

BC/37406

IB/80798

SIDADE

JAL DE

CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

In3_e

Maria Elena Infante-Malachias

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE) DA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL : ANÁLISE ATRAVÉS DE
TRÊS TIPOS DE MARCADORES GENÉTICOS**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Maria Elena Infante-Malachias</i>
<i>[Assinatura]</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>02/03/99</i>

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia, Departamento de
Genética e Evolução para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências - Área de Genética.

Orientadora: Profª Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin

Campinas - SP

1999

UNIDAX	IB
N.º CH. FOLIOS:	I/UNICAMP
	In3e
	Fi
	BC, 37406
	229/99
	0 18
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/04/99
N.º CPU	ACC-22874-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Infante-Malachias, Maria Elena
In3e Estrutura genética de populações de *Cochliomya hominivorax*
(Diptera: Calliphoridae) da região sudeste do Brasil: análise através
de três tipos de marcadores genéticos /Maria Elena Infante-Malachias. --
Campinas, SP:[s.n.],1999.
122f.:ilus.

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

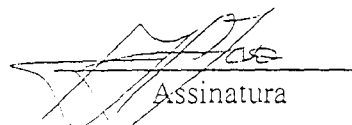
1. Estrutura genética. 2. Marcadores moleculares. 3. Diptera.
I. Espin, Ana Maria Lima de Azeredo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 02 de março de 1999

Banca Examinadora

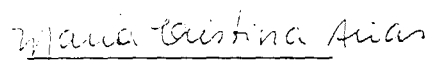
Professores Titulares

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



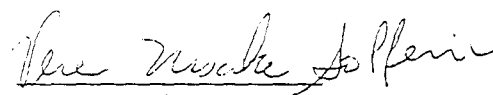
Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Arias



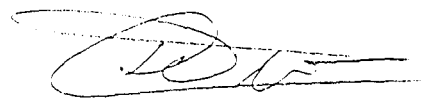
Assinatura

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini



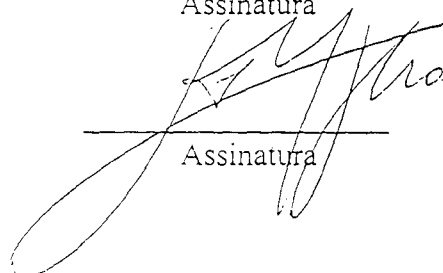
Assinatura

Prof. Dr. Daniel Frías Lasserre



Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko



Assinatura

Professores Suplentes

Profa Dra. Christine Hackel

Assinatura

Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

Assinatura

SUMÁRIO

	página
Dedicatórias	i
Agradecimentos	iv
Epígrafes	ix
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	
I. SOBRE ALGUMAS ESPÉCIES CAUSADORAS DE MIÍASES	3
II. ABORDAGEM GENÉTICA	7
1. Análise da Variabilidade Genética	7
2. Marcadores Moleculares e Diversidade Genética	9
2.1. Eletroforese de Proteínas: Princípios e Aplicações da Técnica	10
2.2. RFLP: Princípios e Aplicações da Técnica	14
2.3. RAPD: Princípios e Aplicações da Técnica	18
3. Estudos Comparativos de Marcadores Moleculares	22
III. VARIABILIDADE GENÉTICA DE CALLIPHORIDAE	24
1. Variabilidade Genética em Algumas Espécies Causadoras de Miíase	24
2. Variabilidade Genética e Estrutura Populacional de <i>C. hominivorax</i> : Uma Abordagem Histórica	25
APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS E OBJETIVOS	30
Trabalho 1: Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, <i>Cochliomyia hominivorax</i> (Diptera: Calliphoridae) from Brazil.	33
Abstract	33

Introduction	33
Materials and Methods	35
Results	37
Discussion	46
References	50

Trabalho 2: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis in Populations of <i>Cochliomyia hominivorax</i> (Diptera: Calliphoridae), From Northern Argentina and Southeastern Brazil	53
Abstract	54
Introduction	55
Materials and Methods	57
Results	62
Discussion	63
References	68

Trabalho 3: Population Heterogeneity of <i>Cochliomyia hominivorax</i> (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil.	84
Abstract	84
Introduction	85
Material and Methods	86
Results	87
Discussion	89
References	91

DISCUSSÃO	103
------------------	-----

CONCLUSÕES	108
-------------------	-----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
-----------------------------------	-----

In Memoriam

Desde aquellos lejanos días en que de tu mano caminaba pisando las hojas coloridas del otoño, soñando contigo en construir un mundo mejor, tu mano grande, fuerte, manchada con los largos años de colillas preocupadas.....me enseñó a tener fé, a creer que las personas siempre tienen algo bueno que nos ofrecer, a ser honesta, verdadera, a ser libre!!

Poco a poco, tu imagen de caballero de la triste figura fue moldando eses tus frutos de amor, tus hijos, y todos fuimos a tu imagen y semejanza amando y respetando la vida (esa de la que ahora bebes en abundancia), siendo fraternos y un poco locos también porque no ?

Hoy sé que te alegras conmigo, y podrás decir "mi doctora Lén", por eso yo quiero apenas repetir que te amo papito y te agradezco profundamente el ejemplo de tu vida porque,..... las palabras no saben traducir el lenguaje del alma.

*A mi padre Jaime Infante Zamorano,
Dedico*

A mi madre Luisa, por tanto amor y comprensión, por la gran confianza en sus hijos, por su valor e ser siempre mi puerto seguro, a quien amo profundamente.

A Teresita

A Cristina, Sergio y Camilito

A Jaime, Susan, Coni y Sofia:

Mis hermanos y mi familia, por haber crecido juntos en el amor, por ser siempre mis amigos, por compartir penas y alegrías y por la enorme nostalgia que siento

Ofrezco

Célio:

*Nos momentos felizes, iluminas e das
sentido a partilha da alegria, na calma me
ensinas a sentir e escutar o silêncio, na
tormenta você me dá coragem e me acolhe nos
seus braços compreensivos.*

*A cada dia do seu lado descubro o
valor da alegria de sermos companheiros,
caminhar e sonhar sempre juntos.*

*E principalmente a cada dia podemos
juntos compreender a voz do amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a Deus pelo dom da vida, pela inquietação para buscá-lo e amá-lo em todas as coisas e por todas as coisas existirem nEle.

À minha querida família brasileira, Dona Cida, Sandra e Sidnei Malachias por terem feito sentir-me como membro da família desde o princípio, pelo apoio, pela compreensão e pelo grande amor com que me acolheram.

Aos meus muito queridos amigos-irmãos de fé, de caminhada e de vida: Germano e Jorge, pela coragem de serem livres para escolher, pelo grande amor e amizade que nos unem há tanto tempo e que não de perdurar aonde quer que formos.

A todos os amigos da Companhia de Jesus, por tantos momentos compartilhados pela grande amizade e pelo exemplo de vida e apostolado, especialmente os Padres: Ulpiano (mi querido abuelito), Walter, Ramón, Quevedinho, Luis Antônio, Kiko, os queridos noviços e os futuros padres: Sérgio, Adilson e Neilton.

Ao mestre de noviços Padre Toninho, meu orientador espiritual e "meu pai", pelo seu coração generoso, sempre aberto, a descobrir coisas boas nos seus filhos e a aconselhar com firmeza e amor. Pelo grande carinho e amizade, pelo estímulo a sempre caminhar olhando para Jesus.

Ao meu querido amigo Fábio Papes, por tantas conversas profundas e produtivas que nos deixavam com um gostinho bom, pelo seu grande apoio e sua profunda amizade.

À minha querida amiga-irmã, Dra Maria Teresa Marquez Novo, por ter me ajudado a dar os primeiros passos no RAPD, mas, principalmente pela força, fé, por possuir um enorme coração, por ser um exemplo de vida para mim e por ser minha grande amiga.

Ao meu muito querido amigo-padrinho, Dr. Andrés Yunes, por estarmos orbitando o mesmo centro, por tantas buscas e encontros, pelo grande carinho.

A todos os meus queridos alunos e companheiros do Crisma na UNICAMP, por tantas experiências de comunidade e pela riqueza da partilha de vida.

A todos os amigos da PU da UNICAMP, por dividir nossas inquietações e pela cumplicidade do encontro na missa nas quintas.

A todos os queridos amigos do Charolais, presentes e os tantos que um dia passaram, por estes sete anos de crescimento, reflexão, oração e principalmente de valiosa amizade.

À minha República, eternamente minha, a todos os amigos antigos e novos por tantos anos de aprendizado e prática de valores, por terem colaborado com um grãozinho de areia na construção de uma sociedade mais fraterna: Nancy, Luzão, Betty, Claudinha, Ana, Edson, Edson "Baiano", Nicola, Guilherme, Gonçalo, Camilo, Bia, Marco, Alessandra, Fagoni, Brochi, Jorge, Ana Paula,

Patrícia, Eliane, Nilda, Germano, Andrés, Fabinho, Alexandra, Sérgio, Luís "Zé Banheirinho", Sílvinha, Sílvia Maria, Ana Paula Dra, Ana Lúcia, Kelly, a nossa querida, dengosa e fiel Chita e mais alguém que eu devo estar esquecendo.

Ao grupo dos "12", pela cumplicidade de estarmos trilhando juntos a experiência dos Exercícios Espirituais de Santo Ignácio de Loyola, por querer viver de maneira diferente.

Aos meus queridos amigos da Rede Apostólica Inaciana: Marisa, Ailton, Ernesta, Lurdes e à minha querida Rossi, por sermos todos tão Inacianos e acreditar na construção de um mundo melhor.

À Família Ferreira, Sr Toninho, Dona Maria Helena, Marta; Chico e família; Luís e família: por tantos anos de amizade, pelo carinho e pelo apoio que sempre encontro neles.

Aos meus queridos irmãos e amigos Juan e Valéria (incluindo Candi, Juanito, Bartolomé e Clarisa) que, mesmo longe, estão mais perto no coração, pela fé profunda que nos fez ser amigos no Senhor, pela enorme saudade e por ser exemplo de matrimônio para mim e Célio.

À minha irmã Marymar e à sua família David e Gabriel, pela certeza de que a distância nos mantém unidas.....até o céu.

Ao meu querido santinho Baiano, Evandro, grande companheiro de trabalhos e grande amigo; pela força, coragem e estímulo que sempre me dá com a sua vida, pela duradoura amizade.

Aos meus queridos amigos que ficaram no Chile esperando meu retorno: Juan Carlos, Pilo, PatyE, Sônia, José Luis, Coca, Anita, Moncho, por terem sempre acreditado em mim, por terem contribuído para me formar como pessoa, por tantos momentos guardados como tesouros na lembrança e pelo amor que cresce na distância.

A todos os familiares que torcem por mim no Chile: Irma, Juanita, Toya, Cecilia, Irene, Mário, Gustavo, Tencha, Teruca, Nana, Ivonne, Vivi, Lorena, Rosita, Pepe Rosales, Emilia, Lucia etc, e especialmente Tio Enrique Lagos, que me dão força com seu grande carinho.

Aos meus queridos amigos Cristiano e Romis, pela confiança, por estar torcendo sempre por mim e pelo exemplo de vida (apesar de serem tão novos!!).

Aos meus amados "filhos" Flávia e Alysson, pelas pessoas maravilhosas que são e pelo enorme carinho do qual não sou merecedora.

Aos colegas e amigos do "meu" laboratório: Karla, Taíla, Ana Carolina, Patrick, Tati e a todos os que um dia fizeram parte, pela partilha do dia a dia, pelos momentos intra e extra laboratório que propiciaram apoio às dificuldades, pela grande colaboração na elaboração deste trabalho e pela paciência principalmente na fase final da tese.

À "Branca de Neve" minha amiga Adriana Capella, pelo grande carinho e pela amizade que ha de transpor as paredes do CBMEG.

À querida e saudosa Juliana do Valle amiga e companheira do tempo do mestrado, por tentar manter os laços mesmo na distância.

Ao meu querido "primeiro orientado" Marco Antônio Milleo de Oliveira Jr, pela sua grande alegria, por ter trazido ares novos ao laboratório e pela confiança depositada em mim.

À minha muito querida Silvinha, Sílvia Geurgas, pela gratuidade da empatia, pela preciosa ajuda, por tantas benditas conversas e pela grande e valiosa amizade.

À minha muito querida amiga, conselheira e cúmplice, Ana Cláudia, por tantas e tantas conversas, por sempre perceber quando eu não estou bem, pela sua clareza, sinceridade e principalmente pela sua grande amizade.

À querida Claudette pela sua ternura e pelas palavras de encorajamento que me animavam sempre.

À Rachel Branquinho, quase doutora, pela partilha do "sofrimento" na fase final da tese e pela amizade desde a minha chegada ao Brasil.

À querida Dona Cida pelos conselhos oportunos e pelas suas orações, desde que comecei a trabalhar com as mosquinhas no Barracão da Genética.

Aos Pós-doc do CBMEG, Mano, Ivan, Celso, Míriam, Alba pelos auxílos solícitos prestados e pela convivência agradável.

Ao novo Dr. André Vettore, por estes anos de paciência e amizade e a todos os colegas do sequenciamento: Edson, Felipe, Kelly, Fabiana, Silvana e Adriana.

Aos amigos e companheiros de luta nos cursos de férias: Sibov, Marcela, Lee, Eneida, Karen, Lúcio, Suzana, Daniela, Margareth, Carlos.....e todos os que passaram pela experiência especialmente Ed, Sandrinha e Juliana, pela grande dedicação, amor e seriedade com que trabalhamos juntos.

Às três professoras do Curso de Férias: Alexandra, Brígida e Fabiana por terem me ajudado a descobrir de novo minha paixão pela educação.

À Profa. Dra. Denise Lannes, grande amiga e excelente profissional, pelo seu entusiasmo pela vida e por acreditar nas pessoas, na educação e no Brasil.

A todos os colegas do Laboratório de Plantas, particularmente Márcio José da Silva, pela sua sempre boa disposição para ajudar e Sílvia Turcinelli pelos momentos extra-laboratório partilhados.

A todos os colegas dos Labs. de Microorganismos, Genética Humana e Análises Moleculares, pela sempre boa disposição para me socorrer e pelo convívio.

À Rosangela Rodrigues, pela sua dedicação, grande paciência, amizade e auxílio desde a minha chegada ao laboratório....e pelos muitos biscoitinhos.

À Maria Salete Campos, por tantos anos de agradável convivência por sua prestatividade, amizade e pelo grande carinho.

Ao Mário Constantino Filho, pela sua ajuda fundamental nas coletas e no campo e pelas boas conversas na Argentina.

À Tereza, Célia, Patricia, Ana Rita, Claudinha, Sandra, Tânia, Fabiana e Zaira pela valiosa e oportuna prestatividade com que atenderam às minhas árduas solicitações no doutorado.

Aos funcionários e técnicos do CBMEG: Sr. João, Sr. Chico, Sr. Manuel, Duarte, Maurício, Wilson, Madá, Sandra, Sr. Bento e Zildinha, pela atenção, carinho e pelo sempre bom humor, que muitas vezes me levantou o ânimo.

À turma do laboratório de isozimas, Veridiana, Juliana Félix, Bruno, Ju, Fabiana, Allan, Herbert por terem me acolhido tão bem que me fizeram sentir em casa e especialmente à Soninha pela ajuda na hora do desespero e pela amizade.

À minha amiga e compatriota Ingrid, pelo seu apóio, pelas conversas e desabafos e pela sua grande amizade.

Às amigas Marta Baracho, Maria Emori e Adalgisa, pelo companheirismo fiel que perdura desde a minha chegada ao Brasil e pela amizade.

Aos colegas e amigos distantes, porém não esquecidos, Gonçalo, Edson "Baiano", Fernando e Liriam, pelo grande carinho e pelos bons momentos.

Ao Prof. Dr. Crodowaldo Pavan, por ser o responsável pela minha vinda ao Brasil, pelo estímulo e pela confiança em mim.

À Profa. Dra. Maria Cristina Arias, pela grande amizade, companheirismo e pela grande dedicação na leitura minuciosa da tese.

À Profa Dra. Vera Nisaka Solferini, pelo agradável convívio no seu laboratório, por sua grande disposição para me auxiliar e valiosa colaboração no empréstimo de materiais e na correção da tese.

À Profa. Dra. Christine Haeckel, por ter acreditado sempre em mim e pela alegria com que sempre me recebe.

Ao Prof. Dr. Daniel Frías, de quem aprendi a gostar de Genética, pelo grande incentivo desde meus tempos de graduação e por ter aceitado generosamente participar de minha banca de tese, vindo da minha saudosa terra.

Ao Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko, grande mestre e profissional, pelo seu apoio sincero, por ter aceitado participar da banca desta tese, pelas reflexões e principalmente pelo seu exemplo.

Ao Prof. Dr. Ademilson. E. E. Soares, pela grande gentileza, bom humor e disposição para participar como suplente da banca de tese.

Aos Profs. Drs. Paulo Arruda, Yoko Bomura Rosato, Edi Sartoratto, Anete Pereira de Souza, Maricilda Pallandi de Mello, por sua sempre excelente disposição para atender meus pedidos e por terem contribuído para a minha formação profissional e pelo convívio no CBMEG.

Aos Profs. Drs. Laura Ottoboni, Adilson Leite, Laudénir Prioli e Octávio Pavan pelos momentos descontraídos de conversas nos intervalos do trabalho.

À Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin, pelos longos anos de convivência, por ter acreditado e apoiado sempre esta sua primeira aluna orientada, pelo estímulo, carinho e a confiança depositada na minha capacidade profissional.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo durante a realização do doutorado. Ao CNPq, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo suporte financeiro dado ao projeto, do qual este trabalho faz parte.

Finalmente, desejo ressaltar que este trabalho é o fruto da interação e colaboração de muitas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a sua realização. Por isso, deixo aqui meu sincero agradecimento a todos aqueles que não mencionei.

UN TIEMPO NUEVO

*Es necesario afrontar la guerra más dura:
la guerra contra sí mismo. Es necesario
llegar a desarmarse.*

*Yo he luchado en esta guerra durante muchos
años. Es una guerra difícil. Pero ahora estoy desarmado.*

*Ya no tengo miedo a nada, porque el amor
arroja fuera el temor.*

*Estoy desarmado de querer siempre
tener la razón y de justificarme,
descalificando a los demás.*

*Ya no soy un guardián nerviosamente crispado
que vive cuidando sus riquezas.*

Ahora yo acojo y participo.

Ya no estoy demasiado aferrado a mis ideas y proyectos.

*Si me presentan proyectos mejores,
o aunque no sean mejores, si son buenos
los acepto sin dificultad.*

*He renunciado a las comparaciones
y ahora ya no tengo miedo.*

Cuando no se tiene nada, no hay miedo.

*Cuando se está desarmado y desposeído de sí mismo;
cuando se está abierto a Jesucristo, Dios y hombre,
que hace todas las cosas nuevas,*

*sucede que Él borra el pasado de pecado y de maldad
y nos da un tiempo nuevo, donde todo es posible.*

Patriarca Atenágoras I

*"Tomai Senhor e recebei,
toda minha liberdade e
a minha memória
também, o meu
entendimento, e toda a
minha vontade,
tudo o que tenho e
posso, vós me destes
com amor. Todos os
dons que me destes,
com gratidão vos
devolvo, disponde deles
Senhor, segundo a vossa
vontade. Dai-me
somente o vosso amor,
vossa graça,
isto me basta, nada
mais quero pedir."*

Santo Ignácio de Loyola

RESUMO

Cochliomyia hominivorax (Coquerel), conhecida pelo nome de “mosca da bicheira”, é considerada no Brasil umas das principais moscas causadoras de miíases em vertebrados vivos silvestres e especialmente domésticos. Esta espécie é um ectoparasita de grande importância econômica pelos graves danos que causa à pecuária. É uma espécie praga capaz de infestar uma grande variedade de hospedeiros, tem uma ampla distribuição geográfica na região Neotropical, e possui a habilidade de se adaptar a novos ambientes, por estes motivos algumas questões importantes a serem analisadas são a extensão da variabilidade genética e a estrutura de populações naturais desta espécie na América do Sul.

Este é o primeiro estudo no qual a variação e estrutura genética de *C. hominivorax* são analisadas simultaneamente utilizando-se 3 tipos de marcadores genéticos: (1) polimorfismo de proteínas através de eletroforese de isozimas, (2) sequências arbitrárias do genoma nuclear, amplificadas por marcadores RAPD, (3) e o genoma mitocondrial através de análise de RFLP. As informações obtidas com estas abordagens de análises são portanto muito importantes para elucidar a dinâmica de populações desta praga no Brasil e na América do Sul.

Baseado nos resultados obtidos com RAPD e RFLP, verificou-se a existência de uma elevada variabilidade genética, através de isozimas foi obtido um índice de heterozigosidade de 16.5%. Os resultados dos três marcadores indicaram uma forte estruturação genética das populações brasileiras desta espécie: RAPD ($F_{st}=0.12$), isozimas ($F_{st}= 0.21$) e RFLP do DNAm ($F_{st}= 0.23$). Estes dados sugerem que a América do Sul provavelmente seja o centro de origem de *C. hominivorax*.

ABSTRACT

Cochliomyia hominivorax (Coquerel, 1859) the New World Screwworm fly, causes invasive myiasis in warm blooded vertebrates, particularly livestock, in South, Central and North America, causing great profit losses for cattle breeders. The eradication program applied in the Neartic region, has determined that the historical geographic distribution of *C. hominivorax* in the New World from Southern U.S to Northern Argentina changed to the present continental distribution of this fly, being today entirely Neotropical. In Brazil, the screwworm fly is one of the most devastating insect pest in domestic animals. Due to biological traits of this species, such as environmental adaptativeness, geographical range and the use of non-specific hosts, the genetic variability and structure of natural populations of *C. hominivorax* from South America are important features to understanding evolutionary aspects of this plague.

This is the first survey in which genetic variation and population structure in Brazilian populations of *C. hominivorax* is analyzed simultaneously at the following three commonly used genetic markers: (1) polymorphism of protein throughout isozyme electrophoresis, (2) arbitrary sequences of nuclear genome, amplified by RAPD markers, (3) and the mitochondrial genome using RFLP analysis.

Results obtained by RAPD and RFLP have shown high genetic variability in the analyzed populations. Isozymes shown 16.5% of heterozygosity. These genetic markers consistently demonstrated high genetic differentiation in *C. hominivorax* Brazilian populations: RAPD ($F_{st}=0.12$), isozyme electrophoresis ($F_{st}= 0.21$) and RFLP of mtDNA ($F_{st}= 0.23$).

The results obtained with this combined approach produce a more congruent and robust analysis, providing very important data to elucidate population dynamics of this species plague in Brazil and South America. This study suggests that South America probably is the center of origin of *C. hominivorax*.

INTRODUÇÃO

I. SOBRE ALGUMAS ESPÉCIES CAUSADORAS DE MIÍASES

O termo miíases designa a infestação causada por larvas de dípteros em órgãos ou tecidos de animais incluindo a espécie humana. Hope (1840), utilizou pela primeira vez a palavra miíase (do grego myia; mosca), para diferenciar esta doença daquelas provocadas por larvas de lepidópteros e coleópteros. Zumpt (1965), definiu miíase como “infestação de seres humanos e vertebrados vivos por larvas de dípteros que pelo menos por algum período de tempo se alimentam dos tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, das suas substâncias corporais líquidas ou do alimento por ele ingerido.” Os vertebrados usualmente infestados são mamíferos, aves e répteis (ver revisão em Hall & Wall, 1995).

As diferentes formas de miíases têm sido classificadas segundo dois critérios; primeiro em termos anatômicos, baseado na parte do corpo do hospedeiro que foi infestada (miíase cutânea, miíase nasal etc.) e o critério parasitológico, que descreve o tipo de relação entre parasita-hospedeiro.

Segundo o critério parasitológico, existem dois grupos de espécies causadoras de miíases: aquelas que são parasitas obrigatórios e que se desenvolvem em hospedeiro vivo, e parasitas facultativos, que podem se desenvolver em hospedeiros vivos ou mortos. Os parasitas facultativos podem ser divididos em dois grupos: a) espécies primárias, aquelas que são capazes de iniciar uma miíase, isto é, onde as larvas se desenvolvem em feridas recentes de animais vivos, causando a chamada miíase primária e b) espécies secundárias, onde as larvas se desenvolvem em tecidos necrosados e/ou material orgânico em decomposição.

Existe um outro tipo de miíase denominado pseudomiíase provocada por larvas ingeridas acidentalmente junto com alimentos e que podem apresentar ou não manifestações patológicas.

Na literatura têm sido registrados apenas poucos casos de pseudomiíase, causadas por larvas de Syrphidae, Psychodidae, Tephritidae e Calliphoridae (Guimarães *et al.*, 1983).

Dentre os dípteros causadores de miíases, destacam-se os pertencentes às famílias Calliphoridae, Oestridae e Sarcophagidae, que incluem espécies de grande importância clínica e econômica por infestar o homem e produzir graves prejuízos à pecuária.

Nas áreas tropicais e subtropicais das Américas existem seis gêneros de Calliphoridae. Dois deles, *Cochliomyia* e *Chrysomya*, apresentam espécies com ampla distribuição geográfica e comportamento sinantrópico, sendo consideradas de grande importância médica e sanitária por promoverem a disseminação mecânica de patógenos (Linhares, 1981). O gênero *Cochliomyia* é endêmico do continente americano e o gênero *Chrysomya* foi introduzido, sendo nativo das regiões tropicais e subtropicais do velho mundo.

Dentre algumas das espécies causadoras de miíases secundária ou facultativa da família Calliphoridae, destacam-se as espécies: *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), e espécies do gênero *Chrysomya* (*C. putoria*, *C. chloropyga*, *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. rufifacies*) (Guimarães *et al.*, 1979; Ferreira, 1982; Baumgartner & Greenberg, 1984).

Cochliomyia hominivorax (Coquerel), é um parasita obrigatório, geralmente de feridas dérmicas. Conhecida no Brasil como a “mosca da bicheira”, é considerada uma das mais importantes causadoras de miíase primária na América tropical, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (Guimarães *et al.*, 1983), e na América Central, atingindo o Caribe e o México. As fêmeas colocam seus ovos em feridas expostas recentes ou em orifícios corporais dos hospedeiros (Thomas & Mangan, 1989), e após 24 horas as larvas eclodem e começam a se alimentar de tecidos vivos (biontófagos), originando extensas feridas, que podem ocasionalmente levar à morte do animal dependendo da gravidade da infestação. Embora a mosca

da bicheira tenha como seus principais hospedeiros os rebanhos bovino, ovino e caprino, o homem é também altamente suscetível ao seu ataque (James, 1947). O próprio nome da espécie (*C.hominivorax*), descrita em 1859 por Coquerel, foi devido a ter sido registrada pela primeira vez causando miíase em um homem em Cayena, na Guiana Francesa. No Brasil, os casos de miíases humanas registrados são freqüentes e numerosos (Fraiha *et al.*, 1979).

Esta espécie junto com a mosca do berne *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr, da família Oestridae), é considerada uma das principais pragas da pecuária brasileira causando graves prejuízos econômicos. Em 1966, *C.hominivorax* foi erradicada do sul dos Estados Unidos através da técnica do macho estéril, SIT, “Sterile Insect Technique” (Knipling, 1937). Ocorrências esporádicas e tentativas de recolonização vêm sendo continuamente monitoradas e controladas utilizando-se esta técnica (Krafsur *et al.*, 1987). Em 1988, foi registrada a ocorrência de infestação por *C.hominivorax* na Líbia (Beesley, 1990; Gillman *et al.*, 1992), e foi declarada oficialmente livre de *C.hominivorax* em abril de 1991, através da utilização desta técnica (SIT) (Spradbery, 1994).

C. hominivorax e *D. hominis* são consideradas pragas na região Neotropical por infestar preferencialmente animais domésticos, principalmente bovinos, causando grandes prejuízos econômicos na produção animal (Guimarães *et al.*, 1983). As infestações tornam o couro desqualificado devido à presença de cicatrizes e há uma significativa redução na produção de leite e carne. No Brasil, os métodos empregados no combate a estas pragas são principalmente através do uso de inseticidas químicos. Todas as características já citadas fazem com que estas espécies de moscas tenham uma grande importância econômica, médica e veterinária.

Os registros históricos de mudança na incidência da miíase em espécies de animais silvestres e domésticos, e as variações intra e interespecíficas relacionadas à propensão de

infestação constituem fortes argumentos para sugerir que algumas das espécies causadoras de miíase facultativa possam ter coevoluido para a especialização junto com a domesticação e expansão da população dos animais (Hall & Wall, 1995). Sugere-se que provavelmente estes dípteros, que eram inicialmente parasitas generalistas e infestavam animais selvagens, foram capazes de tirar vantagem com a introdução de animais domésticos não resistentes à infestação.

Poucos estudos sobre a evolução das espécies causadores de miíase tem sido realizados. A filogenia das três principais famílias (Oestridae, Calliphoridae e Sarcophagidae) foi considerada em detalhe por McAlpine (1989) e Pape (1992). Recentemente, outros estudos filogenéticos em Calliphoridae tem sido publicados (Rognes, 1997; Wells & Sperling, 1998). Lessinger (1998), realizou um estudo utilizando sequenciamento da região controle ou A+T do DNA mitocondrial de 5 espécies de dípteros causadores de miíase para estabelecer algumas inferências filogenéticas

Devido às singularidades encontradas na biologia destas espécies, a importância adquirida como pragas da pecuária e como vetores disseminadores de agentes patogênicos e especialmente, aos aspectos evolutivos, estas espécies de moscas se tornaram um importante material de pesquisa científica tanto do ponto de vista acadêmico, como do ponto de vista aplicado da saúde pública e da pecuária.

II. ABORDAGEM GENÉTICA

1. Análise da Variabilidade Genética

Vários são os métodos que podem ser utilizados para se analisar a variabilidade genética, que envolvem desde estudos de variação morfológica e comportamental até métodos mais sofisticados envolvendo os ácidos nucleicos e proteínas. O estudo da genética de populações teve um grande avanço quando foi demonstrado que a análise eletroforética de variação de proteínas podia ser utilizado para estimar níveis de variabilidade genética dentro de espécies e descrever estrutura de populações (revisão em Mitton, 1994). Posteriormente, uma segunda inovação na análise da variabilidade genética foi a utilização de métodos de extração, digestão com endonucleases de restrição, amplificação e seqüenciamento do DNA, que tem gerado atualmente um grande volume de informações.

A variabilidade genética de uma espécie pode ser determinada pela estrutura geográfica das populações que a formam; a estrutura geográfica corresponde à abundância de genótipos dentro e entre as populações, e é formada pela estrutura demográfica e pela estrutura genética. A estrutura demográfica é determinada por todos os processos associados com nascimentos, mortes e dispersão, incluindo o sistema de acasalamento e a história de vida de uma determinada população (Slatkin, 1994). A estrutura genética é determinada pela estrutura de população, e pode ser descrita como a distribuição da variação genética determinada por processos genéticos tais como seleção, recombinação e mutação (Slatkin, 1994).

A natureza desta estrutura genética numa determinada população pode nos revelar muito sobre a atual influência de forças evolutivas tais como deriva e migração (Barton & Clark, 1990). Por outro lado, propriedades como a biologia reprodutiva e dispersão de um organismo, que geralmente são difíceis de inferir através de medidas diretas, podem ser interpretadas através

do efeito que elas têm na estrutura genética da população (Avise, 1994; Mitton, 1994; Slatkin, 1994). Ainda, outras informações importantes da história de uma população, tais como grandes mudanças no tamanho populacional ou a presença de barreiras para o fluxo gênico, podem ser detectadas junto com a obtenção de dados relevantes de estrutura genética (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1994; Meyer *et al.*, 1996). Estudos que associem a informação fornecida por marcadores genéticos apropriados ao conhecimento da história natural de um organismo podem revelar como as atuais características demográficas e eventos passados determinaram a estrutura genética de uma determinada espécie, e também estimar de que maneira a estrutura observada pode influenciar no processo evolutivo envolvido (Ross *et al.*, 1997).

Na última década, vários estudos empíricos da estrutura genética de populações têm utilizado múltiplos tipos de marcadores genéticos (Avise, 1994; Mitton, 1994). Cada tipo de marcador pode diferir em relação ao modo de herança, nível de polimorfismo detectado e a natureza da seleção a qual está sujeito, e desta forma cada um deles pode fornecer uma visão um pouco diferente da estrutura genética e seus determinantes (Ross *et al.*, 1997)

Por este motivo, dificilmente pode-se generalizar o uso de um determinado marcador para resolver uma ampla diversidade de modelos biológicos, não sendo possível identificar um provável “marcador molecular universal”. A utilização de mais de um marcador, com a obtenção de evidências evolutivas provenientes de fontes independentes (metodologias distintas ou regiões gênicas diferentes, no caso de seqüenciamento), surge como uma alternativa no sentido de encontrar a abordagem que, apesar das suas limitações intrínsecas, melhor expresse a dinâmica evolutiva responsável pela estrutura genética atual dos grupos estudados.

2. Marcadores Moleculares e Diversidade Genética

A análise de dados moleculares pode fornecer um conjunto de marcadores genéticos com diferentes modos de herança para examinar a estrutura genética de populações de uma espécie ou mesmo estimar relações filogenéticas. O ponto em comum das técnicas moleculares é a capacidade de identificar variação genética em indivíduos, tanto indiretamente, como no caso de análise de isozimas, ou diretamente ao nível do DNA. A variação deste último tipo tem sido detectada de diversas formas: a) análise e mapeamento do genoma mitocondrial e nuclear com endonucleases de restrição, técnica denominada RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); b) amplificação de fragmentos de DNA utilizando a enzima DNA polimerase, técnica denominada PCR (Polymerase Chain Reaction), para comparações de estrutura e ordem gênica; c) polimorfismo da sequência nucleotídica dentro de genes cópia única, através de seqüenciamento; d) VNTR (Variable Number Tandem Repeat) para polimorfismos de sequência e e) amplificação randômica de segmentos de DNA utilizando primers de seqüências nucleotídicas aleatórias, técnica denominada RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR), entre outras.

Tradicionalmente, esses polimorfismos têm sido descobertos ao acaso a partir do estudo de genes específicos, ou deliberadamente através da análise de seqüências aleatórias. Em muitos casos, estas metodologias têm sido empregadas para análises evolutivas e quantificação da variabilidade genética intra e interespecífica dos genomas mitocondrial e nuclear em diferentes grupos de animais (revisão em Avise, 1994).

A seguir, serão descritos três tipos de marcadores que foram utilizados neste trabalho para a análise da variabilidade e estrutura genética de populações de *C. hominivorax*.

2.1. Eletroforese de Proteínas: Princípios e Aplicações da Técnica

Desde a descoberta do gel de eletroforese de amido (Smithies, 1955) e da visualização histoquímica das enzimas em géis (Hunter & Market, 1957), os estudos clássicos de Hubby & Lewontin (1966) e Lewontin & Hubby (1966) levaram à descoberta e utilização de uma nova classe de marcadores genéticos. A análise de enzimas representou um avanço frente as técnicas citológicas e morfológicas, já que estes marcadores não são tão profundamente afetados pela interação com o ambiente e possibilitaram um grande avanço na compreensão dos processos micro e macro evolutivos.

A eletroforese de proteínas é baseada no princípio de que duas proteínas, com diferentes cargas elétricas mobilizam-se a velocidades diferentes num campo elétrico, podendo desta forma ser diferenciadas. Assim, podem ser identificadas no gel as isozimas que são enzimas que possuem funções catalíticas idênticas ou similares, mas que podem ser diferenciadas pela sua estrutura. Uma mudança na sequência de aminoácidos (aa) envolvendo a substituição de um ou mais aa, pode resultar na produção de uma enzima variante. Este grupo de enzimas, denominado alozimas, são isozimas geneticamente segregantes codificadas pelo mesmo locus ou variantes proteicas produzidas por formas alélicas do mesmo locus (Prakash *et al.*, 1969).

Em populações naturais de diversos organismos, polimorfismos proteicos utilizando proteínas enzimáticas e não enzimáticas têm sido utilizados para estudar eficiência enzimática, variabilidade genética, fluxo gênico, estrutura genética, hibridização e relações filogenéticas, entre outras abordagens (revisão em Murphy *et al.*, 1994).

Várias pesquisas têm demonstrado que as isozimas são extremamente úteis para estudos em insetos (revisão em Wagner & Selander, 1974; Selander e Whittam, 1983). Desde o início das aplicações da técnica, esses estudos foram nas áreas de organização de tecidos, desenvolvimento

e metamorfose (Wagner & Selander, 1974). Além de detectar as mudanças nos padrões isoenzimáticos durante o ciclo de vida dos insetos, as primeiras pesquisas serviram também para determinar o alto grau de especificidade para tipo de tecido e de célula das variantes proteicas. Um dos primeiros trabalhos que revelaram esta especificidade protéica (McReynolds & Kitto, 1970), mostrou que a enzima Malato desidrogenase (MDH) de *Drosophila virilis* existe em duas formas que catalizam a mesma reação, mas diferem na mobilidade eletroforética; uma forma citoplasmática e outra mitocondrial.

Um outro exemplo da organização subcelular das isozimas foi associado com a atividade da enzima α -Glicerofosfato desidrogenase (α -GPDH) em *Drosophila melanogaster* (O'Brien & MacIntyre, 1972). Esta enzima existe na forma de três isozimas separáveis eletroforeticamente, possuindo também formas citoplasmática e mitocondrial. Somente α -GPDH da forma 3 é detectada em larva, e corresponde também a forma com maior atividade em pupa. Ambas as formas 1 e 3, estão presentes no adulto; a forma 1 no tórax e a forma 3 no abdômen. A forma 2 está presente em quase todos os estágios, mas de maneira muito fraca.

Os estudos de isozimas em insetos foram também uma importante fonte de informação para estudos de duplicação gênica (Kikkawa, 1964; Doane, 1969, 1969a) contribuindo para a compreensão dos processos evolutivos do genoma.

No entanto, o maior interesse no estudo dos marcadores genéticos do tipo isozimas, tem sido para a genética evolutiva, através da descoberta de grande variabilidade macromolecular dentro e entre populações (Wagner & Selander, 1974). Numerosos estudos de polimorfismo de proteínas permitiram determinar a estrutura genética de populações naturais de uma grande variedade de organismos (revisões em: LeCam *et al.*, 1972; Lewontin, 1974; Wagner &

Selander, 1974, Selander & Whittam, 1983; Murphy *et al.*, 1994). Um exemplo da sua aplicação para análise da estrutura genética foi o trabalho de Selander & Whittam (1983). Compararam a estrutura genética de populações de duas espécies de caramujos utilizando oito locos polimórficos. A primeira espécie estudada foi uma população relativamente jovem de *Helix aspersa*, introduzida na Califórnia em 1859, e a outra foi *Cepaea nemoralis*, espécie nativa da Europa desde o Pleistoceno. Foi sugerido que a ausência de diferenciação genética encontrada entre os indivíduos da população de *H. aspersa* tenha sido resultado da deriva genética. Por outro lado, os autores sugerem que a complexa diferenciação genética observada nas populações de *C. nemoralis* na Europa seja devido à ruptura e união de populações locais através de seleção natural. Em ambos os casos, a estrutura do ambiente determinou os padrões de subdivisão das populações.

Russo *et al.*, (1994), analisaram a variabilidade genética e estrutura de populações de duas espécies tropicais de anêmona coletadas ao longo de 1.500 km de costa no Brasil, com estratégias reprodutivas e capacidade de dispersão diferentes. *Bunodosoma caissarum* se reproduz sexualmente e possui larvas planctônicas; *Actinia bermudensis* possui os dois tipos de reprodução e pode se dispersar apenas em pequenas áreas. *B. caissarum* mostrou altos níveis de heterozigosidade ($H= 0,35$) e quase nenhuma estruturação genética ($F_{ST}= 0,04$), enquanto que *A. bermudensis* apresentou baixos níveis de heterozigosidade ($H= 0,17$) associado com uma alta estruturação de populações ($F_{ST}= 0,26$), indicando que os níveis de diferenciação genética estão relacionados com a capacidade de dispersão.

A principal premissa na utilização de dados de frequências alélicas para inferir estrutura de população é que alelos alternativos de um determinado locus são seletivamente equivalentes ou neutros (Kimura, 1982 a,b; 1983) ou praticamente neutros (Ohta, 1992). De forma geral,

considera-se que os marcadores moleculares sejam neutros; entretanto, casos de não neutralidade têm sido descritos como por exemplo o da *Adh* em *Drosophila* (Anderson & Mc Donald, 1983), que é considerada uma enzima influenciada por seleção natural. No entanto, na ausência de evidência de seleção para um locus particular, Allendorf & Phelps, (1981) sugeriram que os estudos se iniciem com a hipótese de neutralidade dos alelos.

Embora a análise de polimorfismo de proteínas através de isozimas tenha sido a base para importantes avanços na genética evolutiva, uma das limitações da técnica reside no número limitado de locos examinados e no reduzido polimorfismo que pode ser revelado (Melchinger *et al.*, 1990a). Este fato é uma característica intrínseca do marcador, uma vez que a eletroforese de proteínas apenas permite o reconhecimento de polimorfismos de regiões expressas, as quais representam uma pequena parte do genoma na maioria das espécies (Marshall & Brown, 1975; Edwards *et al.*, 1987). Além disto, uma outra limitação envolvendo esta classe de marcadores moleculares é a possibilidade de que um único gene codifique diferentes proteínas (policistrônico) ou de que uma proteína seja formada a partir de porções codificadas por diferentes genes, as quais são unidas num único produto final. No entanto, apesar das limitações, esta técnica continua fornecendo marcadores genéticos extremamente úteis para o estudo da diversidade e da estrutura genética de populações.

2.2. RFLP: Princípios e Aplicações da Técnica

As variações nas sequências de DNA são a base da diversidade dentro de uma espécie. Em muitos casos, essa variação de sequência é fenotipicamente neutra, pois grande parte das mutações que alteram a sequência de nucleotídeos somente é mantida porque são mutações silenciosas, isto é, não causam efeito no indivíduo. O número destas variações é elevado, podendo chegar a 1 de cada 100 nucleotídeos, e não está sujeito à influência do ambiente, representando desta forma uma rica fonte de polimorfismo a ser explorada.

O desenvolvimento de técnicas para o estudo do DNA propiciou um enorme e acelerado conhecimento da biosistemática, evolução e genética de animais e plantas. A grande sensibilidade destas técnicas, associada à descoberta de regiões com alto grau de variabilidade, têm permitido avanços significativos para estudos de genética de populações, biogeografia e polimorfismo em populações de diversos organismos, e em particular em populações humanas, onde têm sido desenvolvidas aplicações na medicina forense, na determinação de paternidade e no diagnóstico de doenças hereditárias.

Marcadores moleculares do tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) apresentam herança mendeliana, sendo codominantes para o DNA nuclear e dominantes para o DNA mitocondrial. A detecção do polimorfismo entre indivíduos é baseada na diferença de tamanho dos fragmentos de restrição do DNA digerido por uma determinada endonuclease, observada em autoradiogramas, após hibridização de uma membrana com uma sonda específica (Southern, 1975). À medida que endonucleases de restrição cortam o DNA em sítios específicos, mutações pontuais dentro de um determinado sítio resultam na perda ou no ganho de um sítio de reconhecimento, gerando nesta região fragmentos de restrição de tamanhos diferentes. Mutações

originadas por inserção, deleção ou inversão de segmentos de DNA podem também gerar variação de comprimento dos fragmentos de restrição.

O DNAm tem sido utilizado freqüentemente para análise de RFLP, devido à sua organização simples e uniforme, ausência de recombinação, herança materna na maioria dos casos e taxa de substituição nucleotídica relativamente alta. O genoma mitocondrial animal ocorre normalmente na forma de uma molécula de dupla fita circular fechada, exceto para alguns cnidários e em *Tetrahymena*, onde foi observado na forma de uma ou duas moléculas lineares (Flavel & Jones, 1970; Arnberg *et al.*, 1975; Bridge *et al.*, 1992). A molécula de DNAm animal possui informação para codificar 12 ou 13 genes responsáveis pelas subunidades protéicas dos complexos respiratórios da membrana interna da mitocôndria, 2 RNAs ribossômicos (rRNA) e 22 RNAs transportadores (tRNA), existindo ainda uma região não codificadora que contém a origem de replicação para a cadeia pesada do DNAm de vertebrados, conhecida como região “D-loop” (Brown, 1983) e para ambas as cadeias em *Drosophila* (conhecida em invertebrados como região rica em A+T) (Clary & Wolstenholme, 1987). A estrutura compacta do DNAm animal faz com que grande parte da variação detectada esteja localizada na região rica em A+T que está sujeita a seleção contínua, ou em pequenas regiões intergênicas (revisão em Gray, 1989).

A partir da década de 80, o DNAm começou a ser amplamente utilizado em estudos evolutivos, principalmente nos níveis intra e interespecíficos (Wilson *et al.*, 1985; Powell, 1994). Devido às suas características, os níveis de variação populacional detectados com essa molécula são maiores do que aqueles obtidos com o uso de isozimas, que eram, até então, os marcadores moleculares mais utilizados. O DNAm também é uma alternativa ao uso do DNA nuclear, pois a

análise dos dados obtidos é mais simples do que a análise de dados nucleares por não envolver recombinação gênica (Wilson *et al.*, 1985).

Estudos utilizando vários taxa de animais têm demonstrado que a análise do DNAm^t é um método sensível para detectar a estrutura populacional de uma espécie e/ou espécies crípticas (Avice & Lansman, 1983) assim como para estudos de padrões de variação geográfica e padrão de colonização de uma espécie (Avice *et al.*, 1987). Grande parte dos trabalhos que envolvem a análise do DNAm^t foram revisados por Wilson *et al.*, (1985), Avice *et al.*, (1987), Moritz *et al.*, (1987) e Wolstenholme (1992).

A análise do DNAm^t em populações do roedor *Peromyscus maniculatus* da América do Norte revelou que esta espécie é estruturada em populações distintas, enquanto que a análise de alozimas não permitiu mostrar tal subdivisão (Avice *et al.*, 1979). Lamb & Avice (1992), analisando 53 indivíduos de populações da serpente *Malaclemys terrapin* utilizando 18 endonucleases, verificaram polimorfismo de tamanho, heteroplasmia (presença de mais de um tipo de DNAm^t no indivíduo), e um único sítio de restrição pareceu ser geograficamente informativo. Com apenas este sítio polimórfico foi possível demonstrar que esta espécie está subdividida em dois grupos um ao norte e outro ao sul da Flórida, região de Cabo Canaveral nos Estados Unidos.

Em invertebrados, principalmente em insetos, vários autores (Clary & Wolstenholme, 1983; Moritz *et al.*, 1987; Crozier *et al.*, 1989; Harrison, 1989; Yoon & Aquadro, 1994; Simon *et al.*, 1994) têm utilizado o genoma mitocondrial com o objetivo de obter dados comparativos que indiquem similaridade genética, taxas de evolução e relações filogenéticas.

Entre os insetos, espécies de dípteros têm sido as mais analisadas em estudos genéticos utilizando o DNAm^t. Em mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles*, juntamente com estudos utilizando análise do RNA ribossomal e alozimas, verificou-se a utilidade do DNAm^t para detecção

de espécies crípticas, e comprovou-se que vários subgrupos de *Aedes* (*A. albopictus* e *A. scutellaris*), que não exibem uma divergência morfológica significativa, podem ser diferenciadas através do DNAm (Mitchell *et al.*, 1992; Kambhampati *et al.*, 1992a; Kambhampati & Karamjit, 1991; Cann *et al.*, 1993). Sheppard *et al.*, (1992) analisando o DNAm com endonucleases de restrição de populações naturais e de laboratório da mosca das frutas *Ceratitis capitata*, provenientes de Havaí, Venezuela, Argentina, Califórnia e Guatemala, verificaram a existência de dois haplótipos mitocondriais entre todas as populações estudadas. O haplótipo observado na amostra do Havaí não correspondeu ao apresentado pela população da Califórnia, fornecendo uma forte evidência de que a infestação na Califórnia não foi causada por *Ceratitis* provenientes do Havaí. Szalanski *et al.*, (1996), não encontraram variação no DNAm de *Stomoxys calcitrans* entre populações do Canadá, Nebraska e Texas, o que é um indicativo de que existe um alto fluxo gênico entre elas. A análise do DNAm de populações brasileiras de *Dermatobia hominis* (Geurgas, 1998) permitiu caracterizar 48 haplótipos mitocondriais, que puderam ser agrupados em 3 clados distintos.

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

Os marcadores do tipo RFLP apresentam uma série de vantagens em relação à marcadores morfológicos, citológicos ou de isozimas, tais como: (a) são herdados como marcadores mendelianos livres de efeitos pleiotrópicos; (b) não são afetados pelo ambiente; (c) podem ser obtidos em número elevado e (d) têm distribuição aleatória no genoma.

2.3. RAPD: Princípios e Aplicações da Técnica

Desde o seu desenvolvimento, a técnica do PCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki *et al.*, 1988) tem revolucionado a Biologia Molecular. Modificações desta técnica produziram uma classe específica de marcadores moleculares chamados de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990).

A técnica de RAPD é baseada na amplificação por PCR de fragmentos aleatórios de DNA, que têm herança Mendeliana (Williams *et al.*, 1990). Para a amplificação são utilizados oligonucleotídeos de sequência arbitrária como “primer”. Os “primers” usados, em geral, têm de 9 a 10 pares de bases (pb) de tamanho, alto conteúdo de GC (de 50 a 80%) e não contém sequências palindrômicas. Estes “primers” ligam-se em sítios complementares e iniciam a amplificação de alguma região do genoma; desta forma não é requerido um conhecimento prévio da sequência do DNA alvo. Somente é utilizado um tipo de “primer” para cada reação, e a técnica envolve ciclos de amplificação com baixa temperatura de anelamento (baixa estringência).

Os produtos de PCR são produzidos em regiões do genoma flanqueadas por dois sítios que devem estar a uma distância máxima de 3.500 pb, uma vez que pelas características da enzima *Taq* polimerase o limite do tamanho das bandas varia de 100 a 3000 pb (Kang *et al.*, 1993). Os produtos de amplificação do RAPD podem ser facilmente separados por eletroforese em gel de agarose, corados com Brometo de Etídeo e visualizados através de luz Ultravioleta (U.V.). Esta técnica distingue-se da técnica de RFLP pela sua rapidez e facilidade de trabalho, já que não envolve hibridação ou radioatividade. Além disto, utiliza uma quantidade bem menor de DNA (10 a 50ng) do que a técnica de RFLP (2 a 10 µg) (Waugh & Powell, 1992).

Apesar da aparente facilidade de sua metodologia, a técnica requer uma otimização empírica entre uma dada combinação de DNA molde - “primer”, o que pode ser problemático devido a uma série de variáveis a serem consideradas: (a) temperatura de anelamento; (b) duração da desnaturação; (c) intervalos de anelamento e extensão; (d) qualidade e concentração do DNA; (e) concentração de magnésio (cofator da enzima); (f) concentração da *Taq* DNA polimerase; (g) sequência do primer e (h) termociclador utilizado. Recentemente, Schweder *et al.*, (1995) indicaram também o efeito do intervalo de transição entre a temperatura de desnaturação e a temperatura de anelamento.

Em sua maioria os marcadores de tipo RAPD são herdáveis como caráter dominante. Os polimorfismos podem ser devido a alterações de uma única base, deleções nos sítios de ligação do “primer” ou inserções que aumentem a separação dos sítios de anelamento destes acima de 3000pb. Os polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento em outro genótipo. A reação de amplificação é repetida com vários “primers” diferentes em condições que resultem na produção de várias bandas para cada “primer”. Um “primer” pode identificar várias bandas, cada uma representando um locus (Williams *et al.*, 1993). O polimorfismo detectado através do RAPD é resultado de mudanças na sequência do sítio de ligação do “primer”, como por exemplo, mutações pontuais que podem modificar a estabilidade da associação “primer”-DNA, e/ou decorrente de mudanças que alterem o tamanho do DNA alvo (inserções, deleções, inversões).

Entre as principais aplicações do RAPD estão o “fingerprint” em estudos de genética de populações e de taxonomia molecular (Welsh & Mc Clelland, 1990; Lanham *et al.*, 1995), o mapeamento genético (Binelli & Bucci, 1994; Plomion *et al.*, 1995), tipagem molecular de

genótipos e de espécies para estudo de genética de populações, melhoramento e biossistemática (Hilu, 1995).

Devido as características dos fragmentos de DNA amplificados por RAPD, a deriva genética e as mutações assumem um papel muito mais importante que a seleção natural na evolução destas sequências não codificadoras, o que faz com que o RAPD seja interessante no estudo de forças evolutivas estocásticas em dinâmicas de populações (Haymer, 1994b)

A técnica de RAPD tem sido aplicada a uma ampla variedade de organismos incluindo bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Welsh *et al.*, 1991; Chapco *et al.*, 1992; Waugh & Powell, 1992; Williams *et al.*, 1993).

Michelmore (1991), mostrou que o perfil de bandas de RAPD ligado a um caráter de interesse poderia ser facilmente identificado usando-se duas amostras de DNA: uma de indivíduos que expressem o caráter, e outra de indivíduos que não o expressem. Qualquer polimorfismo entre os dois “pools”deveria estar ligado ao caráter. Esta técnica foi denominada “Bulk Segregant Analysis” e hoje é amplamente usada para mapear caracteres simples com marcadores RAPD principalmente em plantas (Rafalski & Tingey, 1993). Em plantas, os RAPDs tem sido extensivamente utilizados, e correspondem ao maior volume de publicações com este tipo de marcador (revisão em Lanza, 1996).

A técnica de RAPD-PCR tem sido amplamente utilizada em insetos por apresentarem um genoma relativamente grande em tamanho, com maior probabilidade de se detectar polimorfismo (Kambhampati *et al.*, 1992). Uma das primeiras aplicações da técnica foi realizada para diferenciar populações naturais de duas espécies de grilo *Melanoplus sanguinipes* e *M. femurrubrum* (Chapco *et al.*, 1992), que pelas análises morfométricas, de DNAm_t e de isozimas foram agrupadas no dendrograma. Esta metodologia também foi eficiente para diferenciar e

identificar populações de mosquito *Aedes aegypti* (Ballinger-Crabtree *et al.*, 1992), subespécies de *A. scutellaris* (Kambamphati *et al.*, 1992) e para caracterizar espécies crípticas de *Anopheles gambiae* e *A. arabiensis* (Wilkerson *et al.*, 1993). Em populações naturais da mosca das frutas *Ceratitidis capitata*, a técnica de RAPD-PCR tem sido eficiente na caracterização da variabilidade em populações de diferentes localidades geográficas nos Estados Unidos, Havaí, Argentina e Israel (Haymer & McInnis, 1993), entre populações do Havaí e Okinawa (Haymer, 1995) e em populações africanas desta espécie (Baruffi *et al.*, 1995). Na sistemática de insetos, a identificação de espécies e a filogenia de um grupo de coleópteros (*Ips grandicollis*) foi realizada através de RAPD. As espécies têm morfologia muito semelhante e são simpátricas. A filogenia baseada nos dados de RAPD foi congruente com a reconstrução por dados de isoenzimas (Cognato *et al.*, 1995).

Outros grupos de insetos analisados através desta técnica foram afídeos e seus parasitóides (Black *et al.*, 1992; 1993), homópteros (Gawel & Bartlett, 1993; Mendel *et al.*, 1994), himenópteros (Vanlerberghe-Masutti, 1994; Edwards & Hoy, 1995), coccinélidos (Roehrdanz & Flanders, 1993), lepidópteros (Dowdy & McGaughey, 1996), mosca doméstica (Chen & Bull, 1994) e no califorídeo *Lucilia sericata* (Stevens & Wall, 1995).

Pelo enorme potencial da técnica de RAPD no estudo de genética de populações, Lynch & Milligan (1994) propuseram uma série de correções para se poder utilizar os resultados obtidos em cálculos clássicos de genética de populações e estimar parâmetros populacionais. As correções se baseiam em diversos pressupostos que possibilitam esta análise. Este tipo de abordagem começou a ser utilizado recentemente em populações de *Aedes aegypti* (Apostol *et al.*, 1996), populações de *Morone saxatilis* (Bielawsky & Pumo, 1997) e em populações de *Cochliomyia hominivorax* (Infante-Malachias *et al.*, 1998)

3. Estudos Comparativos de Marcadores Moleculares

Vários trabalhos se propuseram realizar estudos comparativos entre isoenzimas, RFLPs e RAPDs, com a finalidade de avaliar a utilidade de cada tipo de marcador na determinação de relações genéticas entre diferentes espécies de microrganismos e de plantas (ver Lanza, 1996). Em geral, foi observado que apesar de os dados de RAPD mostrarem maior variabilidade genética, se correlacionam significativamente com dados isoenzimáticos.

Puterka *et al*, (1993) estudaram a variação genética e relações filogenéticas em populações russas de *Diuraphis noxia* utilizando análise de isozimas e de RAPD. A análise de isozimas não revelou variabilidade e a média da heterozigosidade esperada foi de 4.9 %, em contraste a análise com marcadores do tipo RAPD, revelou alta variabilidade nas mesmas populações. As filogenias resolvidas por ambos os métodos foram concordantes.

Análise de sequência de genes mitocondriais e RAPD foram utilizados por Stevens & Wall (1996b), para caracterizar a variação genética intraespecífica de duas espécies de Calliphoridae consideradas pragas, *Lucilia sericata* e *L. cuprina*. Para *L. sericata* não foi observada nenhuma evidência de isolamento genético, apesar da separação geográfica entre as populações estudadas. Para *L. cuprina* foram detectados diversos padrões de variação genética, possivelmente associados a isolamento geográfico. Para estas espécies de Calliphoridae, as conclusões obtidas pela análise de RAPD foram corroborados pelos dados de sequência do DNAm.

Recentemente, Ross *et al*, (1997) realizaram uma análise hierárquica da estrutura genética de populações da formiga *Solenopsis invicta* de duas regiões da Argentina, utilizando para este fim três tipos de marcadores moleculares, dois deles sendo marcadores nucleares: alozimas e microsátélites e um marcador do genoma mitocondrial através de PCR-RFLP. Com o uso de

alozimas foi detectada uma forte estruturação genética nos ninhos nas duas formas sociais estudadas (uma única rainha e várias rainhas). Usando os dois marcadores nucleares, estruturação microgeográfica menor, mas significativa, foi detectada nas populações com várias rainhas, mas não em populações com rainha única. Uma alta diferenciação mitocondrial foi observada para populações com múltiplas rainhas. Com o conjunto dos três marcadores, foi detectada uma grande estruturação genética entre as duas regiões estudadas, e os autores sugerem, através de análises filogeográficas do DNAm, que esta estruturação em grande escala seja devida à limitações recentes ao fluxo gênico.

Mais recentemente foram utilizados marcadores de tipo RFLP do DNAm, isozimas e RAPD, para determinar a origem geográfica de 4 populações de *Ceratitis capitata* de três diferentes regiões da Espanha e uma população de laboratório (Reyes & Ochando, 1998). Os resultados obtidos indicaram que tanto RAPD quanto o RFLP do DNAm indicaram a origem correta da população de laboratório, o que não aconteceu com a análise de isozimas, devido a ser uma técnica fortemente afetada por restrições seletivas. Os autores discutem os efeitos do afinamento populacional sofrido pela população de laboratório, que influencia a variabilidade genética e a capacidade dos diversos marcadores para detectar a origem geográfica da mesma.

III. VARIABILIDADE GENÉTICA DE CALLIPHORIDAE

1. Variabilidade genética em algumas espécies causadoras de miíase

Estudos sobre a variabilidade genética de populações de algumas destas espécies, particularmente dos gêneros *Cochliomyia*, *Phaenicia* e *Chrysomya* são relativamente poucos considerando a importância econômica e sanitária.

Os estudos genéticos realizados em *C. macellaria*, *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria* têm se referido à caracterização cariotípica (Boyes, 1961; Boyes & VanBrink, 1965; Boyes & Shewell, 1975, Azeredo Espin, 1982; Azeredo Espin & Pavan, 1984) e à análise do DNAm de populações brasileiras (Valle & Azeredo Espin, 1995; Valle, 1997). Para populações brasileiras de *P. eximia*, foi realizada recentemente uma análise preliminar do DNAm (Azeredo Espin & Madeira, 1996). Análises de RAPD e sequências de genes mitocondrias para determinar variação intraespecífica em *Lucilia sericata* e *Lucilia cuprina* foram conduzidas por Stevens & Wall (1995, 1996a, b). Para *D. hominis*, da família Oestridae, foram conduzidos no nosso laboratório estudos de marcadores RAPD no DNA genômico (Yotoko, 1998) e de RFLP no DNAm (Geurgas, 1998). Lessinger (1998), estudou sequências específicas do DNAm de 5 espécies de moscas causadoras de miíases, para estabelecer inferências filogenéticas.

Para outras espécies de dípteros causadores de miíase não existe até o momento algum estudo intra ou interespecífico que permita caracterizar a variabilidade genética e a estrutura populacional.

2. Variabilidade genética e estrutura populacional de *C. hominivorax* : Uma abordagem histórica

Há mais de uma década *Cochliomyia hominivorax* vem sendo considerada uma espécie importante para estudos genéticos devido à identificação errada da espécie, variabilidade intraespecífica e perante a possibilidade de existir populações isoladas reprodutivamente (Mangan, 1985).

Em 1937, Knipling foi o primeiro a propor um método de erradicação da mosca da bicheira através da liberação de moscas esterilizadas por radiação ionizante, método denominado de esterilização de machos. Como resultado destas pesquisas, surgiram os primeiros estudos genéticos em *C. hominivorax*, centrados nos danos citológicos ocasionados pela radiação em pupas, o que causava dano permanente as espermatogônias devido às quebras cromossômicas induzidas (Kauffman & Wasserman, 1957). As primeiras tentativas de utilização do método de esterilização foram conduzidas com êxito na ilha de Curaçao (Baumhover, 1966), onde foi possível erradicar *C. hominivorax*. Embora este método esteja sendo empregado com sucesso no México e em alguns países da América Central, parece não ser o mais indicado para as condições do Brasil, devido a grande extensão territorial, por ser um método caro e que depende, para o êxito das medidas de controle adotadas, da cooperação de países vizinhos que também apresentam esta praga.

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

A continuidade dos estudos genéticos em *C. hominivorax* foram baseados em análises cariotípicas, morfológicas e de compatibilidade sexual em diferentes populações e forneceram interpretações divergentes. Richardson *et al.* (1982 a e b), sugeriram isolamento sexual entre algumas populações que apresentaram certa diferenciação morfológica e cariotípica, caracterizando *C. hominivorax* como um complexo de espécies crípticas. Por outro lado, as interpretações sobre a variabilidade cariotípica desta espécie dadas por McInnis (1981) sugerem que a variabilidade encontrada nesta espécie decorre de um polimorfismo cromossômico de uma única população intercruzante. No Brasil, Azeredo-Espin (1987) realizou um estudo abrangente em diversas populações brasileiras desta espécie, através de análise cariotípica, morfométrica e de compatibilidade sexual. Este trabalho sugeriu que *C. hominivorax* é um complexo biológico com grande variabilidade intra e interpopulacional em franco processo evolutivo.

Com o advento da técnica de isozimas foi possível utilizar pela primeira vez nesta espécie um marcador molecular para identificar mudanças genéticas nos indivíduos irradiados. Foram afetados dois loci polimórficos de enzimas envolvidas na produção de energia na musculatura de voo, α GDH e PGM (Bush & Neck, 1976). Estes mesmos autores identificaram 5 loci enzimáticos variáveis em populações de laboratório, mas eles não estudaram populações naturais. Richardson *et al.*, (1982b) indicaram a existência de um significativo polimorfismo enzimático concordante com isolamento reprodutivo de populações; infelizmente, não foram publicados outros estudos confirmando estes dados. Whitten, (1980) estudou dois loci de uma única população de Texas e Krafur & Whitten, (1993) examinando três loci em 11 populações do México concluíram que *C. hominivorax* é uma população panmítica. Posteriormente, Taylor & Peterson, (1994) e Taylor *et al.*, (1996) estudando isozimas de populações de *C. hominivorax* de Costa Rica, e do Brasil e

comparando com os dados obtidos para as populações mexicanas, concluíram que existe um alto fluxo gênico entre as populações e ausência de estruturação genética, confirmando, portanto a hipótese de Krafur & Whitten, (1993) que indica que esta espécie é panmítica ao longo da sua distribuição espacial e histórica. No entanto até 1993 nenhum estudo mais abrangente sobre a variabilidade genética de populações da América do Sul foi realizado, prevalecendo esta interpretação.

Um outro marcador molecular foi utilizado também isoladamente, a análise do DNAm com endonucleases de restrição. Estes estudos foram feitos inicialmente em populações geográficas dos Estados Unidos, México, Jamaica, Costa Rica e Guatemala (Roerhdanz & Johnson, 1988; Roerhdanz, 1989). Estas análises indicaram uma significativa variabilidade interpopulacional. No trabalho de Roerhdanz & Johnson (1988), foram analisadas 6 populações de *C. hominivorax* do México, Jamaica e dos Estados Unidos, utilizando-se 15 endonucleases. A grande diversidade do DNAm dos indivíduos da Jamaica, sugere que essa população poderia ter se separado das demais há milhões de anos e que poderia ter sido originada pela migração de indivíduos provenientes da América do Sul.

Roerhdanz (1989), analisou 30 linhagens de *C. hominivorax*, incluindo populações da América do Norte, Central, Costa Rica e Guatemala. Das 15 endonucleases de restrição que foram utilizadas, 11 revelaram polimorfismo. Foram obtidos 16 haplótipos e/ou genótipos mitocondriais. Dois destes haplótipos foram amplamente distribuídos nas populações (sul e costa oeste do México), e os outros 14 haplótipos apareceram exclusivamente em algumas localidades. A interpretação dada por Roerhdanz (1989) para explicar a variabilidade observada em *C. hominivorax* é a de que em algumas localidades esta espécie contém uma substancial variabilidade genética, sugerindo um reduzido fluxo gênico interpopulacional, especialmente no México e na ilha de

Jamaica. Os dados apresentados por Roehrdanz (1989) indicam que a grande variedade de genótipos mitocondriais pode ser utilizada como marcadores genéticos eficientes para caracterizar as diferentes populações desta espécie.

Posteriormente, Narang & Degrugillier, (1995) através dos padrões do DNAm_t já conhecidos para *C. hominivorax* em sua área original de distribuição, puderam confirmar que indivíduos coletados na Líbia, durante a fase final do programa de erradicação da espécie no país, eram provavelmente provenientes da América do Sul, e não do México, América do Norte ou Costa Rica.

Taylor *et al.*, (1996), analisaram populações de *C. hominivorax* e *C. macellaria* provenientes do Caribe, América do Norte e América do Sul. Enquanto as populações de *C. macellaria* não apresentaram variabilidade, os haplótipos encontrados para *C. hominivorax* foram divididos em três grupos representativos de cada grande área analisada, sem, no entanto, haver uma distribuição geográfica definida, indicando que ocorre fluxo gênico entre as áreas.

No Brasil, a análise do DNAm_t de populações de *C. hominivorax* realizadas por Azeredo-Espin (1993), Infante (1994) e Infante e Azeredo-Espin (1995), revelou uma alta variabilidade intra e interpopulacional de genótipos mitocondriais, sugerindo que existem diferentes linhagens maternas contribuindo para a manutenção das populações. Assim como os resultados obtidos para as populações norte-americanas, observou-se um pequeno número de haplótipos distribuídos entre as populações e um grande número de haplótipos locais, evidenciando um reduzido fluxo gênico entre algumas das populações, provavelmente associado com a distância entre as localidades.

Pela controvérsia observada nos resultados das análises de isozimas e de DNAm^t de populações de *C. hominivorax*, tornou-se importante realizar uma análise mais completa da estrutura genética de populações tropicais desta espécie, utilizando outras abordagens.

APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS E OBJETIVOS

Esta tese é constituída de três trabalhos; um já publicado, outro no prelo e o terceiro sera submetido à publicação. Os trabalhos analisam a estrutura genética de populações brasileiras da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae), baseado em diferentes marcadores moleculares.

Trabalho 1: **Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae), from Brazil.**

Infante, M.E. and Azeredo Espin, A.M.L. *Biochemical Genetics*. 33 (7): 237-256. (1995).

Objetivos:

1. Verificar a existência de variabilidade genética intra e interpopulacional.
2. Verificar se o DNA mitocondrial (DNAm_t) pode ser utilizado como marcador genético para analisar estrutura de populações e/ou caracterizar populações desta espécie.
3. Baseado nos marcadores de DNAm_t obtidos determinar a qual categoria filogeográfica de Avise *et al*, (1987) às populações brasileiras analisadas correspondem.

Resumo:

Neste trabalho foi utilizada a análise de RFLP do DNA mitocondrial de 4 populações de *C. hominivorax* do Estado de São Paulo, para examinar a variabilidade genética e a estrutura de população desta espécie. A análise realizada com 15 endonucleases de restrição em 405 indivíduos revelou que quatro endonucleases de restrição (*Hae*III, *Hind*III, *Msp*I e *Pvu*II) detectaram variabilidade no DNAm_t em todas as populações analisadas. Baseado nos fragmentos de restrição obtidos para essas 4 enzimas, foram detectados 15 haplótipos mitocondriais. Os resultados sugerem que as populações de *C. hominivorax* estudadas provém de uma única linhagem evolutiva, estão subdivididas ao nível geográfico e interconectadas por um reduzido fluxo gênico.

Trabalho 2: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis in populations of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae), from Northern Argentina and Southeastern Brazil.

Infante-Malachias, M.E; Yotoko, K. & Azeredo Espin, A.M.L. (1998) (*Genome*, no prelo).

Objetivos:

1. Determinar a distância genética e quantificar o grau de estruturação genética entre as populações analisadas.
2. Comparar os dados obtidos via RAPD com dados publicados previamente em outras populações desta espécie , usando outros marcadores moleculares (DNAmt e isozimas).
3. Verificar a utilidade da técnica de RAPD na estimativa de parâmetros populacionais em populações de *C.hominivorax*.

Resumo:

Neste trabalho foi otimizada a técnica de RAPD-PCR para a análise da variabilidade genética de 7 populações de *Cochliomyia hominivorax*, a saber: 6 do Brasil (Adamantina, Amparo, Botucatu, Caraguatatuba, Pirassununga e Valinhos) e uma da Argentina (Rafaela). Com 12 primers aleatórios foi detectada alta variação de padrão de bandas. De um total de 209 locus detectados, 198 foram polimórficos. As populações analisadas revelaram uma alta estruturação genética ($F_{st}= 0.12$). Os resultados obtidos indicaram que a técnica de RAPD-PCR pode ser utilizada para detectar variabilidade genética em *C. hominivorax*, não detectada por outras técnicas e representa um método eficiente para compreender a estrutura genética desta espécie.

Trabalho 3: Population Heterogeneity of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil.

Infante-Malachias, M.E; Solferini, V.N; Andrade, S.C.S. and Azeredo Espin, A.M.L.

Objetivos:

1. Examinar a estrutura genética de populações brasileiras de *C. hominivorax*.
2. Determinar o grau de heterozigosidade.
3. Correlacionar os dados obtidos com diferentes marcadores moleculares para interpretar a estrutura genética desta espécie em habitats tropicais.
4. Estabelecer inferências evolutivas sobre a estrutura populacional de *C. hominivorax*.

Resumo:

Em 5 populações brasileiras de *C. hominivorax* foram testadas 20 enzimas, das quais 11, representando 19 locus, puderam ser analisadas. Um total de 10 locus (52,6%) foram polimórficos e utilizados na análise. A média da heterozigosidade esperada foi alta (16.5%). O índice de fixação de Wright revelou que a estrutura populacional de *C. hominivorax* é caracterizada por uma alta diferenciação geográfica ($F_{st}= 0,21$) com um baixo fluxo gênico ($N_m=0.92$). Os dados obtidos neste trabalho associados aos resultados previamente obtidos com RFLP do DNAm e RAPD, indicam que existe uma grande variabilidade e diferenciação genética nas populações de *C. hominivorax* no Brasil, sugerindo que provavelmente a América do Sul seja o centro de origem desta espécie.

Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil

Maria Elena Infante Vargas¹ and Ana Maria Lima de Azeredo Espin^{1,2}

Received 3 Jan. 1995—Final 11 Apr. 1995

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) was used to examine genetic variation and population structure of screwworm flies in four populations from São Paulo State, Brazil. The total DNA of 405 individuals was digested with 15 restriction endonucleases and probed with five cloned HindIII fragments representing the entire mitochondrial genome of Cochliomyia hominivorax. The survey revealed that four enzymes (HaeIII, HindIII, MspI, and PvuII) were suitable to detect mtDNA variation among all populations. Based on the fragment patterns obtained for these four enzymes, a total of 15 haplotypes in combination was detected. Heteroplasmic individuals for the PvuII pattern were obtained in one of the populations. The estimated average for nucleotide sequence divergence (δ) was 0.92%. The cladogram of the geographical distribution among the observed haplotypes suggests that the sampled screwworms probably belong to a single evolutionary lineage with populations interconnected by reduced gene flow.

KEY WORDS: mitochondrial DNA; restriction fragment length polymorphism; *Cochliomyia hominivorax*; screwworm fly; population genetics.

INTRODUCTION

The screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1859), causes invasive myiasis in warm-blooded vertebrates, particularly livestock, in South, Central, and North America. The historical geographic distribution of *C.*

¹ Depto. de Genética e Evolução e CBMEG, Universidade Estadual de Campinas, P.O. Box 6109, Campinas, SP, Brazil.

² To whom correspondence should be addressed.

hominivorax in the New World extended from the southern United States to Argentina. The fly has been successfully eradicated from the United States and Mexico using the sterile insect technique (Knippling, 1955; Graham, 1985). The present continental distribution of this fly is entirely Neotropical. In 1988, screwworm flies from the New World were recorded for the first time in Libya (North Africa), infesting wounds in livestock and humans (El-Azazy, 1989; Gabaj and Beesley, 1989; FAO, 1993).

In Brazil, the screwworm fly is one of the most devastating insect pests, as it infests open wounds of man (Fraiha *et al.*, 1979) and warm-blooded vertebrates, causing severe myiasis and great profit losses for cattle breeders.

Classical approaches to genetic analysis based on cytogenetics and morphological studies have been conducted previously in some geographic populations of screwworm flies from North America and Brazil. Most researchers believe *C. hominivorax* to be a single, highly polymorphic species (McInnis, 1981; McInnis *et al.*, 1983; LaChance *et al.*, 1982; Azeredo Espin, 1987). Richardson *et al.* (1982) described several "biotypes" of screwworm fly from Mexico, based on anatomical differences in male genitalia. However, in opposition, Gagne and Peterson (1982) found that genitalia differences can arise from age and frequency of mating, and their conclusion was that these differences cannot be used to separate populations of screwworm.

More recently, restriction enzyme site polymorphism of mtDNA (RFLP) has been used to analyze the genetic variation in natural populations of *C. hominivorax* from North and Central America and North Africa (Roehrdanz and Johnson, 1988; Roehrdanz, 1989; Taylor *et al.*, 1991). A total of 30 screwworm lines from Texas to Costa Rica and Jamaica was examined using 15 restriction endonucleases. Eleven enzymes revealed polymorphism and yielded 17 haplotypes in combination (Roehrdanz, 1989; Taylor *et al.*, 1991). The average sequence diversity among 27 mainland lines from North America was about 0.5%. The two Jamaican lines and one East Coast mainland line differed from the others by >2%. The high frequency of unique haplotypes was interpreted by (Roehrdanz, 1989) as suggesting a very reduced gene flow, which is in marked contrast to what was found in many of these same lines by other analyses such as polytene chromosome, isozymes, and cuticular hydrocarbons (Dev *et al.*, 1986; LaChance and Whitten, 1986; Pomonis, 1989; Krafur and Whitten, 1993).

The mtDNA restriction fragment analysis of a screwworm population from Libya (North Africa) revealed a new haplotype that differs from the previously reported haplotypes from Mexico and Central America (Taylor *et al.*, 1991). The unusual haplotype suggests that the Libyan population did not originate from North or Central America but from some region of South America via infested livestock (Taylor *et al.*, 1991).

Genetic Variability in Screwworm mtDNA

In Brazil, preliminary seasonal analysis in screwworm populations, collected in a single locality (Caraguatatuba, SP), was performed to detect any possible variation in mtDNA. This study indicated that significant genetic heterogeneity exists within some restriction sites over time. This variability was observed especially in the samples collected during the summer and fall with six unique haplotypes (Azeredo Espin, 1993).

We have chosen restriction analysis of mitochondrial DNA as a tool to examine the population genetics of *C. hominivorax* because it may be more sensitive in detecting population subdivisions due to mtDNA characteristics (Avisé *et al.*, 1979, 1987). We also want to compare the mtDNA data from Brazilian screwworm populations with the previously published data on North and Central America and Libya populations obtained by Roehrdanz and Johnson (1988), Roehrdanz (1989), and Taylor *et al.* (1991).

MATERIALS AND METHODS

Screwworm Fly Populations. Larvae of *C. hominivorax* were obtained from individual wounded cattle and sheep (an average of five wounded animals per locality). A total of 15 wounds (405 individuals) was sampled from 1991 to 1993, from four locations in the State of São Paulo, Brazil (Fig. 1). The geographic location of the four sampling areas, the number of wounds sampled per locality, and the mean number of individuals analyzed from

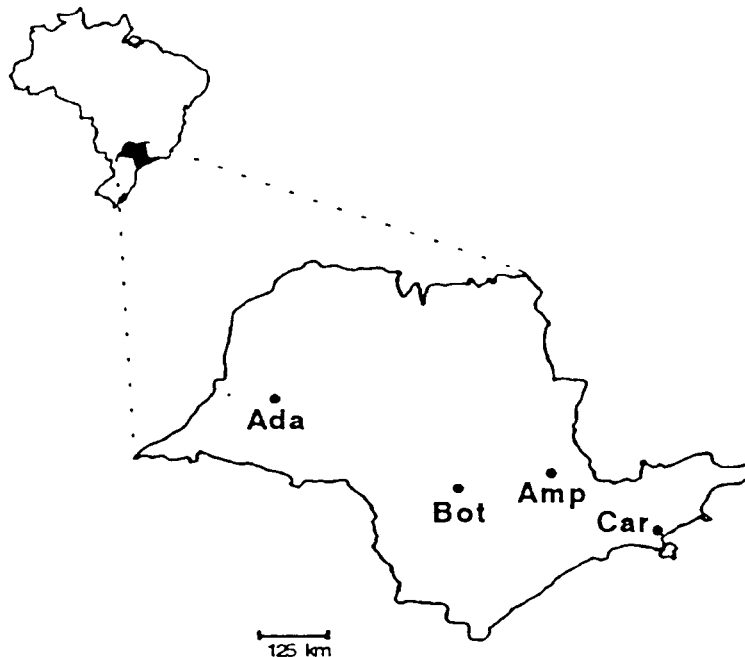


Fig. 1. Geographic origins of the screwworm sample populations.

each wound were the following: Adamantina (Ada), 3 wounds, in different animals, $n = 47$ (16 individuals/wound/animal); Amparo (Amp), 2 wounds, $n = 46$ (23 individuals/wound/animal); Botucatu (Bot), 2 wounds, $n = 63$ (31 individuals/wound/animal); and Caraguatatuba (Car), 9 wounds, $n = 249$ (27 individuals/wound/animal). We assume that more than one female can contribute egg masses in one wound (see Thomas and Mangan, 1989).

Screwworm larvae were reared in the laboratory in a medium of fresh cattle meat, ground and supplemented with blood and water (2:1). Larvae were maintained at approximately 37°C. Mature larvae were allowed to pupate in sawdust. Adults were maintained in cages (34 × 50 × 26) at 25°C and fed with dried milk, sugar, and yeast ferment. A laboratory population of *C. hominivorax* (F₁₅ to F₂₀), originally from Caraguatatuba, provided material from which mtDNA probes were constructed (pure or cloned mtDNA).

Isolation of Total Nucleic Acids. Total nucleic acids were isolated from pupae using the method described by Azeredo Espin *et al.* (1991) with some modifications (Azeredo-Espin, 1993). One individual was gently homogenized in a 15-ml Corex tube with 1 ml of grinding buffer (10 mM Tris, 60 mM NaCl, 300 mM sucrose, 10 mM EDTA). One milliliter of lysis buffer containing 2% DEPC (300 mM Tris, 40 mM SDS, 20 mM EDTA) was added. The resulting lysate was incubated at 4°C for 15 min. An equal volume of buffer-saturated phenol (0.5 M Tris, pH 8.0) was added and centrifuged at 3000g for 10 min. The aqueous phase was transferred into another 15-ml Corex tube and extracted with phenol and chloroform.

The final supernatant was then ethanol precipitated at -70°C for 45 min. The samples were centrifuged at 11,000g for 45 min to pellet the DNA. The pellet was dried at room temperature and resuspended in 200 µl of TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0). DNA isolated from a single individual provided enough material for 15 digestions.

Probe Production. To obtain pure mtDNA for probes, two methods were used. (a) Pure mtDNA from 8 g of pupae from the laboratory population was homogenized in mitochondrial isolation medium buffer (MIM; 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 M Hepes, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.5). The mitochondria were concentrated by differential centrifugation in CsCl and mtDNA purified by methods described by Azeredo Espin *et al.* (1991). (b) To clone the entire mtDNA of *C. hominivorax* the procedures described by Sambrook *et al.* (1989) were followed. Purified mtDNA was digested with *Hind*III and inserted into pGEM-3Z vector DNA (Promega). Recombinant plasmids were selected in *E. coli* strain DH-5α using the culture conditions and screening methods described by Sambrook *et al.* (1989). Five clones (6.8, 4.2, 4.0, 0.6, and 0.5 kb) were obtained, representing the entire mitochondrial genome of *Cochliomyia hominivorax*.

mtDNA Analysis. Total DNA from individual pupae of *C. hominivorax* was digested with 15 restriction endonucleases: *Cla*I (AT/CGAT), *Eco*RI (G/AATTC), *Eco*RV (GAT/ATC), *Hae*III (GG/CC), *Hind*III (A/AGCTT), *Kpn*I (GGTAC/C), *Msp*I (C/CGG), *Pst*I (CTGCA/G), *Pvu*II (CAG/CTG), *Sau*96 I (G/GNCC), *Ssp*I (AAT/AAT), *Sst*I (GAGCT/C), *Taq*I (T/CGA), *Xba*I (T/CTAGA), and *Xho*I (C/TCGAG). Digestion was carried out under the conditions specified by the supplier (GIBCO, BRL). Restriction fragments were separated in 0.8, 1.0, or 1.2% horizontal agarose gels and visualized by ethidium bromide stain. DNA/*Hind*III from λ phage and DNA/*Hae*III from ϕ X 174 were used as a size marker. Restriction fragment sizes were estimated by using both markers. Gels containing the digested total DNA were transferred to nylon membranes (Hybond-N, Amersham) according to Southern (1975).

The purified or cloned *C. hominivorax* mtDNA was nick translated (Rigby *et al.*, 1977) to yield a ^{32}P -labeled probe. Hybridization was carried out under standard conditions (Maniatis *et al.*, 1982). Visualization of mtDNA fragments was conducted by autoradiography and fragment sizes were estimated from autoradiographs.

Data Analysis. Estimates of the index of nucleotide diversity (δ) were calculated based on the proportion of shared restriction fragments (F) in any two haplotypes using the equation, $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ (Nei and Li, 1979), where N_x and N_y are the numbers of restriction fragments in haplotypes x and y , respectively. N_{xy} is the number of restriction fragments shared by haplotype x and y . The index of nucleotide diversity was estimated using the equation, $\delta = -(\ln S)/r$ (Nei and Li, 1979), where r is the number of nucleotides of the restriction sequence for restriction endonucleases used. Separate values were determined for the different classes of endonucleases. Haplotypes were also converted into strings of 1s and 0s matrix for a cladistic analysis using the parsimony criterion. The PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) program was used (Swofford, 1990).

RESULTS

The initial survey revealed that 4 of 15 enzymes used were suitable to detect mtDNA variation among all populations. A total of five patterns for *Hae*III and *Msp*I, four for *Hind*III, and three for *Pvu*II were observed (Table I and Figs. 2 and 3).

The size of mtDNA of *C. hominivorax* was estimated as 16.3 kb. Fragments <0.5 kb were usually not observed or included in Table I. The coexistence of an unknown number of small fragments can explain why some of the fragment totals fall short of the estimated size for the mtDNA. The enzymes *Hae*III, *Hind*III, and *Msp*I produced the greatest number of bands,

Table I. Comparison of mtDNA Restriction Patterns Obtained from the Same Enzymes, for *C. hominivorax* from Brazil (Adamantina, Amparo, Botucatu, and Caraguatatuba) and North and Central America^a

Enzyme	Restriction fragment (kb)		
	São Paulo state ^b		North and Central America ^a
<i>Cla</i> I			
A	13.7, 1.7, 1.3		Not tested
<i>Eco</i> RI			
A	9.0, 3.5, 1.5, 1.3	A	9.0, 3.5, 1.5, 1.2, 1.05
<i>Eco</i> RV			
A	6.6, 5.0, 2.9, 1.5	A	6.6, 5.0, 2.9, 1.5
		B	6.6, 5.0, 4.5
<i>Hae</i> III			
A	7.5, 4.8, 2.0, 1.1, 0.8	A	7.5, 4.8, 2.0, 1.1, 0.8
B	7.5, 7.0, 1.1, 0.8	B	7.5, 7.0, 1.1, 0.8
C	8.6, 4.8, 2.0, 0.8	C	8.6, 4.8, 2.0, 0.8
D	—	D	7.5, 5.9, 2.0, 0.8
E	8.2, 7.5, 1.1, 0.8	E	—
F	7.5, 3.0, 2.0, 1.8, 1.1, 0.8	F	—
<i>Hind</i> III			
A	6.8, 4.2, 3.8, 0.6, 0.5	A	6.8, 4.2, 3.3, 0.52, 0.5, 0.45
B	8.0, 6.8, 0.8	B	7.7, 6.8, 0.52, 0.5, 0.45
C	—	C	5.5, 4.2, 3.3, 1.3, 0.52, 0.5, 0.45
D	6.8, 3.8, 3.6, 0.6	D	6.8, 4.0, 3.8, 0.52, 0.5, 0.45
E	6.8, 4.2, 3.1, 0.7, 0.6	E	6.8, 4.0, 3.0, 0.8, 0.52, 0.5, 0.45
F	—	F	5.5, 4.2, 3.0, 1.3, 0.52, 0.5, 0.45, 0.3
<i>Kpn</i> I			
A	16.3		Not tested
<i>Msp</i> I			
A	5.0, 4.8, 4.2, 1.3	A	5.0, 4.9, 4.2, 1.4
B	6.1, 5.2, 3.8, 1.3	B	6.1, 5.0, 4.2
C	—	C	4.7, 4.7, 4.5, 1.0, 0.35
D	—	D	5.0, 4.8, 2.3, 1.8, 1.3
E	6.1, 5.2, 4.9	E	5.6, 5.0, 4.9
F	5.2, 5.0, 4.2, 1.3	F	—
G	5.2, 4.2, 3.8, 1.3	G	—
<i>Pst</i> I			
A	16.3	A	16.0
<i>Pvu</i> II			
A	—	A	7.8, 3.0, 2.9, 0.87, 0.57
B	—	B	7.8, 3.0, 2.9, 1.4
C	9.0, 3.0, 2.9, 0.8, 0.6	C	—
D	9.0, 5.9, 0.8, 0.6	D	—
"E"	9.0, 7.8, 3.0, 2.9, 0.8, 0.6	E	—
<i>Sau</i> 96I			
A	5.8, 4.9, 2.1, 1.6, 1.07	A	5.8, 4.7, 2.0, 1.6, 1.1, 0.4, 0.3
		B	5.8, 5.7, 2.0, 1.6, 0.4, 0.3
<i>Ssp</i> I	Undetermined		Not tested
<i>Sst</i> I			
B	6.0, 5.3, 3.9	A	9.0, 6.0, 0.6
<i>Taq</i> I		B	6.0, 5.2, 3.8, 0.6
A	3.8, 2.5, 1.3, 0.8		Not tested
<i>Xba</i> I			
A	16.3	A	16.0
		B	None
<i>Xho</i> I			
A	16.3	A	16.0

^aFrom Roehrdanz (1989).

^bThe fragment patterns for each enzyme follow the nomenclature described by Roehrdanz (1989). The new Brazilian patterns were denoted with different letters.

Genetic Variability in Screwworm mtDNA

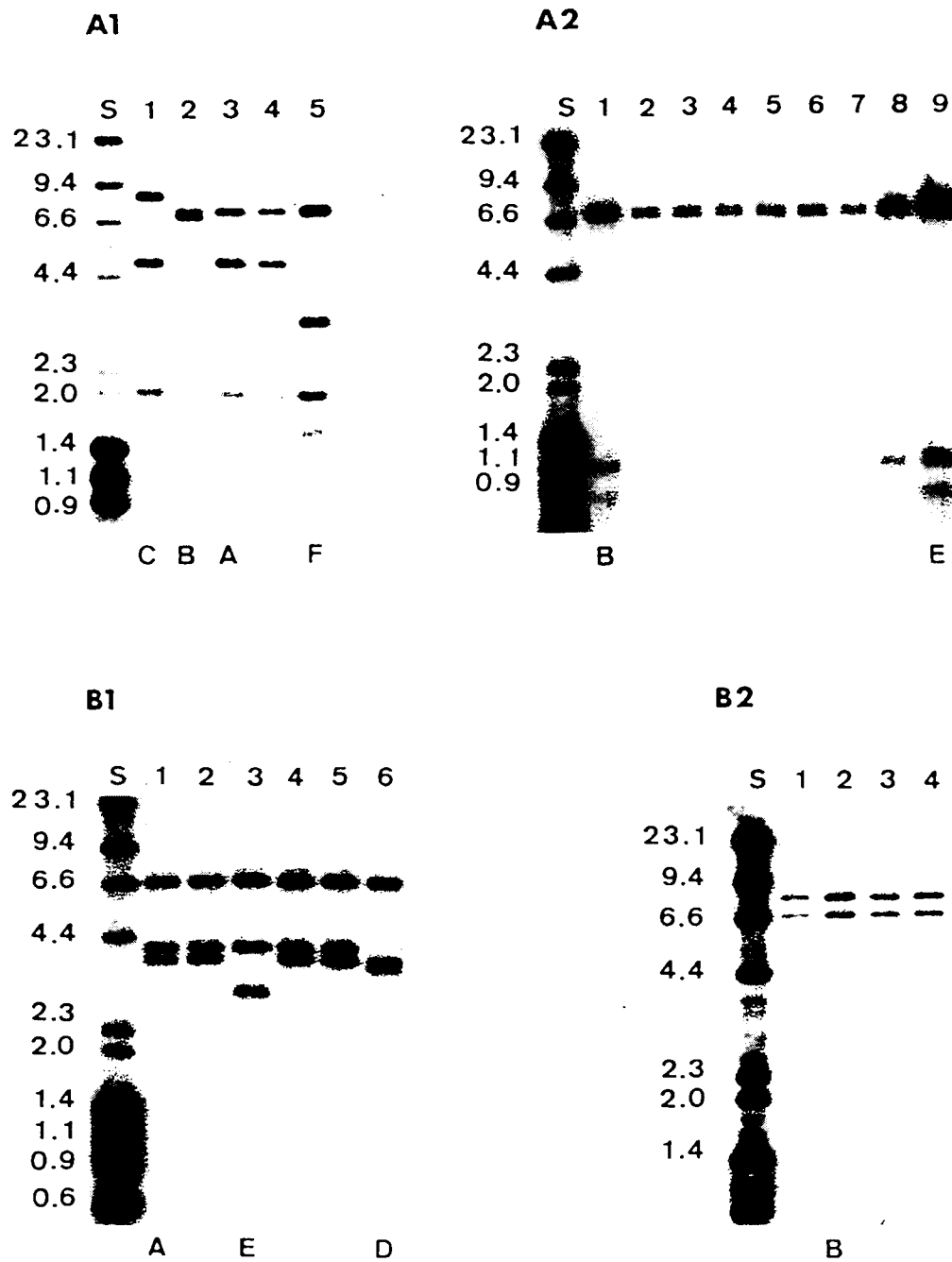


Fig. 2. Autoradiograms of Southern blot showing *C. hominivorax* mtDNA of sampled populations digested with *Hae*III (A1 and A2) and *Hind*III (B1 and B2). A1: Lane 1, Car, pattern C; lane 2, Amp, pattern B; lanes 3 and 4, Car, pattern A; lane 5, Car, pattern F. A2: Lanes 1–8, Amp, pattern B; lane 9, Car, pattern E. B1: Lanes 1 and 2, Ada, pattern A; lane 3, Car, pattern E; lanes 4 and 5, Car, pattern A; lane 6, Car, pattern D. B2: Lanes 1–4, Bot, pattern B. *Hind*III cut λ DNA and *Hae*III cut $\phi \times 174$ DNA (S) are the size standards. Sizes of fragment patterns are given as kilobase pairs on the left in each panel.

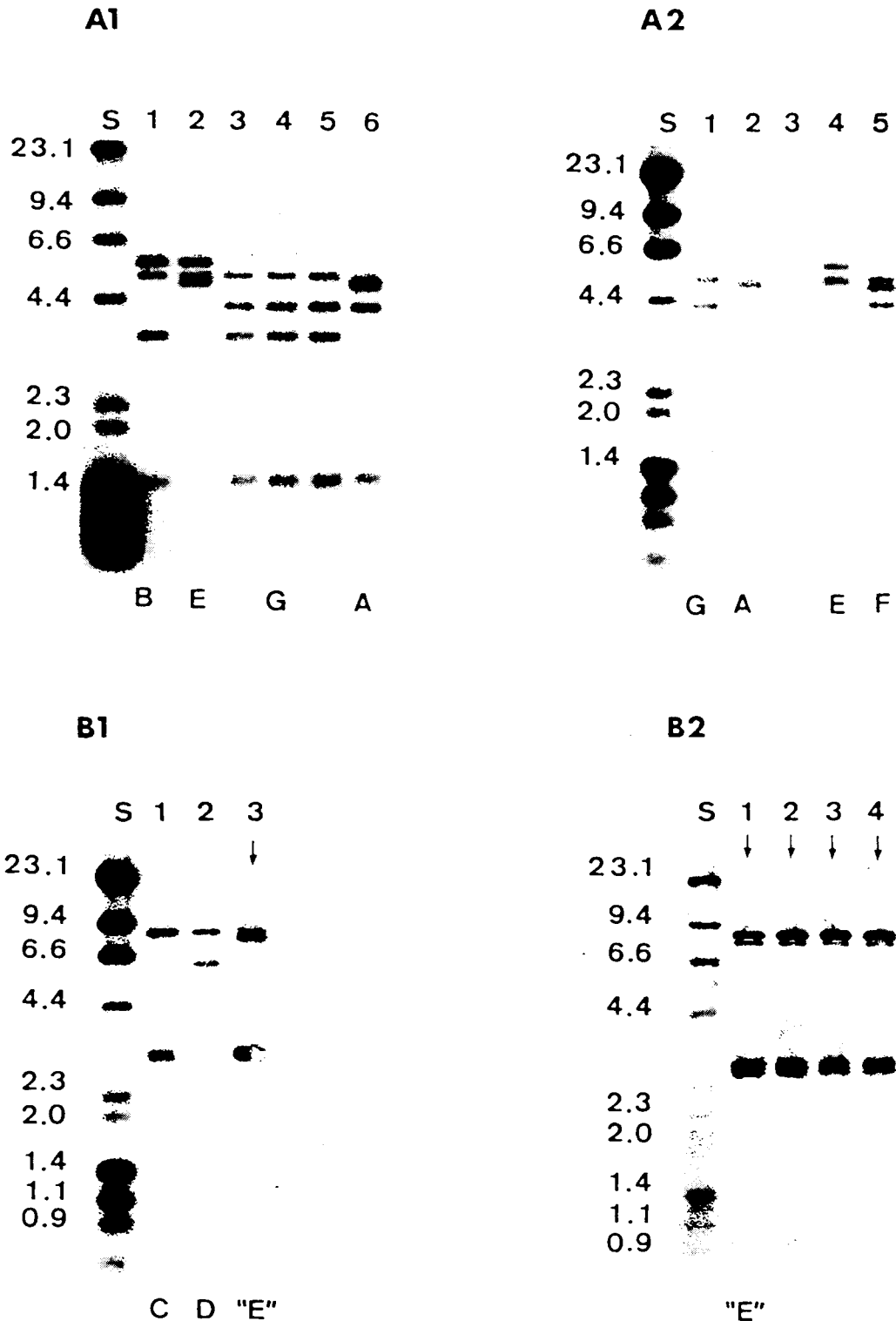


Fig. 3. Autoradiograms of Southern blot showing *C. hominivorax* mtDNA of sampled populations digested with *Msp*I (A1 and A2) and *Pvu*II (B1 and B2). A1: Lane 1, Car, pattern B; lane 2, Car, pattern E; lanes 3–5, Ada, pattern G; lane 6, Ada, pattern A. A2: Lane 5, Car, pattern F. B1: Lane 1, Bot, pattern C; lane 2, Car, pattern D; lane 3, Car, pattern "E." Arrows indicate the heteroplasmic individuals showing two size class molecules of mtDNA. *Hind*III cut λ DNA and *Hae*III cut $\phi \times 174$ DNA (S) are the size standards. Sizes of fragment patterns are given as kilobase pairs on the left in each panel.

some of small size. The fragment sizes are given as kilobase pairs (kb). Totals of fragment size for the 15 restriction endonucleases (average value = 16.3 kb) were in close agreement with the sum of sizes for the *HindIII* fragments of 6.8, 4.2, 4.0, 0.6, and 0.5 kb cloned into the pGEM-3Z vector.

The different patterns observed for mtDNA of *C. hominivorax* Brazilian populations (see Figs. 2 and 3) and North and Central American populations are shown in Table I. With three of the four marker enzymes, unique patterns of mtDNA of screwworm from single localities were obtained: B for *HindIII* in Botucatu, B for *MspI*, C for *HaeIII*, and "E" heteroplasmic for *PvuII* in Caraguatatuba.

Most of the fragment patterns for a specific endonuclease can be related to one another by simple gain or loss of a restriction site. Transformation series reflecting probable steps for interconversion of the restriction patterns are shown in Figs. 4 and 5 for the four enzymes (*HaeIII*, *HindIII*, *MspI*, and *PvuII*) that produced more than one pattern.

For *HaeIII* (Fig. 4), pattern B probably originated by the loss of restriction site H_4 in pattern A, producing the 7.0-kb fragment. Pattern C probably originated by the loss of restriction site H_1 in pattern A, producing the 8.6-kb fragment. Pattern A probably originated by the loss of a single H_3 site in pattern F, producing the 4.8-kb fragment. Probably the 8.2-kb E fragment derives from the 7.5-kb A fragment, a small fragment <0.5 kb not being detected.

For *HindIII* (Figure 4), pattern A probably originated by the loss of a single I_3 site in pattern E, producing the 3.8-kb fragment, and pattern B originated by the loss of the I_4 restriction site in the A pattern, producing the 8.0-kb fragment. Pattern A differs from D by one site, probably the 4.2-kb fragment that corresponds to a 3.6-kb fragment and a 0.6-kb small fragment, not observed on the gel.

For *MspI* (Fig. 5), the five patterns observed can be related by simple loss of a restriction site; we consider some homoplasies (G to B and F, B to E, E to F, and F to A). The difficulty in establishing the relations among the patterns is probably due to undetected small fragments.

Three patterns (C, D, and "E") were found for *PvuII*. Pattern D can arise by loss of a P_3 site in pattern C, which produces the 5.9-kb fragment (Fig. 5).

Cases of heteroplasmy were identified when a restriction digest of screwworm from one of the four populations from Caraguatatuba, using the *PvuII* enzyme, produced a double band where only one was expected (see arrows in Fig. 3). This was designated the "E" heteroplasmic pattern. The number of heteroplasmic individuals was low ($n = 17$) and their mtDNA (pattern "E") revealed two size classes of mtDNA. Pattern C contains bands

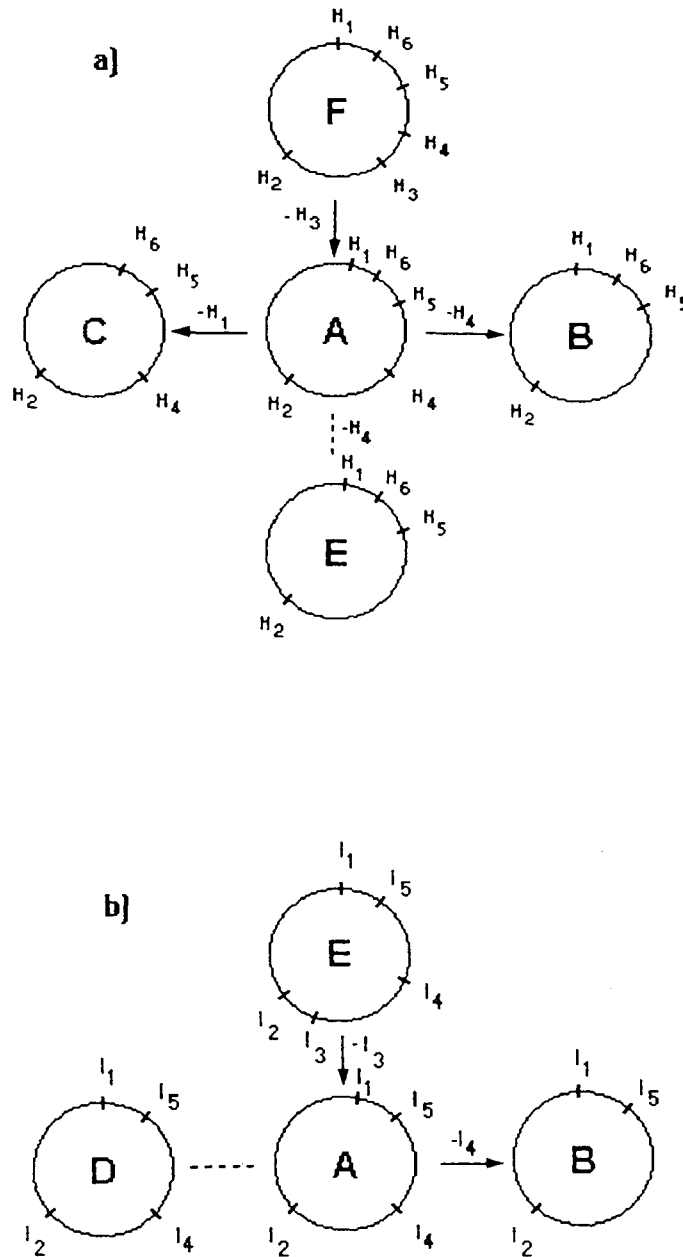


Fig. 4. Interconversion steps for *Hae*III (a) and *Hind*III (b) patterns of *C. hominivorax* mtDNA. An arrow indicates loss of a single site.

of 9.0, 3.0, 2.9, 0.8, and 0.6 kb, and “E” contains an additional band of 7.8 kb plus bands of 9.0, 3.0, 2.9, 0.8, and 0.6 kb. However, pattern “E” was not observed as a single pattern in Brazilian populations; the molecule of 16.3 kb (*Pvu*II, pattern C) is the most common pattern in homoplasmic individuals ($n = 382$).

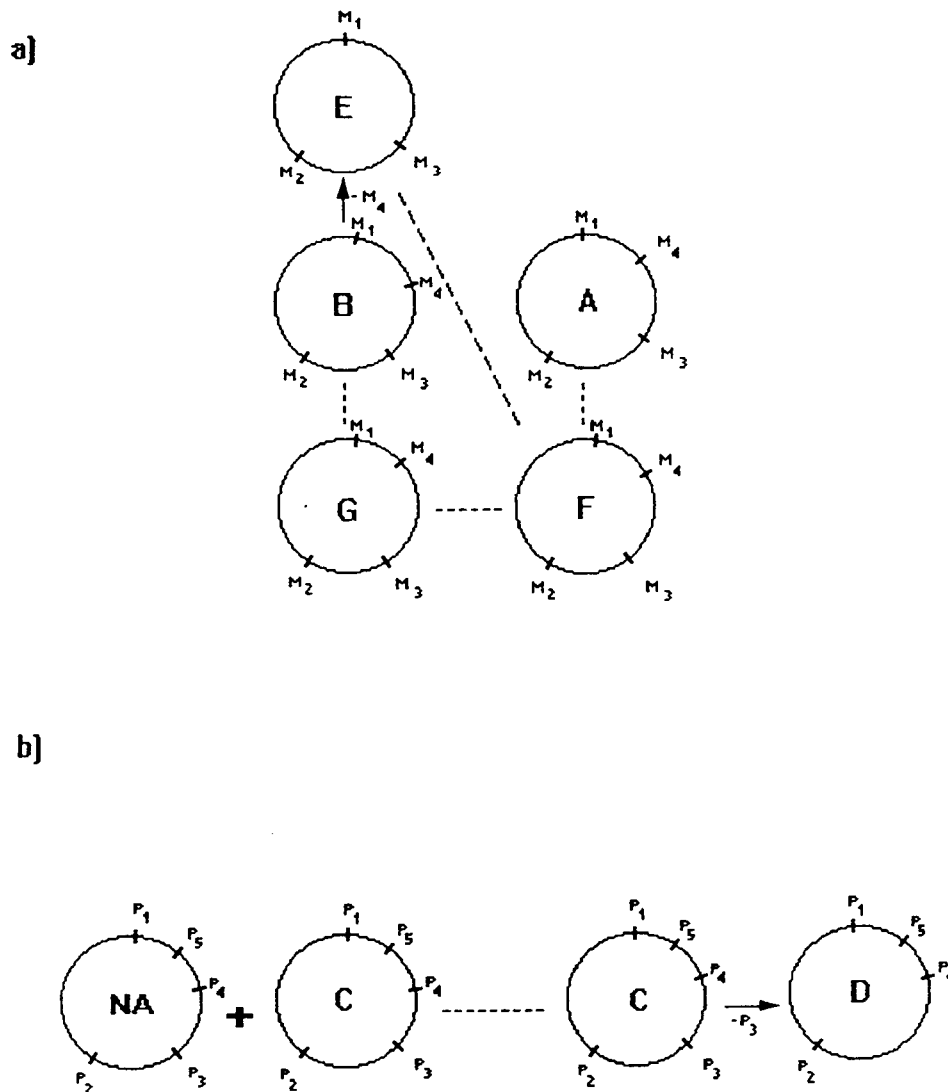


Fig. 5. Interconversion steps for *Msp*I (a) and *Pvu*II (b) patterns of *C. hominivorax* mtDNA. The "E" heteroplasmic pattern combines the NA (North American) pattern (Roehrdanz, 1989) with the C (Brazilian) pattern. An arrow indicates loss of a single site. A dashed line indicates homoplasies.

Based on the fragment patterns for the four marker enzymes, 15 mtDNA composite genotypes (haplotypes) were detected among the 405 individuals of the four populations of *C. hominivorax*. Rare patterns detected in the analyzed populations (observed only two or three times) were not considered for the haplotype analysis, (e.g., patterns C and F from *Hae*III, E from *Hind*III, and B from *Msp*I) (Table II).

Haplotype 2 accounted for about 44% of the samples and was widely distributed throughout the studied area. The second haplotype (1) was observed in 11% of the samples. The differences between haplotype 1 and

Table II. Distribution of mtDNA Haplotypes in Populations of *Cochliomyia hominivorax* (Number of Individuals with a Haplotype and Number of Egg Masses)

Mitochondrial haplotype				Population ^a				
<i>Hae</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Pvu</i> II	Ada	Amp	Bot	Car	Total
(1) A	A	G	C	—	6	2	37	45
(2) B	A	A	C	35	39	20	84	178
(3) B	A	A	D	—	—	—	6	6
(4) B	B	A	C	—	—	29	—	29
(5) B	A	F	C	—	—	6	1	7
(6) A	A	E	C	—	—	2	8	10
(7) E	A	A	C	3	—	—	7	10
(8) B	A	E	C	—	—	3	29	32
(9) A	D	G	C	—	—	—	16	16
(10) B	D	A	C	—	—	—	5	5
(11) A	A	A	C	9	1	1	31	42
(12) A	A	F	C	—	—	—	4	4
(13) A	D	A	C	—	—	—	4	4
(14) B	A	A	E	—	—	—	8	8
(15) A	A	G	E	—	—	—	9	9
N of individuals/per population				47	46	63	249	405
N of wounds				03	02	02	09	15

^aAda, Adamantina; Amp, Amparo; Bot, Botucatu; Car, Caraguatatuba.

haplotype 2 are one restriction site change (site H₄ for *Hae*III) and homoplasies for *Msp*I. Three haplotypes were found in Amparo and Adamantina populations, with two shared haplotypes. Among the remaining haplotypes, eight were unique to a population. In Botucatu, seven haplotypes were observed, and haplotype 4, with the highest frequency (29/63), is unique for this locality. In Caraguatatuba, a total of 14 haplotypes was found, with 7 unique haplotypes for this locality (3, 9, 10, 12, 13, 14, and 15; Table II).

The genetic similarity between the mtDNAs of any two populations may be estimated by the proportion of the digestion fragments they share (*F*). The mean number of fragments shared by any two patterns was *F* = 0.965, with a 0.898–0.982 range. Nucleotide divergence estimates (δ) (Table III) between pairs of haplotypes ranged from 0.3% (4 vs 2, 5 vs 3, 7 vs 3 and 4, 10 vs 3 and 4, and 14 vs 3 and 4) to 2.7% (6 vs 3 and 4, 8 vs 7). Haplotype 4 (BBAC) was considerably different from most other haplotypes, with (δ) ranging from 0.3 to 2.7%, and it was found only in Botucatu.

In Table III, values of ~ 1.0 and ~ 0.0 indicate some haplotype divergence, not detected easily by RFLP (e.g., homoplasies).

A transformation series that relates the 15 mtDNA haplotypes using parsimony criteria is presented in Fig. 6. In this cladogram, haplotype 1 constitutes a hub for haplotypes 6, 9, 12, and 15 and haplotype 2 is a hub for

Table III. Nucleotide Divergence (δ) (Above Diagonal) Between 15 *Cochliomyia hominivorax* mtDNA Haplotypes Based on Proportion of Shared Restriction Fragments (F) (Below Diagonal) (Nei and Li, 1979)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	—	0.011	0.014	0.014	0.011	0.011	0.010	0.024	~0.000	0.011	~0.000	~0.000	~0.000	0.011	~0.000
2	0.960	—	~0.000	0.003	~0.000	0.024	~0.000	0.012	0.011	~0.000	0.011	0.011	0.011	~0.000	0.011
3	0.941	~1.000	—	0.007	0.003	0.027	0.003	0.015	0.014	0.003	0.014	0.014	0.014	0.003	0.027
4	0.941	0.981	0.962	—	0.004	0.027	0.003	0.015	0.011	0.003	0.014	0.014	0.014	0.003	0.014
5	0.960	~1.000	0.981	0.975	—	0.024	~0.000	0.012	0.011	~0.000	0.011	0.011	~0.000	~0.000	0.011
6	0.960	0.917	0.898	0.898	0.917	—	0.022	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.024	0.011
7	0.963	~1.000	0.981	0.981	~1.000	0.923	—	0.027	0.010	0.014	0.010	0.010	0.010	0.014	0.010
8	0.920	0.957	0.938	0.938	0.957	0.957	0.907	—	0.024	0.012	0.024	0.024	0.024	0.012	0.024
9	~1.000	0.960	0.941	0.960	0.960	0.960	0.963	0.917	—	0.011	~0.000	~0.000	~0.000	0.011	~0.000
10	0.960	~1.000	0.981	0.982	~1.000	0.960	0.949	0.957	0.960	—	0.011	0.011	0.011	~0.000	0.011
11	~1.000	0.960	0.941	0.941	0.960	0.960	0.963	0.917	~1.000	0.960	—	~0.000	~0.000	0.011	~0.000
12	~1.000	0.960	0.941	0.941	0.960	0.960	0.963	0.917	~1.000	0.960	~1.000	—	~0.000	0.011	~0.000
13	~1.000	0.960	0.941	0.941	~1.000	0.960	0.963	0.917	~1.000	0.960	~1.000	~1.000	—	0.011	~0.000
14	0.960	~1.000	0.981	0.981	~1.000	0.917	0.949	0.957	0.960	~1.000	0.960	0.960	0.960	—	0.011
15	~1.000	0.960	0.898	0.941	0.960	0.960	0.963	0.917	~1.000	0.960	~1.000	~1.000	~1.000	0.960	—

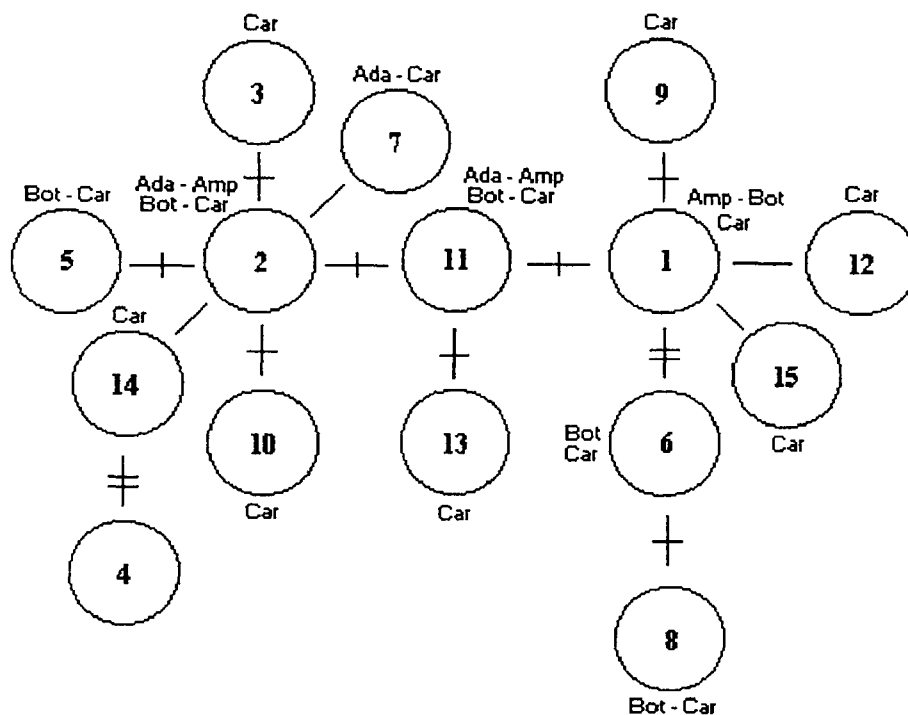


Fig. 6. Cladogram of 15 haplotypes of *C. hominivorax* mtDNA, based on presence/absence site matrix. Branches through the lines represent the number of probable restriction site changes between the haplotypes. Circled numbers correspond to haplotypes listed in the same order as in Table II.

haplotypes 3, 5, 7, 10, 11, and 14. The cladogram resembles the interhaplotype (δ) values displayed in Table III, e.g., haplotypes directly connected differ from each other only by a single mutational step with the exception of the pairs 1-6 and 14-4, which were separated by two nucleotide changes, and the pairs 1-12, 1-15, 2-7, and 2-14, which were separated by length variability.

DISCUSSION

The estimated length of the mitochondrial genome of *Cochliomyia hominivorax* in the analyzed populations is approximately 16.3 kb. This length is similar to the size of mtDNA described for the North and Central American populations [16.0 kb (Roehrdanz and Johnson, 1988; Roehrdanz, 1989)]. These values correspond to the estimated length of the mitochondrial genome described for many insects (Brown, 1983; Chapco *et al.*, 1992).

The RFLP analysis of *C. hominivorax* mitochondrial genome using 15 restriction endonucleases revealed 48 restriction sites with 4 enzymes detecting variability. The distribution pattern of a small number of haplotypes with

a wide distribution and a large number which appear to be local is very similar to that reported by Roehrdanz (1989). Of 16 haplotypes observed in Mexico, only 2 showed ample distributions and the remaining 14 haplotypes were found individually only in a single location. This is similar to our observation in the Caraguatatuba population. The high frequency of unique haplotypes in Southern Mexico was interpreted by Roehrdanz (1989) as a result of reduced gene flow between the populations. In the Caraguatatuba population, genetic heterogeneity has been reported previously in four sampled populations taken in different seasons from the same locality (Azeredo Espin, 1993). Seven haplotypes that were found in the samples collected during the summer and fall were not detected in other samples at this locality in spring and winter. This variability, added to the fact that a large number of cattle are being taken into the area each year, could be the reason for the presence of different maternal lineages in Caraguatatuba. A similar situation seems to occur in the Botucatu population. Then the discontinuity in the distribution of some of the haplotypes, with nucleotide diversity ranging from 0.3 to 2.7%, could be interpreted as due to human interference, e.g., it is likely that extensive commerce between these areas includes movement of livestock with active myiases that could have harbored Caraguatatuba and Botucatu populations. The fact that haplotypes 1, 3, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, and 15 were observed at a low frequency suggests that this interpretation is more likely than the possibility of an intense gene flow among the populations. Another point that reinforces this interpretation is the fact that haplotypes 2 and 4 are the most frequent in the Caraguatatuba and Botucatu populations, respectively, suggesting that these forms represent the local haplotypes for each of these populations.

Heteroplasmy, the occurrence of more than one mtDNA genotype in individuals, followed by germ line segregation and selection, was observed in one *C. hominivorax* population and for one specific enzyme (*Pvu*II). As far as the heteroplasmic *Pvu*II "E" pattern is concerned, the possibility of partial restriction digest, star activity of the enzyme or contamination was considered. The reproducibility of pattern "E" under conditions of excess enzyme (10 U/700 ng DNA), a long incubation period (5–8 hr), and different incubation times (1, 2, 3, and 4 hr) discarded the hypothesis of partial restriction digest or star activity. On the other hand, if the heteroplasmy in size was caused by contamination of mtDNA from different individuals, the patterns for other restriction endonucleases should show heterogeneity for any site variants from which the contaminating flies may have differed. None of the individuals that were putatively heteroplasmic for size variants was found to be heterogeneous for size variants for other enzymes. This fact ruled out the possibility of contamination.

The unusual "E" pattern of *C. hominivorax* mtDNA, observed exclu-

sively in the 17 individuals from Caraguatatuba, suggests the presence of two mitochondrial size type molecules, originating by length heteroplasmy. The "E" heteroplasmic pattern containing bands of 9.0, 7.8, 3.0, 2.9, 0.8, and 0.6 kb could be a combination of two patterns: C from São Paulo showing bands of 9.0, 3.0, 2.9, 0.8, and 0.6 kb, which was observed in all four populations, plus another type with bands of 7.8, 3.0, 2.9, 0.8, and 0.6 kb, which is pattern A of screwworms from North and Central America, described by Roehrdanz (1989), denoted pattern NA in Fig. 5. The difference between the smallest (15.1-kb) and the largest (16.3-kb) molecules was about 1.2 kb, which is consistent with other reports of size variation in insect mtDNA (Harrison *et al.*, 1985; Hale and Singh, 1986; Solignac *et al.*, 1987; Bentzen *et al.*, 1988). However, this pattern of length variation and heteroplasmy was not verified with other restriction endonucleases. Seventeen of the individuals, which carried *PvuII* (pattern "E"), yielded fragments of both 9.0 and 7.8 kb in substoichiometric quantities (Fig. 3). The possibility that this apparent heteroplasmy was caused by a 1.2-kb length polymorphism was eliminated by the observation that no substoichiometric bands were seen when the same samples were digested with other enzymes.

We favor the possibility that in *C. hominivorax* the heteroplasmy represents a transient state between haplotypes after paternal contribution and should be relatively rare. In fact, in the whole sample of 405 individuals, 17 heteroplasmic individuals were found, all in the pattern for *PvuII* (São Paulo C/North America A; Fig. 5). The observations that only in the Caraguatatuba population were there heteroplasmic individuals and that most of the populations studied were found to have fixed homoplasmic haplotypes supports this interpretation. To clarify this point it will be necessary to follow the frequencies of size variants from parents through progeny of specific crosses among *C. hominivorax* lines with distinct mtDNA types to determine if significant paternal leakage is occurring. On the other hand, in order to confirm the hypothesis that the "E" haplotype equals C São Paulo/A North America, it will be necessary to analyze samples from both São Paulo and North America together, in the same gel with the same size markers.

A comparison between the patterns, obtained for the same restriction endonucleases tested in the populations from North and Central America and from Brazil, is displayed in Table I to facilitate the analysis. The correspondences between the shared fragment patterns were three for *MspI* (patterns A, B, and E) and four for *HaeIII* (A, B, C, and D) and *HindII* (A, B, D, and E).

In the Brazilian samples two new patterns for *HaeIII* (patterns E and F), *MspI* (F and G), and *PvuII* (C and D), were observed.

HaeIII detected a rare pattern B, observed exclusively in sheep-

collected samples from Botucatu ($n = 29$; Fig. 2). Because it was observed in only one locality (Bot), further studies about the existence of correlations concerning host specificity or adaptive profit of individuals that carry determinate mitochondrial haplotypes in infest determinate host are needed to confirm it.

Within the five categories for intraspecific mtDNA phylogenies (Avice *et al.*, 1987), we included the Caraguatatuba and Botucatu populations in category II (mtDNA genetic discontinuity not associated with geographic separation). Roehrdanz (1989) included in this same category the North American populations, especially the Chetumal collection from Mexico, due to the presence of one haplotype (6) that makes this category feasible for this population. For Avice *et al.* (1987), this category occurs when there is contact between populations from different localities and haplotypes. The presence of a low variability in the Adamantina and Amparo populations suggests that the detected haplotypes correspond to local haplotypes. We suggest that these two populations can be included in category V (phylogenetic continuity with partial and spatial separation). The three haplotypes from Amparo and Adamantina seem to be closely related, yet one is geographically dispersed (haplotype 2) and the others are spatially separated (haplotypes 1 and 7). Thus, unlike category III, presumed ancestral genotypes occur over a broad area (haplotype 2), while unlike category IV, newly arisen mutations have not yet spread throughout the range of a species (haplotypes 1 and 7). Figure 6 shows a parsimony cladogram interconnecting the 15 haplotypes observed in the four populations. As drawn, this cladogram is unrooted, but additional hypotheses about phylogenetic orientation can be advanced. Haplotype 2 is a likely candidate for the "old" haplotype within the populations because (1) it is by far the most common, occurring in 178 of 405 individuals; (2) it is geographically the most widespread, observed in all populations; and (3) in the cladogram, it forms the hub connecting separately to six other haplotypes (3, 5, 7, 10, 11, and 14) with four by only a single site changed. The analysis of the geographical distribution among the observed haplotypes suggests that the sampled populations probably belong to a single evolutionary lineage interconnected by reduced gene flow.

The average of nucleotide diversity 0.92% obtained for *C. hominivorax* in the present study falls within the range of the estimated values for intraspecific differentiation in insect species (see summaries by Martin and Simon, 1990; Chapco *et al.*, 1992) and is low compared with the divergence described between Mexico and two Jamaican lines (2.5%), an indication that these populations began their separation about a million years ago (Roehrdanz and Johnson, 1988). In addition, comparison of the results of mtDNA restriction patterns for screwworms from Jamaica and Brazil has

indicated the same patterns for eight enzymes (*EcoRI* A, *EcoRV* A, *HaeIII* A, *HindIII* E, *PstI* A, *SstI* B, *XbaI* A, and *XhoI* A). Roehrdanz and Johnson (1988) suggest that, due to the widespread distribution of screwworms in Central and South America, it is conceivable that Jamaica was colonized by flies from Northern South America rather than from the Mexico area, and the Jamaican flies may be more closely related to South American flies. This interpretation, added to the fact that the first registers of myiasis in South America and Brazil—1580 and 1587, respectively (Souza, 1938; Lamas, 1981)—were earlier than in Jamaica, 1764 (Grainer, 1764), indicates that probably the pathway led from the mainland (South America) to the island (Jamaica) and not the reverse. Although the haplotype BCB for *HaeIII*, *HindIII*, and *PvuII* was not observed in the Brazilian samples described here, preliminary analysis of screwworm samples from the North of Brazil (Amazônia) indicates a high similarity with the Jamaican lines (Azeredo Espin in preparation), which reinforces this interpretation.

In a screwworm population from Libya, Taylor *et al.* (1991) described a single haplotype and there is no similarity to any that have been reported in Brazilian populations. Although further analysis involving other geographic populations from Brazil and from other South American countries is necessary to confirm this suspicion, there are indications that the infestation originated from Uruguay, as suggested by Beesley (1991).

The analysis conducted in Brazil and North and Central America has demonstrated that in spite of the high dispersal capacity of screwworm flies and the movement of livestock in some regions, *C. hominivorax* populations are subdivided with respect to mtDNA polymorphism at a geographic level.

Further study of mtDNA, involving more samples associated with other genetic markers, will be valuable for resolving evolutionary genetic and pest management questions that persist regarding this insect in tropical habitats.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for comments and suggestions of an anonymous referee. We thank Rosangela A. Rodrigues and Nairlidia S. Hallais for technical assistance. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Grant 912572.0 to A.M.L.A.E.; M.E.I.V. was supported by a fellowship from Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal do Ensino Superior, CAPES, Brazil.

REFERENCES

- Avise, J. C., Smith, M. M., and Selander, R. K. (1979). Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus* VII geographic differentiation in members of the *truei* and *maniculatus* species groups. *J. Mammal.* **60**:177.

Genetic Variability in Screwworm mtDNA

- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., and Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**:489.
- Azeredo Espin, A. M. L. (1987). *Análise Cariotípica, Morfométrica e de Compatibilidade Sexual, em Linhagem Brasileiras de Cochliomyia hominivorax (Diptera:Calliphoridae)*, Ph.D. thesis, Universidade de Campinas.
- Azeredo-Espin, A. M. L. (1993). Mitochondrial DNA variability in geographic populations of screwworm fly from Brazil. *Int. Atom. Energy Agency* **327**(17):161.
- Azeredo Espin, A. M. L., Schoereder, R. F. W., Huettel, M. D., and Sheppard, W. S. (1991). Mitochondrial DNA variation in geographic populations of colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Experientia* **47**:483.
- Bentzen, P., Leggett, W. C., and Brown, G. G. (1988). Length and restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of American shad (*Alosa sapidissima*). *Genetics* **118**:509.
- Beesley, W. N. (1991). The New world screwworm fly in North Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **85**:173.
- Brown, W. M. (1983). Evolution of animal mitochondrial DNA. In Nei, M., and Koehn, R. (eds.), *Evolution of Genes and Proteins*, Sinauer, Sunderland, MA, pp. 62–88.
- Chapco, W., Kelln, R. A., and McFadyen, D. A. (1992). Intraspecific mitochondrial DNA variation in the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Heredity* **69**:547.
- Coquerel, C. (1859). Note sur une larve d'oestride extraite du bras d'un homme à Cayenne. *Rev. Mag. Zool.* **2**(11):356.
- de Souza, G. S. (1938). *Tratado descritivo do Brasil em 1587* (3a. ed.), Companhia Editora Nacional São Paulo.
- Dev, V., LaChance, L. E., and Whitten, C. J. (1986). Polytene chromosomes, karyotype correlations and population cytology of the primary screwworm fly. *J. Hered.* **77**:427.
- El-Azazy, O. M. E. (1989). Wound myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in Libya. *Vet. Record* **124**:103.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1993). *The New World Screwworm Eradication Programme, North Africa 1988–1992*.
- Fraiha, H., Azevedo, J. B. C., and Azevedo, J. V. C. (1979). Myiasis in man in Amazonia. 1. Gingival myiasis by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1958) (Diptera:Calliphoridae). *Rev. Fundação SESP* **24**:31.
- Gabaj, M. M., and Beesley, W. N. (1989). American screwworm fly in Libya. *Vet. Record* **124**:152.
- Gagne, R., and Peterson, R. D. (1982). Physical changes in the genitalia of males of the screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae), caused by mating. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **75**:574.
- Graham, O. H. (1985). Introduction, Conclusions. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* **621**, 67.
- Grainer, J. (1764). An essay on the more common West Indian diseases and the remedies which that country itself produces, to which are added some hints on the management of negros, London, VI + pp. 8.75.
- Hale, L. R., and Singh, R. (1986). Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:113.
- Harrison, R. G., Rand, D. M., and Wheeler, W. C. (1985). Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science* **228**:1446.
- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* **48**:459.
- Krafsur, E. S., and Whitten, C. J. (1993). Breeding structure of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) in Colima, Mexico. *J. Med. Entomol.* **30**(2):477.
- LaChance, L. E., and Whitten, C. J. (1986). Cytogenetic studies of screwworm (Diptera: Calliphoridae) populations from southern Mexico and Jamaica. Symposium: Genetics in Entomology. *Ann. Entomol. Am.* **79**:729.
- LaChance, L. E., Bartlett, A. C., Bram, R. A., Gagne, R. J., Graham, O. H., McInnis, D. O., Whitten, C. J., and Seawright, J. A. (1982). Mating types in screwworm populations? *Science* **218**:1142.

- Lamas, G. (1981). Introducción a la historia de la entomología en el Perú I. Inicios y periodo exploratorio pre-Darwiniano. *Revta. Peru. Entomol.* 23(1):17.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Martin, A., and Simon, C. (1990). Differing levels of among population divergence in the mitochondrial DNA of periodical cicadas related to historical biogeography. *Evolution* 44:1066.
- McInnis, D. O. (1981). Cytogenetics of a local population of the screwworm *Cochliomyia hominivorax*, from northeastern Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 74:582.
- McInnis, D. O., Whitten, C. J., Mackley, J. W., Peterson, R. D., and Spencer, J. P. (1983). Cytogenetic studies of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae), from Chiapas, Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76:628.
- Nei, M., and Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7(10):5269.
- Pomonis, J. G. (1989). Cuticular hydrocarbons of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae). Isolation, identification and quantification as a function of age, sex and irradiation. *J. Chem. Ecol.* 15:2301.
- Richardson, R. H., Ellison, J. R., and Averhoff, W. W. (1982). Autocidal control of screwworm in North America. *Science* 215:361.
- Rigby, P. W. J., Dieckman, C., Rhodes, and Berge, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237.
- Roehrdanz, R. L. (1989). Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm fly (*C. hominivorax*). *Biochem. Genet.* 27:551.
- Roehrdanz, R. L., and Johnson, D. A. (1988). Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *J. Med. Entomol.* 25(2):136.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Solignac, M., Genérmont, M., Monnerot, M., and Mounolou, J. C. (1987). *Drosophila* mitochondrial genetics. Evolution of heteroplasmy through germ line cell division. *Genetics* 117:687.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503.
- Swofford, D. L. (1990). *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.0*, Ill. Nat. Hist. Surv., Champaign.
- Taylor, D. B., Hammack, L., and Roehrdanz, R. L. (1991). Reproductive compatibility and mitochondrial DNA restriction site analysis of new world screwworm fly *C. hominivorax* from north Africa and central America. *Med. Vet. Entomol.* 5:145.
- Thomas, D. B., and Mangan, R. L. (1989). Oviposition and wound visiting behavior of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82:526.

Genome G98-164

**Random Amplified Polymorphic DNA of Screwworm Fly Populations
(Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil and Northern Argentina.**

Maria Elena Infante-Malachias, Karla Suemy Clemente Yotoko and Ana Maria Lima de Azeredo Espin.

Departamento de Genética e Evolução e Centro de Biologia Molecular e Eng. Genética, CBMEG,
Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

Dr. Ana Maria Lima de Azeredo Espin

Depto. de Genética e Evolução,

Universidade Estadual de Campinas,

P.O. Box 6109, Campinas, SP, Brazil.

Phone: 00-55-19-7881090

Fax: 00-55-19-7881089

E-mail: azeredo@obelix.unicamp.br

Random Amplified Polymorphic DNA of Screwworm Fly Populations (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil and Northern Argentina.

M.E. Infante-Malachias, K.S.C. Yotoko and. A.M.L. de Azeredo Espin

Abstract: The screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1859), is one of the most important agents of traumatic myiasis throughout Neotropical regions. In this work, we optimized the technique of RAPD-PCR for these species and used it to study the genetic variability among seven populations (6 from southeastern Brazil and one from northern Argentina) of *C. hominivorax*. RAPD fingerprints showed high variation for twelve primers used, revealing 209 presumptive loci of which 198 were polymorphic. Marker pattern relationships for these different populations were used to determine genetic relatedness as well as to examine potential patterns of gene flow. Our interpretation of Lynch and Milligan's analogue of Wright's $F_{(ST)}$ was that *C. hominivorax* populations are genetically subdivided ($F_{(ST)}$ for pooled samples = 0.122). Our data suggested that the subdivision detected in *C. hominivorax* populations by RAPD can be explained by the interplay of random factors affecting allele frequency changes. These results indicate that the RAPD-PCR technique is useful for revealing genetic variation in screwworm fly populations not detected by others techniques and can represent an efficient method for understanding the genetic structure and population genetic phenomena of this important pest.

Key Words: *Cochliomyia hominivorax*, screwworm fly, population genetics, gene flow.

Introduction

The New World Screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1859) is one of the most important agents of traumatic myiasis throughout Neotropical regions (Guimarães et al., 1983). It is an obligate ectoparasite and can infest almost all warm-blooded animals including humans. Before its eradication from North America (Graham, 1985), screwworm ranged from the Central United States to Central Argentina and Chile (Dear, 1985; Hall and Wall, 1995). In Brazil this pest is devastating, causing great profit losses for cattle breeders.

Natural populations almost always display differences in allele frequencies from one geographic region to another. Such geographic population structure can have profound consequences on the evolutionary destiny of a species (Hartl, 1988). The population structure can be quantified using F statistics (Wright, 1978).

A singularly important aspect of molecular analyses is that they allow direct comparisons of genetic differentiation among any group of organisms. The earliest studies for characterizing the genetic variation of *C. hominivorax* populations were based on allozymic analysis of laboratory colonies and field populations (Bush and Neck, 1976; Whitten, 1980; Krafur and Whitten, 1993; Taylor and Peterson II, 1994, Taylor et al. 1996). Results indicated no evidence of population substructure, and the hypothesis was that a high level of gene flow occurred between populations.

Variation in mitochondrial DNA (mtDNA) has been used in the study the differentiation of *C.hominivorax* from Brazil (Infante and Azeredo Espin, 1995). This variation has been interpreted as a result of reduced gene flow and some geographic population subdivision. These results are in marked contrast to what was found by the analyses of polythene chromosome, isozymes, and

cuticular hydrocarbons (Dev et al. 1986; LaChance and Whitten, 1986; Pomonis, 1989; Krafur and Whitten, 1993).

The RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) was developed to detect genetic polymorphism and to select genetic markers with no prior knowledge of DNA sequence (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al. 1990). RAPD-PCR technique uses DNA primers of arbitrary nucleotide sequence to amplify arbitrary regions of the genome. We used the RAPD method because it is a sensitive method of detecting nuclear DNA variation, and it is likely to discriminate between populations of various species (Hadrys et al. 1992; Hedrick, 1992; Black et al. 1992; Baruffi et al. 1995; Stevens and Wall, 1995).

Lynch and Milligan (1994) have presented modifications to estimators for several population genetic parameters to be used with RAPD-PCR markers. These modifications show that the RAPD markers can be used as alleles. The diagnostic fingerprints produced by this technique have been applied for detecting genetic divergence and levels of gene flow in other organism (Apostol et al. 1996; Bielawski and Pumo, 1997).

The objectives of the present work were (i) to standardize the methodology of RAPD for screwworm flies (*C. hominivorax*) and (ii) apply this technique to detect genetic variation and gene flow among the sampled populations.

Materials and methods

Fly strains: *C. hominivorax* used in this study were from six locations (Adamantina, Amparo, Botucatu, Caraguatatuba Pirassununga and Valinhos) from São Paulo State in southeastern Brazil, and one from northern Argentina (Rafaela), (Fig.1). The number of individuals analyzed for each population was 11. The samples were obtained by two sources. The Adamantina, Amparo, Botucatu, Caraguatatuba, Pirassununga and Rafaela populations were originally collected in individual wounded cattle from March 1991 to February 1997. In Botucatu and Rafaela the screwworm samples were also obtained in sheep. The Valinhos sample was collected in 1992 from a wounded dog. All larvae were allowed to pupate and then stored in a freezer at - 70°C.

Genomic DNA extraction: Screwworm genomic DNA was extracted and quantified from single individuals using the procedure described previously (Infante and Azeredo Espin, 1995). RNA was removed using RNAase A (20 mg/ml). The above genomic DNA was then submitted to another extraction, as follow: an equal volume of buffer-saturated phenol (0.5M Tris-HCl, pH 8.0) and chloroform were added and centrifuged at 8,000 rpm for 2 min. in a microcentrifuge. The aqueous phase was transferred into another Eppendorf tube and extracted with chloroform: isoamyl alcohol (24:1). The final supernatant was then ethanol precipitated at - 70°C for 30 min. The samples were then centrifuged at 12,000 rpm for 30 min. in a microcentrifuge to pellet the DNA. The pellets were air-dried for 15 min. and resuspended in 100 µl of diluted TE (1mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 7.0) buffer.

DNA concentration was determined by comparison with lambda DNA (5 ng/ml) in 0.8% agarose gel (Sambrook et al. 1989). DNA working solutions were prepared at a concentration of 5ng/ml in TE buffer and 100µl aliquots stored at -20°C.

Optimization of amplification conditions: As a primary screen for RAPD-PCR conditions, the procedures described by Williams et al. (1990) were used without success. To determine the best conditions for *C. hominivorax* DNA amplification by RAPD, we tested (i) fifteen DNA concentrations in the range of 100pg to 60ng with the primer OPB-10; (ii) seven *Taq* DNA polymerase (GIBCO) concentrations, ranging from 1.0 U to 4.0 U; (iii) seven magnesium concentrations, ranging from 1.0 mM to 4.0 mM; (iv) and five dNTPs concentrations, ranging from 0.05 mM to 0.25 mM.

After eleven months, the reproducibility of the RAPD patterns was tested. To perform this test we mixed the DNA of five individuals from each population in an optimized RAPD reaction.

RAPD-PCR amplification: Total reaction volumes of 15ml were used with following final concentrations: 2 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.01 mM EDTA; 0.1 mM DTT; 5%(v/v) glycerol; 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 2.5 mM MgCl₂; 0.2 mM of primer; 5 and 10 ng of template DNA and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Gibco). Amplifications were performed in a thermal cycler (Perkin Elmer- Cetus, Norwalk, CT). The cycling parameters, of Williams et al. (1990), were used with some modifications. We included an initial denaturation step of 94°C for 5 min. (1 cycle); 45 cycles of 94°C for 1 min. for denaturation, 36°C for 1 min. for annealing and 72°C for 2 min. for extension. Finally, we included an extension step of 72°C for 7 min.; all cycles with minimum ramp times.

Primer selection: A total of 120 decamer primers of random sequence from six kits (OPA, OPB, OPC, OPD, OPJ and OPN, Operon Technologies, Alameda, Ca) were used for an initial screening of *C. hominivorax* populations. This first screening selected 39 primers that produced clear markers. After a second screening, 12 primers exhibiting consistent results within individuals and high quality of banding patterns were selected for population analysis.

The sequence (5' to 3') of each primer is the following: OPB-2: TGATCCCTGG; OPB-07: GGTGACGCAG; OPB-09: TGGGGGACTC; OPB-11: GTAGACCCGT; OPC-07: GTCCCGACGA; OPC-14: TGCGTGCTTG; OPD-09: CTCTGGAGAC; OPD-16: AGGGCGTAAG; OPJ-03: TCTCCGCTTG; OPJ-06: TCGTTCCGCA; OPN-07: CAGCCCAGAG and OPN-20: GGTGCTCCGT.

A negative control reaction was prepared for each primer and was made by replacing DNA with milli-Q water. For each individual screwworm, all the reactions were made with duplicates at two DNA concentrations (5 and 10 ng). Amplification products were visualized using ethidium bromide (0.8 mg/ml) staining of DNA after electrophoresis in 1.5 % agarose gels, and photographed using long wave (312 nm) ultraviolet light. The approximate molecular weight of amplification products was based on the procedures of Plikaytis et al. (1986), using ϕ X 174 DNA digested with *Hae* III and 1kb Ladder (Gibco).

Data Analysis: Eleven flies were examined from each sampled population ($n = 77$) for each of the 10-mer primers selected. A data matrix was constructed with the RAPD-PCR band information scored as 1 or 0 for the presence or absence of bands respectively.

Distance Measures: Two types of matrices were obtained to analyze the *C. hominivorax* populations. The first contains the distance measures calculated using the Nei and Li (1979) similarity index, $S = 2N_{AB}/N_A + N_B$, where N_{AB} is the number of bands that individuals A and B share and N_A is the number of bands in individual A and N_B is the number of bands in individual B.

Because RAPD loci segregated independently (Williams et al. 1990), suggesting that they represent individual loci and the vast majority (usually > 95%) of alleles are dominant, a second measure was used for comparing RAPD patterns between individuals. The dominant phenotype is expressed, on agarose gel, as the presence of a band of a specific molecular weight. The recessive

phenotype is the absence of that band. Thus, pairs of individuals can be compared phenotypically at any locus, based on the shared presence or absence of a band. The shared absence of a band actually provides more information regarding their similarity (both homozygote recessives) than does the shared presence (heterozygote or homozygote dominant).

The similarity of pairs of individuals were measured by the estimate of the fraction of matches (M), $M = N_{XY}/NT$, where N_{XY} is the total of matches in individuals X and Y (i.e. both absence or presence) and NT identifies the total number of loci scored in the overall study.

Both matrices were calculated using a FORTRAN program “RAPDPLOT” (written by and available from W.C.B.4).

Analysis of RAPD-PCR markers as alleles: The RAPD-PCR markers were analyzed as alleles by making some assumptions: Each fragment (locus) can be treated as a two-allele system, with only one of the alleles per locus being amplifiable by the PCR. The “null” allele may fail to amplify either because of loss of a primer site or because an insertion has caused the distance between primer sites to exceed the capacity of PCR. RAPD products segregate as dominant alleles in a Mendelian fashion. Genotype frequencies at RAPD loci were in Hardy-Weinberg proportions. To perform the analyses of RAPD markers as alleles, we restricted the analyses to bands whose observed frequency was less than $1 - (3/N)$, i.e. markers whose incidence was less than 0.73 (Lynch & Milligan, 1994), in this case, we considered 109 of 198 polymorphic fragments.

Heterozygosity: The means and the variance of heterozygosity were calculated for each population with the assumptions and modification proposed by Lynch and Milligan (1994). The percentage of the variance was divided in components due the sample size and due to the variability.

Calculations of $F_{(ST)}$ and estimation of the effective migration rate (Nm): Lynch and Milligan's (1994) $F_{(ST)}$, like Wright's (1978) measure of population subdivisions, takes on extreme values 0 when all populations have identical gene frequencies and 1 when all populations are completely homozygous for alternate alleles. The $F_{(ST)}$ estimate was performed using a FORTRAN program, "RAPDFST" (written by and available from W.C.B.4). Estimation of Nm from $F_{(ST)}$ assumes the island model of migration among populations.

Genetic Distance: Nei (1972) introduced a measure of genetic distance among populations (D_{ij}) that provides an estimate of the mean number of mutations separating the genes from two populations. The genetic distances among the screwworm populations analyzed were estimated by Nei's Distance (Nei, 1972) with Lynch and Milligan's (1994) correction. These estimates were obtained by the FORTRAN program "RAPDDIST 1.0" (available from W.C.B.4). Cluster analysis of distance measure via UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Arithmetic means) was done using the Neighbor Program in Phylip 3.5C (Joseph Felsenstein of the University of Washington).

Results

Optimization of amplification conditions: The best reproducible amplification profile was obtained between 200 pg to 10 ng of genomic DNA. Considering these results, the DNA concentrations of 5 and 10ng were established in our amplification reactions. No bands were observed with less than 2.0 U of enzyme. With the concentration of 2.5 U of *Taq* DNA polymerase, the amplification profile was very reproducible. For the $MgCl_2$ concentration, the best results were obtained with 2.5 mM. Finally, the best reproducible bands were obtained with 0.2 mM of each dNTP.

For all previously described conditions, only unambiguous fingerprint patterns were selected as polymorphic markers for *C. hominivorax* DNA.

RAPD-PCR products of *C.hominivorax* DNA: Reproducibility of RAPD-PCR patterns was tested by conducting replicate reactions for each individual, using two DNA concentrations (5 and 10 ng). In these amplification reactions, RAPD patterns were reproducible, although the relative intensity of some bands was sometimes variable. With 12 primers, 209 total bands were produced and 198 of these were polymorphic, ranging from approximately 300 to 3,000 base pairs in size (fig.2).

The test for reproducibility, after eleven months, of the RAPD-PCR banding patterns for *C. hominivorax* genomic DNA showed that, for all populations, the banding patterns were very reproducible, showing the same pattern obtained at the preliminary screening with several diagnostic bands.

RAPD-PCR variation within and between populations: Intrapopulation similarity indices for both methods (S and M) were high, ranging from S=0,714 in Amparo and M=0,789 in

Adamantina to $S=0,785$ and $M=0,849$ respectively in Pirassununga (table 1). The indices were lower within populations for both methods. The S values ranged from 0.582 between Amparo x Rafaela to 0.653 between Valinhos x Rafaela. The M values range from 0.704 between Rafaela x Adamantina to 0.789 between Amparo x Adamantina (table 2).

Cluster analysis was carried out on the set of genetic distance measures (Nei, 1972 modified by Lynch and Milligan, 1994) using UPGMA (fig. 3). In this figure, the genetic distance indicates that the sampled populations are very closely related. The Lynch and Milligan's (1994) $F'_{(ST)}$ statistic for the pooled populations was 0.122 and the N_m was 1.8. These data indicate a moderate genetic differentiation among these populations. Figure 4 shows the loci distribution of the $F'_{(ST)}$ frequencies.

Discussion

As to many factors can alter the reproducibility of RAPD-PCR products and the polymorphism analysis, it is necessary to standardize the amplification conditions prior to analysis of insect DNA such as *C. hominivorax* populations. In this work, the intensity of the bands decreased with DNA concentrations over 40 ng. This might indicate that the DNA excess modifies the amount of amplified products in each band, but not the band profile as observed by Novo et al. (1996). For DNA concentrations below 200 pg no reproducible fragment pattern was observed, probably because the high ratio of primer to DNA creates amplification artifacts.

High *Taq* DNA polymerase concentration (over 3.5 U) enhances the non specific product accumulation, increasing the smear on agarose gel. The high enzyme concentration can affect either the activity or fidelity of *Taq* DNA polymerase (Innis and Gelfand, 1990).

Magnesium concentration is also very important for the reproducibility of patterns in amplification reactions. It can affect the primer annealing, the denaturation temperature of template and primer DNA, and can provoke artifacts by dimer formation by primers (Innis and Gelfand, 1990). We found each primer to generate a variable number of amplified fragments, depending on the analyzed population. Generally, the proportion of monomorphic bands was higher than that of polymorphic ones. However, the polymorphic band can have hidden genetic heterogeneity due to dominance of RAPD markers (Williams et al. 1990; Baruffi et al. 1995).

In this study, we applied five analysis methodologies to determinate the genetic relationships from seven geographic populations of screwworm flies. They were, the similarity index analysis (S), the percent match analysis (M), the heterozygosity (H), the Nei's genetic distance (D) and the Lynch and Milligan's analogue $F'_{(ST)}$ measure of population subdivision with effective migration rate (Nm).

The mean of the similarity measures (S and M) obtained for the RAPD analysis shows that the populations are closely related. The intrapopulation similarity index was always higher than 0.7. This is consistent with the fact that individuals from the same population should represent a somewhat narrow genetic pool (Haymer et al. 1997). The between populations comparison indices are all greater than 0.5. This indicates that these populations are very similar to each other. The percent match analysis (M), showed similar results. The similarity values between populations were always lower than within populations. In addition, we compared the similarity values between the Rafaela and Brazil populations to values obtained among the Brazilian populations only and no differences was detected.

The mean of heterozygosity calculated with the Lynch and Milligan (1994) modifications shows that the genetic divergence in the populations is low. The cluster analysis of Nei's unbiased

genetic distance indicates that the sampled *C. hominivorax* populations were not strongly differentiated. However, estimates of F_{st} (Lynch and Milligan, 1994) indicated the presence of subdivisions among the pooled *C. hominivorax* populations ($F_{(ST)} = 0.122$). The mean F_{st} value indicates that 12 percent of genetic variation in screwworm flies is attributable to moderate differentiation among the sampled populations. It is important to note past high migration rates and recent migration can mask these values. These factors can be associated with the host transport through the Neotropical region that started with the introduction of the cattle breeding in the continent in the 16 th century and increased with the improvement of the transport technology.

In contrast, population genetic studies using protein electrophoresis have indicated a low genetic differentiation in natural populations of screwworm flies. Studies in the Northwest of Costa Rica revealed that *C. hominivorax* is a panmitic species (Taylor and Peterson, 1994). In Central America, Krafur and Whitten (1993) obtained the same results. Taylor and Peterson (1994) revised these data and concluded that the low $F_{(ST)}$ values obtained for isozymes suggest that there is a low genetic differentiation between Mexican and Central American populations.

Recently, Taylor et al. (1996) has indicated a low genetic differentiation between only one screwworm sample from Brazil and the Central American populations. Using isozyme data these authors suggest that *C. hominivorax* is a panmitic species.

mtDNA data of *C. hominivorax* analyzed from Brazil (Infante and Azeredo Espin, 1995) and North and Central America (Roehrdanz and Johnson, 1988 and Roehrdanz, 1989) have shown high genetic variability with low gene flow, indicating genetic differentiation among populations.

In general, results of both mitochondrial (Roehrdanz and Johnson, 1988; Roehrdanz, 1989 and Infante and Azeredo Espin, 1995) and RAPD analysis are concordant in suggesting divergence among *C. hominivorax* populations. The discrepancy between allozyme and PCR data may suggest

that allozyme analyses result in an underestimation of genetic diversity (Clegg, 1989). As indicated in other systems (Gibbs et al. 1994), RAPD markers may evolve at a rate similar to mtDNA. The variability detected at the level of DNA with RAPD markers is higher than at protein level, as suggested by Lu and Rank, (1996). Due to the degeneracy of genetic code approximately 29% of the mutations occurring at the nucleotide level cannot be detected by amino acid changes (Nei, 1987). An additional 70 – 75% of amino-acid substitutions cannot be detected by ordinary protein electrophoresis because of maintenance of net protein charge (Lu and Rank, 1996).

DNA-based polymorphism identified using RAPDs will also tend strongly to originate from repetitive sequences, although they certainly can be derived from single-copy sequences. In fact, considerably more variation can be found to exist in terms of nucleotide sequence changes in non-coding or repetitive DNA than in coding DNA (Haymer, 1994)

Another explanation for the discrepancies of the results between protein electrophoresis, RAPD and mitochondrial results for the *C. hominivorax* populations may be due to on distinct regions of sampling. Our results for mtDNA and RAPD-PCR show that the *C. hominivorax* populations are heterogeneous and display some population structuring in South America. Previous reports working on samples from North America populations concluded that the species was panmitic, i.e., extremely homogeneous. Analyzing all the variables, we can speculate that South America probably is the center of origin of this species, explaining the variability found there. The populations from North America were possibly formed by a founder effect, giving rise to population homogeneity. Although this seems a plausible hypothesis, there are technique differences that must be checked out by means of protein analysis of the South American populations to confirm the heterogeneity of the species in this region.

Acknowledgements

We thank Dr O. Anziani for his generous support in our visit to the experimental station of INTA (Rafaela, Argentina); M.T. .M. Novo and V. N. Solferini for helpful suggestions for this work and R.A. Rodriguez, M.C. Filho and M.S. do Couto for technical assistance. We also thank an anonymous referee for his helpful suggestions. This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, grant 95/8856-1 and PADCT/CNPq grant 62.0097/95-7 to A.M.L.A.E. M.E.I-M. and K.S.C.Y was supported by fellowships from Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, Brazil.

References

- Apostol, B.L., Black IV, W.C., Reiter, P., and Miller, B. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*. **76**: 325-334.
- Baruffi, L., Damiani, G., Guglielmino, C.R., Bandis, C., Malacrida, A.R., and Gasperi, G. 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity*. **74**: 425-437.
- Begun, D.J., and Aquadro, M. 1992. Levels of naturally occurring DNA polymorphism are correlated with recombination rates in *Drosophila melanogaster*. *Nature (London)* **356**: 519-520.
- Bielawsky, J.P., and Pumo, D.E. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of atlantic coast striped bass. *Heredity*. **78**: 32-40.
- Black IV, W.C., Duteau, N.M., Puterka, G.J., Nichols, J.R., and Pettorini, J.M. 1992. Use of the Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in Aphids (Homóptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*. **82**: 151-159.

- Bush, G.L., and Neck, R. W. 1976. Ecological genetics of the Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) and its bearing on the quality control of mass reared insect. Environ. Entomol. **5** 821-826.
- Clegg, MT. 1989. Molecular diversity in plant populations in plant population genetics, breeding and genetic resources. Edited by H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler and B.S Weir. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Coquerel, C. 1859. Note sur une larve d'oestridae extraite du bras d'un homme à Cayenne. Rev. Mag. Zool. **2** (11): 356.
- Crespi, B.J. 1991. Heterozygosity in haplodiploid thysanoptera. Evolution. **45**: 458-464.
- Dear, J.P. 1985. A revision of the new world Chrysomyini (Diptera:Calliphoridae). Revista Brasileira Zoologia, São Paulo. **3**: 109-169
- Dev, V., La Chance, L.E., and Whitten, C.J. 1986. Polytene chromosomes, karyotype correlations and population cytology of the primary screwworm fly. J. Hered. **77**: 427-434.
- Gibbs, H.L., Prior, K.A., and Weatherhead, P.J. 1994. Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. Mol. Ecol. **3**: 329-337.

- Graham, O.H. 1985. Symposium on eradication of the screwworm from the United States and Mexico. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 62: 1-68.
- Graur, D. 1985. Gene diversity in Himenoptera. Evolution. **39**: 190-199.
- Guimarães, J.H., Papavero, N., and Pires do Prado, A. 1983. As míases na região Neotropical (identificação, biologia, bibliografia. Revta. Bras. Zool. **1**(4): 239-416.
- Hadrys, H., Balick, M., and Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. **1**: 55-63.
- Hall, M., and Wall, R. 1995. Myiasis of humans and domestic animals. Advances in Parasitology. **35**: 57-334.
- Haymer, D.S. 1994. Random amplified polymorphic DNA and microsatellites. What are they and can they tell us anything we don't already know?. Ann. Entomol. Soc. Am. **87**: 717-722.
- Haymer, D.S., Mei, H., and McInnis, D.O. 1997. Genetic marker analysis of spatial and temporal relationships among existing populations and new infestations of the mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). Heredity. **79**: 302-309.
- Hedrick, P. 1992. Shooting the RAPD's. Nature. **355**: 679-680.

Hartl, D.L. 1988. A Primer of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

Infante, M.E. and Azeredo Espin , A.M.L. 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. Biochemical Genetics. **33**: 737-756.

Innis, M.A., and Gelfand. D.H. 1990. Optimization of PCR. Em "PCR protocols: A Guide to Methods and Applications". Academic Press Inc.

Krafsur, E.S., and Whitten, C.J. 1993. Breeding structure of screwworm fly populations (Diptera:Calliphoridae) in Colima, Mexico. J. Med. Entomol. **30**: 477-480.

LaChance, L.E., and Whitten, C.J. 1986. Cytogenetic studies of screwworm (Diptera:Calliphoridae) populations from Southern Mexico and Jamaica. Symposium: Genetics in Entomology. Ann Entomol. Am. **79**: 729.

Lu, R., and Rank, G.H. 1996. Use of RAPD analysis to estimate population genetic parameters in the alfalfa leaf cutting bee, *Megachile rotundata*. Genome. **39**: 655-663.

Lynch, M., and Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol. Ecol. **3**: 91-99.

- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. **106**: 283-292.
- Nei, M., and W.H.,Li 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 5269-5273
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- Novo, M.T.M., Souza, A.P.de., Garcia Jr, O., and Ottoboni, L.M.M. 1996. RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *System and Appl. microbiology*. **19**: 91-95.
- Plikaytis, B.D., Carlone, G.M., Edwards, P., and Mayer, W. 1986. Robust estimation of standard curves for protein molecular weight and linear-duplex DNA base-pair number after gel electrophoresis. *Anal. Biochem*. **152**: 346-364.
- Pomonis, J.G., 1989. Cuticular hydrocarbons of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae). Isolation, identification and quantification as a function of age, sex and irradiation. *J. Chem. Ecol*. **15**: 2301.
- Roehrdanz, R.L. 1989. Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm fly (*C.hominivorax*). *Biochemical Genetics*. **27**: 551-559.

- Roehrdanz, R.L., and Johnson, D.A.1988. Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. J. Med. Entomol. **25**(2): 136-141.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Stevens. J., and Wall. R. 1995. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae) in southern England. Bulletin of Entomological Research. **85**(4): 549-555.
- Taylor, D.B., and Petterson II, R. D. 1994. Population genetics and gene variation in primary and secondary screwworm (Diptera: Calliphoridae). Ann. Entomol. Soc. Am. **87**: 626:633.
- Taylor, D.B., Petterson, R. D, II., and Moya-Borja, G.E. 1996. Populations genetics and gene variation in screwworms (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. Biochemical Genetics. **34** (1-2): 67-76.
- Whitten, C.J. 1980. Use of the isozyme technique to asses the quality of mass-reared sterile screwworm flies. Ann. Entomol. Soc. Am. **73**: 7-10.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., K, Rafalsky, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.* **18**: 6531-6535.
- Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids. Res.* **18**: 7213-7218.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations. Vol.4, Variability within and among natural populations.* University of Chicago Press. Chicago
- Yong, H.S. 1990. Low allozyme variability in *Batrocera albistrigata* (Insecta: Diptera: Tephritidae) from peninsular Malaysia.. *Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem. Mol. Biol.* **97**: 119-121.

Table 1 Summary of Nei and Li (1985) similarity index (S) based on RAPD markers and the estimative of the similarity fraction of matches (M) based on the comparing RAPD patterns between individuals within *Cochliomyia hominivorax* populations sampled from the Southeastern Brazil and Northern Argentina.

Table 2 Summary of Nei and Li (1979) similarity index (S) based on RAPD markers (lower diagonal) and the estimative of the similarity fraction of matches (M) based on the comparing RAPD patterns between individuals (upper diagonal) among *C. hominivorax* populations sampled from Southeastern Brazil and Northern Argentina.

Table 3. Mean of heterozigosity (Lynch & Milligan, 1994) and the proportion of variance due to the sample size and due to the variability of *C. hominivorax* populations sampled from Southeastern Brazil and Northern Argentina .

Population	M	S
RAFAELA	0.838	0.772
VALINHOS	0.836	0.771
PIRASSUNUNGA	0.849	0.785
CARAGUATATUBA	0.804	0.715
BOTUCATU	0.804	0.722
AMPARO	0.803	0.714
ADAMANTINA	0.789	0.725

Table 1. Infante-Malachias, M.E; Yotoko, K.S.C. & Azeredo-Espin, A.M.L.

	1	2	3	4	5	6	7
1. RAFAELA		0.755	0.756	0.729	0.72	0.711	0.704
2. VALINHOS	0.653		0.754	0.73	0.722	0.716	0.719
3. PIRASSUNUNGA	0.653	0.653		0.722	0.719	0.716	0.715
4. CARAGUATATUBA	0.609	0.614	0.601		0.74	0.729	0.726
5. BOTUCATU	0.601	0.609	0.602	0.626		0.726	0.716
6. AMPARO	0.582	0.595	0.591	0.605	0.607		0.789
7. ADAMANTINA	0.596	0.621	0.613	0.622	0.615	0.596	

Table 2. Infante-Malachias, M.E; Yotoko, K.S.C. & Azeredo-Espin, A.M.L.

	Mean Heterozigosity	Total Variance	Sample Variance	Diversity Variance
RAFAELA	0.123606	0.000237	$3.64 \cdot 10^{-5}$ (15%)	0.000201 (85%)
VALINHOS	0.101196	0.000207	$3.10 \cdot 10^{-5}$ (15%)	0.000176 (85%)
PIRASSUNUNGA	0.00568	0.000208	$3.03 \cdot 10^{-5}$ (14%)	0.000178 (86%)
CARAGUATATUBA	0.119957	0.000195	$4.27 \cdot 10^{-5}$ (22%)	0.000153 (78%)
BOTUCATU	0.123531	0.000207	$4.18 \cdot 10^{-5}$ (20%)	0.000166 (80%)
AMPARO	0.111318	0.000162	$4.46 \cdot 10^{-5}$ (27%)	0.000117 (73%)
ADAMANTINA	0.140167	0.000227	$4.53 \cdot 10^{-5}$ (20%)	0.000182 (80%)

Table 3. Infante-Malachias, M.E; Yotoko, K.S.C. & Azeredo-Espin, A.M.L.

Fig. 1. Geographic locations of the *C. hominivorax* populations included in the present study.

Fig. 2. Examples of RAPD band profiles generated from genomic DNA from 7 populations of the screwworm fly, *C. hominivorax*. Panel A, amplifications performed with the primer OPN-07. Panel B, amplification reactions performed with the primer OPC-13. S is the 1kb ladder molecular weight standard, the size are in kilo base pair. Populations: Ada, Adamantina; Amp, Amparo; Bot, Botucatu; Car, Caraguatatuba; Pir, Pirassununga; Val, Valinhos and Raf, Rafaela (Argentina). The upper arrow indicates a monomorphic band, the lower arrow indicates a polymorphic band.

Fig.3. UPGMA dendrogram for *C. hominivorax* populations, sampled from Southeastern Brazil and Northern Argentina, based on Nei genetic distance (Nei,1972) computed from RAPD marker frequencies.

Fig. 4. Distribution of *C. hominivorax* F_{st} values at 109 RAPD loci among six populations sampled from Southeastern Brazil and one from Northern of Argentina.



Fig. 1. Infante-Malachias, M.E.; Yotoko, K.S.C. & Azeredo-Espin, A.M.L.

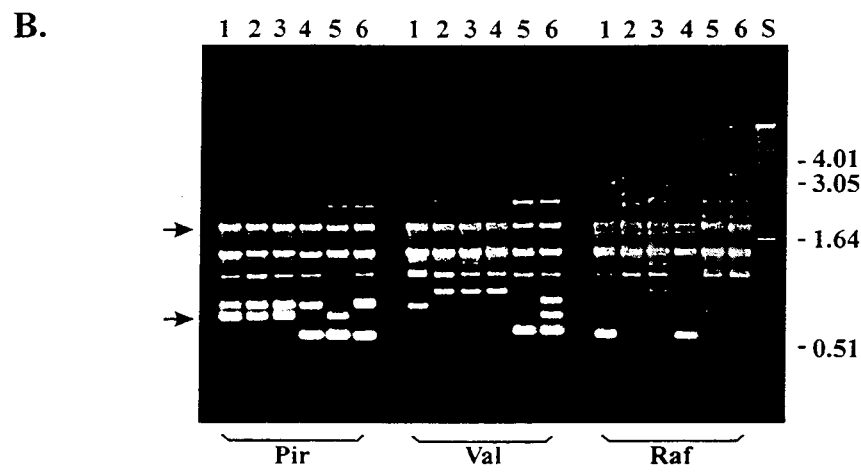
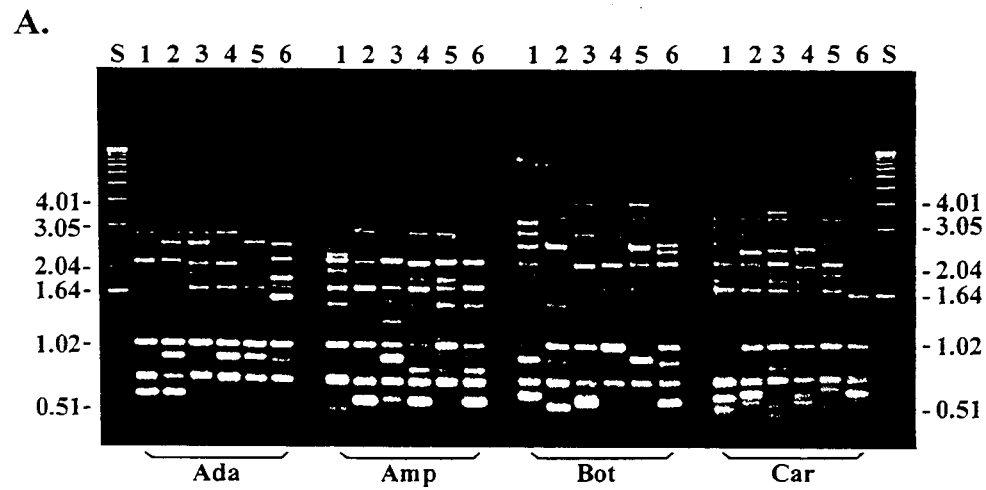


Fig. 2. Infante-Malachias, M.E.; Yotoko, K.S.C. & Azeredo-Espin, A.M.L.

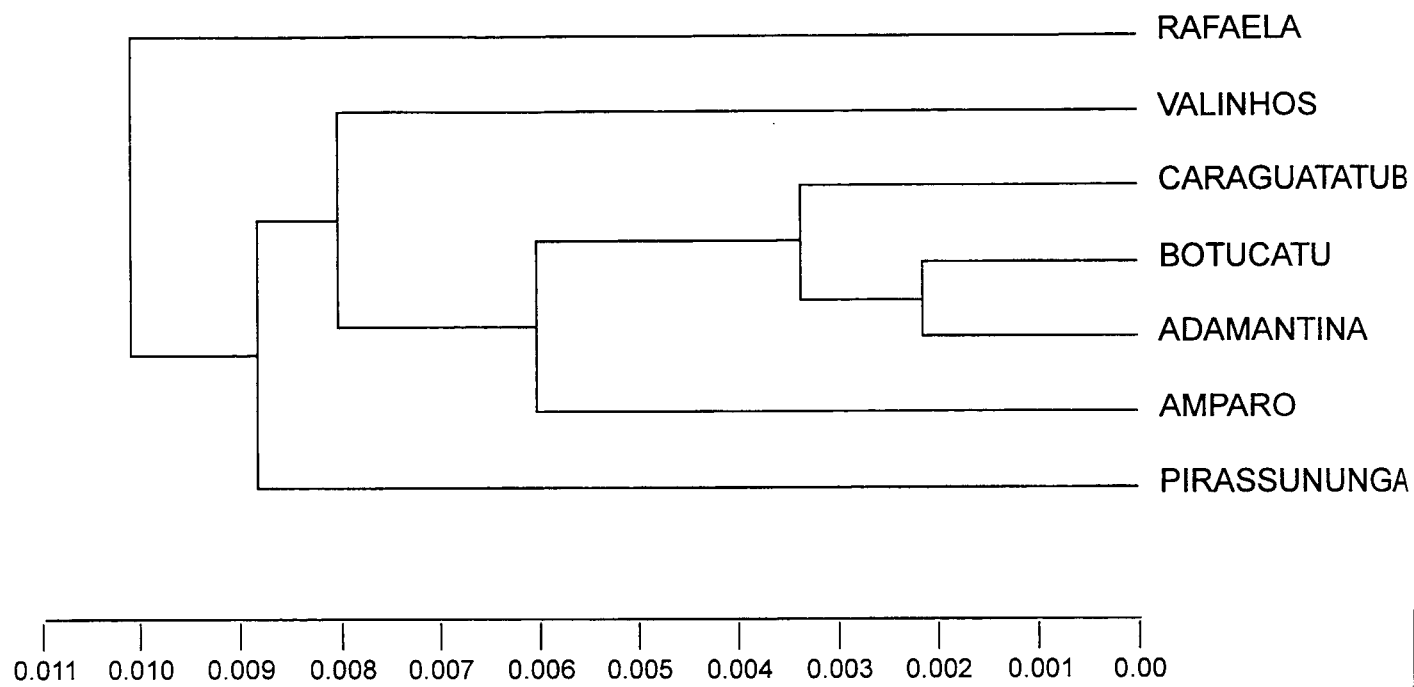


Fig. 3. Infante-Malachias, M.E; Yotoko, K.S.C. & Azeredo-Espin, A.M.L.

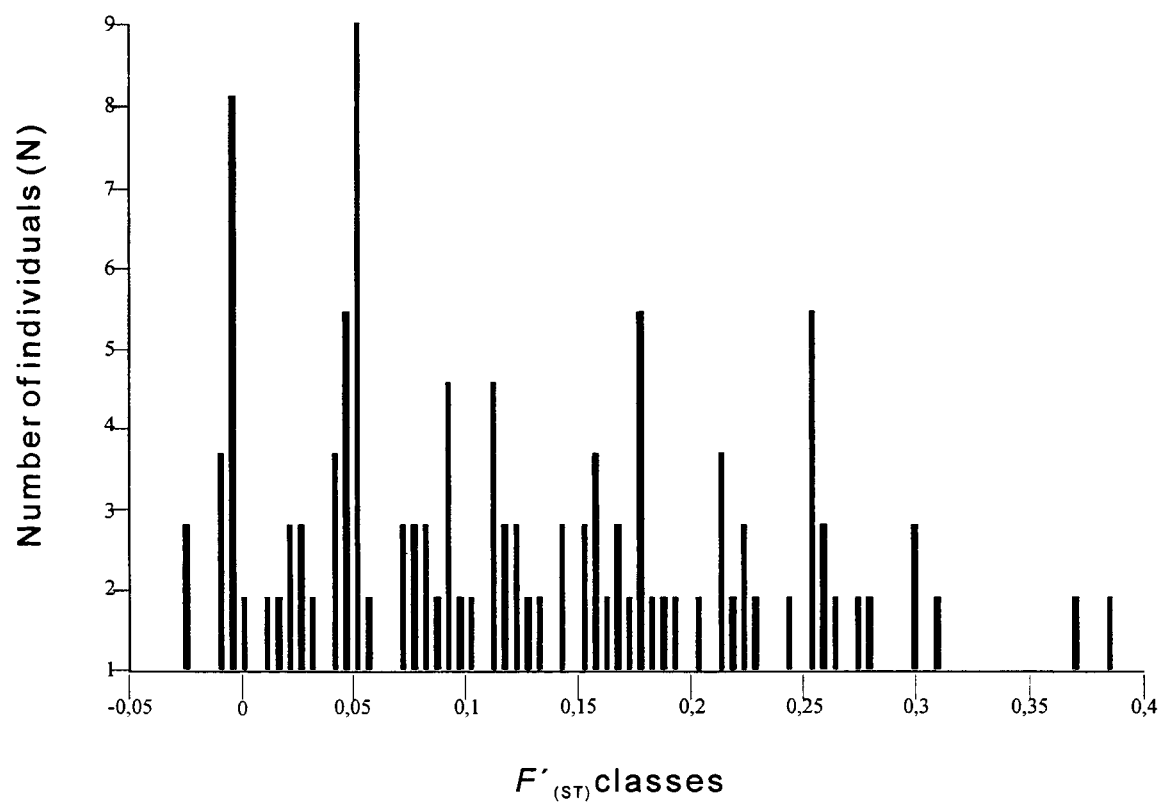


Fig. 4. Infante-Milachias, ME; Yotoko, KSC. & Azeredo-Espin, AML.

POPULATION HETEROGENEITY OF *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) POPULATIONS FROM SOUTHEASTERN BRAZIL.

Infante-Malachias, M.E; Solferini, V.N; Andrade, S.C.S. and Azeredo-Espin, A.M.L.

ABSTRACT

In this study 20 enzymes were evaluated in five sampled *Cochliomyia hominivorax* populations, from southeastern Brazil. 11 of these enzymes representing 19 isozyme loci, were suitable for allozyme analysis. Polymorphisms were detected at ten (52,6%) loci: DIA-B, EST, G3PDH, GPI, HBDH-B, IDH-A, IDH-B, PGM-A, PGM-B and TPI. The average expected heterozygosity amongst these loci was 16.5 per cent.

The Wright's F statistics reveal that the population structure of the *Cochliomyia hominivorax* is characterized by high geographical differentiation across southeastern Brazil ($F_{st}=0.214$) with relatively low gene flow ($Nm=0.92$).

These data on MLEE confirm our previously results obtained with DNA data about the great genetic differentiation of Brazilian *C. hominivorax* populations, probably as a result of genetic drift. Previous reports revealed absence or very little genetic differentiation in North and Central American screwworm populations. It is probably the results of founder effect originating the observed populations homogeneity.

With the data presented in this work, associated to mtDNA and RAPD analysis conducted in Brazilian screwworms populations, we can suggest that probably South America is the center of origin of New World Screwworm fly, *C. hominivorax*.

Keywords: allozyme electrophoresis, genetic differentiation, population genetics, *Cochliomyia hominivorax*, Calliphoridae

INTRODUCTION

The term myiasis was proposed by Hope (1840) to refer to animal disease caused by fly larvae (Hall and Wall, 1995). Zumpt (1965) did the best definition for myiasis as “the infestation of live human and vertebrate animals with dipterous larvae, which, at least for a certain period, feed on the host’s dead or living tissue, liquid body substances or ingested food”. There are about some 20 species of obligate myiasis flies worldwide; the most important, in the tropics and subtropics, are the two screwworm fly species, the Old World Screwworm fly *Chrysomya bezziana* Villeneuve and the New World Screwworm fly (NWS), *Cochliomyia hominivorax* Coquerel (1859), (Spradbery, 1994).

C. hominivorax causes severe invasive myiasis particularly in livestock causing great economic losses throughout the Neotropical region (Guimarães *et al.*, 1983). The original distribution of NWS extended from Southern United States to Northern Argentina, but, recent eradication programs have eliminated *C. hominivorax* from USA, Mexico and several Caribbean islands (Krafsur *et al.*, 1987).

Many studies on the population genetics of NWS have been published (La Chance *et al.*, 1982; Mc Innis, 1983; Mc Innis *et al.*, 1983; Dev *et al.*, 1986; Krafsur and Whitten, 1993; Taylor and Peterson, 1994; Taylor *et al.*, 1996) showing no population substructuring. Taylor *et al.* (1996) examined thirteen isozyme loci from two Brazilian populations and compared the results with previous data from Costa Rica populations (Taylor and Peterson, 1994) and partial data from Mexico (Krafsur and Whitten, 1993); they concluded that NWS is a genetically homogeneous panmictic species.

On the other hand, substantially more genetic variation has been detected recently using mitochondrial DNA/restriction fragment length polymorphism (mtDNA-RFLPS) (Roehrdanz and Johnson, 1988; Roehrdanz 1989, Taylor *et al.*, 1991; Infante and Azeredo Espin, 1995). Roehrdanz (1989) interpreted the high frequency of unique haplotypes observed in North and Central America as suggesting a very reduced gene flow among these populations.

More recently, Infante-Malachias *et al.*, (in press) using RAPD-PCR analysis (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) have demonstrated that there is genetic differentiation

among southeastern Brazil and northern Argentina populations, and these *C. hominivorax* populations are genetically subdivided.

When the analysis is performed at the DNA level the ability to detect genetic differentiation of populations is higher (Haymer, 1994). This has been previously demonstrated in some insect groups with low levels of electrophoretic variation (Black *et al.*, 1992; Begun & Aquadro, 1992). Our previous data on Brazilian *C. hominivorax* populations were performed at DNA level and the data from North and Central America were on protein electrophoresis. For this reason, and, in order to confirm our previous data on high variation and high genetic differentiation of *C. hominivorax* populations from Brazil with DNA data, we describe in this paper the analysis of five populations from Southeastern Brazil, using the multilocus enzyme electrophoretic approach (MLEE).

According to Stehli and Webb (1985) if reproductively isolated populations of *C. hominivorax* do exist, it probably would be found in South America, given the biogeographic history of the Americas. For this reason, additional detailed informations on the population genetic structure of *C. hominivorax* in South America especially in Brazil are needed.

Understanding the genetic structure and the ecological features of tropical and South American *C. hominivorax* populations is very important for an effective pest management of this important Calliphoridae species.

MATERIAL AND METHODS

Population samples. *Cochliomyia hominivorax* larvae were collected in individual wounded cattle or sheep from March 1991 to March 1998 on four localities from southeastern Brazil: Alfenas, n = 23; Botucatu, n = 19; Campinas, n = 23 and Caraguatatuba, n = 28. One sample was obtained from our laboratory colony (n = 30). All larvae were allowed to pupate and then stored at -70°C. The sampling sites are indicated in Figure 1.

Enzyme electrophoresis. Horizontal starch gel electrophoresis was performed on crude protein extracts of pupae tissue. Preparation of extracts, methods for electrophoresis and detection of

enzymatic activity were performed adopting the procedures described in Shaw & Prasad, (1970). Electrophoresis conditions were set at 180 V constant voltage for Tris-HCl gels and 50 m.a for Tris-Citrate, Tris Borate EDTA-Lithium and Amine Citrate (Morfoline) gels. The buffer solution used and the investigated enzyme system are indicated in Tables 1 and 2 respectively.

The most common allele at each locus was designated 100 or -100 corresponding to anodal or catodal migration product respectively. The designation of alternate alleles at each locus corresponds to the relative mobility of its product compared to the common allele product.

Twenty enzyme systems were screened for NWS populations (Table 1). The enzymes used in this study were selected for their reliable staining and confidence interpretation of the banding pattern. Enzyme system that was variable in *C. hominivorax* was given preference.

Statistical analysis: BIOSYS-1 (Swofford and Selander, 1981) was used to compute population allele frequencies, expected and observed heterozygosities, the genetic distance and genetic identity (Nei, 1978), and Wright's F statistic (Wright, 1978). To test the correlation between genetic and geographical distances, a Mantel test was used. A quantitative estimate of gene flow (Nm) was derived using the indirect method of Wright (1978). In this method, assuming neutrality of the alleles studied and an equilibrium between genetic drift and migration in an infinite island model, Nm is related to F_{st} by the formula $F_{st} = 1/(1+4Nm)$, where N is the local population size and m is the average rate of immigration.

RESULTS

Allele frequency variation and genetic diversity. Of the 20 enzyme systems evaluated (Table 2) 11, representing 19 isozyme loci were suitable for analysis. Nine systems did not stain or were too weak to score (ACO, ACPH, ATT, FUM, α GPDH, HK, LAP, LDH and PEP). Of the 19 loci, nine were monomorphic in our analysis (DIA-A, HBDH-A, MDH-A, MDH-B, MDH-C, ME-A, ME-B, 6PGD-A and 6PGD-B), and were not included in the population survey. The 52,6% of loci were polymorphic (DIA-B, EST, G3PDH, GPI, HBDH-B, IDH-A, IDH-B, PGM-A, PGM-B and TPI). Table 3 shows allele frequencies for each polymorphic loci in the five sampled populations. In Caraguatatuba population there were allele frequency variation at five

loci: EST, HBDH-B, IDH-A, PGM-A and PGM-B. In Alfenas the variation were registered at eight loci : EST, HBDH-B, PGM-A, G3PDH, IDH-A, IDH-B, GPI and TPI. In the Campinas population, six loci were variables: DIA-B, EST, HBDH-B, PGM-A, PGM-B and TPI. For Botucatu and Laboratory populations only four loci were variables (EST, HBDH-B, PGM-B, TPI and EST, HBDH-B, PGM-A and PGM-B respectively).

The Esterase system was the most polymorphic with ten alleles, the HBDH-B system shown three alleles and was polymorphic in all the studied populations. PGM-A and PGM-B with three alleles each one, were variable at four populations. The TPI system also with three alleles, was variable at three populations. IDH-A with two alleles was variable at two populations. On the other hand, the loci DIA-B, G3PDH, IDH-B, and GPI were variable for only one population. Table 4 shows the parameters of genetic variability estimated in our samples.

Genetic differentiation. *C. hominivorax* populations from southeastern Brazil (Table 5) show great genetic differentiation ($F_{st}=0.214$). These mean F_{st} value indicate that 21% of genetic variation in *C. hominivorax* is attributable to differentiation among populations. The inbreeding estimate was high ($F_{is}=0.382$). The rate of gene flow from the total sample of *C. hominivorax* was $Nm = 0.92$.

Genetic distance. Low values of genetic distance (Table 6) were found among the five sampled populations of *C.hominivorax* (average $D = 0.061$). The comparison between genetic and geographical distances (Mantel test) for four *C. hominivorax* populations (the laboratory sample was not included in this test), reveals a no significantly correlation between them ($r = 0.2226$ and $p = 0.713$)

Cluster analysis. The genetic relationships among the populations are depicted in Fig.2. The UPGMA clustering procedure revealed that all the populations cluster together in the phenogram constructed on the basis of the matrix of Nei's unbiased genetic distance.

DISCUSSION

The first report of myiasis in cattle in South America and Brazil was in 1580 and 1587, respectively, (in de Souza, 1938; Lamas, 1981) latter *C. hominivorax* was detected in Jamaica (Grainer, 1764). This indicates that probably the pathway led from the South America to the rest of the continent (North, Central America and Caribbean Island). Perhaps, although *C. hominivorax* could have been introduced by cattle, it is also possible that early colonist of this region may have already encountered screwworms in native buffalo, coyotes and other wild animals native to North and Central America (Cushing & Parman, 1942). These reports allow us to think in two hypotheses about the original distribution of *C. hominivorax* in the Americas: first; the screwworm fly was restricted to tropical areas and the cattle introduction could be permitted the colonization of other regions of the Americas. On other hand, the second hypothesis suggests that the initial distribution of this specie could be throughout all its historical distribution.

Several authors have reported absence of genetic differentiation in *C. hominivorax* populations in samples collected on Northern and Central America and Caribbean Islands (Whitten, 1980; Krafur & Whitten, 1993; Taylor & Peterson, 1994 and Taylor *et al.* 1996). These reports has shown very little genetic differentiation between screwworm populations from Mexico, Texas, Costa Rica and between two populations from Brazil, and the authors has suggested that *C. hominivorax* is a panmitic species throughout both its historical and it existing ranges (Taylor *et al.* 1996). These reports can be to confirm the second hypothesis, but we are in disagreement with these conclusions because some results obtained for *C. hominivorax* from South America has shown different results.

On the other hand, in a previous study of geographic patterns of mitochondrial DNA Infante & Azeredo Espin (1995), it was demonstrated the occurrence of genetic differentiation between populations of *C. hominivorax*. Recently, these observations was confirmed by *F* statistics analysis indicating high genetic differentiation ($F_{st} = 0.23$). More recently, genomic DNA data were analyzed in 7 South American populations by RAPD-PCR technique (Infante-Malachias *et al.* 1998). These data has revealed a significant *Fst* value (0.122), indicating a high geographical differentiation of *C. hominivorax* from South America.

The Caraguatatuba population showed a greater percentage of polymorphic loci (50 %) more alleles per locus (2.6) and a greater expected heterozygosity (18 %). On other hand, the laboratory and the Alfenas samples showed the same percentage of polymorphic loci (30 %) and correspond to smaller value. The laboratory sample also showed the small number of alleles per locus (1.4) and expected heterozygosity (13.1 %). The results obtained in the laboratory sample can be explained by the drastic reduction suffered by the population when it was established in the laboratory. The bottlenecks that occur during the initial generations of establishment under laboratory conditions can greatly modify the genetic characteristic of a population causing reductions of the genetic variability at every levels (Nei *et al.*, 1975; Chakraborty & Nei, 1977). In contrast, the Caraguatatuba population to receive cattle from different regions of Brazil frequently, had the greater sample heterozygosity.

The average observed and expected heterozygosity was high (9.9 and 16.5 % respectively) in the five analyzed populations. The high value for F_{st} (0.21) suggest that our samples are representative of different populations, with high genetic differentiation.

In contrast, with allozyme analysis Taylor & Peterson (1994) studying populations from Costa Rica have report little differentiation ($F_{st}=0.01$). They concluded that screwworm populations from Costa Rica, Texas and Central Mexico are genetically similar and homogeneous. On other hand, the average of Nei's unbiased genetic distance among Brazilian populations in our work were high (0.064) when compared with the genetic distance among populations from Costa Rica (Taylor & Peterson, 1994) and the data from Taylor *et al.*, (1996). Finally, studies on only two Brazilian populations (Taylor *et al.*, 1996), contrary to our results, have shown absence of genetic differentiation ($F_{st}=0.023$). Although, these work corroborate our data on heterozygosity ($H=16.5\%$).

With our data and with other kind of molecular markers (this work, Infante & Azeredo Espin, 1995; Infante-Malachias *et al.*, 1998) we select the first hypothesis and suggest that probably South America is the center of origin of this very important pest species.

Other kind of analysis of DNA sequences of the allozyme and mitochondrial genes involving more samples of *C. hominivorax* is needed to test our hypothesis. These approach is essential for understanding the population structure and evolutionary genetic for *C.*

hominivorax, and for pest management questions that persist regarding this insect in South American tropical habitats.

REFERENCES

- Begun, D.J. & Aquadro, C.F. (1992). Levels of naturally occurring DNA polymorphism correlate with recombination rates in *D. melanogaster*. *Nature*, **356**, 519-520.
- Black, W.C.IV; Duteau, N.M; Puterka, G.J; Nichols, J.R. & Pettorini, J.M. (1992). Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in aphids. *Bulletin of Entomological Research*, **82**, 151-159.
- Chakraborty, R. & Nei, M. (1977). Bottleneck effects on average heterozygosity and genetic distance with the stepwise mutation model. *Evolution*, **31**, 347-356.
- Clayton, J.W. & Tretiak, D.N. (1972) Amine-Citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *Journal of Fisch. Res. Board Canada*, **29**, 1169-1172.
- Coquerel, C. (1859) Note sur une larve d'oestride extraite du bras d'un homme à Cayenne. *Revue Mag. Zool.* **2**(11), 356
- Dev, V; LaChance, L.E. & Whitten, C.J. (1986). Polytene chromosomes, karyotype correlations and population cytology of the primary screwworm fly. *Journal of Heredity*, **77**, 427.
- Cushing, E.C. & Parman, D.C. (1942). The screwworm and blowfly problem. United States Department of Agriculture, Yearbook of Agriculture (Keeping Livestock Healthy), Washington, pp 313-322.
- Dev, V; LaChance, L.E. & Whitten, C.J. (1986). Polytene chromosomes, karyotype correlations, and population cytology of the primary screwworm fly. *The Journal of Heredity*, **77**, 427-434.
- de Souza, G.S. (1938). Tratado descritivo do Brasil em 1587. (3 ed.), Companhia Editora Nacional São Paulo.
- Grainer, J. (1764). An essay on the more commom West Indian diseases and the remedies which that country itself produces, to which are added some hints on the management of negros. London, VI + pp 8.75.
- Guimarães, J.H; Papavero, N. & Pires do Prado, A. (1983). As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Revista Brasileira de Zoologia*, **1**, 239-416.
- Hall, M. & Wall, R. (1995). Myiasis of Humans and Domestic Animals. *Advances in Parasitology*, **35**, 256-333.

- Haymer, D.S., (1994). Random Amplified Polymorphic DNAs and Microsatellites; What are they and can they tell us anything we don't already know? *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 717-721.
- Hope, F.W. (1840). On insects and their larvae occasionally found in the human body. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 256-271.
- Infante, M.E. & Azeredo Espin, A.M.L. (1995). Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae), from Brazil. *Biochemical Genetics*, **33**, 237-256.
- Infante-Malachias, M.E; Yotoko, K.S.C. & Azeredo-Espin, A.M.L., (1999). Random Amplified Polymorphic DNA of screwworm fly (Diptera: Calliphoridae) populations from Southeastern Brazil and Northern Argentina. (*Genome*, in press).
- Krafsur, E.S; Whitten, C.J. & Novy, J.E. (1987). Screwworm eradication in North and Central America. *Parasitology Today*, **3**, 131-137.
- Krafsur, E.S. & Whitten, C.J. (1993). Breeding structure of Screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) in Colima, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, **30**, 477-480.
- La Chance, L.E; Bartlett, A.C; Bram, R.A; Gagné, R.J; Graham, O.H; McInnis, D.O; Whitten, C.J. & Seawright, J.A. (1982). Mating types in screwworm populations? *Science*, **218**, 1142-1143.
- Lamas, G. (1981). Introducción a la historia de la entomología en el Perú. I. Inicios y periodo exploratorio pre-Darwiniano. *Revista Peruana de Entomología*, **23** (1): 17
- McInnis, D.O. (1983). Chromosomal variation in the Screwworm: polymorphism of cryptic species? *American Naturalist*, **22**, 840-842.
- McInnis, D.O.; Whitten, C.J.; Mackley, J.W.; Peterson, R.D. & Spencer, J.P. (1983) Cytogenetic studies of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae) from Chiapas, Mexico. *Annals of the Entomological Society of America*, **76**, 628-640.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distances from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Nei, M; Maruyama, T. & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, **29**, 1-10.
- Roehrdanz, R.L. & Johnson, D.A. (1988). Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Journal of Medical Entomology*, **25**, 136-141.

- Roehrdanz, R.L. (1989). Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the Screwworm fly (*C. hominivorax*). *Biochemical Genetics*, **27**, 551-569.
- Shaw, C.R. & Prasad, R. (1970). Starch Gel Electrophoresis of Enzymes - A compilation of Recipes. *Biochemical Genetics*, **4**, 297-320.
- Spradbery, J.P. (1994). Screw-worm Fly: a Tale of Two Species. *Agricultural Zoology Reviews*, **6**, 1-62.
- Stehli, F.G. & Webb, S.D. (1985) *The Great American Biotic Interchange*, Plenum, New York.
- Swofford, D.L. & Selander, R.B. (1981). BYOSIS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics, release 1.7. *Journal of Heredity*, **72**, 281-283.
- Taylor, D.B; Hammack, L. & Roehrdanz, R.L. (1991). Reproductive compatibility and mitochondrial DNA restriction site analysis of new world Screwworm fly *C. hominivorax* from North Africa and Central America. *Medical and Veterinary Entomology*, **5**, 145-151.
- Taylor, D.B & Peterson, R.D. (1994). Population Genetics and Gene variation in Primary and Secondary Screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 626-633.
- Taylor, D.B; Peterson, R.D. & Moya-Borja, G. (1996). Populations Genetics and Gene Variation in Screwworms (Diptera: calliphoridae) from Brazil. *Biochemical Genetics*, **34**, 67-76.
- Turner, B.J. (1973). Genetic variation of mitochondrial aspartate aminotransferase in the teleost *Cyprinodon nevadensis* Comp. Biochem. Physiol. **44B**, 89-92.
- Whitten, C.J. (1980). Use of the isozyme technique to assess the quality of mass reared sterile screwworm flies. *Annals of the Entomological Society of America*, **79**, 7-10.
- Wright, S. (1978). Variability within and among natural populations. vol. 4. *In Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Zumt, F. (1965). *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. Butterworths, London.

Table 1: Electrophoresis buffer

Buffer System	Electrode (g/litter)	Gel
I Tris-Citrate ^a 0.155 M tris 0.043 M citric acid	Tris (16.35 g) citric acid (9.04 g) pH = 7.0	Dilute 66,7 ml of electrode buffer to 1 litter. pH = 7.0
II Amine-Citrate (Morpholine) ^b 0.04 M citric acid	citric acid monohydrate (8.4 g) 10 ml of N-(3 aminopropyl)-morpholine pH = 6.0	1:19 dilution of stock solution pH = 6.0
III Tris-Borate-EDTA-Lithium ^c 0.9 M tris 0.4 M lithium hidroxiide 0.5 M boric acid 0.1 M EDTA	Tris (109 g) lithium hidroxiide (16.8 g) boric acid (30.9 g) EDTA (29.2 g) 225 ml to 2litter of H ₂ O pH = 9.1	40 ml of stock solution to 1 litter. pH = 9.1
IX Tris-HCl ^a 0.5 M tris-HCl	Tris (60 g) HCl (150 ml of 1 M Hcl) NaCl (5.8 g) pH = 9.0	Dilute 100 ml of electrode buffer to 1 litter. pH = 9.0

^a (Shaw & Prasad, 1970); ^b (Clayton & Tretiak, 1972); ^c (Turner, 1973).

Table 2: Enzyme buffer system used for *C. hominivorax*.

Enzyme	Number ^a	Symbol ^b	Buffer System
Acid phosphatase	EC 3.1.3.2	ACPH	I
Aconitate hydratase	EC 4.2.1.3	ACOH	IX
Aspartato Transaminase	EC 2.6.1.1	ATT	IX
Diaphorase	EC 1.6.2.2	DIA	I
Esterase	EC 3.1.1.1	EST	III
Fumarate hydratase	EC 4.2.1.2	FUMH	III
Glyceraldehido-3-phosphatase dehydrogenase	EC 1.1.1.12	G3PDH	I
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	EC 1.1.1.49	G6PHD	I
α - Glycerophosphatase dehydrogenase	EC 1.1.1.8	α GPDH	II
Glucose-6-phosphate isomerase	EC 5.3.1.9	GPI	I
Hexokinase	EC 2.7.1.1.	HK	IX
Hydroxibutirate dehydrogenase	EC 1.1.1.30	HBDH	III
Isocitrate dehydrogenase	EC 1.1.1.42	IDH	II
Leucine aminopeptidase	EC 3.4.11.1	LAP	IX
L-Lactato dehydrogenase	EC 1.1.1.27	LDH	IX
Malate dehydrogenase	EC 1.1.1.37	MDH	II
Malic enzyme	EC 1.1.1.40	ME	I
Peptidase	EC 3.4.1.1	PEP	IX
Phosphoglucomutase	EC 5.4.2.2	PGM	II
Triose phosphate isomerase	EC 5.3.1.1	TPI	III

^a Nomenclature committee International Union of Biochemistry 1984

^b Murphy et al, 1990

Infante-Malachias, M.E.; Solferini, V.N.; Andrade, S.C.S. and Azeredo-Espin, A.M.L.

Table 3: Allele frequencies at 10 polymorphic allozyme loci in five brazilian populations of *Cochliomyia hominivorax*, Car (Caraguatatuba), Bot (Botucatu), Alf (Alfenas), Cam (Campinas) and Lab (Laboratório).

Locus (N) ¹ allele (R.M)	Alf	Bot	Cam	Car	Lab
DIA-B	28	19	23	23	30
180	1.000	1.000	0.978	1.000	1.000
100	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000
EST	26	19	23	23	11
30	0.036	0.000	0.043	0.087	0.000
50	0.000	0.211	0.043	0.043	0.000
70	0.107	0.026	0.065	0.022	0.000
100	0.125	0.000	0.152	0.109	0.000
120	0.268	0.026	0.283	0.283	0.000
130	0.107	0.053	0.043	0.043	0.000
150	0.125	0.105	0.239	0.326	0.000
170	0.071	0.079	0.130	0.087	0.000
190	0.107	0.342	0.000	0.000	0.818
210	0.054	0.158	0.000	0.000	0.182
G3PDH	28	19	23	23	30
130	0.036	0.000	1.000	1.000	1.000
100	0.964	1.000	0.000	0.000	0.000
HBDH-B	28	19	22	23	30
120	0.036	0.316	0.295	0.109	0.633
100	0.946	0.684	0.659	0.891	0.367
70	0.018	0.000	0.045	0.000	0.000
IDH-A	28	19	23	23	30
170	0.679	0.000	0.000	0.087	0.000
100	0.321	1.000	1.000	0.913	1.000
IDH-B	28	19	23	23	30
100	0.929	1.000	1.000	1.000	1.000
70	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000
GPI	28	19	23	23	30
100	0.946	1.000	1.000	1.000	1.000
60	0.054	0.000	0.000	0.000	0.000

PGM-A	28	19	23	23	30
130	0.018	0.000	0.130	0.022	0.000
100	0.982	1.000	0.761	0.957	0.967
70	0.000	0.000	0.109	0.022	0.033
PGM-B	28	19	23	23	28
140	0.000	0.053	0.022	0.022	0.339
100	1.000	0.947	0.978	0.848	0.661
70	0.000	0.000	0.000	0.130	0.000
TPI	28	19	23	23	30
150	0.036	0.000	0.022	0.000	0.000
100	0.964	0.763	0.978	1.000	1.000
50	0.000	0.237	0.000	0.000	0.000

¹ Number of individuals interpreted from each population.

Table 4: Summary of genetic variability at 10 polymorphic loci in the five sampled populations of *C. hominivorax*. Standard error in parenthesis.

Population	Sample size	Percentage of Polymorphic loci*	Mean number of alleles per locus	Mean heterozygosity	
				Direct Count	H - W expected**
Alfenas	23	30.0	2.4 (0.7)	0.154 (0.071)	0.185 (0.091)
Botucatu	19	40.0	2.0 (0.7)	0.079 (0.049)	0.173 (0.089)
Campinas	23	40.0	2.3 (0.7)	0.143 (0.080)	0.152 (0.079)
Caraguatatuba	28	50.0	2.6 (0.7)	0.050 (0.025)	0.183 (0.086)
Laboratório	30	30.0	1.4 (0.2)	0.071 (0.048)	0.131 (0.063)
Mean		38.0	2.14 (0.46)	0.099 (0.046)	0.165 (0.023)

* A locus is considered polymorphic if frequency of the most common allele does not exceed 0.095.

** Unbiased estimate (Nei, 1978).

Infante-Malachias, M.E.; Solferini, V.N.; Andrade, S.C.S. and Azeredo-Espin, A.M.L.

Table 5: Summary of F - statistics calculated within and among populations for *C. hominivorax*, at polymorphic loci.

Locus	F (IS)	F (IT)	F (ST)
DIA - B	- 0.022	- 0.004	0.017
EST	0.464	0.556	0.172
G3PDH	1.000	1.000	0.029
HBDH - B	0.281	0.427	0.204
IDH - A	0.588	0.811	0.541
IDH - B	1.000	1.000	0.058
GPI	0.648	0.663	0.043
PGM - A	- 0.008	0.084	0.092
PGM - B	0.464	0.554	0.168
TPI	- 0.094	- 0.075	0.155
Mean	0.382	0.514	0.214

Table 6: Matrix of genetic similarity and distance coefficients (Nei, 1978) of *C. hominivorax* populations.

Populations	1	2	3	4	5
1- Alfenas	***	0.024	0.008	0.072	0.079
2- Botucatu	0.976	***	0.028	0.083	0.042
3- Campinas	0.992	0.972	***	0.048	0.096
4- Caraguatatuba	0.931	0.920	0.953	***	0.157
5- Laboratório	0.929	0.959	0.908	0.855	***

Below diagonal, Nei (1978) unbiased genetic identity

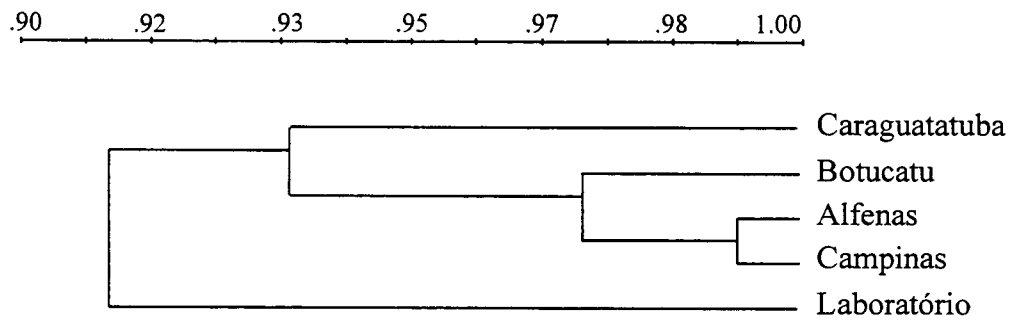
Above diagonal, Nei (1978) unbiased genetic distance

Figure 1: Sampling locations of *C. hominivorax* populations.



Infante-Malachias, M.E.; Solferini, V.N.; Andrade, S.C.S. and Azeredo-Espin, A.M.L.

Figure 2: Cluster analysis using unweighted pair group method of *C. hominivorax* populations (Nei, 1978).



DISCUSSÃO*

As abordagens moleculares utilizadas para a análise da variabilidade genética de *C. hominivorax* têm utilizado o genoma mitocondrial (DNAm_t) e o genoma nuclear (DNAn) independentemente. Por este motivo, ao avaliar-se o polimorfismo detectado em populações naturais desta espécie, utilizando o DNAm_t ou DNAn, é necessário levar-se em consideração os diferentes modos de transmissão e taxas evolutivas destes dois genomas. De acordo com Brown (1983), o DNAm_t evolui mais rapidamente do que o DNAn, sendo que este último contém seqüências repetitivas nas regiões teloméricas ou centroméricas dos cromossomos e repetições terminais invertidas que podem conter um maior número de sítios possíveis de amplificação via RAPD-PCR do que as regiões codantes (Gawel & Bartlett, 1993). Desta forma, os rearranjos, translocações e amplificação de seqüências repetitivas de DNAn, que constituem os processos fundamentais na evolução deste genoma (Bedbrook *et al.* 1980a, b; Rogers, 1985), podem representar tanto seqüências não codificadoras como seqüências codificadoras, envolvendo diferentes partes do genoma que podem evoluir com taxas diferentes (Kimura, 1982a, b, 1983; Nei, 1987).

Considera-se que a fonte de variação detectada por RAPD-PCR no DNAn (Gawel & Bartlett, 1993), seja provavelmente decorrente da variabilidade das seqüências repetitivas.

Em populações de *C. hominivorax* da América do Norte, o marcador do tipo isozimas mostrou ausência de diferenciação genética e baixa variabilidade, já a análise do DNAm_t revelou alta variabilidade.

* Cada um dos artigos apresenta uma ampla discussão dos seus respectivos resultados. Assim, esta discussão é geral, dando ênfase ao entendimento da estrutura populacional de *C. hominivorax*.

Esses resultados contrastantes podem ter ocorrido porque em geral, os marcadores de DNA revelam uma maior variabilidade genética do que o polimorfismo de proteínas, e fornecem diversos grupos de loci com diferentes modos de herança para serem analisados (Mitton, 1994).

Dadas as diferentes características evolutivas associadas com diferentes partes do genoma, a utilização de técnicas complementares ou a utilização de mais de um marcador molecular tornou-se essencial para esclarecer aspectos de variabilidade e estrutura genética de *C. hominivorax*.

No estudo com RFLP do DNAm_t, encontrou-se uma alta variabilidade nas populações com reduzido fluxo gênico entre elas; o índice de fixação indicou uma grande estruturação genética ($F_{st} = 0,23$) (Infante & Azeredo Espin, 1995). Estes dados foram corroborados através da análise de RAPD que mostraram também uma alta variabilidade nas populações se apresentando geneticamente estruturadas ($F_{st} = 0,12$) (Infante-Malachias *et al.*, no prelo). Finalmente, os dados obtidos pela análise de isozimas (Infante-Malachias *et al.*, em preparação), revelaram uma heterozigosidade de (16.5%) e uma grande estruturação genética ($F_{st} = 0,21$).

O marcador do tipo RFLP do DNAm_t, mostrou os maiores valores para estruturação genética, em segundo lugar a análise de isozimas e finalmente o marcador do tipo RAPD mostrou o menor valor de estruturação. As diferenças observadas podem ser devido as características de cada marcador e principalmente aos métodos empregados nos cálculos. Mesmo com as diferenças, os três marcadores corroboraram os resultados obtidos para as populações brasileiras desta espécie.

Nossos dados em populações de *C. hominivorax* da América do Sul sugerem que em habitats tropicais esta espécie apresenta uma significativa divergência em relação as populações da América do Norte e Central. Populações brasileiras têm mostrado altos índices de

variabilidade e de diferenciação genética, provavelmente originada por ação da deriva genética. Por outro lado, populações desta espécie provenientes da América do Norte, Central e do Caribe, têm mostrado pouca ou nenhuma diferenciação genética ($F_{st} = 0,01$) (Taylor & Peterson, 1994). Esses dados podem ser um indício de que *C. hominivorax* possa estar sendo submetida a restrição populacional nos extremos da sua distribuição, indicado pela baixa variabilidade observada na América do Norte (limite norte da distribuição) e na Argentina (limite sul da distribuição) resultante de efeito fundador. Hipótese de efeito fundador provocado por introduções recentes da espécie praga (*Ceratitis capitata* Wied.) foram propostas por Gasperi *et al.* (1991) para explicar a baixa variabilidade desta espécie na África; e por Nibouche *et al.* (1998) para populações de *Helicoverpa armigera* também da África.

A maior diferenciação genética de *Cochliomyia hominivorax* poderia estar concentrada nas populações brasileiras, como observado, e portanto no centro da sua distribuição.

Provavelmente a baixa variabilidade e a ausência de estruturação genética de *C. hominivorax* detectada na sua distribuição nas Américas do Norte, Central e Caribe seja devido a efeito fundador de moscas provenientes de regiões tropicais da América do Sul, provavelmente do Brasil. Por outra parte, os mesmos resultados de ausência de estruturação obtidos recentemente nas regiões onde esta espécie foi erradicada através da técnica SIT, pode ser resultado de introduções recentes de *C. hominivorax*.

Dados semelhantes têm sido obtidos em outras populações de insetos. Latorre *et al.*, (1986), analisaram o DNAmT de populações de *D. subobscura* do Velho e Novo Mundo, encontrando somente 2 haplótipos mitocondriais, sendo que um deles foi encontrado em populações de ilhas do Atlântico, nenhum em populações africanas, e ambos na Europa. Afonso *et al.*, (1990), trabalhando com a mesma espécie no Velho Mundo, confirmaram que existe

estruturação das populações naturais dessa espécie, tanto localmente como entre os continentes, de acordo com os dados de outros marcadores moleculares (revisão em Afonso *et al.*, 1990). Latorre *et al.*, (1992), analisando o DNAm e isozimas de populações do Velho Mundo, encontraram que as populações eram estruturadas para o DNAm, mas panmítica para os genes nucleares.

Hale and Singh, (1986, 1987, 1991), analisando o DNAm de amostras de *D. melanogaster* provenientes de vários continentes, encontraram uma grande variabilidade entre essas populações geográficas, causada tanto por variação em sítios de restrição como por heteroplasmia. As populações do Novo e Velho Mundo eram diferenciadas com relação ao DNAm, diferentemente dos resultados obtidos com genes nucleares. As populações da América do Norte se mostraram pouco variáveis, sugerindo que a colonização do continente é recente.

De Salle & Templeton (1992), através de estudos morfológicos, comportamentais e genéticos (DNAm) em *Drosophila silvestris* (espécie originária do Havai), concluíram que as moscas da parte norte da ilha são ancestrais em relação às moscas da região sul, e sugerem portanto que a colonização ocorreu do norte para o sul. Em contraste com a variabilidade do DNAm observada nestas três espécies de *Drosophila*, Halliburton & Barker (1993), analisando o DNAm de *Drosophila buzzatti*, espécie nativa da Argentina e do Brasil e introduzida na Austrália, verificaram que não apresentou nenhuma variabilidade, nem de sítio de restrição, nem de tamanho. Todas as amostras analisadas apresentaram o mesmo padrão para as 12 endonucleases testadas. Os autores sugerem que estes resultados são decorrentes do afunilamento da população quando esta espécie colonizou a Austrália, hipótese que é consistente com os dados alozímicos e cromossômicos, onde somente poucos indivíduos teriam contribuído para fundar a população australiana de *D. buzzatti*. Rossi *et al* (1996), analisando populações dessa espécie provenientes

da Argentina e Península Ibérica, encontraram uma baixa variabilidade entre as populações argentinas, e monomorfismo nas populações européias, o que sugere que ocorreu também um afinamento populacional recente dessa espécie na Europa.

Baseado nos dados discutidos neste estudo e em evidências de outras espécies sugere-se que provavelmente a América do Sul seja o centro de origem de *C. hominivorax*. Estudos mais abrangentes incluindo amostras de outros países da América do Sul são necessários para uma maior compreensão sobre a evolução desta espécie e para elaboração de projetos visando estabelecer estratégias mais adequadas para o monitoramento e controle da mesma na América Central e do Sul.

CONCLUSÕES

Os três tipos de marcadores utilizados neste estudo (RFLP, RAPD e isozimas) forneceram importantes informações complementares e indicaram a grande estruturação genética de *Cochliomyia hominivorax* em habitats tropicais.

Em contraste com a alta capacidade de dispersão de *C. hominivorax* quer natural ou através de hospedeiros, a análise conduzida com a técnica de RFLP tem demonstrado que algumas das populações analisadas podem ser diferenciadas para variantes de DNA mitocondrial, indicando subdivisão geográfica de populações desta espécie ($F_{st} = 0,23$).

A análise de 198 locus polimórficos através de RAPD, mostrou alta variabilidade genética nas populações de *C. hominivorax*. O índice de fixação revelou que existe diferenciação genética entre as mesmas ($F_{st} = 0,12$).

O estudo de 10 locus polimórficos de isozimas em 5 populações de *C. hominivorax* mostrou alta variabilidade genética (heterozigosidade esperada, $H = 16.5\%$). O baixo fluxo gênico detectado ($N_m=0.92$) corroborou a grande diferenciação genética observada ($F_{st} = 0,21$).

Os resultados compatíveis obtidos com os marcadores de tipo RAPD e isozimas podem ser resultantes da alta capacidade do marcador RAPD de detectar polimorfismos e pelo maior tamanho amostral utilizado para o marcador de isozimas, que normalmente é menos variável.

Os resultados obtidos demonstraram que a detecção de variabilidade genética de populações de *C. hominivorax* pode ser obtida utilizando qualquer uma das três técnicas moleculares descritas neste trabalho (RFLP, RAPD e Isozimas). Todas elas foram eficientes para fornecer marcadores genéticos para caracterização da estrutura genética desta importante espécie praga.

As populações brasileiras de *C. hominivorax* analisadas neste estudo mostraram altos índices de variabilidade e de diferenciação genética, provavelmente originada por ação da deriva genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, J.M; Volz, A; Hernandez, M; Ruttkay, H; Gonzalez,M; Larruga, J.M; Cabrera, V.M; Sperlich, D., 1990. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in old world populations of *Drosophila suboscuro*. Mol. Biol. Evol. 7(2): 123-142.
- Allendorf, F.W; Phelps, S.R., 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38: 1507-1514.
- Anderson, S.M; McDonald, J.S., 1983. Biochemical and Molecular Analysis of Naturally Occurrent Adh Variant in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4798-4802.
- Apostol, B.L; Black IV, W.C; Reiter, P; Miller, B., 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: The breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Heredity 76: 325-334.
- Arnberg, A.C; van Bruggen, E.F.J; Brost, P; Clegg, R.A; Schutgens, R.B.H; Waijers, P.J; Goldbach, R.W., 1975. Mitochondrial DNA of *Tetrahymena pyriformis* strain ST contains a long terminal duplication - inversion. Biochem. Biophys. Acta 383: 359-369.
- Awise, J.C., 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Edited by Chapman & Hall, New York, NY. pp 511.
- Awise, J.C; Arnold, J; Ball, R.M; Bermingham, E; Lamb, T; Neigel, J.E; Reeb, C.A; Saunders, N. C., 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 489-522.
- Awise, J.C; Lansman, R.A., 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In Evolution of Genes and Proteins. Edited by M. Nei and R. Koehn. Sinauer, Sunderland, MA, pp 147-164.
- Awise, J.C; Smith, M.M; Selander R.K., 1979. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. VII geographic differentiation in members of the *truei* and *maniculatus* species groups. J. mammal. 60: 177-192.
- Azeredo Espin, A.M.L., 1982. Análise Cariotípica de cinco espécies de Calliphoridae (Diptera) do Estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 200 pp.
- Azeredo Espin, A.M.L., 1987. Análise Cariotípica, Morfométrica e de Compatibilidade Sexual, Em Linhagens Brasileiras de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 149 pp.
- Azeredo Espin, A.M.L., 1993. Mitochondrial DNA variability in geographic populations of screwworm fly from Brazil. International Atomic Energy Agency, 161-165.

Azeredo Espin, A.M.L; Madeira, N.G., 1996. Primary Myiasis in dog caused by *Phaenicia eximia* (Diptera: Calliphoridae) and preliminary mitochondrial DNA analysis of the species in Brasil. J. Med. Entomology 33 (5): 839-843.

Azeredo Espin, A.M.L; Pavan, C., 1984. Análise cariotípica de diferentes linhagens de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Supl. Ciência e Cultura. 36 (7): 790.

Ballinger-Crabtree, M.E; Black IV, W.C; Miller, B.R., 1992. Use of genetic polymorphism detected by the Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 47: 893-901.

Barton, N.H; Clark, A., 1990. Population structure and process in evolution. In Population Biology: Ecological and Evolutionary Viewpoints. Edited by K. Wöhrmann and S.K. Jain. Springer-Verlag, Berlin. pp. 115-173.

Baruffi, L; Damiano, G; Guglielmino, C.R; Bandi, C; Malacrida, A.R; Gasperi, G., 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: Comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. Heredity 74: 425-437.

Baumhower, A.H., 1966. Erradication of the Screwworm fly. The journal of American Medical Association 196: 240-248.

Baumgartner, D.L; Greenberg, B., 1984. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. J. Med. Entom. 21: 105-113.

Bedbrook, J.R; Jones, J; O'Dell, M; Thomson, R.D; Flawell, R.B., 1980a. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Scale sp.* Cell. 19: 545-560.

Bedbrook, J.R; O'Dell, M; Flawell, R.B., 1980b. Amplification of rearranged repeated DNA sequences in cereal plants. Nature. 288: 133-137.

Beesley, W.N., 1990. Halt in spread of New world Screw-worm in Africa? Vet. Rec. 126 (19): 488-489.

Bielawsky, J.P; Pumo, D.E., 1997. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of atlantic coast striped bass. Heredity 78: 32-40.

Binelli, G; Bucci, G., 1994. A genetic linkage map of *Picea abies* Karst, based on RAPD markers, as a tool in population genetics. Theor. Appl. Genet. 88: 283-288.

Black IV, W.C; DuTeau, N.M; Puterka, G.J; Nichols, J.R; Pettorini, J.M., 1992. Use of the Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in aphids (Homoptera: Aphinidae). Bulletin of Entomological Research 82: 151-159.

- Boyes, J.W., 1961. Somatic chromosomes of higher Diptera V. Interspecific variation in the Calliphoridae. *Can. J. Zool.* 39: 549-570.
- Boyes, J.W; Shewell, G.E., 1975. Cytotaxonomy of Calliphoridae (Diptera). *Genetica.* 45: 435:488.
- Boyes, J.W; VanBrink, J.M., 1965. Chromosomes of Calyptrate Diptera. *Can. J. Genet. and Cytol.* 7:537-550.
- Bridge, D; Cunningham, C.W; Schierwater, B; DeSalle, R; Boss, L. W., 1992. Class-level relationships in the phylum cnidaria: Evidence from mitochondrial genome structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8750-8753.
- Brown, W.M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. *In* Evolution of Genes and Proteins. Edited by M. Nei and R.K. Koehn, Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA. pp 62-88.
- Bush, G.L; Neek, R. W., 1976. Ecological genetics of the Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) and its bearing on the quality control of mass reared insect. *Environ. Entomol.* 5: 821-826
- Cann, J; Cockburn, A.F; Mitchell, S.E., 1993. Population differentiation of the malaria vector *Anopheles aquasalis* using mitochondrial DNA. *The Journal of Heredity* 10: 248-253.
- Chapco, W; Ashton, N.W; Martel, R.K.B; Antonishyn, N., 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and the systematics of grasshoppers. *Genome.* 35: 569-574.
- Chen, A.C; Bull, D.L., 1994. Random Amplified Polymorphic DNA as a tool for differentiating house fly strains. *Southwestern Entomologist.* 19(4): 361-369.
- Clary, D.O; Wolstenholme, D.R., 1983. Nucleotide sequence of a segment of *Drosophila* mitochondrial DNA that contains the genes for cytochrome c oxidase subunits II and III and ATPase subunit 6. *Nucleic Acids Res.* 11: 4211-4227.
- Clary, D.O; Wolstenholme, D.R., 1987. *Drosophila* mitochondrial DNA: Conserved sequences in the A+T rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. *J. Mol. Evol.* 25: 116-125.
- Cognato, A.I; Rodgers, S.O; Teale, S.A., 1995. Species diagnosis and phylogeny of *Ips grandicollis* group (Coleoptera: Scolytidae) using random amplified polymorphic DNA. *Annals of Entomological Society of America* 88(4): 397-405.
- Coquerel, C., 1859. Note sur une larve d'oestride extraite du bras d'un homme à Cayenne. *Rev. Mag. Zool.* 2 (11): 356.

Crozier, R.H; Crozier, Y.C; Mackinlay, A.G., 1989. The COI and COII region of Honeybee mitochondrial DNA: Evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Mol. Biol. Evol.* 6(4): 399-411.

DeSalle, R; Templeton, A; Mori, I; Pletscher, S; Johnston, J.S., 1987a. Temporal and spatial heterogeneity of mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Drosophila mercatorum*. *Genetics* 116 (2): 215-224.

De Salle, R; Templeton, A; Mori, I; Pletscher, S; Johnston, J.S., 1987b. Temporal and spatial heterogeneity of mtDNA polymorphism in natural populations of *Drosophila mercatorum*. *Genetics* 116: 215-223.

DeSalle, R; Templeton, A., 1992. The mtDNA genealogy of closely related *Drosophila silvestris*. *The Journal of Heredity* 83: 211-216.

De Salle, R; Val giddings, L; Kaneshiro, K.Y., 1986. Mitochondrial DNA variability in natural populations of Hawaiian *Drosophila* II. Genetic and phylogenetic relationships of natural populations of *D. silvestris* and *D. heteroneura*. *Heredity* 56: 87-96.

Doane, W.W., 1969. Amylase variants in *Drosophila melanogaster*: Linkage studies and characterization of enzyme extracts. *J. Exp. Zool.* 171: 321-342.

Doane, W.W., 1969a. *Drosophila* amylases and problems in cellular differentiation. *In* Problems in Biology. : RNA in development. Edited by E. W. Hanly. Salt Lake City, University of Utah Press. pp. 73-109.

Dowdy, A.K; McGaughey, W.H., 1996. Using Random Amplified polymorphic DNA to differentiate strains of indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Environ. Entomol.* 25 (2): 396-400.

Edwards, M.D; Stuber, C.W; Wendel, J.F., 1987. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 116: 113-125.

Edwards, O.R; Hoy M.A., 1995. Random Amplified Polymorphic DNA markers to monitor laboratory-selected, pesticide resistance *Trioxys pallidus* (Himenoptera: Aphidiidae). After release into three California walnut orchards. *Environ. Entomol.* 24 (3): 487-496.

Ferreira, M.J.M., 1982. Sinantropia de Calliphoridae (Diptera) em Goiânia, Goiás. *Revta. Bras. Biol.* 43 (2): 199-210.

Flavell, R.A; Jones, I.G., 1970. Mitochondrial deoxyribonucleic acid from *Tetrahymena pyriformis* and its kinetic complexity. *Biochem. J.* 116: 811-817.

Fraiha, H; Azevedo, J.B.C; Azevedo, J.V.C., 1979. Myiasis in man in Amazonia -1. Gingival myiasis by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera:Calliphoridae). Rev. Fundação SESP. 24: 31-34. 1979.

Gasperi, G; Guglielmino, C.R; Malacrida, A.R; Milani, R., 1991. Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata* (Wied.) (medfly). Heredity 67: 347-356.

Gawel, N.J; Bartlet, A.C., 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. Insect Molecular Biology. 2(1): 33-38.

Geurgas, S.R., 1998. Análise do Polimorfismo de Populações Brasileiras de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) Através de RFLP de DNA Mitocondrial. Tesse de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. 90 pp.

Gillman, H; Cunningham, E.P; Sidahmed, A., 1992. The New World Screwworm Eradication Programme. North Africa 1988-1992. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Goldring, E.S; Peacock, W.J., 1977. Intramolecular heterogeneity of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. The Journal of Cell Biology. 73: 279-286.

Guimarães, J.H; Prado, A.P; Buralli, G.M., 1979. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera: calliphoridae). Revta. Bras. Ent. 23 (4): 245-255.

Guimarães, J.H; Papavero, N; Prado, A.P., 1983. As Miíases na região Neotropical (Identificação, Biologia, Bibliografia). Revta. Bras. Zool. 1(4): 239-416.

Gray, M.W., (1989). Origin and Evolution of mitochondrial DNA. Annu. Rev. Cell. Biol. 5: 25-50.

Hale, L.R; Beckenbach, A.T., 1985. Mitochondrial DNA variation in *Drosophila pseudoobscura* and related species in Pacific Northwest populations. Canadian Journal of Genetics and Cytology 27 (3): 357-364.

Hale, L.R; Singh, R., 1986. Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 8813-8817.

Hale, L.R; Singh, R., 1987. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in populations of *Drosophila melanogaster*. Molecular Biology and Evolution 10 (2): 622-637.

Hale, L.R; Singh, R.S., 1991. A comprehensive study of genic variation of natural populations of *Drosophila melanogaster*. IV Mitochondrial DNA variation and the role of history v/s selection in the genetic structure of geographic populations. Genetics 129: 103-117.

Hall, M.; Wall, R., 1995. Myiasis of human and domestic animals. *Advances in Parasitology* 35: 257-334.

Halliburton, R.; Barker, J.S.F., 1993. Lack of mitochondrial variation in Australian *Drosophila buzzatti*. *Molecular Biology and Evolution* 10 (2): 484-487.

Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4: 6-11.

Haymer, D.S., 1994b. Random Amplified Polymorphic DNAs and Microsatellites; What are they and can they tell us anything we don't already know? *Annals of the Entomological Society of America* 87: 717-721.

Haymer, D.S., 1995. Genetic analysis of laboratory and wild strains of the melon fly (Diptera:Tephritidae) using Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88(5): 705-710.

Haymer, D.S.; Mc Innis, D.O., 1993. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*. 37: 244-248.

Hilu, K.W., 1995. Evolution of finger millet: evidence from random amplified polymorphic DNA. *Genome* 38: 232-238.

Hope, F.W., 1840. On insects and their larvae occasionally found in the human body. *Trans. Ent. Soc. Lond.* 2: 256-271, pl.22, figs. 1-5.

Hubby, J.L.; Lewontin, R.C., 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 577-594.

Hunter, R.L.; Market, C.L., 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295.

Infante, M.E., 1994. Análise do DNA Mitocondrial em Populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), do Estado de São Paulo. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. 118 pp.

Infante, M.E.; Azeredo Espin, A.M.L., 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochemical Genetics* 33 (7/8): 237-256.

Infante-Malachias, M.E.; Solferini, V.N.; Andrade, S.C.S.; Azeredo-Espin, A.M.L., 1998. Population Heterogeneity of *C. hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil. (Medical and Veterinary Entomology, submitted).

Infante-Malachias, M.E; Yotoko, K.S.C; Azeredo-Espin, A.M.L., 1998. Random Amplified Polymorphic DNA of screwworm fly (Diptera: Calliphoridae) populations from Southeastern Brazil and Northern Argentina. (Genome, in press).

James, M.T., 1947. The Flies that cause Myiasis in Man. United States Department of Agriculture, Miscellaneous Publication Number 631.

Kambhampati, S; Black IV, W.C; Karamjit, S.R., 1992. Random Amplified Polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. Journal of Medical Entomology 29: 939-945.

Kambhampati, S; Karamjit, S.R., 1991. Variation in mitochondrial DNA of *Aedes* species (Diptera:Culicidae). Evolution. 45(1): 120-129.

Kambhampati, S; Rai, K. S; Verleye, D.M., 1992a. Frequencies of mitochondrial DNA haplotypes in laboratory cage populations of the mosquito *Aedes albopictus*. Genetics 132: 205-209.

Kang, F.Y; Deynze, A.V; Pauls, K.P., 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. pp 287-301. In Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. Edited by R.B. Glib and J. Thompson. CRC Press, Inc.

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

Kikkawwa, H., 1964. An electrophoretic study on amylase in *Drosophila melanogaster*. Jap. J. Genet. 39: 401-411.

Kimura, M., 1982a. The neutral theory as a basis for understanding the mechanism of evolution and variation at the molecular level. In Molecular Evolution, Protein Polymorphism and the Neutral Theory. Edited By M. Kimura. Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer Verlag, Berlin. pp. 3-56.

Kimura, M., 1982b. Molecular Evolution, Protein Polymorphism and the Neutral Theory. Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Springer Verlag, Berlin.

Kimura, M., 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge.

Knipling, E.F., 1937. Possibilities of Insect Control of Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. J. Econ. Entom. 30: 29-39.

Krafsur, E.S; Whitten, C.J; Novy, J.E., 1987. Screwworm eradication in North and Central America. Parasitol. Today 3: 131-137.

- Krafsur, E.S; Whitten, C.J., 1993. Breeding structure of screwworm fly populations (Diptera:Calliphoridae) in Colima, Mexico. *J. Med. Entomol.* 30: 477-480.
- Lamb, T; Avise, J.C., 1992. Molecular and population genetic aspects of mitochondrial DNA variability in the Diamond back terrapin, *Malaclemys terrapin*. *Journal of Heredity.* 83: 262-269.
- Lanham, P.G; Brennan, R.M; Mackett, C; McNicols, R.J., 1995. RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. *Theor Appl. Genet.* 90: 166-172.
- Lanza, L.L.B., 1996. Distâncias Genéticas Entre Linhagens Endogâmicas de Milho (*Zea mays* L.) e Predição de Híbridos Simples Através de Marcadores do Tipo RAPD. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. 141 pp.
- Latorre, A; Hernández, C; Martinez, D; Castro, J.A; Ramón, M; Moya, A., 1992. Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of *Drosophila subobscura*. *Heredity* 68: 15-24.
- Latorre, A; Moya, A; Ayala, F.J., 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8649-8653.
- LeCam, L.M; Neyman, J; Scott, E.L., 1972. Darwinian, Neo Darwinian and Non Darwinian Evolution. *Proc. 6th. Berkeley Symp. Math. Stat. Prob.*, Vol 5, Univ. of California Press, Berkeley.
- Lessinger, A.C., 1998. Análise do Genoma Mitocondrial de Dípteros Causadores de Miíases: Estrutura, Função e Perspectivas Filogenéticas Utilizando a Região Controle. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 104 pp.
- Lewontin, R.C., 1974. *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Columbia Univ. Press, New York.
- Lewontin, R.C; Hubby, J.L., 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *genetics* 54: 595-609.
- Linhares, A.X., 1981. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Revta. Bras. Ent.* 25 (3): 189-215.
- Lynch, M; Milligan, B.G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Mangan, R.L., 1985. Population ecology and genetics research on Mexican screwworms. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, Number 62: 56-66.

Marshall, O.R; Brown, A.H.D., 1975. The charge state model of protein polymorphism in natural populations. *J. Mol. Evol.* 6: 149-163.

McAlpine, J.F., 1989. Phylogeny and classification of the Muscomorpha. In "Manual of Nearctic Diptera." (J.F. McAlpine, Ed.), Vol. 3. Research Branch, Agriculture Canada, Monograph N° 32, pp. 1397-1518.

McInnis, D.O., 1981. Cytogenetics of a local population of the Screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, from Northeastern Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 74: 582-589.

McReynolds, M.S; Kitto, G.B., 1970. Purification and properties of *Drosophila* malate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 198: 165-175.

Melchinger, A.E; Lee, M; Lamkey, K.R; Woodman, W.L., 1990a. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphism: relation to estimated genetics effects in maize inbreds. *Crop Sci.* 30: 1033-1040.

Mendel, Z; Nestel, D; Gafny, R., 1994. Examination of the origin of the Israely population of *Matsucoccus josephi* (Homóptera: Matsucoccidae). Using Random Amplified polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Method. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87 (2): 165-169.

Meyer, A; Knowless, L.L; Verheyen, E., 1996. Widespread geographical distribution of mitochondrial haplotypes in rock-dwelling cichlid fishes from lake Tanganyika. *Mol. Ecol.* 5: 341-350.

Michelmore, R.W; Paran, I; Kessel, R.V., 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9828-9832.

Mitchell, S.E; Narang, S.K; Cockburn, A.F; Seawright, J.A; Goldenthal, A., 1992. Mitochondrial and ribosomal DNA variation among members of the *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) species complex. *Genome* 35: 939-950.

Mitton, J.B., 1994. Molecular approaches to Population Biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 45-69.

Moritz, C; Dowling, T.E; Brown, W.M., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.

Murphy, R.W; Sites, J.W, Jr; Buth, D.G; Haufler, C.H., 1996. Proteins: Isozyme Electrophoresis. In *Molecular Systematics*. Edited by Hillis, D.M; Moritz, C. and Mable, B. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. pp. 51-119.

- Narang, S.K; Degrugillier, M.E., 1995. Genetic fingerprint of the screwworm (Diptera: calliphoridae) infestation in North Africa by mitochondrial DNA markers. *Florida Entomologist* 78 (2): 294-304.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nibouche, S; Buès, R; Toubon, J.F; Poitout, S., 1998. Allozyme polymorphism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): comparison of African and European populations. *Heredity* 80: 438-445.
- O'Brien, S.J; MacIntyre, R.J. 1972. The α -glycerophosphate cycle in *Drosophila melanogaster*. I. Biochemical and developmental aspects. *Biochem. Genet.* 7: 141-161.
- Ohta, T., 1992a. The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23: 263-286.
- Pape, T., 1992. Phylogeny of the Tachinidae family group (Diptera: Calyptratae). *Tijdschrift voor Entomologie*. 135: 43-86.
- Pissios, P; Scouras, Z.G., 1993. Mitochondrial DNA evolution in the montium-species subgroup of *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 10(2): 375-382.
- Plomion, C; Bahman, N; Durel, C-E; O'Malley, D.M., 1995. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity* 74: 661-668.
- Powell, J.R. 1994. Molecular Techniques in Population genetics. *In* *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Edited by B. Shierwater; B, Streit; G, Wagner and R, DeSalle. Birkhause, Verlag, Basel. pp 131-156.
- Prakash, S; Lewontin, R.C; Hubby, J.L., 1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 61: 841-858.
- Puterka, G.J; Black IV, W.C; Steiner, W.M; Burton, R.L., 1993. Genetic variation an phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* 70: 604-618.
- Rafalsky, J.A; Tingey, S.V., 1993. Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *TIG* 9(8): 275-280.
- Reyes, A; Ochando, M.D., 1998. Use of molecular markers for detecting the geographical origin of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91 (2): 222-227.

- Richardson, R.H; Ellison, J.R; Averhoff, W.W., 1982a. Autocidal control of Screwworm in North America. *Science* 215: 361-370.
- Richardson, R.H; Ellison, J.R; Averhoff, W.W., 1982b. Matting types in Screwworm populations? Reply. *Science*. 218: 1143-1145.
- Roerhdanz, R.L., 1989. Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the Screwworm fly (*C. hominivorax*) *Biochemical Genetics*. 27: 551-569, 1989.
- Roerhdanz, R.L; Flanders, R.V., 1993. Detection of DNA polymorphism in predatory coccinellids using polymerase chain reaction and arbitrary primers (RAPD-PCR). *Entomophaga* 38: 479-491.
- Roerhdanz, R.L; Johnson, D.A., 1988. Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *J. Med. Entomol.* 25(2): 136-14.
- Rogers, J., 1985. Origins of repeated DNA. *Nature*. 317: 765-766.
- Rognes, K., 1997. The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are not a monophyletic group. *Cladistics* 13, 27-66.
- Ross, K.G; Krieger, M.J.B; Shoemaker, D.D; Vargo, E.L; Keller, L., 1997. Hierarchical Analysis of Genetics Structure in Native Fire Ant populations: Results From three Classes of Molecular Markers. *Genetics* 147: 643-655.
- Rossi, M.S; Barrio, E; Latorre, A; Quezada-Diaz, J.E; Hasson, E. Moya, A; Fontdevila, A., 1996. The Evolutionary History of *Drosophila buzzatii*. XXX. Mitochondrial DNA Polymorphism in Original and Colonizing Populations. *Molecular Biology and Evolution* 13 (2): 314-323.
- Russo, C.A.M; Solé-Cava, A.M; Thorpe, J.P., 1994. Population structure and genetic variation in two tropical sea anemones (Cnidaria, Actinidae) with different reproductive strategies. *Marine Biology* 119: 267-276.
- Saiki, R.K; Gelfand, D.H; Stoffel, S; Scharf, S.J; Higuchi, R; Horn, G.T; Mullis, K.B, Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Schweder, M.E; Shatters, R.G; West, S.H; Smith, R.L., 1995. Effect of transition interval between melting and annealing temperatures on RAPD analysis. *Biotechniques* 19 (1): 153-156.
- Selander, R.K; Whittam, T.S., 1983. Protein Polymorphism and the Genetic Structure of Populations. *In* *Evolution of Genes and Proteins*. Edited by M. Nei and R.K. Koehn. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. pp 89-114.

Sheppard, W.S; Steck, G.J; McPherson, B.A., 1992. Geographic populations of the medfly may be differentiated by mitochondrial DNA variation. *Experientia* 48: 1010-1013.

Simon, C; Frati, F; Beckenbach, A; Crespi, B; Liu, H; Flook, P., 1994. Evolution, Weighting and Phylogenetic Utility of Mitochondrial DNA Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87(6):651-701.

Slatkin, M., 1994. Gene Flow and Population Structure. *In Ecological Genetics*. Edited by Leslie A. Real. Princeton University Press. pp. 3-17.

Smithies, O., 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.* 61: 629-641.

Spradbery, J.P., 1994. Screw-worm Fly: A Tale of Two Species. *Agricultural Zoology Reviews*. 6 . Edited by K. Evans, pp 62.

Stevens, J; Wall, R., 1995. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in South England. *Bulletin of Entomological Research* 85: 549-555.

Stevens, J; Wall, R., 1996a. Species, sub-species and hybrid populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of Royal Society of London, serie B: Biological Science* 263: 1335-1341.

Stevens, J; Wall, R., 1996b. Genetic variation in populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. Biochemical Systematics and Ecology* 25 (2): 81-97.

Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503.

Szalanski, A.L; Taylor, D.B; Peterson II, R.D., 1996. Populations Genetic and Gene Variation of Stable fly Populations (Diptera:Muscidae) in Nebraska. *Journal of Medical Entomology* 33 (3): 413-420.

Taylor, D.B; Peterson II, R.D., 1994. Population Genetics Variation in Primary and Secondary Screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87 (5): 626-633.

Taylor, D.B; Peterson II, R.D; Moya-Borja, G., 1996. Population Genetics and Gene Variation in Screwworms (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochemical Genetics* 34 (1/2): 67-76.

Thomas, D.B; Mangan, R.L., 1989. Oviposition and wound-visiting behavior of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 526-534.

- Valle, J.S. Azeredo Espin, A.M.L., 1995. Mitochondrial DNA variation in two Brazilian populations of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Braz. J. Genetics, 18 (7): 521-526.
- Valle, J.S., 1997. Análise da Variabilidade Genética de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae); Avaliação Através do DNA Mitocondrial e Análise Cariotípica. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, SP. 90 pp.
- Vanlerberghe-Masutti, F., 1994. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Himenóptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. Insect Molecular Biology. 3(4): 229-237.
- Wagner, R.P; Selander, R.K., 1974. Isozymes in Insects and Their Significance. Ann. Rev. Entomol. 19: 117-138.
- Waugh, R; Powell, W., 1992. Using RAPD markers for crop improvement. Tibtech. 10: 186-191.
- Welsh, J; McClelland, M. 1990., Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213-7218.
- Welsh, J; Petersen, C; McClelland, M., 1991. Polymorphism generated by arbitrary primer PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. Nucleic Acids. Res. 19: 303-306.
- Wells, J.D; Sperling, F.A.H., 1998. Molecular Phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). Medical Veterinary Entomology (in press).
- Whitten, C.J., 1980. Use of the isozyme technique to asses the quality of mass-reared sterile screwworm flies. Ann. Entomol. Soc. Am. 73: 7-10.
- Wilkerson, R.C; Parsons, T.J; Albrigh, D.G; Klein, T.A; Brown, M.J., 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). Insect Molecular Biology 1(4): 205-211.
- Williams, J.G.K; Kubelik, A.R; Livak, K.J.K; Rafalsky, J.A; Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.
- Williams, J.G.K; Nanafey, M.K; Rafalsky, J.A; Tingey, S.V., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Meth. Enzymol. 218: 704-740.
- Wilson, A.C, Cann, R; Carr, S.M; George, M; Gyllestein, U.B; Helm-Bychowski, K.M; Higuchi, G; Palumbi, S.R; Prager, E.M; Sage, R.D; Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biological Journal of the Linnean Society 26: 375-400.

Wolstenholme,D.R., 1992. Animal mitochondrial DNA: Structure and Evolution. International Review of Cytology, vol 4. 141: 173-216.

Yoon, C.K; Aquadro, C.F., 1994. Mitochondrial DNA variation among the *Drosophila athabasca* semispecies and *Drosophila affinis*. J. of Heredity 85: 421-426.

Yotoko, K.S.C., 1998. Caracterização da Variabilidade Genética da Mosca do Berne *Dermatobia hominis* (Diptera:Oestridae) Através da Técnica de RAPD-PCR. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. 69 pp.

Zumpt, F. 1965., Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworths, London.