importante, pelos momentos “nonsense”, pelo 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.

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	5
Características biológicas da mosca-dos-chifres	6
Distribuição geográfica da Mosca-dos-chifres	7
Contexto da investigação científica da mosca-dos-chifres.....	8
Marcadores Microssatélites	11
Acesso ao polimorfismo de microssatélites	13
Uso dos marcadores microssatélites em dípteros	19
Objetivos.....	20
Metodologia.....	21
Amostras de <i>Haematobia irritans</i>	21
Extração e Digestão do DNA Genômico	21
Ligação de Adaptadores	22
Pré-amplificação dos fragmentos ligados aos adaptadores.....	22
Amplificação dos fragmentos selecionados via PCR.....	24
Clonagem dos fragmentos.....	24
Amplificação dos insertos clonados.....	24
Seqüenciamento, análise das seqüências 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.....	31
Discussão.....	39
Isolamento e caracterização de locos de microssatélites	39
Considerações Finais.....	45

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 microssatélites (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 microsatellite-enriched 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 analysed, 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 efficiency of 22%). Regarding the composition of the microsatellites sequenced retrieved 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 heterozygosities ranged from 0,1421 to 0,7702 and 0,1500 to 0,6750, respectively. Heterozygosity values were considered low. In this analysis, at least three loci presented heterozygosity 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.

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).

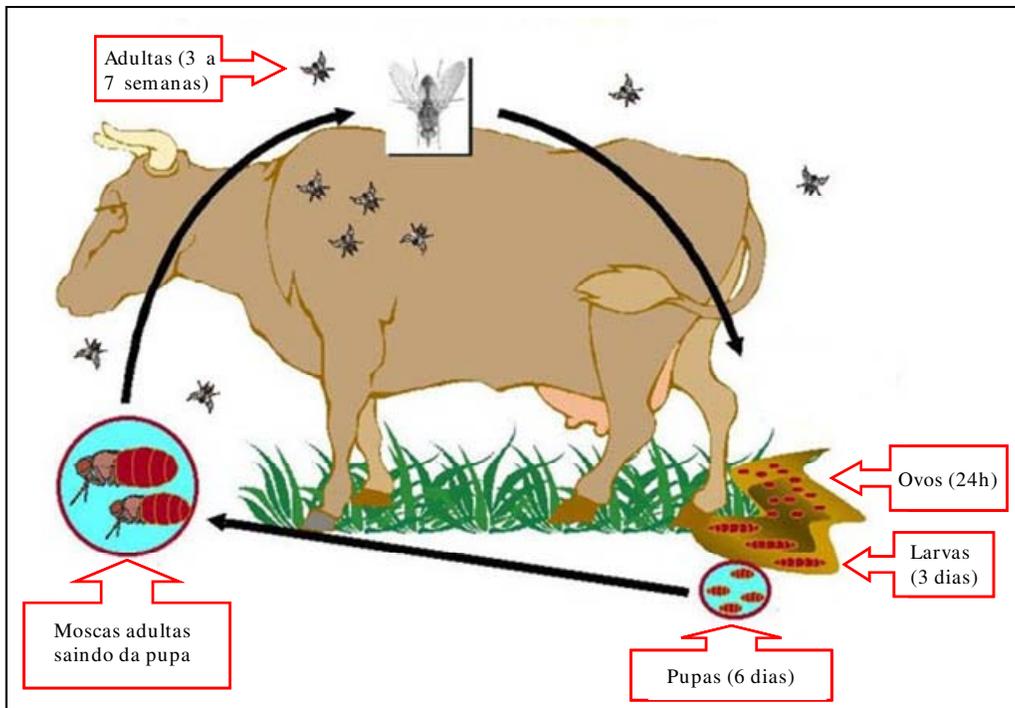


Figura 2. Ciclo-de-vida da mosca-dos-chifres.

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.

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 (CsCl_2). 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 microsatélites. 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 microsatélites, 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 microsatélites, ocorrem a uma taxa muito maior que a registrada em DNA não repetitivo.

Os microsatélites podem ser classificados em três famílias: de repetições puras ou microsatélites perfeitos (por exemplo: CACACACACACACA); de repetições compostas, contendo mais de uma unidade repetida (exemplo: CACACACACACACAGAGAGAGAGAGAGA); e repetições interrompidas ou microsatélites imperfeitos (exemplo: CACACACACACACATATCACACACACA) (Jarne & Lagoda, 1996; Chambers & MacAvoy, 2000).

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

Entre os motivos de repetições encontrados em regiões de microsatélites, 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

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 (A)_n, dinucleotídeos (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 flangeadoras 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)

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 frequências 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-fantasma 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 muitas 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).

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 pós-replicacional (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).

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.

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/*Hind* 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 subsequente visualização em gel de agarose 1%. Neste, foram aplicados 10 µL das diluições e, como padrão de peso molecular, foram aplicados 250 ng e 125 ng de “λ DNA/*Hind* III Fragments” (0,5 µg/µL). Foi estimada uma concentração de 1 µg/µL para a amostra de DNA de *H. irritans*.

Num volume final de 100 µL com 4 mM de espermidina foram acrescentados 6 µg 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 µL foram adicionados 6 µL de DNA digerido, 4U de T4 DNA ligase, 0,4 µM 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, pré-amplificados 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 pré-amplificação foram purificados com o kit “Quiaquick PCR purification kit” (Quiagen), conforme instruções do fabricante.

O processo de enriquecimento 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 µM) 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 ímã 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.

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 µL foram ligados a 1 µL 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 µL de IPTG e 60µL 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 µM do adaptador Rsa21 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.

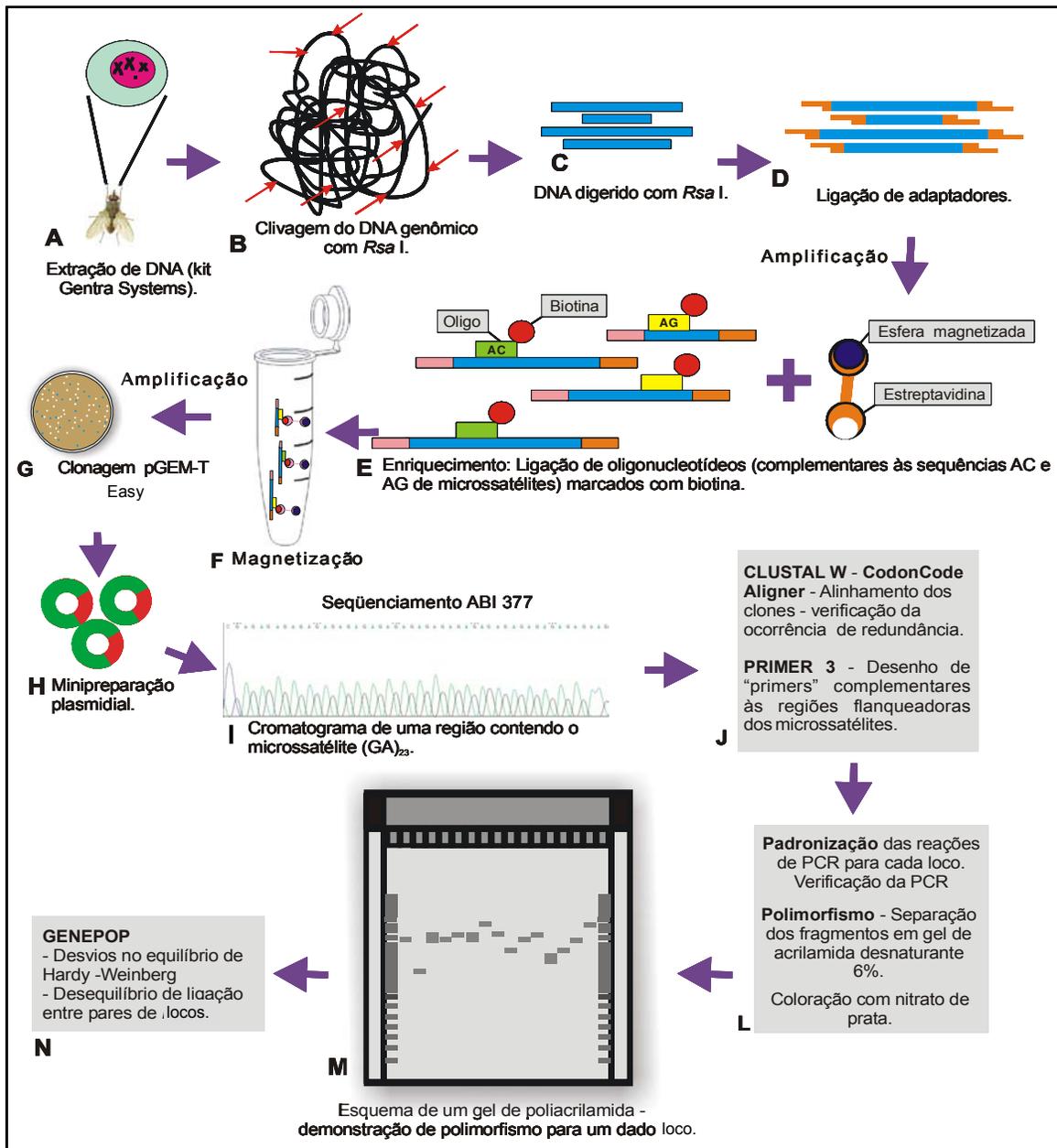


Figura 6. Esquema da metodologia empregada para a construção da biblioteca de microssatélites de *H. irritans* (A-G), seqüenciamento dos insertos clonados (I), desenho de "primers" (J), otimização das amplificações e verificação de polimorfismo (L-N).

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 *EcoR* 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.

Deteção 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:

$$H = n / (n - 1) [1 - (\sum q_i^2)],$$

Onde n é o número de alelos e q_i é a frequência 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 consequência 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 ($\alpha=0,05$) 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%.

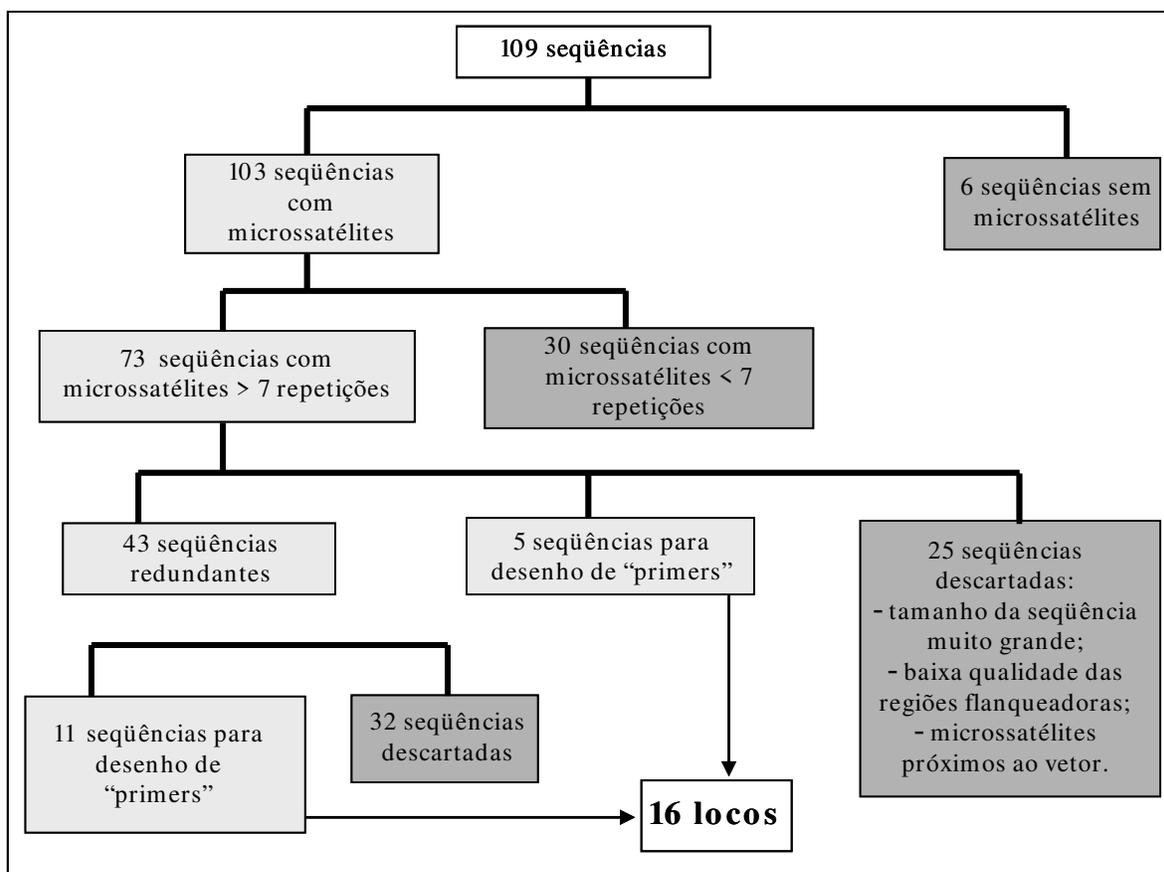


Figura 7. Esquema que demonstra o aproveitamento das seqüências até resultar no número de locos que foram caracterizados neste trabalho.

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.

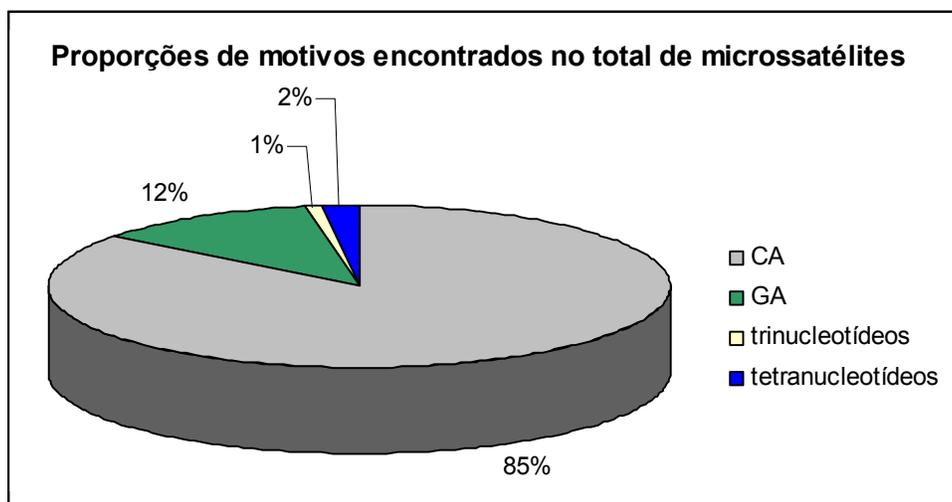


Figura 8. Gráfico que demonstra as proporções dos motivos de microssatélites no total de seqüências.

Seleção de “primers” e otimização das reações de PCR

Dezoito pares de “primers” (nomeados como *HI01* a *HI18*) 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.

- *HI15*: (CA)₁₀, com “primers” D: ATACGCTGCTCTTCTTGC e R: CGTATTTCTTTCAATTTTGC, com as mesmas condições de padronização e tamanho do alelo de 151 pb.

alelos nulos neste loco, o que é sugerido pelo excesso de homozigotos verificado. Para os locos *HI05*, *HI16* e *HI17* 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 *HI04*. 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 *HI03*, *HI05*, *HI07*, *HI08*, *HI09*, *HI10*, *HI13*, *HI14*, *HI16* e *HI17*, 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 frequência 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 $\alpha=0,05$.

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 *HI16* e *HI17* 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 *HI16* possui os valores de P iguais a zero para ambas as populações geográficas. Já o loco *HI17*, possui os valores de P iguais a 1,0000 (Candiba/BA) e 0,0782 (Caraguatatuba/SP). Portanto, quando consideradas duas populações, o loco *HI17* está em equilíbrio de Hardy-Weinberg e o loco *HI16* mantém-se em desvio pelo esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Podemos observar baixa variabilidade genética nos locos *HI03*, *HI07* e *HI09*, com valores de heterozigosidade inferiores a 0,5 (tabela 2).

Testes exatos para desequilíbrio de ligação foram realizados entre pares de locos (tabela 4). Para este teste, a hipótese nula (H_0) 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 $\alpha=0,05$ 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.

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.

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 subsequente 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 (*HI16* e *HI17*). 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 conjuntamente 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.

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, Relatório 2005 (<http://www.abiec.com.br/estatisticas/13.pdf>).
- Agis, M., Schlotterer, 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.

- 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 mutation-rates. *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.

- 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 hypothesis. *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., Malcevski, A., Marmioli, 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.

- 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.

