

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

L995v	Lyra, Mariana Lúcio Variabilidade mitocondrial e morfológica em populações naturais da mosca da bicheira, <i>Cochliomyia hominivorax</i> / Mariana Lúcio Lyra. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientadores: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Louis Bernard Klaczko. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. <i>Cochliomyia hominivorax</i>. 2. Mosca da bicheira. 3. Inseto - População. 4. DNA mitocondrial. 5. Morfologia (Biologia). I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de. II. Klaczko, Louis Bernard. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (rcdt/ib)
--------------	---

Título em inglês: Mitochondrial and morphological variation in natural populations of New World Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*.

Palavras-chave em inglês: *Cochliomyia hominivorax*; New World Screwworm; Insect - Population; Mitochondrial DNA; Morphology (Biology).

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Jorg Kobarg, André Vitor Lucci de Freitas, Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky, Cláudio José Von Zuben.

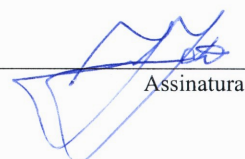
Data da defesa: 25/01/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 25 de Janeiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

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



Assinatura

Profa. Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky



Assinatura

Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben

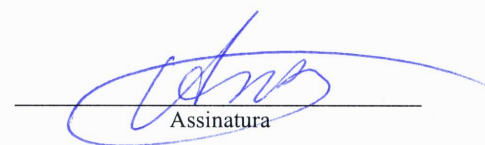


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis

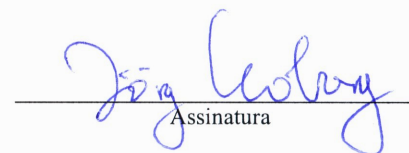
Assinatura

Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas



Assinatura

Dr Jörg Kobarg



Assinatura

Profa. Dra. Ana Cláudia Lessinger

Assinatura

Prof. Dr Wesley Augusto Conde Godoy

Assinatura

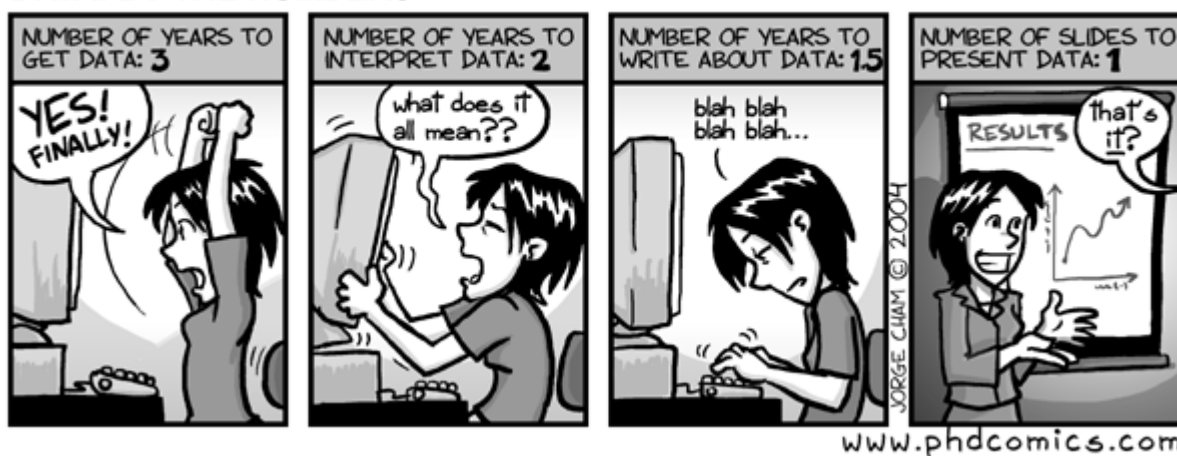
*“O esforço é grande e o homem é pequeno.
Eu, Diogo Cão, navegador, deixei
Este padrão ao pé do areal moreno
E para diante naveguei.*

.....

*A alma é divina e a obra é imperfeita.
Este padrão sinala ao vento e aos céus
Que, da obra ousada, é minha a parte feita:
O por fazer é só com Deus”*

(Fragmento de “Mar Português: III - Padrão”
Fernando Pessoa)

DATA: BY THE NUMBERS



"Piled Higher and Deeper" - Jorge Cham 2004(www.phdcomics.com)
Reproduzido com autorização do autor

Aos meus pais Christiano e Sônia,
ao meu irmão Pedro,
por “me ensinarem a viver curiosamente”

AGRADECIMENTOS

Agradeço à querida professora Ana Maria, pela orientação, pelo estímulo, carinho e confiança. Pela visão crítica e muitas vezes ousada. Por me dar a oportunidade de vivenciar e me apaixonar para sempre pelo mundo do ensino e da pesquisa. Por me fazer crescer nesse mundo intrigante do DNA mitocondrial. Por me acompanhar nessa descoberta.

Agradeço ao professor Louis Bernard, ao amigo, por ser grande mestre e guia, pelo exemplo profissional, pelo apoio sincero, pelas reflexões. Por acreditar sempre. Por acompanhar os primeiros passos dessa carreira acadêmica, por me mostrar o mundo encantador da evolução.

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal, os mais sinceros agradecimentos.

Ao amigo Pablo, pela companhia de todas as horas, pela ajuda na bancada sempre, por compartilhar comigo as descobertas e angústia da “genética de populações da mosca da bicheira” e do DNAm, pela coleta no “Uruguay” e pelos momentos de “terapia de bar”. “Gracias”.

À Rosângela pela ajuda em todas as horas, por me ensinar com paciência os procedimentos de bancada e fazer milagres para desenhar figuras para painéis e apresentações, pela companhia na coleta em Caiapônia.

À Salete por me ajudar sempre na criação de mosca da bicheira, pelas conversas e por “padronizar o protocolo do café”.

Às queridas amigas DDD: Ana Carolina (Catarina), por estar comigo nos primeiros passos da bancada, por compartilhar comigo as idéias do mundo fantástico do “ancient DNA”, e Tati, por dividir comigo a paixão pela diversidade do mundo da “mosca da bicheira”, pela amizade desde os primeiros dias de graduação, pela companhia em coletas, congressos e viagens.

Ao Túlio, amigo de coleta e de bancada, pela ajuda e apoio sempre, pelas discussões apaixonantes sobre estrutura e evolução do DNAm.

À Norminha, pela amizade dentro e fora do laboratório, pela companhia indispensável na coleta do Rio Grande.

À Lú, “complementar reversa”, pela amizade e ricas discussões sobre a vida e as “asas”.

À Ana Cláudia, pela visão crítica e discussões sobre a “Região controle”.

Aos amigos Renato, Marco Antônio (“Palocci”), Gustavo (“Johnny”), Bárbara, Karina, Alessandra, Priscila, Joan, Lissiene, Jaú, Sofia, Aline, Pedro, pela partilha do dia a dia, pela

colaboração, pelos momentos dentro e fora do laboratório, por criarem sempre um ambiente agradável e de saudáveis discussões.

Aos amigos do laboratório de Biodiversidade e evolução de *Drosophila*, agradeço pelo apoio sempre, pelo interesse na “gigante mosca verde”, pelos almoços “científicos”, por dividirem comigo um pouquinho do mundo das *Drosophilas*, pela companhia em congressos e no “IV Simpósio de Ecologia, Genética e Evolução de *Drosophila*”. Marcão, Gália, Prianda, Cacá, Roberto e Felipe, muito obrigada.

Agradeço aos amigos do “meu” Laboratório de Biocomputação e computação Bioinspirada, LBiC, por acreditarem na ciência, me fazerem ver com outros olhos a biologia e a cada dia permitirem que eu tenha mais certeza que a “ciência da vida” está sendo a escolha certa. Ao professor e amigo Fernando Von Zuben, por me receber de braços abertos, por me fazer parte do laboratório, pelo apoio. Ao Marcelo pela amizade, pela companhia em tantos momentos, pelas discussões abertas sobre co-evolução e música. Obrigada “Criatura”. Ao Tiago (meu “avesso” e irmão), por ser ele mesmo, pelo abraço apertado, o olhar amigo, pelos momentos culturais e gastronômicos. Ao Renan, pelo carinho, confiança e projetos “Verão”. Ao Pablo, pelo apoio e indispensável companhia para o almoço e cafezinho. Renato, George, Helder, Hamilton, Wilfredo e Eurípedes, muito obrigada.

Agradeço muito ao amigo Max, pelo carinho, apoio e preocupação, pelas tardes de conversa, pelo abraço; e às amigas, Tati (“de Cuiabá”), Dani (“letreira”), Ana Flávia (“Engenheira”), Flávia (“Economista”), pela diversidade.

Agradeço aos amigos André, César e Thiago, por garantirem um pouco de falta de juízo! e pelas seções musicais e “etílicas”.

Aos amigos da turma da 98D e aos que se tornaram da turma 98D: Fabíola, Tininha e Tiago, Fábio e Ana, Gustavo, Mário, Thaís, Sylvia, Natália, Dudu, Leo, Priscila, Aninha, Helena, Teresa, Silvinha, Leticia, Luis, Jair e Miriam, Fábio (Periquito); aos amigos da Biologia-UNICAMP e do “Futsal”, agradeço por tantas histórias e momentos nostálgicos, e pela amizade duradoura.

À minha família querida, meu porto seguro, meu mais terno e eterno agradecimento.

Aos meus pais Christiano e Sônia. Por tudo. Por serem exemplos de vida, por serem meus mais completos professores e amigos, por me ensinarem a amar a universidade e a pesquisa, por dividirem comigo as alegrias e angustias do caminho que escolhi, por acreditarem sempre...por me ajudarem a buscar meus sonhos.

Ao Pedro e a Débora, por estarem sempre ao meu lado, pelo carinho de irmãos, por compartilharem o sonho. Pela torcida e incentivo, pela força em todas as horas.

Aos meus avós maternos e paternos (*in memoriam*), por construírem uma base forte para essa tão querida família, à Gerusa, aos meus tios e primos, pelo apoio, por acreditarem em mim e garantirem sempre um porto seguro nas terras onde nasci. Às queridas tias “Anas”, em especial à minha tia Titina, pelo carinho.

Agradeço a minha “família campineira”, que escolhi e me escolheram, os irmãos “por opção” que reconheci nesse caminho, pela certeza que a qualquer momento eles estão aí, dividindo tristezas e alegrias, pelo apoio, força e confiança. Aninha, Nala, Paulo, Juliana, Tiago, Eva, André, Helena, André Ribeiro, muito obrigada. Às “cunhadas” Elaine, Adriana e Mônica, agradeço por fazerem parte dessa família e fazerem desses meus “irmãos” pessoas mais felizes.

À todos que ajudaram na obtenção das amostras, veterinários, donos de fazendas e estâncias, trabalhadores do campo, muito obrigada. Sem essa ajuda, esse e outros trabalhos do laboratório não seriam possíveis. Em especial agradeço: Aos amigos do Uruguai, “Los caçadores de mosca” Stela Lanzeri, Santos Gama e Stela Martines, pela acolhida e descontraídos 3000 km de passeio e trabalho duro, além de obterem amostras do Paraguai; ao Vinícius e família, pela ajuda na obtenção das amostras do Rio Grande do Sul, em especial Dona Ulda, de Pinheiro Machado; a Miriam e Wiston pela ajuda na coleta de Carambeí; ao Renato e Família pela ajuda da obtenção de tantas amostras de Caiapônia; ao Túlio e família pelas amostras “do Paraíso”; as Veterinárias Miriam e Adriana pela obtenção das amostras de Campinas; a Agência Internacional de Energia Atômica por promover o contato entre tantos grupos e garantir a obtenção de amostra, especialmente René Garcia, pela coleta das amostras em Cuba, República Dominicana, Trinidad & Tobago e Colômbia, e Alfredo Coronado pela coleta de amostras na Venezuela.

Às meninas da secretaria do CBMEG, Tânia e Sandra, e meninas da secretaria de pós-graduação, pela ajuda indispensável, tanto nos relatórios de reserva técnica como na solução de problemas burocráticos, quanto por atenderem as inúmeras solicitações.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por ser a minha segunda casa, por ser um excelente ambiente humano, científico, acadêmico e cultural; e aos professores do curso de biologia, pela contribuição contínua na minha formação acadêmica.

Agradeço aos professores Cláudio José Von Zuben, Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky, Jörg Kobarg e André Victor Lucci Freitas, pela participação e sugestões na banca e/ou pré-banca.

À Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), pela oportunidade de participar de um projeto que reúne diferentes pessoas, culturas e linhas de pesquisa, no objetivo comum de conhecer mais sobre a mosca da bicheira.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro através de concessão de com bolsas de estudo (processos 01/12528-2 e 03/13598-0). E ao CNPq, Capes, FAPESP e IAEA pelo financiamento dos projetos do laboratório, que garantiram a execução desse e de outros trabalhos.

RESUMO

A mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*, é um ectoparasita de animais de sangue quente endêmico da região Neotropical, responsável por causar graves prejuízos à pecuária. Nesta tese, diferentes aspectos da variação molecular e morfológica da espécie foram abordados com o objetivo de se obter um cenário mais amplo sobre a extensão e distribuição da diversidade genética em *C. hominivorax*. As principais contribuições da tese estão compiladas em duas partes. Uma delas trata da diversidade do DNA mitocondrial (DNAm) da espécie e está dividida em 4 trabalhos. O primeiro (Artigo 1) trata da diversidade genética e estrutura de populações no Uruguai; os resultados sugerem que as populações nessa localidade são panmíticas e polimórficas com relação ao DNAm. O segundo trabalho (Artigo 2) apresenta um estudo da distribuição da diversidade mitocondrial em 34 populações de 10 diferentes países, desde o Caribe até o Uruguai. Na região do Caribe foi identificada alta estruturação populacional e baixos índices de diversidade, enquanto que na América do Sul foi identificada alta diversidade e baixa estruturação populacional. Os resultados revelaram um padrão complexo para a distribuição da diversidade genética, sugerindo que diferentes processos estão atuando na formação e manutenção do padrão observado. O terceiro trabalho desta parte trata da caracterização da variação de tamanho da região controle do DNAm, identificada em alguns indivíduos da espécie; essa variação se deu por repetições em série dos blocos de sequência conservada e parece ter surgido de forma independente em cada localidade. A análise do domínio B da região controle sugere que este pode ser um potencial marcador para análise de populações, uma vez que revelou grande polimorfismo intra-específico. O quarto trabalho investiga a relação entre as amostras de diferentes regiões do Caribe e América continental por sequenciamento do gene COII; os resultados sugerem que as populações de Cuba são bem diferenciadas e que as populações do Caribe podem ser originadas de diferentes eventos de colonização. A outra parte das contribuições desta tese é formada por dois trabalhos e trata da caracterização da variação morfológica da asa. O primeiro deles (Artigo 3) caracteriza a variação morfológica de asas de *C. hominivorax* entre sexos e localidades. Foi identificado um grande dimorfismo sexual na espécie para tamanho e forma da asa, sugerindo a existência de diferentes pressões seletivas em cada sexo. Também foram identificadas variações entre as populações analisadas, que não estão correlacionadas com as diferenças de latitude e temperatura, sugerindo que diferentes características das localidades, dos hospedeiros ou eventos históricos podem influenciar na

variação das asas. O segundo trabalho dessa parte apresenta uma comparação de morfologia da asa entre as espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*. Os resultados indicam que análises de morfometria geométrica podem ser utilizadas para identificação das espécies, sendo essa abordagem uma estratégia para a rápida identificação de *C. hominivorax* e monitoramento de eventos de invasão desta espécie em áreas onde foi erradicada. Os resultados obtidos nos dois trabalhos dessa parte demonstram que a variação da asa é um potencial marcador para estudo de variação morfológica entre populações da mosca da bicheira e entre espécies do gênero *Cochliomyia*.

PALAVRAS CHAVE: *Cochliomyia hominivorax*, mosca da bicheira, diferenciação genética, populações, DNA mitocondrial, variação morfológica da asa.

ABSTRACT

The New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*, is an important parasitic insect pest in Neotropical region, and represents a serious threat to the livestock sector. In this thesis we analyzed different aspects of molecular and morphological variation in the species, aiming to obtain a clear scenario about the extent and distribution of genetic diversity in *C. hominivorax*. The main contributions of this thesis are organized in two parts. The first one, composed of four different works, contains the results about mitochondrial DNA (mtDNA) diversity in the species. In the first work (Article 1), mtDNA was used to study the diversity and population structure of *C. hominivorax* in Uruguay; results indicated high mtDNA variability and suggested that in Uruguay species form a single panmitic population. In the second work (Article 2) we analyzed 34 populations of *C. hominivorax* in ten different countries of Caribbean and South America, encompassing almost all the current distribution of the species. Significant population structure and low variability were found in Caribbean populations; in contrast, high variability and low differentiation was found among mainland populations. Our results showed a complex pattern of population genetic structure for the species, suggesting that different processes are acting to the shaping and maintenance of the observed patterns. The third work in this part is about the characterization of length variation in the mtDNA control region; the variation was due to the existence of tandem repetitions of conserved sequence blocks in the control region and the observations suggested that repetitions may be independent events in each locality. The analysis of variable domain revealed high intra-specific polymorphism and suggested that this region may be a potential marker for the study of species populations. The fourth work analyses the relationship between Caribbean and mainland population; Cuban populations differs significantly from all others results suggested different colonization events for Caribbean region. The other part of this thesis consists of two works about characterization of wing variation. The first one (Article 3) provides a morphological analysis of wing variation of *C. hominivorax* and evaluate the potential use of this morphological character for population variation studies. We found a striking sexual dimorphism in the species for both wing size and shape and suggested that it reflects a history of different selection pressures operating on males and females. We also found morphological variation between populations, which were not associated with latitude or temperature; these preliminary results suggested that *C. hominivorax* morphology might be affected by locality and/or host characteristics. The second work is about wing variation between

C. hominivorax and *C. macellaria*, results indicated that geometric morphometric methods are useful for species identification and that this strategy could be useful in monitoring invasions events in regions where species have been previous eradicated. Results of this part indicated that wing shape and size may be a reliable marker for population analyses of New World Screwworm, and for inter-specific analyses in genus *Cochliomyia*.

KEY WORDS: *Cochliomyia hominivorax*, New World screwworm, genetic differentiation, populations, mitochondrial DNA, wing morphological variation.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	xix
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS.....	xxiii
APRESENTAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	xxv

PARTE I- CONTEXTO DO TRABALHO

1. Introdução

1.1 A mosca da bicheira.....	29
1.2 Importância econômica e métodos de controle.....	32
1.3 Variabilidade genética em populações de <i>Cochliomyia hominivorax</i>	35
1.4 Marcadores moleculares e morfológicos e o estudo de populações.....	36

2. Objetivos.....

39

3. Metodologia Detalhada

3.1 Coleta de amostras.....	41
3.2 Obtenção e análise dos dados moleculares.....	45
3.3 Obtenção e análise dos dados morfológicos.....	51

PARTE II - ABORDAGEM MOLECULAR

4. Artigo 1: “Análise da variabilidade mitocondrial e estrutura genética em populações da mosca da bicheira (Diptera: Calliphoridae) no Uruguai”	57
5. Artigo 2: “Padrão complexo de distribuição da diversidade genética na mosca da bicheira revelado por marcadores do DNA mitocondrial”	67
6. “Caracterização da variação de tamanho da região controle do DNA mitocondrial de <i>Cochliomyia hominivorax</i> ”	95
7. “ <i>Cochliomyia hominivorax</i> em Cuba: Nova perspectiva sobre endemismo e introdução da praga no Caribe”	111

PARTE III: ABORDAGEM MORFOLÓGICA

8. Artigo 3: “Variação de tamanho e forma de asa na mosca da bicheira (Diptera: Calliphoridae): Dimorfismo sexual e análise preliminar de populações”.....	125
9. “Morfometria geométrica como ferramenta para identificação de <i>Cochliomyia hominivorax</i> e <i>Cochliomyia macellaria</i> ”.....	143

PARTE IV - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

10. Discussão Geral

10.1 Diversidade Genética e estrutura de populações da mosca da bicheira.....	151
10.2 Mosca da bicheira como modelo para estudos de pragas.....	156
11. Conclusões.....	159

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	161
---------------------------------	-----

APÊNDICES

A. Artigo 4: “Acessando a Variabilidade Genética em populações da mosca da bicheira, <i>Cochliomyia hominivorax</i> , no Uruguai”.....	175
B. “ <i>Cochliomyia hominivorax</i> da América do Sul X <i>C. hominivorax</i> da Líbia: É possível inferir a possível origem da infestação com base nos haplótipos de DNAm?”.....	187

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1.1- Representação do ciclo de vida de *Cochliomyia hominivorax*, a mosca da bicheira. (pg. 30)

Figura 3.1- Mapa representando as localidades amostradas no trabalho. (pg. 44)

Figura 3.2- Marcos anatômicos escolhidos para análise da variação morfológica em asa de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 52)

Artigo 1: Figura 1- Localização geográfica das populações amostradas no Uruguai. (pg. 60)

Artigo 2: Figura 1- Mapa esquemático da América do Sul e Central representando locais de coleta de amostras de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 92)

Artigo 2: Figura 2- Árvore UPGMA (A) e diagrama MSD (B) representando populações de *Cochliomyia hominivorax* analisadas. (pg. 93)

Figura 6.1- Representação da região A+T do DNAm de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 99)

Figura 6.2- Esquema representativo da variação de tamanho encontrada na região A+T de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 103)

Figura 6.3- Árvores obtidas pelo método de UPGMA, representando relações entre indivíduos seqüenciados de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 105)

Figura 7.1- Árvore do gene COII, obtida pelo método UPGMA, para indivíduos de *Cochliomyia hominivorax* com haplótipo H8 de PCR-RFLP. (pg. 118)

Figura 7.2- Árvore do gene COII, obtida pelo método UPGMA, para todos os indivíduos de *Cochliomyia hominivorax* analisados. (pg. 119)

Figura 7.3- Rede de relação dos haplótipos identificados em *Cochliomyia hominivorax*, construída usando o método de parcimônia estatística. (pg. 120)

Artigo 3: Figura 1- Asa de *Cochliomyia hominivorax* e representação dos marcos anatômicos escolhidos para medidas. (pg. 140)

Artigo 3: Figura 2- Relação entre tamanho e forma da asa em machos e fêmeas de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 140)

Artigo 3: Figura 3- Variação de comprimento e razão (largura/comprimento) da asa em populações de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 141)

Figura 9.1- Gráfico do tamanho médio dos indivíduos machos e fêmeas de *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*. (pg. 146)

Figura 9.2- Gráfico de RW1 (60,1%) vs RW2 (9,3%) para machos e fêmeas de *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*. (pg. 146)

TABELAS

Tabela 1.1- Número de animais sujeitos a infestação por *Cochliomyia hominivorax* e estimativa de custos anuais em tratamento e controle. (pg. 33)

Tabela 3.1- Localidades amostradas, código das localidades, latitude, longitude e descrição dos trabalhos em que as localidades foram incluídas. (pg. 43)

Tabela 3.2- Padrões de restrição obtidos para as regiões A+T/12S e COI/COII de *Cochliomyia hominivorax* na análise preliminar para escolha das enzimas marcadoras. (pg. 48)

Artigo 1: Tabela 1- Padrões de restrição obtidos por PCR-RFLP para amostras de *Cochliomyia hominivorax* do Uruguai. (pg. 61)

Artigo 1: Tabela 2- Distribuição dos haplótipos mitocondriais nas populações de *Cochliomyia hominivorax* do Uruguai. (pg. 61)

Artigo 1: Tabela 3- Estimativa dos índices de diversidade e diferenciação populacional para populações de *Cochliomyia hominivorax* do Uruguai. (pg. 62)

Artigo 2: Tabela 1- Localização geográfica das populações de *Cochliomyia hominivorax* amostradas e número de indivíduos analisados. (pg. 88)

Artigo 2: Tabela 2- Padrões de restrição e haplótipos compostos obtidos para populações de *Cochliomyia hominivorax* da América do Sul e Central. (pg. 89)

Artigo 2: Tabela 3- Diversidade Genética e distribuição de haplótipos nas populações de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 90)

Artigo 2: Tabela 4- Resultados de AMOVA para populações e grupos de populações de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 91)

Tabela 6.1- Indivíduos com região A+T analisados, localidades de origem da amostra, tamanho estimado da região A+T e haplótipos observados por PCR-RFLP. (pg. 97)

Tabela 6.2- Tamanho observado da região A+T de *Cochliomyia hominivorax* dos indivíduos analisados. (pg. 101)

Tabela 6.3- Esquema de alinhamento das repetições das amostras de *Cochliomyia hominivorax* com variação de tamanho na região A+T. (pg. 104)

Tabela 7.1- Localidades amostradas com indivíduos de *Cochliomyia hominivorax* com haplótipo H8 de PCR-RFLP. (pg. 113)

Tabela 7.2- Número de indivíduos com região COII seqüenciados e haplótipos mitocondriais amostrados por país. (pg. 114)

Tabela 7.3- Haplótipos de seqüência identificados e correspondência entre haplótipos de seqüência e haplótipos PCR-RFLP. (pg. 117)

Artigo 3: Tabela 1- Localização geográfica das áreas amostradas e número de indivíduos analisados em relação a tamanho e forma da asa em *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 139)

Artigo 3: Tabela 2- Médias de comprimento e razão (largura/comprimento) da asa de machos e fêmeas de *Cochliomyia hominivorax*. (pg. 139)

Artigo 3: Tabela 3- Resultados de ANOVA para variação de comprimento e razão (largura/comprimento) da asa de *Cochliomyia hominivorax* entre as populações. (pg. 139)

Tabela 9.1- Localização geográfica das áreas amostradas e número de indivíduos de *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* analisados. (pg. 144)

Tabela 9.2- Resultados de ANOVA no tamanho do centróide e MANOVA nos componentes não-uniformes das deformações parciais para *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*. (pg. 145)

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

“*d*”: distância evolutiva.

“*H_s*”: diversidade haplotípica.

“*F_{ST}*”: índice de fixação.

“*Φ_{ST}*”: Parâmetro *Phi st*, índice de fixação.

“*π*”: diversidade nucleotídica.

“*δ*”: divergência nucleotídica.

A+T: Região controle (A+T) do DNA mt.

A+T/12S: Região controle (A+T) do DNA mt e região do gene rRNA 12S.

ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne.

AMOVA: Análise de Variância Molecular.

ANOVA: Análise de Variância.

ARLEQUIN: programa de análise de dados “Integrated software package for population genetics data analysis”.

CBMEG: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética.

CIN: “Centro de Investigaciones Nucleares” – Uruguai.

COI/COII ou COI/II ou *coxI/coxII*: Subunidades I e II da Citocromo oxidase C (DNAm_t).

COII: Subunidade II da Citocromo oxidase C (DNAm_t).

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DNAm_t ou mtDNA: DNA mitocondrial.

FAO: Sigla inglês de “Food and Agriculture Organization of the United Nations”, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação.

FAOSTAT: Banco de dados estatísticos “FAO integrated database”.

Genbank: Banco de dados de seqüências do NIH (“National Institutes of Health”).

IAEA: Sigla em inglês de “International Atomic Energy Agency”, Agência Internacional de Energia Atômica.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

MANOVA: Análise multivariada de variância.

MEGA4: programa de análise de dados “Molecular Evolutionary Genetics Analysis software”.

PCA: Análise de componentes principais.

PCR: Reação em cadeia da Polimerase, sigla em inglês de “Polymerase Chain Reaction”

PCR-RFLP: Sigla em inglês de “Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism”

“Primer”: Temo em inglês para oligonucleotídeo iniciador

REAP: Programa de análise de dados “Restriction Analysis Package”

RFLP: Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição, Sigla em inglês de “Restriction Fragment Length Polymorphism”

rRNA12S: RNA ribossomal, subunidade 12S

RWA: Análise de deformações relativas, sigla em inglês de “Relative Warps Analyses”

SIT: Técnica do inseto estéril, sigla em inglês de “Sterile Insect Technique”.

TC: Tamanho do Centróide

tRNA-I ou tRNA-Ile: RNA transportador de Isoleucina

tRNA-M ou tRNA-Met: RNA transportador de Metionina

tRNA-Q ou tRNA-Gln: RNA transportador de Glutamina

tRNA-W ou tRNA-Trp: RNA transportador de Triptofano

tRNA-V ou tRNA-Val: RNA transportador de Valina

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

US\$: Dólar americano

APRESENTAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DA TESE

O trabalho aqui apresentado está inserido em um contexto de caracterização da diversidade genética da mosca da bicheira. Seu objetivo principal é conhecer mais detalhadamente a espécie, possibilitando assim futuros avanços no desenvolvimento e aplicação de técnicas de manejo e controle desta espécie nas Américas.

Este é, até o momento, o trabalho mais amplo de estudo sobre a variabilidade genética e distribuição da diversidade em populações naturais da espécie, e incluiu a análise, através de marcadores do DNAm, de populações desde o Caribe até o Uruguai, o que abrange quase que a totalidade da distribuição geográfica atual da mosca da bicheira. Também é o primeiro trabalho que caracteriza a variação morfológica da asa e avalia a utilidade desse caráter para futuros estudos populacionais.

O texto está organizado da seguinte forma:

A parte I, denominada “contexto do trabalho”, é composta por uma introdução, descrevendo características da mosca e atual panorama do conhecimento da diversidade genética molecular e morfológica da espécie, seguida da apresentação dos objetivos principais do trabalho e da metodologia detalhada, incluindo os principais procedimentos utilizados para obtenção e análise dos dados.

A parte II descreve a abordagem molecular e está dividida em 4 trabalhos: um artigo publicado sobre variação no Uruguai (Artigo 1), um artigo aceito para publicação que aborda a distribuição da diversidade ao longo da distribuição geográfica (Artigo 2), um item sobre caracterização da variação de tamanho da região controle do DNAm da espécie e um item de análise por sequenciamento do gene COII, para investigar a relação entre algumas amostras de diferentes localidades do Caribe e América continental.

A parte III aborda a variação morfológica da asa de *C. hominivorax* e divide-se em 2 trabalhos: um artigo em preparação sobre a caracterização da variação de tamanho e forma da asa em populações da espécie (Artigo 3), e um item sobre a comparação da morfologia da asa entre *C. hominivorax* e *C. macellaria*.

A parte IV apresenta, por fim, uma discussão geral sobre os resultados obtidos e as conclusões do trabalho.

Além das referências bibliográficas, o texto inclui ainda dois Apêndices: um trabalho publicado como capítulo de livro, realizado com marcadores microssatélites e mitocondriais para análise da diversidade genética de populações do Uruguai (Artigo 4), e um trabalho em preparação que discute o problema de identificação de origem das amostras introduzidas na Líbia no final da década de 1980.

PARTE I

CONTEXTO DO TRABALHO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Mosca da Bicheira

A espécie *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858 - Diptera: Calliphoridae), conhecida no Brasil como a mosca da bicheira, é um ectoparasita obrigatório considerado importante praga da pecuária na região Neotropical (Guimarães *et al.*, 1983). Juntamente com a mosca do berne (*Dermatobia hominis*) e a mosca dos chifres (*Haematobia irritans irritans*) é responsável por graves prejuízos econômicos a pecuária por afetar diretamente a produção animal, através da redução na produção de carne e leite e da qualidade do couro (Guglielmone *et al.*, 1999; Guimarães & Papavero, 1999).

O que faz da mosca da bicheira uma importante praga da pecuária é seu modo de infestação, conhecido como miíase. O termo miíase foi definido por Zumpt em 1965 e refere-se à “infestação de vertebrados vivos por larvas de dípteros que, pelo menos durante algum período do seu desenvolvimento, se alimentam dos tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de suas substâncias corporais ou alimentos por ele ingeridos”. Dentre as moscas causadoras de miíases, destacam-se as pertencentes às famílias Calliphoridae, Oestridae e Sarcophagidae (Diptera: Brachycera), que são em geral espécies de importância médico-sanitária e econômica, uma vez que infestam o homem e seus animais domésticos e/ou promoverem a disseminação mecânica de patógenos (Guimarães & Papavero, 1999). Das moscas da família Calliphoridae, a mosca da bicheira, com distribuição Neotropical, e a sua equivalente ecológica *Chrysomya bezziana* (Villeneuve), com distribuição no velho mundo (Hall & Wall, 1995), são as que mais se destacam por causarem miíases obrigatórias (alimentam-se de tecidos vivos do hospedeiro).

Cochliomyia hominivorax foi descrita pela primeira vez pelo médico francês Charles Coquerel (Coquerel, 1858) em 1858 como *Lucilia hominivorax* a partir de um exemplar obtido parasitando um homem, e por isso “*hominivorax*” o que quer dizer literalmente “comedora de homem” (Rocha, 1956). O gênero *Cochliomyia* só foi sugerido mais de meio século depois da identificação da espécie, por C.H.T Townsend (1915), para incluir as moscas da família Calliphoridae causadoras de miíase no Novo Mundo.

Dada a grande similaridade morfológica entre *C. hominivorax* e *C. macellaria* (Fabrício, 1775), a primeira foi considerada por muito tempo sinônimo da segunda. Apesar de alguns autores já haverem sugerido que eram duas espécies diferentes (Rocha, 1956), foi apenas em 1933 que a situação dessas espécies foi definitivamente esclarecida por Cushing & Patton (1933).

Estes autores identificaram que existiam duas espécies distintas: uma saprófaga, *C. macellaria*, e a outra, *C. hominivorax*, responsável pelas miíases primárias causadas em animais domésticos e no homem.

Atualmente, considera-se que o gênero *Cochliomyia* Townsend é formado por quatro espécies de callifórideos endêmicos do Novo Mundo: *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), *C. macellaria* (Fabrícus, 1775), *C. aldrichi* (Del Ponte, 1938) e *C. minima* (Shannon, 1926), sendo a primeira espécie a única considerada praga da pecuária e, por isso, causadora de grandes prejuízos econômicos (FAO, 1993).

Cochliomyia hominivorax é um ectoparasita de animais de sangue quente, que possui uma ampla gama de possíveis hospedeiros, desde pequenos mamíferos silvestres até o homem, porém é mais conhecido por parasitar animais domésticos tais como bois, ovelhas e cães. O ciclo de vida desta espécie está esquematizado na figura 1.1.



Figura 1.1 – Representação do ciclo de vida de *Cochliomyia hominivorax*, a mosca da bicheira.

As fêmeas de *C. hominivorax* colocam seus ovos em bordas de feridas recentes ou em orifícios corporais dos hospedeiros e as larvas, após eclodirem, se alimentam de seus tecidos vivos, gerando exsudatos que atraem outras fêmeas para oviposição. Cada fêmea pode colocar em média 200 ovos (variando de 10 a 500) e após 24 horas as larvas eclodem e começam a se alimentar do tecido do hospedeiro. A larva atinge a maturidade entre 4-8 dias, após esse período deixa a ferida e cai no solo, onde se transforma em pupa. O adulto emerge em aproximadamente 8 dias, podendo levar até 50 dias dependendo das condições do ambiente, dando início a um novo ciclo (Cushing & Patton, 1933; Hall, 1948, Guimarães *et al.*, 1983). As fêmeas dessa espécie copulam uma única vez (Crystal, 1967) e os machos possuem comportamento muito agressivo (Guillot *et al.*, 1978; Krafur, 1978).

Historicamente a distribuição geográfica de *C. hominivorax* se estendia desde o Sul dos Estados Unidos até o Uruguai e parte da Argentina, porém foi erradicada da América do Norte e América Central continental pela “Técnica do Inseto Estéril” (revisão em Hall & Wall, 1995; Dyck, Hendrichs & Robinson, 2005). A atual distribuição dessa espécie compreende os países da América do Sul, exceto Chile, e algumas ilhas do Caribe (Hall & Wall 1995).

A espécie *C. macellaria* é muitas vezes confundida com *C. hominivorax* pois suas larvas também podem ser encontradas em feridas de mamíferos, porém se alimentando de tecidos necrosados. As larvas dessa mosca são encontradas na maior parte das vezes em carcaças, lixo urbano ou fezes, juntamente com outras espécies de califorídeos, sarcófagídeos e muscídeos (Guimarães *et al.*, 1983; Zumpt 1965). Por possuir hábito necrófago e sinantrópico, *C. macellaria* está listada entre os vetores de doenças em homens e animais, assumindo assim importância médico-sanitária (Ferreira, 1983). Essa espécie é comum na América Neotropical, distribuída desde o sul do Canadá até o norte da Argentina (Baumgartner & Greenberg 1985).

Pouco se sabe sobre os hábitos e abundância relativa das outras duas espécies do gênero, *C. aldrich* e *C. minima*. Estas espécies têm distribuição geográfica restrita a algumas ilhas do Caribe e à Flórida (Dear, 1985). Os adultos são aparentemente atraídos por material em decomposição (Hall, 1948), e em Porto Rico foi registrado um único caso de *C. minima* associado a miíase (De León & Fox, 1980). Estas espécies são raramente consideradas em guias de identificação e os seus estágios imaturos ainda não estão descritos na literatura (FAO, 1993).

1.2 Importância econômica e métodos de controle

A produção animal tem uma significativa importância no contexto sócio –econômico brasileiro, bem como em outros países da América do Sul e Central (FAO, 2007). Os produtos derivados da produção animal são utilizados tanto para consumo no país de origem como representam parte importante das balanças comerciais de importação e exportação (ex: ABIEC, 2007; IBGE, 2007). Por exemplo, em 2005, o Brasil figurava em primeiro lugar da lista em produção de bovinos no mundo, seguido por Índia e China, e a exportação de couro chegou a representar cerca de 10% do mercado mundial (IBGE, 2005).

A tendência do crescimento da população mundial é um fator que aumenta a demanda da produtividade de carne, leite e derivados e para tanto o desenvolvimento do setor pecuarista é extremamente importante. Esse desenvolvimento está diretamente associado a um controle sanitário dos animais, reduzindo os custos e aumentando a qualidade dos produtos; nesse sentido é importante um contínuo investimento em tratamento e controle de pragas da pecuária, como a mosca da bicheira.

Embora ainda não tenha sido estabelecida uma estimativa oficial de custo relativo a tratamento e controle da mosca da bicheira no Brasil, Vargas-Terán *et al.* (2005) estimou que este pode ser de aproximadamente 1,5 milhão de dólares anuais. Esta estimativa foi realizada considerando como referência um trabalho realizado na do Caribe por Rawlins (1985), que estimou que a perda anual com monitoramento e tratamento da praga variou de US\$ 4,82 a US\$ 10,71 (média US\$ 7,76) por animal. Considerando a mais recente estimativa de rebanhos no Brasil e em outros países da América do Sul e Central, podemos estimar que as perdas anuais são ainda maiores (Tabela 1.1).

Tabela 1.1-Número (x1000) de animais sujeitos a infestação por *Cochliomyia hominivorax* (FAOSTAT 2007, IBGE 2007) e estimativa aproximada de custos anuais em tratamento e controle da praga em alguns países da América do Sul e Central (considerando média de gastos US\$ 7,76 por cabeça; adaptado e atualizado de Vargas-Terán *et al.*, 2005).

	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Suínos	Equinos	Aseninos e Muares	Total	Custos*
Brasil	207.157	15.588	10.307	34.064	5.787	2.580	275.483	2137,75
Argentina	50.768	12.450	4.200	1.490	3.655	283	72.846	565,28
Colombia	25.699	3.333	4.105	1.724	2.554	571	37.986	294,77
Venezuela	16.615	525	1.342	3.264	500	512	22.759	176,61
Uruguai	11.956	9.712	16	257	432	5	22.378	173,66
Paraguai	9.983	500	155	1.600	360	50	12.647	98,14
Bolivia	7.517	8.987	1.926	2.488	456	717	22.092	171,44
Peru	5.241	14.822	1.957	3.005	730	910	26.666	206,93
Equador	4.971	1.053	144	1.281	411	295	8.155	63,28
Cuba	3.737	2.761	1.171	1.761	483	30	9.943	77,16
Rep. Domin.	2.200	123	190	580	343	291	3.727	28,92
Jamaica	430	1	440	85	4	33	993	7,71
Trinid. & Tob.	29	3	59	43	1	4	140	1,09

*US\$ Milhão

O método tradicional de controle de *C. hominivorax*, e mais utilizado até hoje na América do Sul e Caribe, envolve o uso tóxico de diferentes inseticidas nos animais infestados por larvas. Dentre os compostos mais utilizados no Brasil estão os organofosforados, piretróides e as avermectinas (Sindam, 2008). O principal problema deste método está no fato de que a aplicação de inseticidas pode resultar no acúmulo de resíduos na carne, leite e derivados, ou ainda no meio ambiente (Serenio *et al.*, 1996). Além disso, o uso impróprio e contínuo desses químicos pode levar a seleção de linhagens resistentes do parasita.

O impacto econômico causado pela praga na primeira metade do século passado, principalmente no sul dos Estados Unidos (Broce, 1985), despertou o interesse da comunidade científica em desenvolver medidas de controle desta praga, e alguns pesquisadores concluíram que reduzir ou eliminar a população de insetos seria uma solução melhor do que tratar topicamente os animais infestados. Foi nesse cenário, e somado aos adventos das técnicas de criação em massa de *C. hominivorax* em laboratório, que E. F. Knipling concebeu um novo método para controle (e erradicação) desta espécie, que foi denominado “Técnica do Inseto Estéril” (temo em inglês, “Sterile insect technique”-SIT) (Knipling, 1955).

O SIT é uma técnica que envolve a criação, esterilização e liberação de milhares de insetos. O princípio do método é a liberação no campo de machos estéreis em maior número do que os selvagens (mínimo 3 vezes mais) para acasalarem com fêmeas que, por sua vez, irão produzir proles inviáveis, levando a população à extinção (Knipling, 1955). Atualmente esta técnica tem sido utilizada com sucesso para erradicação e controle de diferentes espécies de inseto praga (ex: *Ceratitis capitata*, *Cydia pomonella*, *Glossina palpalis*; Dyck, Hendrichs & Robinson, 2005)

No início de 1954 o primeiro teste efetivo de erradicação de *C. hominivorax* foi realizado com sucesso na ilha de Curaçao (Klassen & Curtis, 2005). Em 1956 foi iniciado um programa para erradicação da praga nos Estados Unidos com a utilização de SIT; uma década mais tarde o país foi considerado livre da mosca. Depois disso, foram estabelecidos outros programas de erradicação através do SIT na América do Norte e Central (revisão em Vargas-Terán *et al.*, 2005). Hoje são declarados livres da praga: Porto Rico (declarado livre de *C. hominivorax* em 1975), México (1991), Belize e Guatemala (1994), El Salvador (1995), Honduras (1986), Nicarágua (1999), Costa Rica (2000) e Panamá (2001). Está sendo mantida uma barreira permanente através da liberação de insetos estéreis na divisa entre Panamá e Colômbia para impedir a re-introdução na América Central e do Norte, por moscas advindas da América do Sul (Vargas-Terán *et al.*, 2005). Ocorrências esporádicas e tentativas de re-introdução vêm sendo continuamente monitoradas e controladas utilizando-se esta técnica (Vargas-Terán *et al.*, 2005).

Em 1988, foi registrada pela primeira vez fora das Américas, a ocorrência de infestação por *C. hominivorax* na Líbia (Gabaj & Beesley, 1989; El-Azazy, 1992; Vargas-Terán *et al.*, 1994), demonstrando o grande potencial de dispersão e adaptação dessa espécie em novas regiões (ver detalhes no Apêndice B deste trabalho). A mesma técnica (SIT) foi utilizada na Líbia, declarada livre da praga em julho de 1992 (Vargas-Terán *et al.*, 1994; Klassen & Curtis, 2005).

A lista de sucessos envolvendo erradicação de *C. hominivorax* pelo uso de SIT fez dessa espécie um importante modelo para erradicação de pragas (Klassen & Curtis, 2005). O único caso problemático de erradicação de *C. hominivorax* ocorreu na Jamaica (FAO, 1999; Dyck, Reyes Flores *et al.*, 2005) e, apesar do insucesso ter sido atribuído principalmente a problemas operacionais, foi reconhecida a necessidade de se obter mais dados sobre ecologia e dinâmica das populações naturais da mosca da bicheira (Dyck, Reyes Flores *et al.*, 2005).

Nesse contexto, o estudo da variabilidade genética e da estrutura de populações é estratégico para a obtenção das informações sobre biologia da espécie. As informações obtidas na

análise de variabilidade e estrutura de populações podem ser utilizadas para predição de rotas de fluxo gênico, taxas de dispersão de indivíduos entre populações, identificação de populações reprodutivamente isoladas, delimitação de escala geográfica para programa de controle ou ainda monitoração da qualidade dos indivíduos criados em massa em uma biofábrica (revisão em Krafur, 2005). Esses dados são de fundamental importância, por exemplo, para a tomada de decisões em relação à implementação de programas de erradicação baseados em SIT.

1.3 Variabilidade Genética em Populações de *Cochliomyia hominivorax*

Como resultado dos avanços obtidos com métodos de controle baseado em SIT, foram muitos os trabalhos publicados com linhagens de laboratório de *C. hominivorax*, que abordaram, por exemplo, métodos de esterilização por químicos e radiação, comportamento, dispersão e identificação de mutações (revisão em Guimarães *et al.*, 1983). Apesar dos avanços obtidos nesses campos, ainda são poucos os trabalhos de caracterização da variabilidade genética de populações naturais da espécie, e muitas vezes estes apresentaram resultados contraditórios.

Kaufman & Wasserman (1957) foram os primeiros a descrever o cariótipo de *C. hominivorax* ($2n=12$; XX-fêmea, XY-macho). Duas décadas mais tarde, Richardson e colaboradores (Richardson, Ellison & Averhoff, 1982a, 1982b) descreveram distintos cariótipos e indicaram a possibilidade de existência de biótipos (“Biotypes” ou “mating types”) sugerindo que *C. hominivorax* poderia ser considerada um complexo de espécies crípticas. Usando a mesma técnica Gagné & Peterson II, (1982) questionaram a existência desses biótipos. Dev, LaChance & Whitten (1986) desenvolveram poucos anos depois o primeiro mapa do cromossomo politênico dessa espécie e não detectaram variação entre populações originárias dos EUA (Texas) e Costa Rica (Cañas).

A possibilidade da existência de biótipos e sua possível implicação para o programa de controle baseado em SIT, destacou a necessidade de novos estudos genéticos em populações de *C. hominivorax*.

Abordagens genéticas clássicas baseadas em métodos de citogenética ou variação morfológica concluíram que *C. hominivorax* é uma única espécie, porém que apresenta polimorfismo (McInnis, 1981; McInnis *et al.*, 1983; LaChance *et al.*, 1982; LaChance & Whitten, 1986; Azeredo-Espin, 1987).

Estudos da variação genética da espécie baseados na técnica de isoenzimas também resultaram em conclusões divergentes. Krafur & Whitten (1993) e Taylor *et al.* (1994) analisaram populações da América do Norte e Central e concluíram que a espécie constitui uma única população panmictica. Por outro lado, Infante-Malaquias (1999) analisou cinco populações brasileiras com essa técnica e concluiu que existe diferenciação geográfica no sudeste do Brasil.

Análises de marcadores do DNA mitocondrial (DNAmt) revelaram alto polimorfismo na espécie, porém com diferentes níveis de estruturação. Roehrdanz e colaboradores (Roehrdanz & Johnson, 1988; Roehrdanz, 1989) analisaram populações da América Central e do Norte e encontraram baixa divergência entre as populações continentais, em contraste com uma maior divergência entre a população da Jamaica e as do continente. Por outro lado, Infante-Vargas & Azeredo-Espin (1995) analisaram populações do sudeste do Brasil e identificaram certa subdivisão populacional. Os resultados obtidos com marcadores mitocondriais para populações brasileiras foram mais tarde corroborados por estudos com marcadores RAPD do genoma nuclear (Infante-Vargas *et al.*, 1999).

Não existe uma explicação conclusiva para as discrepâncias entre os diferentes trabalhos em genética de populações de *C. hominivorax*. Uma possibilidade é que a diferença entre os trabalhos resulte em um padrão de distribuição da variabilidade genética da espécie em que as populações do centro da distribuição geográfica sejam estruturadas (Brasil) e com alta variabilidade, enquanto que as populações dos extremos da distribuição (no caso América do Norte e Central) sejam menos variáveis e pouco estruturadas, devido a efeitos de colonização (Infante-Vargas, 1999). Outra interpretação possível é que a discrepância entre os resultados reflita a inclusão de diferentes populações nas análises e/ou do uso de diferentes marcadores.

Considerando o exposto acima, fica claro que o cenário da variabilidade e subdivisão populacional em *C. hominivorax* ainda é uma questão em aberto. Nesse sentido um estudo abrangente sobre a extensão e distribuição da diversidade genética na espécie ao longo da atual distribuição geográfica é estratégico, uma vez que pode auxiliar na tomada de decisões em futuros programas de controle.

1.4 Marcadores Moleculares e Morfológicos e o Estudo de Populações

O genoma mitocondrial animal é uma molécula dupla-fita circular relativamente compacta, com um tamanho médio de 16kb na maioria dos animais, que apresenta uma grande

conservação de conteúdo e estrutura, herança predominantemente materna e a alta taxa de substituição (Avise, 2004). Essas características contribuem para que este genoma seja empregado extensivamente como marcador molecular em diversos estudos evolutivos, incluindo inferência filogenética, identificação da origem de espécies, filogeografia, evolução molecular e análises de dinâmica e estrutura de populações (Simon *et al.*, 1994; Zhang & Hewitt, 1997; Boore, 1999; Avise, 2000; Avise, 2004; Shao & Barker, 2007).

A análise de marcadores moleculares do DNA mitocondrial (DNAMt) tem contribuído muito para esclarecer mecanismos evolutivos envolvidos na manutenção da variabilidade genética de espécies da família Calliphoridae (ex: Roehrdanz, 1989; Infante & Azeredo-Espin, 1995; Valle & Azeredo-Espin, 1995; Wells & Sperging, 1999; Hall *et al.*, 2001, Lessinger *et al.* 2004; Azeredo-Espin & Lessinger, 2006). O genoma mitocondrial de *C. hominivorax* foi totalmente sequenciado (Lessinger *et al.*, 2000), e se destaca por ser o primeiro genoma mitocondrial de insetos totalmente sequenciado em laboratório brasileiro.

Dentre as diferentes técnicas empregadas para análise do DNAMt destacam-se a de RFLP total, PCR-RFLP e a de sequenciamento de regiões específicas. O PCR-RFLP vem sendo empregado em diversos estudos de populações naturais (ex: Baker *et al.*, 1998; He & Haymer, 1999; Chow *et al.*, 2000; Ittig & Gardeñal, 2002). Esta técnica, consiste na amplificação de fragmentos específicos do DNAMt seguida pela digestão dos mesmos com enzimas de restrição diagnósticas (Simon *et al.* 1993). A grande vantagem dessa técnica em relação ao RFLP total é que necessita de uma pequena quantidade de DNA, que pode inclusive ser extraído de amostras mal preservadas. Além disso, envolve custos menores do que o sequenciamento (Taylor *et al.*, 1996; Litjens *et al.*, 2001).

Litjens *et al.* (2001) utilizaram a técnica de PCR-RFLP como estratégia para um diagnóstico molecular rápido entre as espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, e sugeriram que esta poderia ser um bom método para estudar populações naturais de *C. hominivorax*, por identificarem polimorfismos nas populações estudadas. Taylor *et al.* (1996) e Narang & Degrugillier (1995), também identificaram polimorfismo populacional em *C. hominivorax* utilizando essa técnica.

Entre as regiões do DNAMt mais utilizadas para o estudo de populações estão as subunidades I e II do citocromo oxidase c (COI/II, COI/COII ou *coxI/coxII*) (ex: He & Haymer, 1998; Brito *et al.*, 2002; Sanetra & Crozier, 2003; Scataglini *et al.*, 2006, Roe & Sperling, 2007). Mais recentemente, a região “controle” (região A+T em insetos, Zhang & Hewitt-1997) foi

incluída no estudo de populações (Baker *et al* 1998; Chow *et al.*, 2000, Mardulyn *et al.*, 2003; Vila & Bjorklund, 2004; Chu *et al.*, 2003; Townsend & Rand, 2004).

O estudo da variação morfológica também é importante para a caracterização da variação presente em uma população local. As variações morfológicas de um indivíduo, ou fenótipo, expressam a interação entre o genótipo e o ambiente, e podem revelar tanto processo de seleção natural, quando o genótipo é alterado, quanto a plasticidade fenotípica, quando apenas a morfologia é alterada (Scheiner, 1993; Ricklefs & Miles 1994). Como a variação nos caracteres fenotípicos pode representar a ação da seleção natural, o estudo da variação morfológica pode revelar importantes resultados que não podem ser obtidos com marcadores moleculares neutros.

Diferenças na morfologia da asa entre populações naturais têm sido bem documentadas em dipteros (e.g. Coyne & Beechan, 1987; Imasheva *et al.*, 1994; Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Bitner-Mathé & Klaczko 1999; Alves & Beló, 2002; David *et al.* 2003; Reigada & Godoy, 2005). A maior parte dos trabalhos sobre o assunto foi realizada no gênero *Drosophila*, na qual a existência de clines em relação ao tamanho do corpo é documentada para diferentes espécies (ex: Pfriem, 1983; Hyytia *et al.*, 1985; Imasheva *et al.*, 1994; Huey *et al.*, 2000; Collinge *et al.*, 2006). A presença de clines, em geral é interpretada como adaptação dos indivíduos às condições do ambiente, e pode revelar muito sobre diferenciação populacional de uma espécie.

Na espécie *C. hominivorax* os estudos de variação morfológica se baseiam principalmente nas características que a diferenciam de *C. macellaria* (FAO, 1993), e pouco se sabe sobre variações morfológicas entre as populações; tão pouco existem marcadores morfológicos bem estabelecidos para a análise de populações.

Um dos poucos estudos que existem sobre variação morfológica entre populações de *C. hominivorax* foi realizado com base nas diferenças da genitália masculina (Richardson, Ellison & Averhoff, 1982b). Entretanto, Gagné & Peterson II (1982) identificaram que a variação na genitália do macho é muito influenciada pela cópula e pela idade dos indivíduos, e portanto, concluíram que as diferenças encontradas não podem ser utilizadas para separar populações. Dixon (1962) realizou um primeiro trabalho sobre variação morfológica de asa na espécie, procurando variações em venações que pudessem separar amostras selvagens das criadas em laboratório. Azeredo-Espin (1987) analisou a variação morfológica em populações de *C. hominivorax* através de diferentes caracteres da morfologia externa dos adultos e demonstrou que caracteres relacionados à variação de asa podem ser informativos para separar populações de diferentes regiões geográficas no Brasil.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho foi realizado com o objetivo geral de fornecer novos dados sobre variabilidade e estrutura genética de populações naturais da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*, buscando a construção de um cenário mais claro sobre a dinâmica populacional da espécie ao longo de sua atual distribuição geográfica.

Os objetivos do projeto incluíram:

- Explorar a utilidade da técnica de PCR-RFLP do genoma mitocondrial para o estudo de populações de *Cochliomyia hominivorax*.
- Analisar e mapear a variabilidade genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* ao longo da atual distribuição geográfica da espécie.
- Identificar e caracterizar as variações morfológicas de tamanho e forma da asa de *Cochliomyia hominivorax*.
- Avaliar o uso da morfologia da asa em estudos de variação populacional da mosca da bicheira.

3. METODOLOGIA DETALHADA

3.1 Coleta das Amostras

Na tabela 3.1 estão descritas as populações geográficas de *Cochliomyia hominivorax* amostradas nesse trabalho, bem como os dados de latitude e longitude de cada localidade e a relação de análises em que as amostras de cada localidade foram incluídas. A figura 3.1 é um mapa representando essas localidades.

As amostras do Brasil das localidades de Caiapônia-GO, Caraguatatuba-SP, Costa Rica-MS, Goiânia-GO, São Sebastião do Paraíso-MG, Estiva-MG, Carambeí-PR, Fagundes Varela-RS e Pinheiro Machado-RS foram coletadas no campo pela equipe do nosso laboratório (Laboratório de Genética Animal – CBMEG - UNICAMP), entre 2002 e 2006.

Para facilitar a obtenção de amostras de outras localidades, foi desenvolvido por Tatiana T. Torres (Laboratório de Genética Animal – CBMEG - UNICAMP) um kit de coleta contendo 12 frascos com EtOH 100% rotulados para identificação das amostras, uma pinça descartável, pares de luvas descartáveis, lápis e um manual de informações e instruções de coleta e armazenamento (Torres, 2006). Esse kit foi enviado para colaboradores e através da sua utilização foram obtidas as amostras de Campinas-SP, Cocalinho-MT, Goianira-GO, Santa Maria das Barreiras-PA e Santo Antônio das Missões-RS.

A amostra de Campo Grande-MS foi gentilmente enviada pelo Dr. Wilson Köller, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande-MS, e é representada por 12 fêmeas adultas de *C. hominivorax* fixadas em EtOH 100%, coletadas em armadilha orientada pelo vento

As amostras do Uruguai foram coletadas em dois anos consecutivos (2003-2004), sendo que a primeira coleta foi realizada por uma equipe formada por pesquisadores do “Centro de Investigaciones Nucleares – CIN” da “Universidad de la República” do Uruguai e Laboratório de Genética Animal- CBMEG-UNICAMP do Brasil, e a segunda coleta foi realizada pelos pesquisadores do CIN e as amostras enviadas para nosso laboratório, fixadas em EtOH 100%. A equipe do CIN também coletou e nos enviou amostras da localidade de Ybytymi no Paraguai.

A Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA- “International Atomic Energy Agency”) facilitou a interação e o contato entre pesquisadores da América Central e do Sul para obtenção de mostras de *C. hominivorax*, como parte do projeto de pesquisa coordenado pelo Laboratório de Genética Animal-CBMEG-UNICAMP intitulado “Genetic Sexing of New World

Screwworm Fly” (FAO/IAEA-11822/RO). Através desse projeto o pesquisador René Garcia coletou e nos enviou amostras das localidades de Cuba, República Dominicana, Trinidad e Tobago, Colômbia e Equador, e o Dr. Alfredo Coronado (“Universidad Centro-occidental Lisandro Alvarado”, Barquisimeto-Venezuela), pesquisador participante do projeto, nos enviou as amostras da Venezuela. As amostras da Jamaica também foram obtidas dentro desse projeto, estas foram coletas pelo Dr. Jimmy Bruce (Coordenador do projeto de erradicação de *C.hominivorax* na Jamaica) e nos enviadas diretamente pelo Dr. Alan S. Robinson (FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Viena, Austria).

Todas as amostras, exceto Campo Grande-MS, foram coletadas diretamente em feridas de animais domésticos (bois, ovelhas, porcos ou cães) como larvas de 2º ou 3º instar. Após coleta, as larvas de cada ferida foram mantidas juntas e devidamente identificadas. Em seguida as larvas foram fixadas em etanol absoluto (EtOH 100%) ou colocadas em serragem para transformarem-se em pupas (quando em 3º instar, já rosadas), ou ainda criadas no laboratório em carne fresca e sangue, até a fase de pupa. As pupas foram congeladas vivas em freezer – 70°C, para posterior extração de DNA, ou mantidas até os adultos emergirem. Os adultos que emergiram foram sacrificados por congelamento após 24h, para retirada das asas e extração de DNA, ou foram colocados em câmara de criação para manutenção de colônias no laboratório.

Tabela 3.1- Localidades amostradas, código das localidades, latitude, longitude e descrição das abordagens de análise conduzidas nas amostras das localidades. Lat: Latitude; Long: Longitude; PCR-RFLP: Análise de amostras pela técnica de PCR-RFLP; AT: Sequenciamento da Região A+T; COII: sequenciamento de fragmento do gene COII; Morf.: análise de morfologia da asa.

	Localidades	Código	Lat.	Long.	PCR - RFLP	AT	COII	Morf.
Br	Caiapônia-GO	BCA	16°57 S	51°48 W				
	Campinas - SP	BCP	22°48 S	47°03 W				
	Campo Grande - MS	BCG	20°27 S	54°36 W				
	Caraguatatuba - SP	BCT	23°37' S	45°24 W				
	Carambei - PR	BCI	24°55 S	50°05 W				
	Cocalinhos - MT	BCO	14°22 S	51°00 W				
	Costa Rica - MS	BCR	18°32 S	53°07 W				
	Estiva-MG	BES	22°27 S	46°01 W				
	Fagundes Varela- RS	BFV	28°52 S	51°41 W				
	Goiânia-GO	BGO	16°43 S	49°15 W				
	Goianira-GO	BGN	16°32 S	49°22 W				
	Pinheiro Machado - RS	BPM	31° 34 S	53° 23 W				
	Santa Maria das Barreiras-PA	BSM	08°52 S	49°42 W				
	São Sebastião do Paraíso-MG	BSS	20°55 S	46°59 W				
	Santo Antônio das Missões-RS	BSA	29°04 S	56°19 W				
Co	Turbo	COT	8°05 N	76°43 W				
Cb	Ciego de Ávila	CCA	21°50 N	78°46 W				
	Ciro Redondo	CCR	21°53 N	82°54 W				
	Pinar del Rio	CPR	22°25 N	83°41 W				
	Santiago de Cuba	CSC	20°01 N	75°49 W				
Eq	Sto Domingo de los Colorados	ECO	0° 15 S	79°10 W				
Jm	Kingston	JAM	17°59 N	76°47 W				
Py	Ybytymi - Paraguari	PYB	25°46 S	56°41 W				
RD	San Domingos	RPD	18°28 N	59°53 W				
T&T	Puerto España	TET	10°40 N	61°28 W				
Uy	Bañados de Medina	UBM	32°23 S	54°21 W				
	Cerro Colorado	UCC	33°52 S	55°33 W				
	Colonia	UCO	34°28 S	57°51 W				
	Dayman	UDA	31°33 S	57°57 W				
	Juaquín Suarez	UJS	34°44 S	56°02 W				
	Paso Muñoz	UPM	31°27 S	56°23 W				
	San Antonio	UST	31°24 S	57°58 W				
Ve	Barquisimeto	VBA	10°03 N	69°19 W				
	Encontrados	VEN	09°03 N	72°14 W				
	Juangriego	VJU	11°04 N	63°57 W				

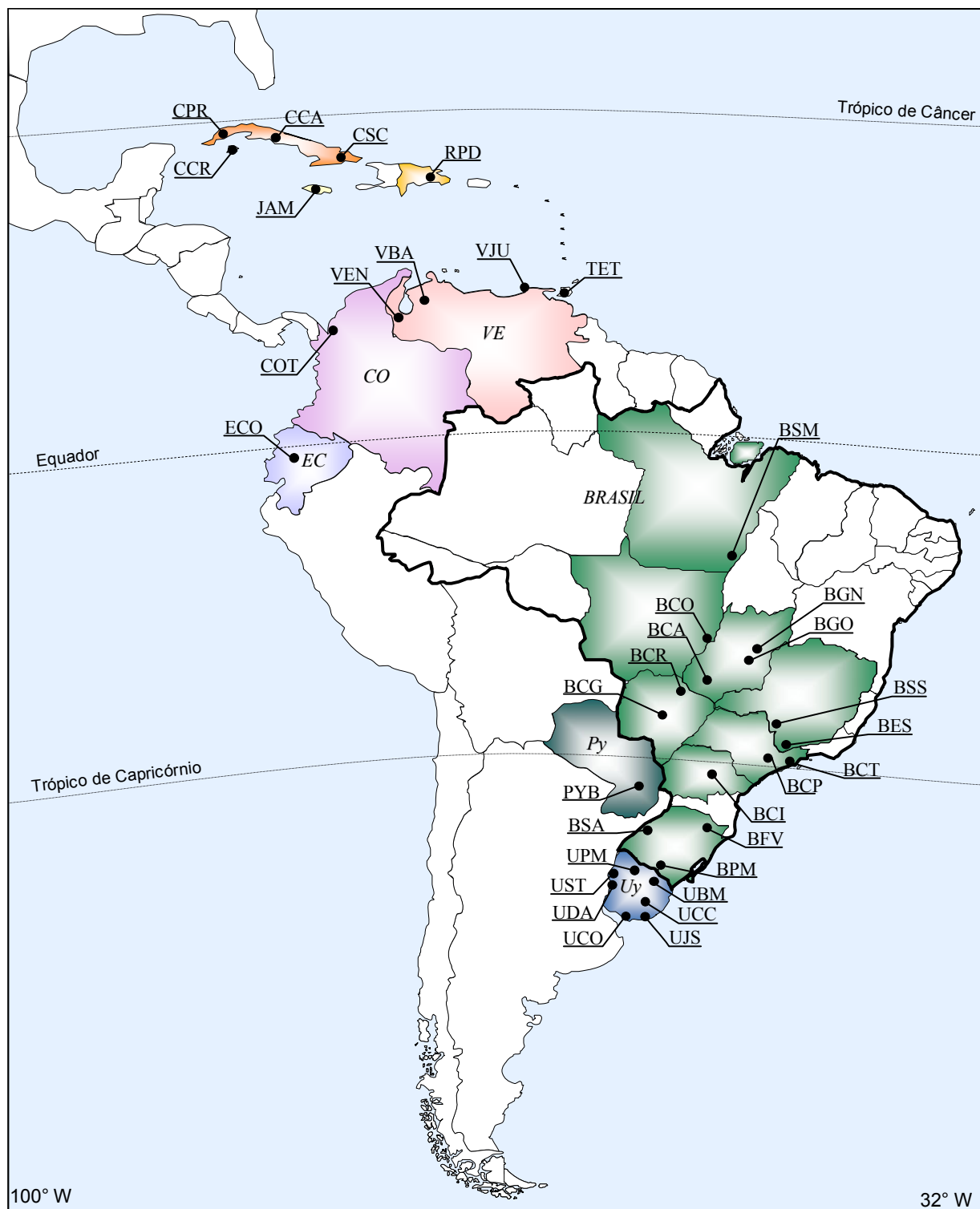


Figura 3.1- Mapa esquemático das localidades amostradas. Códigos das localidades descritos na tabela 3.1.

3.2 Obtenção e análise dos dados moleculares

3.2.1 Extração de DNA

Os indivíduos de *C. hominivorax* coletados (larvas, pupas ou adultos) foram usados para a extração de DNA total, conduzida seguindo método fenol: clorofórmio descrito por Infante-Vargas & Azeredo-Espin (1995) e adaptado para microcentrifuga da seguinte forma: cada indivíduo foi homogeneizado em 300 µl de solução tampão (10mM Tris, 60mM NaCl, 300 mM sacarose, 10 mM EDTA) e em seguida adicionou-se 300 µl de solução de lise, contendo 2% de DEPC (300mM Tris, 40mM SDS, 20 mM EDTA). Essa solução foi encubada por 15 min a 4 °C, adicionou-se 600 µl de fenol (0,5 M Tris, pH 8,0) e centrifugou-se 10 min a 12.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, foi adicionado 300 µl de fenol e 300 µl clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se novamente 5 min a 12.000 rpm. A nova solução aquosa foi transferida para outro tubo e o procedimento anterior foi repetido adicionando-se apenas 600 µl clorofórmio: álcool isoamílico. O sobrenadante final foi precipitado com EtOH 100% gelado, a -20 °C por 1:30h. O precipitado foi ressuspendido em 50 a 300 µl de TE, dependendo da amostra.

Foram extraídos, em média, 3 indivíduos por ferida amostrada, além dos adultos coletados no campo, totalizando 1487 extrações. O DNA total extraído foi armazenado à -20°C.

3.2.2 Amplificações

As regiões do DNA mitocondrial a serem utilizadas na análise por PCR-RFLP foram escolhidas com base nos trabalhos de Infante-Vargas & Azeredo-Espin (1995), Lessinger *et al.* (2000) e Litjens *et al.* (2001). Foram escolhidos dois fragmentos de DNA para análise: (1) um contendo as seqüências completas da região controle, tRNA-Gln e tRNA-Ile, e seqüências parciais do tRNA-Met e do gene 12S rRNA (A+T/12S – 2100pb) e (2) outro fragmento contendo as seqüências completas dos genes da Citocromo oxidase c, subunidades I e II (COI/COII-2360pb)

As regiões A+T/12S e COI/COII do DNAm^t foram amplificadas via PCR (“Polymerase Chain reaction”) utilizando-se pares de oligonucleotídeos (“primers”) previamente descritos por Simon *et al.* (1994). Para a região A+T/12S foi utilizado o par TM-N-193/SR-J-14233 e para COI/COII o par TY-J-1460/TK-N-3785. As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 25 µl e conduzidas em diferentes termocicladores (PTC-100 e PTC-200 – MJ

Research, GeneAmp 9600 - Perking Elmer ou GeneAmp 9700-Applied Biosystems), nas condições descritas em Lessinger & Azeredo-Espin (2000) e Litjens *et al* (2001). Os produtos das reações de amplificação foram analisados através de gel de agarose 1,0% submetido à corrida eletroforética a 80 Volts em tampão 1 X TAE, por aproximadamente 1 hora. O gel foi corado com Brometo de Etídeo (EtBr) por 10 minutos e fotografado usando o programa Kodak EDAS 290 em um trans-iluminador ultravioleta. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram confirmados por comparação com o padrão de peso molecular “DNA ladder Plus 1KB” (12Kb a 100pb, gibco-BRL).

Algumas amostras apresentaram dificuldade de obtenção dos fragmentos diretamente via PCR, e para solucionar esse problema a técnica de “Nested-PCR” foi utilizada com dois conjuntos de “primers” em duas reações distintas. Para tanto, contruiu-se três novos oligonucleotídeos: dois flanqueando a região COI/COII, nos genes ATP8 (A8-N-3931: 5’AAT TGG TGC TAT TTG AGG 3’) e tRNA-Trp (TW-J-1287: 5’ACT AAT AGC CTT CAA AGC 3’); e um no gene tRNA-Val (TV-J-14022: 5’ TTC AAT GTA AAT GAA ATG C 3’), a jusante da subunidade 12S rRNA. O “primer” TV-J-14022 foi utilizado juntamente com o N2-N-327 (Oliveira *et al.*, 2006), para amplificar a região A+T/12S. Uma reação inicial foi conduzida com os “primers” externos para cada região e o produto dessas amplificações foi usado como “amostra” para a segunda reação, como descrito acima.

Para a construção dos novos “primers” a sequência homóloga dos genes tRNA-Trp, tRNA-Val e ATP8 de *C. hominivorax* e outros Califorídeos disponível no GenBank, foram alinhadas independentemente usando o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Os “primers” foram selecionados com base nas sequências conservadas das regiões, na estabilidade estrutural e nas propriedades termodinâmicas de cada um, analisados no programa Gene Runner (Hastings Software Inc., Hastings on Hudson, NY). A nomenclatura e posição relativa dos novos “primers” foi estabelecida de acordo com Simon *et al.* (1994).

Esses novos “primers” foram testados em outras espécies da família Calliphoridae, Oestridae e Muscidae, com o objetivo auxiliar amplificações específicas de regiões do DNAm em futuros trabalhos com essas espécies. Os “primers” A8-N-3931 e TV-J-14022 foram testados em conjunto com outros “primers” universais de insetos (Simon *et al.*, 1994) nas espécies *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya putoria*, *Chrysomya megacephala* da família Calliphoridae, *Musca domestica* e *Stomoxys calcitrans* da família Muscidae e

Dermatobia hominis da família Oestridae. Para todas essas espécies os novos “primers” funcionaram muito bem.

O “primer” TW-J-1287 foi testado com diferentes “primers” desenhados para a região COI/COII de insetos (Simon *et al.*, 1994) em um conjunto maior de espécies, para validar seu uso em trabalhos futuros com o gene COI na família Calliphoridae. Além das espécies citadas acima este “primer” foi testado para: *Chrysomya rufifacies*, *Lucilia eximia*, *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina*, *Hemilucilia segmentaria*, *Hemilucilia semidiaphana*, *Hemilucilia flavifacies*, *Calliphora dubia*, *Calliphora vomitoria*, *Chloroprocta idioidea*, *Phormia regina* e *Protophormia terranova*. O “primer” funcionou para amplificação do segmento em todas as espécies citadas.

3.2.3 Seleção das enzimas marcadoras e digestão das amostras

A análise preliminar para detecção de polimorfismo nas regiões COI/COII e A+T/12S foi realizada com três indivíduos por localidade escolhidos aleatoriamente de diferentes populações, sendo três do Brasil (Manaus-AM, Goiânia-GO e Caraguatatuba-SP) e três do Uruguai (Colonia-Col, San Antonio-Sal e Paysandú-Pay). As amostras do Brasil foram de extrações de DNA total previamente utilizado em estudos em nosso laboratório (Infante-Vargas e Azeredo-Espin, 1995; Lyra & Azeredo-Espin, 2002). As amostras do Uruguai usadas para essa análise preliminar foram coletadas, fixadas em Etanol 100% e nos enviadas no início de 2002 por Pablo Fresia Coronel. As amostras foram amplificadas e digeridas para obtenção de uma informação inicial sobre os sítios de restrição presentes nas regiões escolhidas para a análise.

As enzimas selecionadas para essa análise foram escolhidas com base nos resultados preliminares obtidos por RFLP total do DNAm^t e mapa de restrição do DNAm^t (Infante-Vargas e Azeredo-Espin, 1995; Lessinger *et al.*, 2000), nos dados obtidos por PCR-RFLP das regiões A+T/12S e COI/COII do DNAm^t (Litjens *et al.* 2001) e com base nas seqüências de cada região disponível para *C. hominivorax* (Lessinger *et al.*, 2000) usando o programa WebCutter (Heiman, 1997).

Foram selecionadas 9 diferentes enzimas para digestão da região A+T/12S (*Cla* I, *Dra* I, *EcoR* V, *Hae* III, *Hind* III, *Msp* I, *Mun* I, *Sau*96 I e *Ssp* I) e 13 enzimas para digestão da região COI/COII (*Ase* I, *Dde* I, *Dra* I, *EcoR* I, *EcoR* V, *Hind* III, *Hpa* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Sma* I, *Ssp* I, *Sst* I e *Xho* I) (Tabela 3.1). Alíquotas de 3 µl dos produtos de PCR de cada região foram digeridas separadamente com cada enzima selecionada, de acordo com as recomendações dos fabricantes

(Gibco-BRL e Pharmacia, Peapack, NJ). Os fragmentos obtidos foram separados em gel de agarose 2,0%, corados com brometo de etídio e fotografados utilizando o software Kodak EDAS 290 em transiluminador UV. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados comparando-os com o padrão de tamanhos moleculares DNA Ladder Plus 1kb (12Kb to 100pb; Gibco-BRL). Digestões com enzimas que produziram diferentes padrões foram repetidas para confirmar se os padrões observados não eram resultados de digestão parcial. Fragmentos menores que 200pb não foram incluídos na análise, devido a falta de resolução precisa do gel de agarose, resultando em algumas inconsistências quando comparados à soma dos fragmentos digeridos e o tamanho original da região amplificada (Tabela 3.2).

Tabela 3.2-Padrões de restrição obtidos para as regiões A+T/12S e COI/COII de *C. hominivorax* na análise preliminar para escolha das enzimas marcadoras. Em negrito, enzimas selecionadas para análise populacional. * produto de PCR não digerido. Fragmentos menores que 200pb não foram incluídos na tabela.

<u>A+T/12S</u>		<u>COI/COII</u>	
Enzimas	Padrões de Restrição (pb)	Enzimas	Padrões de Restrição (pb)
<i>Cla</i> I	1800, 300	<i>Ase</i> I	A) 1100, 460, 350, 220 B) 1100, 570, 370
<i>Dra</i> I	A) 800, 320, 200, 200 B) 1000, 320, 200	<i>Dra</i> I	780, 300, 250, 200
<i>Hae</i> III	2100*	<i>EcoR</i> I	2360*
<i>Hind</i> III	1700, 400	<i>EcoR</i> V	1200, 900
<i>Msp</i> I	2100*	<i>Hind</i> III	2360*
<i>Mun</i> I	2100*	<i>Hpa</i> I	2360*
<i>Sau</i> 96I	1850, 250	<i>Msp</i> I	A) 1500, 580 B) 1400, 4800 C) 1500, 300
<i>Ssp</i> I	440, 370, 200	<i>Rsa</i> I	2360*
		<i>Sma</i> I	2360*
		<i>Ssp</i> I	900, 450, 400, 200
		<i>Sst</i> I	1200, 600, 300
		<i>Xho</i> I	1300, 900

Baseados nos resultados dessa análise preliminar, foram escolhidas as enzimas que apresentaram padrões polimórficos para serem utilizadas na análise das populações geográficas de *C. hominivorax*. A enzima *Dra* I foi selecionada para digestão da região A+T/12S e as enzimas *Ase* I e *Msp* I foram selecionadas para a digestão da região COI/COII.

3.2.4 Análises dos dados obtidos por PCR-RFLP

Haplótipos: Os diferentes padrões de restrição obtidos com cada enzima para cada região mitocondrial analisada, foram designados por letras maiúsculas de acordo com a ordem em que eles foram identificados. Para cada indivíduo essas letras foram compiladas em um haplótipo composto designado por números.

Cada haplótipo foi transformado em um vetor de zeros (0) e uns (1) (ausência ou presença de determinado fragmento de restrição, respectivamente), este vetor foi usado para representar os componentes de seu “fenótipo PCR-RFLP” e uma matriz foi construída com todos os haplótipos para ser usada nas análises da variação genética em *C. hominivorax*. Com base nessa matriz, a distância evolutiva (d) entre os pares de haplótipos foi estimada de acordo com Nei & Li (1979) e Nei (1987, eq. 5.55) usando o programa REAP (Restriction Enzyme Analysis Package”, McElroy *et al.* 1992).

Para as estimativas da frequência haplotípica e comparações genéticas entre as populações, cada haplótipo encontrado em uma ferida foi considerado apenas uma vez. Essa abordagem evita um desvio nas análises causado pela re-amostragem da mesma mitocôndria, garantindo uma maior precisão nas estimativas de subdivisão populacional. Por outro lado, essa abordagem conservadora, que diminui o tamanho da amostra, pode causar um desvio nas estimativas de diversidade, já que haplótipos comuns são considerados apenas uma vez em múltiplas infecções; porém esse desvio na estimativa da diversidade é minimizado pelo fato das larvas possuírem hábito gregário (Guimarães *et al.*, 1983), o que aumenta muito a chance de amostragem de larvas irmãs.

Diversidade: a diversidade genética encontrada nas populações foi interpretada usando as estimativas de diversidade haplotípica (H_s = probabilidade de dois haplótipos escolhidos aleatoriamente na população serem diferentes; Nei, 1987-eqs. 8.4, 8.5 e 8.12,) e diversidade nucleotídica (π = proporção de sítios nucleotídicos diferentes quando dois haplótipos são escolhidos ao acaso em uma população; Nei & Tajima, 1981). Esses índices foram estimados no

programa REAP (McElroy *et al.*, 1992), considerando tanto a frequência dos haplótipos na população como a distância d entre os pares de haplótipos.

Diferenciação populacional: A distribuição da variação genética dentro e entre as populações foi estimada por análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), utilizando o programa ARLEQUIN (versão 2.0, Schneider *et al.*, 2000; versão 3.01, Excoffier *et al.*, 2005). O grau de isolamento entre as populações foi interpretado utilizando-se o parâmetro Φ_{ST} (Michalakis & Excoffier, 1996) e a significância dos componentes de variância foi calculada utilizando-se um teste de permutação não paramétrico (10000 permutações, Excoffier *et al.*, 1992). A estrutura populacional também foi interpretada através da estimativa da divergência nucleotídica (δ) entre as populações (Nei & Li, 1979, e Nei, 1987, eq. 5.55) e do F_{ST} 's linearizado de Slatkin's (Slatkin, 1995), sendo que a primeira foi calculada no programa REAP (McElroy *et al.*, 1992) e o segundo computado usando o programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000; Excoffier *et al.*, 2005) (detalhes em Lyra *et al.*, 2005 e Lyra *et al.*, *in press*).

A análise de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas foi realizada através do teste de Mantel (Smouse *et al.*, 1986), utilizando-se as matrizes de distância geográfica e de divergência nucleotídica no programa ARLEQUIN.

Apenas as populações que tiveram pelo menos 4 feridas amostradas foram incluídas nas análises de subdivisão populacional, pois este foi o critério estabelecido como número mínimo para estimativa de frequência de haplótipos nas populações.

3.2.5 Outros métodos de obtenção e análise de dados moleculares

O detalhamento das metodologias utilizadas na obtenção e análise dos dados dos trabalhos “6. Caracterização da variação de tamanho da região controle do DNA mitocondrial de *Cochliomyia hominivorax*” e “7. *Cochliomyia hominivorax* em Cuba: Nova perspectiva sobre endemismo e introdução da praga no Caribe” estão descritos em cada um dos itens relacionados, juntamente com resultados e discussão de cada um desses trabalhos.

3.3 Obtenção e análise dos dados morfológicos

3.3.1 Montagem e digitalização das asas

As amostras utilizadas para caracterização da variação morfológica, foram aquelas coletadas no campo como larvas de terceiro instar e colocadas na serragem para transformarem-se em pupa. Essa escolha se deu principalmente pela dificuldade de se manter populações em laboratório a partir de um número relativamente pequeno de indivíduos coletados (observação pessoal).

Cada pupa foi individualizada em tubos de ensaio e mantida no laboratório à temperatura e umidade constantes (25 °C; 70% umidade), até emergência do adulto. Este, por sua vez, foi identificado quanto ao sexo e sacrificado por congelamento 24h após sair da pupa, tempo necessário para a completa abertura das asas. A identificação do sexo foi realizada após emergência do adulto considerando que na espécie, assim como em outros Calliphoridae, machos possuem olhos juntos em cima – holópticos ou subholópticos- e as fêmeas possuem olhos separados- diacópticos (Dear, 1985).

As asas direita e esquerda de cada indivíduo foram retiradas na lupa com o auxílio de pinça e estilete. O par de asas foi montado sobre uma lâmina com uma gota de água, coberto com lamínula (selada com esmalte). A lâmina foi devidamente identificada com o número do indivíduo, o sexo e a localidade de origem da amostra. Após secagem das lâminas, a imagem de cada asa foi capturada com o auxílio de microscópio e câmara ligada a microcomputador e digitalizada (tomada das coordenadas dos pontos de intersecção e terminais das veias) com o auxílio do programa TPSDig (Version 1.31, Rohlf 2004).

Foram escolhidos dois conjuntos de medidas para a análise da variação de tamanho e forma da asa: (1) um baseado em distâncias entre pontos de referências anatômicas (“landmarks”) - definido como método de “morfometria tradicional”, e (2) outro baseado nas referências de um conjunto de marcos anatômicos - definidos como morfometria geométrica (revisão em Monteiro & Reis, 1999).

Os marcos anatômicos escolhidos para as análises estão esquematizados na figura 3.2. A figura 3.2A representa os 4 marcos escolhidos para as medidas de distância, sendo que as distâncias entre os pontos 1 e 2 foi estabelecida como medida de comprimento e a distância entre os pontos 3 e 4 como medida da largura da asa. A figura 3.2B representa os 16 marcos anatômicos escolhidos para a análise por métodos de morfometria geométrica: 14 marcos do tipo

I (intersecção de veias) e dois marcos do tipo II (marco 6 e 9 da figura 2B - pontos de máxima curvatura e/ou processos morfogenéticos locais) segundo a classificação de Bookstein (1991).

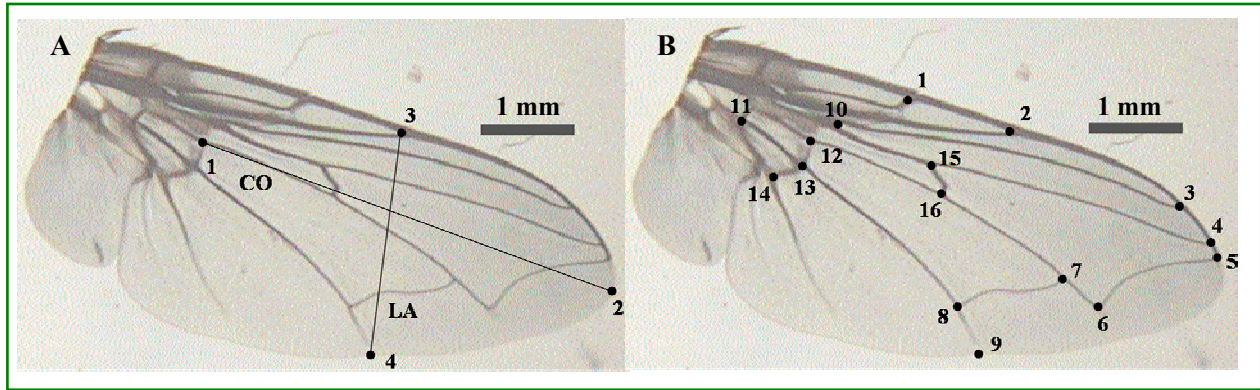


Figura 3.2- Marcos anatômicos escolhidos para análise da variação morfológica em asa de *C. hominivorax*, **A:** marcos para análise por morfometria tradicional - CO: comprimento da asa, LA: largura da asa; **B:** marcos para análise por morfometria geométrica.

3.3.2 Análise dos dados morfológicos

As duas abordagens de análises foram escolhidas pois a morfometria tradicional poderia revelar a variação de forma total da asa e é um método intuitivo e de fácil interpretação em relação a variação de forma e a morfometria geométrica poderia revelar variações locais na morfometria da asa (como por exemplo, variação de posição nas veias internamente a asa).

Morfometria tradicional: Para as análises de variação de tamanho e forma da asa em *C. hominivorax*, o tamanho foi interpretado como o comprimento da asa (distância entre pontos 1 e 2 na figura 3.2A) e a forma como a razão entre largura (distância entre pontos 3 e 4) e comprimento.

As análises dos dados morfológicos foram conduzidas com métodos univariados nos programas MiniTab14 ou Systat (Systat v 8.0; Copyright@SPSS Inc 1998). A média, o desvio-padrão e o intervalo de confiança foram estimados para cada variável. As diferenças entre sexos e localidades foram verificadas por análise de variância (ANOVA). A análise exploratória de associação entre caracteres populacionais e variáveis geográficas ou climáticas (latitude e temperatura) foi realizada por regressão linear. As temperaturas utilizadas nas análises foram obtidas das estações meteorológicas mais próximas do local de coleta, e foram referentes às temperaturas médias do verão da coleta (detalhes em Lyra *et al.* - em preparação, Capítulo II, Artigo 3)

Morfometria geométrica: O estimador isométrico conhecido como “tamanho do centróide” (TC) foi utilizado como variável de tamanho nas análises. Esta é uma medida derivada dos dados de coordenadas cartesianas e é definida como “a raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada marco a um ponto médio na estrutura analisada” (Zelditch *et al.*, 2004). A matriz de deformações (“partial warps”, com os componentes uniformes e deformações parciais) foi interpretada como variável de forma (Zelditch *et al.*, 2004). O programa TpsRegr (Rohlf 2005) foi utilizado para a obtenção das variáveis de tamanho e forma.

As diferenças de tamanho entre sexos e localidades, e a correlação do tamanho com as variáveis geográfica e climática foram testadas por ANOVA e regressão linear, respectivamente, no programa MiniTab14. As diferenças de forma entre sexos e localidades foram testadas por MANOVA, no programa MiniTab14, e a correlação da variação de forma com as temperaturas, latitudes e tamanho dos indivíduos foi testada por regressão multivariada no programa TpsRegr (Rohlf, 2005).

A variação de forma também foi explorada por análise de deformações relativas (“relative warp analysis- RWA”), uma análise semelhante (em resultado) a de componentes principais (PCA) (Bookstein 1989, revisão em Monteiro & Reis 1999). A RWA foi conduzida no programa TPSRelw (Rohlf, 1998).

PARTE II

ABORDAGEM MOLECULAR

*“E um dia os homens descobrirão que esses discos voadores
estavam apenas estudando a vida dos insetos...”*

(Mário Quintana)

4. ARTIGO 1

Lyra, M.L., Fresia, P., Santo, G., Cristina, J., Klaczko, L.B. & Azeredo-Espin A.M.L. (2005) Analysis of Mitochondrial DNA Variability and Genetic Structure in Populations of New World Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal of Medical Entomology*, **42** (4), 589-595.

“Análise da Variabilidade Mitochondrial e Estrutura Genética em Populações da Mosca da Bicheira (Diptera: Calliphoridae) do Uruguai”

Resumo

A mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*, é uma das mais importantes pragas da pecuária na região Neotropical. Neste trabalho a técnica de PCR-RFLP do DNAm foi utilizada para acessar a diversidade e estrutura de 7 populações geográficas de *C. hominivorax* do Uruguai. As regiões controle de replicação (A+T/12S) e Citocromo Oxidase subunidades I e II (*coxI/coxII*) do DNAm foram amplificadas e digeridas com enzimas diagnósticas. Foram identificados 9 haplótipos mitocondriais nas populações analisadas, sendo três amplamente distribuídos e seis raros e localmente distribuídos. A diversidade nucleotídica média ($\pi=2,3\%$) e a diversidade haplotípica ($H=0,6533$) evidenciaram alta variabilidade mitocondrial nesta espécie. O índice de similaridade ($F=96,7\%$), a divergência nucleotídica ($\delta^*=0,00055$) e os resultados da AMOVA (não significativos) demonstraram não haver diferenciação entre as populações. Os dados sugerem que as populações de *C. hominivorax* do Uruguai constituem uma única população panmítica.

Analysis of Mitochondrial DNA Variability and Genetic Structure in Populations of New World Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay

MARIANA LÚCIO LYRA,¹ PABLO FRESIA,² SANTOS GAMA,³ JUAN CRISTINA,⁴
LOUIS BERNARD KLACZKO,⁵ AND ANA MARIA LIMA DE AZEREDO-ESPIN⁵

Laboratório de Genética Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6010, Campinas, São Paulo, 13083-875, Brazil

J. Med. Entomol. 42(4): 589-595 (2005)

ABSTRACT The New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel 1858) (Diptera: Calliphoridae), is one of the most important insect pests of livestock in the Neotropical region. In this work, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA (mtDNA) was used to study the diversity and population structure of seven geographically distinct populations of *C. hominivorax* from most of the important livestock areas in Uruguay. The control region (A+T/12S) and subunits 1 and 2 of cytochrome oxidase (*cox1/cox2*) were amplified and digested with restriction endonucleases. Nine haplotypes were observed among the populations sampled. The mean nucleotide diversity and the haplotype diversity indicated high mtDNA variability in this species. The similarity index, average nucleotide divergence, and analysis of molecular variance results showed no evidence of subpopulation differentiation, indicating that the *C. hominivorax* populations of Uruguay form a single panmictic population. The distribution pattern of the genetic variation in natural populations of *C. hominivorax* and the implications of these results for establishing control program are discussed.

KEY WORDS screwworm, mitochondrial DNA, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, population structure, Uruguay

THE NEW WORLD SCREWORM, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel 1858) (Diptera: Calliphoridae), is an obligate ectoparasite that causes myiasis in warm-blooded vertebrates throughout the Neotropical region (Guimarães et al. 1983). Adult females lay eggs in open wounds where the emerging larvae feed (Guimarães et al. 1983). The infestation by these larvae generates an exudate that stimulates more females to lay their eggs in the wound, resulting in injuries containing hundreds to thousands of larvae (Thomas and Mangan 1989). This mode of infestation makes *C. hominivorax* one of the most important pests of livestock and one of the most expensive to control and treat (Hall and Wall 1995).

Historically, the distribution of *C. hominivorax* extended from the southern United States to Argentina. However, this species has been successfully eradicated from North and most of Central America by using the sterile insect technique (SIT), but it still occurs in the Caribbean islands and South America, except for Chile (Wyss and Galvin 1996, IAEA/FAO 2000). In 1988, *C. hominivorax* was recorded outside of the Americas for the first time (in Libya), but it was efficiently combated using SIT (Vargas-Teran et al. 1994).

In Uruguay, as in other South American countries, *C. hominivorax* is one of the most important insect pests and represents a significant health problem for the livestock industry, often causing great economic losses (Carballo et al. 1990, IAEA/FAO 2000).

Because of the economic importance of *C. hominivorax* and its influence on the trade of live animals among infested and noninfested countries, international efforts have been aimed at designing a program to control and eventually eradicate this species from endemic areas and to prevent invasions into screwworm-free areas. A fundamental component of a successful pest management strategy, such as SIT, is a good understanding of the genetic diversity and struc-

¹ E-mail: marilyra@unicamp.br.

² Sección de Genética Evolutiva, Dpto. de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Avda. Matajoz 2055, Montevideo 11400, Uruguay.

³ Laboratorio de Veterinaria, Centro de Investigaciones Nucleares, Universidad de la República, Avda. Matajoz s/n, Montevideo 11400, Uruguay.

⁴ Dpto. Tecnología Nuclear Aplicada, Centro de Investigaciones Nucleares, Universidad de la República, Avda. Matajoz s/n, Montevideo 11400, Uruguay.

⁵ Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6010, Campinas, SP, 13083-875, Brazil.

ture of the target populations (Roehrdanz 1989, Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995).

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a suitable marker for studying microevolutionary processes in animal populations and can be a suitable marker for estimating the genetic variability within populations (Avisé et al. 1987, Avisé 1994, Rokas et al. 2003). The restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of mtDNA has been successfully used to study the genetic variability in *C. hominivorax* populations and has revealed high variation in this molecule (Roehrdanz and Johnson 1988, Roehrdanz 1989, Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995, Taylor et al. 1996). Another approach for studying mtDNA variation is polymerase chain reaction (PCR)-RFLP analysis. This powerful method has been used in several population analyses (Ross et al. 1997, Dueñas et al. 2002).

The aim of this study was to examine the genetic variability among geographically distinct populations of *C. hominivorax* from Uruguay, at the southern limit of this species' distribution, by using mtDNA PCR-RFLP analysis. Inferences regarding the degree of isolation of the populations analyzed were made by testing the subdivided population hypothesis by using analysis of molecular variance (AMOVA).

Materials and Methods

Samples. Larvae of *C. hominivorax* from seven Uruguayan localities, including important livestock areas, were obtained from wounded sheep, dogs, or cattle in January 2003. Collected larvae were reared in the laboratory for species identification (Guimarães et al. 1983) and were allowed to pupate or fixed in 100% ethanol in the third instar. The adults that emerged and the fixed larvae were used for DNA extractions. Total nucleic acids were isolated using the phenol:chloroform method, as reported in Infante-Vargas and Azeredo-Espin (1995), and the DNA extracted was stored at -20°C . In total, 175 larvae were obtained from 48 wounds.

The geographic locations of the seven areas sampled (all low hills and plains in the transition from the Argentinean pampas to the hilly uplands of southern Brazil) are Bañados de Medina-Cerro Largo ($32^{\circ} 23' 00\text{ S}, 54^{\circ} 21' 00\text{ W}$), Cerro Colorado-Florida ($33^{\circ} 52' 00\text{ S}, 55^{\circ} 33' 00\text{ W}$), Colonia-Colonia ($34^{\circ} 20' 00\text{ S}, 57^{\circ} 86' 67\text{ W}$), Dayman-Paysandú ($31^{\circ} 33' 00\text{ S}, 57^{\circ} 57' 00\text{ W}$), Joaquín Suárez-Canelones ($34^{\circ} 44' 01\text{ S}, 56^{\circ} 02' 12\text{ W}$), Paso Muñoz-Salto ($31^{\circ} 27' 00\text{ S}, 56^{\circ} 23' 00\text{ W}$) and San Antonio-Salto ($31^{\circ} 24' 00\text{ S}, 57^{\circ} 58' 00\text{ W}$) (Fig. 1).

For haplotype frequency estimations and genetic comparisons, each haplotype found in a wound was considered only once. This approach avoids a bias in the analysis caused by sampling the same mitochondria, but it could bias the results toward higher estimates of diversity, because common haplotypes would be counted only once in multiple infections. However, this conservative approach that reduces sample size was preferred to an artificial overestimation of the precision of this study. Moreover, because sibling lar-



Fig. 1. Geographic locations of the screwworm populations sampled in this study.

vae have a gregarious behavior, this putative bias tends to be actually minimized.

Using this approach, the number of *C. hominivorax* considered in the analysis of genetic variation was 65, and it was sufficient to provide information at the hierarchical level of the population.

Amplifications. Two specific mtDNA regions were amplified: one region with 2100 bp included the complete control region and partial rRNA 12S sequences (A+T-rich/12S) and another region with 2360 bp included the entire sequences of cytochrome oxidase subunits 1 and 2 (*cox1/cox2*). PCR assays were done as described by Lessinger and Azeredo-Espin (2000) and Litjens et al. (2001), by using a PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA) thermal cycler. The UBC-insect mtDNA oligonucleotide set described by Simon et al. (1994) was used for A+T rich/12S amplification with the primers TM-N-193 and SR-J-14233; the primers TY-J-1460 and TK-N-3785 were used for *cox1/cox2* amplification. The PCR products were evaluated by electrophoresis in 1.0% agarose gels, stained with ethidium bromide (EtBr), in $1\times$ TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) buffer.

RFLP Procedures. For a preliminary survey to detect mtDNA polymorphisms, three individuals were randomly chosen from different Uruguayan and Brazilian localities. The Brazilian samples were from previous DNA extractions used in RFLP analysis of mtDNA (Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995). The samples were amplified and digested to provide initial information on the restriction sites present in the mtDNA regions analyzed and their usefulness for population analysis.

Aliquots of PCR products of the A+T-rich/12S and *cox1/cox2* regions were single digested for 4 h at 37°C , according to the enzyme supplier's protocols (Invitrogen, Carlsbad, CA, and Pfizer, Inc., New York, NY). The digested fragments were separated by electrophoresis in 2% agarose gels, stained with EtBr, and photographed using the Kodak EDAS 290 software in an UV trans-illuminator. The size of the fragments was estimated by comparison with the molecular size standard DNA Ladder Plus 1Kb (12 kb-100 pb, Invitrogen) by using regression analysis, carried out manually. Digestions with enzymes that produced different re-

Table 1. Diagnostic restriction patterns obtained by PCR-RFLP of *C. hominivorax* from Uruguay

Region	Enzyme	mtDNA	Pattern (bp)			
A+T/12S	<i>Dra</i> I	A	800	320	200	200
		B	1000	320	200	
		C*	1900	320	200	200
<i>cox1/cox2</i>	<i>Ase</i> I	A	1100	460	350	220
		B	1100	680	350	
		C	1500	480		
	<i>Msp</i> I	A	1500	480		
		B	1400	480		
		C	1500	300		
		D	870	680	300	
		E	1400	300		

Capital letters indicate polymorphic restriction patterns. Fragments <200 bp were not considered. The existence of an unknown no. of small fragments accounts for the sum of the fragments being less than that of the intact amplified segment. C* represents the fragment size polymorphism.

striction patterns were repeated to confirm that the observed patterns do not result from partial digests. Fragments <200 bp were not included in the analysis.

The PCR products of the A+T-rich/12S sequences were digested with nine restriction endonucleases: *Cla* I, *Dra* I, *Eco* R V, *Hae* III, *Hind* III, *Msp* I, *Mun* I, *Ssp* I, and *Sau*96 I; three of the enzymes (*Hae* III, *Msp* I, and *Mun* I) did not cut the PCR product, five of the enzymes (*Cla* I, *Eco* R V, *Hind* III, *Ssp* I, and *Sau*96 I) produced only a single cleavage pattern for the samples analyzed, and only *Dra* I detected polymorphism in this region (Table 1). The PCR products of the *cox1/cox2* region were digested with 13 restriction endonucleases: *Ase* I, *Dde* I, *Dra* I, *Eco* R I, *Eco* R V, *Hind* III, *Hpa* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Sma* I, *Ssp* I, *Sst* I, and *Xho* I; four of the enzymes (*Eco* R I, *Hind* III, *Hpa* I, and *Sma* I) did not cut the PCR product, seven of the enzymes (*Dde* I, *Dra* I, *Eco* R V, *Rsa* I, *Ssp* I, *Sst* I, and *Xho* I) produced only a single cleavage pattern for the samples analyzed and the restriction endonucleases *Ase* I and *Msp* I showed diagnostic restriction patterns (Table 1). The enzymes were selected based on a previous RFLP analysis and PCR-RFLP results for *C. hominivorax* (Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995, Litjens et al. 2001) and on an analysis of the mtDNA A+T rich/12S and *cox1/cox2* sequences available for mtDNA *C.*

hominivorax species (Lessinger et al. 2000) by using the WebCutter software (Heiman 1997). The Uruguayan samples were analyzed after the diagnostic enzymes had been selected for both regions.

Data Analysis. Haplotype Analyses. The different restriction patterns for both regions obtained with each enzyme were designated with capital letters, according to the order in which they were detected. For each individual, these letters were compiled into a composite haplotype designated by numbers (Table 2). Each haplotype was scored by a vector of 0s and 1s (absence and presence of a fragment, respectively) that represented the components of their PCR-RFLP phenotypes, and a matrix was constructed to be used as an input file in the analyses of genetic variation. The evolutionary distance (d) between all pairwise comparisons of haplotypes was estimated according to Nei and Li (1979) and Nei (1987) (equation 5.55) by using the REAP software (McElroy et al. 1992), considering the different size of restriction endonuclease recognition sequences (r -value = 4 or 6) (Nei 1987).

Diversity. The genetic diversity within each population analyzed was interpreted using the estimate of haplotype diversity (H_s) and nucleotide diversity (π). Haplotype frequency distributions for each population and the associated d values among haplotypes were used to estimate these diversity indices. Haplotype diversity was estimated according to Nei (1987) (equations 8.4, 8.5, and 8.12), and nucleotide diversity was estimated according to Nei and Tajima (1981) by using the REAP software (McElroy et al. 1992).

Population Differentiation. The variation among the populations analyzed and the population differentiation were interpreted using different indices. The similarity index (F) or the proportion of shared fragments between populations was calculated for each possible pairwise comparison of populations. This index was estimated according to Nei and Li (1979) as $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$, where N_x and N_y are the numbers of fragments in populations x and y , respectively, and N_{xy} is the number of fragments shared by the two populations. The nucleotide divergence (δ) was estimated according to Nei and Tajima (1981) by using the REAP software (McElroy et al. 1992).

Table 2. Distribution of mtDNA haplotypes in Uruguayan populations

Haplotype		JoS	BaM	Col	CeC	PaM	Day	SaA	Total	Freq
1	AAC	2 (7)	5 (14)	3 (12)	6 (15)	3 (12)	7 (17)	7 (10)	33 (87)	0.51
2	AAD		1 (3)						1 (3)	0.02
3	ABA	3 (17)	4 (11)		3 (5)	3 (8)		1 (1)	14 (42)	0.22
4	ABB		2 (8)	2 (10)	6 (10)	1 (2)		1 (4)	12 (34)	0.18
5	BAC						1 (1)		1 (1)	0.02
6	ABE				1 (2)				1 (2)	0.02
7	CAC							1 (3)	1 (3)	0.02
8	AAA						1 (2)		1 (2)	0.02
9	ABC						1 (1)		1 (1)	0.02
Total		5 (24)	12 (36)	5 (22)	16 (32)	7 (22)	10 (21)	10 (18)	65 (175)	1.00
No. wounds		5	8	5	10	4	9	7	48	

The haplotypes are designated by a number and a combination of the three restriction enzymes patterns (*Dra*I, *Ase*I, and *Msp*I). The numbers in parentheses indicate the total number of individuals found with a haplotype and those without parentheses indicate the number of individuals used for population analyses. BaM, Baños de Medina; CeC, Cerro Colorado; Col, Colónia; Day, Dayman; JoS, Joaquín Suárez; PaM, Paso Muñoz; SaA, San Antonio; Freq, frequency.

Table 3. Estimates for the indices of genetic variation within and among populations

Genetic variation within populations		Genetic variation among populations			
π	H_s	F	δ	Φ_{ST} (pd)	Φ_{ST} (nd)
0.022975 ($\pm 2.09 \times 10^{-5}$)	0.6355 ($\pm 1.17 \times 10^{-3}$)	0.967	0.000555 ($\pm 1.2 \times 10^{-6}$)	0.0762 (df = 6, 58; $P = 0.0865$)	0.1449 (df = 6, 58; $P = 0.8768$)

π , nucleotide diversity; H_s , haplotype diversity; F , similarity; δ , nucleotide divergence; Φ_{ST} (pd), F -statistic based on pairwise differences ($=\theta_W$); Φ_{ST} (nd), F -statistic based on Nei's evolutionary distance (d).

To study the distribution of genetic variation within and among populations, an AMOVA was done using ARLEQUIN version 2.0 (Schneider et al. 2001). The degree of isolation of the populations was interpreted using the Φ -statistic (Φ_{ST}) parameter. This analysis was done by considering the number of pairwise differences and the evolutionary distance (d) between haplotypes. The significance of the variance components and Φ_{ST} was computed using a nonparametric permutation test (Excoffier et al. 1992).

Results

Genetic Variation. Two fragments were observed after amplification of the A+T-rich/12S sequences. The most frequent fragment in the Uruguayan populations contained ≈ 2100 bp and occurred in 98% of the samples; this fragment was previously described by Litjens et al. (2001). The second fragment contained ≈ 3200 bp and was identified in three individuals from the same wound in the locality of San Antonio. The nature of this variation is still under investigation. The amplified *cox1/cox2* sequences showed no size polymorphism.

Digestion of the A+T-rich/12S sequences with the enzyme *DraI* produced three diagnostic patterns. Patterns A and B were digestion products of the 2100-bp fragment (restriction site polymorphism), and pattern C was identified when the 3200-bp fragment was digested (fragment size polymorphism) (Table 1). Pattern A occurred in 96% of the samples analyzed. For *cox1/cox2* sequences, the enzyme *MspI* yielded five diagnostic patterns for the populations, whereas the enzyme *AseI* presented two different patterns (Table 1). The existence of an unknown number of small fragments meant that the total size for the sum of the fragments was less than that of the intact amplified fragment.

We examined $\approx 25\%$ (≈ 4.2 kb) of the *C. hominivorax* mitochondrial genome (Lessinger et al. 2000), and nine haplotypes were identified on the basis of the restriction patterns. Table 2 shows the distribution and frequency of the haplotypes found at the different Uruguayan localities sampled. Haplotype 1 was the most frequent (51%) in the sample as a whole and at most of the localities, and it was present in all populations. Haplotypes 3 and 4 represented 22 and 18% of the total sample, respectively, and they were widely distributed among the populations. The distance estimates between pairs of common haplotypes was $d(1vs3) = 0.0227$, $d(1vs4) = 0.0719$ and $d(3vs4) = 0.0110$. The others six haplotypes had a local distribu-

tion and represented a very low proportion of the total sample ($<2\%$ each).

Only one of these six rare haplotypes was found in the three southern locations (Colonia, Joaquín Suárez, and Cerro Colorado) near the Uruguayan coast, and five of these haplotypes were found near the border with Brazil in northwestern and northeastern locations. Although this distribution of haplotype would suggest a decrease in diversity at the edge of the species' range in Uruguay, an AMOVA was conducted to compare the two groups, and the results (data not shown) suggest that they are not different.

On average, the gene diversity within populations based on halotypes (H_s) was 0.6355 and the nucleotide diversity (π) was 0.0229 (Table 3). The levels of diversity did not differ greatly among the populations. Both indices indicated that the Uruguayan *C. hominivorax* populations were highly polymorphic.

Population Differentiation. The overall estimates of nucleotide divergence (δ), similarity (F), and Φ_{ST} parameters are shown in Table 3. The degree of genetic divergence of DNA sequences between two populations is expected to be correlated with the proportion of DNA fragments that they share (Nei and Li 1979). The high similarity (96.7%) and the low nucleotide divergence ($\delta = 0.00055$) estimated for the populations agreed with this correlation and indicate that the sampled populations were very similar.

Two hierarchical AMOVA were used to investigate population differentiation: one considered the pairwise differences among populations and the other considered Nei's genetic distance. The first revealed that 92.4% of the genetic variation was attributable to the variance within populations and the second that 85.5% of this variation can be ascribed to the same hierarchical level. Although both estimates of the Φ_{ST} values among populations indicated some subpopulation differentiation, they were not statistically significant (Table 3).

Discussion

PCR-RFLP analysis of the two amplified regions of the *C. hominivorax* mitochondrial genome by using three restriction endonucleases revealed high genetic variability, with nine haplotypes in the seven Uruguayan screwworm populations sampled (Fig. 1; Table 2).

The PCR-RFLP analysis revealed marked polymorphism in the *cox1/cox2* region at the intra- and inter-population levels and was useful for defining different haplotypes. However, the A+T/12S region

revealed lower PCR-RFLP than expected. For example, only one pattern was found for 96% of the samples analyzed, indicating that the PCR-RFLP approach was not efficient in detecting variation in the A+T/12S region. This result could be attributed to the low resolution of the 2% agarose gel used to screen restriction patterns containing fragments <200 bp in size. In any case, the size variation in the A+T/12S region is an indication of length polymorphism as a molecular marker for screen intraspecific variation.

The high genetic variability was consistent with conclusions reached using independent data sets based on mtDNA RFLP for populations from North America, Central America, and Brazil, which described *C. hominivorax* as a polymorphic species (Roehrdanz 1989, Azeredo-Espin 1993, Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995, Taylor et al. 1996).

The nucleotide diversity (2.3%) estimated for *C. hominivorax* in this study is the highest value obtained for this species and is much higher than the same diversity previously described for Brazilian populations (0.92%) (Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995) and for North and Central American populations (1.3%) (Roehrdanz 1989). This high value probably reflects the inclusion of only polymorphic fragments. However, gene diversity is not affected by the choice of fragments. It can be interpreted as the probability that two randomly chosen flies in a population have different haplotypes. The average value of gene diversity estimated here ($H_s = 0.633$) indicates a high level of genetic variation for *C. hominivorax* and reinforces the results previously obtained.

Comparisons among the Uruguayan screwworm populations clearly indicated that there was no evidence of subpopulation differentiation. The presence of the common haplotype 1 at a high frequency in all populations and the wide distribution of haplotypes 3 and 4 suggested that the populations were very similar. The high value of the similarity index (96.7%) confirmed this observation. There were six local haplotypes, but the divergence between each of them and the common haplotypes was very low (just one mutational step; d data not shown). For this reason, the estimates of nucleotide divergence between populations was very low ($\delta = 0.00055$), indicating that the populations analyzed were very similar.

The AMOVA showed that the genetic variability was distributed mainly within populations. This finding and the Φ_{ST} estimates provide evidence that there was no genetic differentiation by natural forces, such as drift and selection, thus reinforcing the evidence that the screwworm populations of Uruguay are a unique panmictic population.

The population structure of *C. hominivorax* throughout its distribution has been a controversial topic. Allozyme studies have found no differentiation among North and Central American screwworm populations (Krafsur and Whitten 1993, Taylor and Peterson 1994) and only moderate differentiation in Brazilian populations (Infante-Malachias 1999). Infante-Malachias et al. (1999) studied *C. hominivorax* populations from southeastern Brazil and northern

Argentina by using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and found moderate population differentiation despite the low genetic distance. The mtDNA RFLP analysis of four populations from the state of São Paulo in Brazil (Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995) corroborated the results obtained with RAPD and allozymes for South American populations and suggested that the populations were connected by reduced gene flow. Roehrdanz and Johnson (1988) and Roehrdanz (1989) used RFLP of mtDNA to study populations from Texas, Mexico, Jamaica, Costa Rica, and Guatemala; both studies analyzed sequence diversity among populations and concluded that there was some differentiation among the "mainland" versus Jamaican samples and less variation among samples from northern Mexico and Texas.

The distribution of mtDNA polymorphism at a geographic level among the Uruguayan screwworm populations, suggested a panmictic population in the extreme south of this species' occurrence. Based on the distribution of *C. hominivorax* mtDNA polymorphisms in the Neotropical region, we concluded that the populations of this fly cannot be differentiated at the limits of the species' distribution, in contrast to the variation found in southeastern Brazil based on RFLP of mtDNA (Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995). Further analyses using populations from other South America countries with emphasis in Brazilian *C. hominivorax* populations are being done to elucidate the intraspecific genetic variability in this species at a geographic level.

The lack of genetic structure among the screwworm populations in Uruguay may reflect the effect that there are no geographical barriers or important climatic differences among the regions studied. This absence of barriers would facilitate the natural dispersion of flies within Uruguay. Second, according to the Uruguayan Ministry of Agriculture (MGAP 2002), all regions of the country have a large livestock population, such that the trading of animals, possibly infected with *C. hominivorax*, could contribute to the dispersal of this species and results in more homogeneous populations.

Because our data showed that the populations of *C. hominivorax* in Uruguay form a single, panmictic and highly polymorphic population, some implications for sterile control programs need to be discussed. Roehrdanz (1989) showed that the genetic variability in mtDNA, in the form of different haplotypes, was extensive and that the sequence divergence was not great among populations from Texas, Mexico, Costa Rica, Guatemala, and Jamaica, but with greater differences between Jamaican and "mainland" populations. This extensive variability in mtDNA has not adversely affected the eradication programs because SIT has effectively eliminated the *C. hominivorax* from Mexico and from some Central American countries (Wyss and Galvin 1996). In Uruguay, we obtained similar results to those reported by Roehrdanz (1989), which suggests that this country could be a place of choice for testing the efficiency of SIT in South America. Because sterile insect release programs, either as

a holding buffer zone or an eradication campaign, require knowledge of the composition of the target species to determine optimal strategies, we are now using other molecular markers, such as microsatellite (Torres et al. 2004), to obtain a better understanding of the genetic structure of *C. hominivorax* in South America.

Acknowledgments

We thank R. A. Rodrigues and M. S. Couto for valuable technical and laboratory assistance; M. T. de Oliveira, S. Lanzzeri, E. Martines, and A. Maggi for help in collecting the samples; T. T. Torres for valuable suggestions on the manuscript and data analyses; and R. L. Roehrdanz and two anonymous reviewers for critical reviews of the manuscript. This research was supported by grants to A.M.L.A.E. from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant 03/01458-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant 471132/01-2), and the International Atomic Energy Agency (grant 11822/RO). M.L.L. was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grants 01/12528-2 and 03/13598-0).

References Cited

- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489–522.
- Azeredo-Espin, A.M.L. 1993. Mitochondrial DNA variability in geographic populations of screwworm fly from Brazil. *Int. Atomic Energy Agency* 327: 161–165.
- Carballo, M., A. Colombo, and T. Heinzen. 1990. Presencia de especies de dípteros Calífóridos causantes de miasis cutáneas en Uruguay. Relevamiento de larvas parasitarias (instar III) en rumiantes. *Veterinaria* 26: 4–6.
- Dueñas, J.C.R., G. M. Panzetta-Dutari, A. Blanco, and C. N. Gardenal. 2002. Restriction fragment-length polymorphism of mtDNA A+T-rich region as a genetic marker in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 352–358.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Guimarães, J. H., N. Papavero, and A. P. Prado. 1983. As mífases na região Neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1: 239–416.
- Hall, M., and R. Wall. 1995. Myiasis of human and domestic animals. *Adv. Parasitol.* 35: 256–333.
- Heiman, M. 1997. Software Webcutter 2.0. <http://www.firstmarket.com/cutter>.
- Infante-Malachias, M. E. 1999. Estrutura genética de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) da região sudeste do Brasil: análise através de 3 tipos de marcadores genéticos. Ph.D. dissertation, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.
- Infante-Malachias, M. E., K.S.C. Yotoko, and A.M.L. Azeredo-Espin. 1999. Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from southeastern Brazil and northern Argentina. *Genome* 42: 772–779.
- Infante-Vargas, M. E., and Azeredo-Espin, A.M.L. 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochem. Genet.* 33: 237–256.
- [IAEA/FAO] International Atomic Energy Agency/Food and Agriculture Organization. 2000. Genetic sexing and population genetics of screwworms. IAEA-314-D4-00CT2176. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- Krafsur, E. S., and C. J. Whitten. 1993. Breeding structure of screwworm fly populations (Diptera-Calliphoridae) in Colima, Mexico. *J. Med. Entomol.* 30: 477–480.
- Litjens, P., A. C. Lessinger, and A.M.L. Azeredo-Espin. 2001. Characterization of screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Med. Vet. Entomol.* 15: 183–188.
- Lessinger, A. C., and A.M.L. Azeredo-Espin. 2000. Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 14: 71–80.
- Lessinger, A. C., A.C.M. Junqueira, T. A. Lemos, E. L. Kemper, F. R. da Silva, A. L. Vettore, P. Arruda, and A.M.L. Azeredo-Espin. 2000. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Mol. Biol.* 9: 521–529.
- McElroy, D., P. Moran, E. Bermingham, and I. Kornfield. 1992. Restriction analysis package (REAP), version 4.0. University of Maine, Orono, ME.
- [MGAP] Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca de la República Oriental del Uruguay. 2002. <http://www.mgap.gub.uy/>.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University, New York.
- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 5269–5273.
- Nei, M., and F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145–163.
- Roehrdanz, R. L. 1989. Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochem. Genet.* 27: 551–569.
- Roehrdanz, R. L., and D. A. Johnson. 1988. Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *J. Med. Entomol.* 25: 136–141.
- Rokas, A., E. Ladoukakis, and E. Zouros. 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol. Evol.* 18: 411–417.
- Ross, K. G., M.J.B. Krieger, D. D. Shoemaker, E. L. Vargo, and L. Keller. 1997. Hierarchical analysis of genetic structure in native fire ant populations: results from three classes of molecular markers. *Genetics* 147: 643–655.
- Schneider, S. D. Roessli, and L. Excoffier. 2001. Arlequin ver. 2.01. Software for population genetics data analyses. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology and Ecology, University of Geneva, Switzerland.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annu. Entomol. Soc. Am.* 87: 651–701.
- Taylor, D. B., and R. D. Peterson II. 1994. Population genetics and gene variation in primary and secondary screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 626–633.
- Taylor, D. B., A. L. Szalanski, and R. D. Peterson II. 1996. Mitochondrial DNA variation in screwworm. *Med. Vet. Entomol.* 10: 161–169.

- Thomas, D. B., and R. L. Mangan. 1989. Oviposition and wound visiting behavior of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 526-534.
- Torres, T. T., R.P.V. Brondani, J. E. Garcia, and A.M.L. Azeredo-Espin. 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the new world screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Mol. Ecol. Notes* 4: 182-184.
- Vargas-Teran, M., B. S. Hursey, and E. P. Cunningham. 1994. Eradication of the screwworm from Libya using the sterile insect technique. *Parasitol. Today* 10: 119-122.
- Wyss, J. H., and T. J. Calvin. 1996. Central America regional screwworm eradication program (benefit/cost study). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 791: 241-247.

Received 24 January 2005; accepted 23 March 2005.

5. ARTIGO 2

Lyra, M.L., Klaczko, L.B. & Azeredo-Espin A.M.L. Complex pattern of genetic distribution in populations of the New World Screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Submitted to Journal of Medical Entomology.*

“Padrão complexo da distribuição de diversidade genética na mosca da bicheira revelado por marcadores do DNA mitocondrial”

Resumo

Cochliomyia hominivorax – a mosca da bicheira - é um importante agente causador de miíases na região Neotropical reconhecido por causar grande impacto econômico para a pecuária. Esforços internacionais têm sido feitos para desenvolver programas para o controle e erradicação desta espécie nas áreas endêmicas. Um bom conhecimento da genética de populações desta praga é um componente fundamental para o sucesso de programas de manejo, uma vez que, por exemplo, permite a determinação de uma escala apropriada para se conduzir tratamentos efetivos. Nesse estudo, nós realizamos uma análise através de marcadores PCR-RFLP do DNAm_t de 34 populações de *C. hominivorax*, incluindo amostras de 10 diferentes países em quase toda a distribuição geográfica atual da espécie. Os resultados revelaram alta variabilidade mitocondrial ($\pi=2,9\%$) e um padrão complexo para a distribuição dessa diversidade. Uma estruturação populacional significativa ($\Phi_{st}=0,5234$) e baixos índices de diversidade foram identificados na região do Caribe, sugerindo que as ilhas constituem de forma geral unidades evolutivas independentes conectadas por reduzido fluxo gênico. Em contraste a esse resultado, identificamos alta diversidade e baixa estruturação populacional ($\Phi_{st}=0,0483$) na América do Sul. Essa diferenciação não pode ser explicada por modelos de isolamento por distância. Os resultados apresentados sugerem que diferentes processos estão atuando na manutenção do padrão observado, o que tem diferentes implicações para o estabelecimento de programas de controle.

**Complex pattern of genetic distribution in populations of the New World screwworm fly
revealed by mitochondrial DNA markers**

Mariana L. Lyra^{1,2}, Louis Bernard Klaczko² and Ana Maria L. Azeredo-Espin^{1,2}

¹ Laboratório de Genética Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil.

² Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil.

Running title: *New world screwworm fly populations*

Correspondence:

Mariana Lúcio Lyra, Laboratório de Genética Animal, CBMEG– UNICAMP, P.O. Box 6010, CEP 13083-875, Campinas, São Paulo, Brazil, e-mail: marilyra@unicamp.br fax: ++55-19-3521-1089

Abstract

Cochliomyia hominivorax (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae) the New World Screwworm fly is an important agent of traumatic myiasis, endemic in the Neotropical region and with great economic impact on the development of the livestock industry. International efforts have been aimed at designing programmes to control and eradicate this species from endemic areas. A good knowledge of population genetics of an insect pest is a fundamental component for a successful pest management strategy to determine an appropriate geographical scale for carrying out effective treatments. In this study, we undertook a survey of mtDNA PCR-RFLP to analyze 34 populations of *C. hominivorax* in ten countries, encompassing almost all the current distribution of the species. Our results showed high levels of mitochondrial DNA variability ($\pi=2.9\%$) and a complex pattern of population genetic structure for this species. Significant population structure ($\Phi_{st}=0.5234$) and low variability were found in Caribbean populations, suggesting that, in general, islands constitute independent evolutionary entities connected by restricted gene flow. In contrast, high variability and low, but significant, differentiation was found among mainland populations ($\Phi_{st}=0.0483$), which could not be attributed to geographical distance. Several processes may be acting to maintain the observed patterns with different implications for establishing control programmes.

Key words: *Cochliomyia hominivorax*, current geographic distribution, mtDNA, PCR-RFLP, population structure.

Introduction

Cochliomyia hominivorax Coquerel, the New World screwworm fly, is a myiasis-causing fly endemic in the Neotropical region (Guimarães *et al.*, 1983). The larvae of this insect pest invade and feed on the living tissues of warm-blooded vertebrates, enlarging wounds and making it attractive for other female flies to oviposit and, without treatment, it may lead to the animal's death. *C. hominivorax* have a very wide host range, ranging from wildlife to man, but are most notorious when affecting livestock, causing injuries to leather and decline of milk and beef production, and being responsible for substantial profit losses to livestock breeders (Hall & Wall, 1995; Vargas-Terán *et al.*, 2005).

Historically, the geographic distribution of this insect extended from southern United States to Uruguay and part of Argentina (Hall & Wall, 1995). During the second half of the last century, *C. hominivorax* has been successfully eradicated from North and most of Central America through the use of the sterile insect technique (SIT), and a sterile fly barrier system is now in place in Panama to prevent re-invasion. The insect is still present in several islands in the Caribbean and South America (Klassen & Curtis, 2005). In 1988, the fly was first found outside of the Americas, in Libya, and after a major SIT programme, it was eradicated in 1991 (Lindquist *et al.*, 1992; Wyss, 2000).

Because of the economic importance of *C. hominivorax* to the livestock industry, international efforts have been aimed at designing programmes to control and eventually eradicate this species from other endemic areas (IAEA/FAO, 2000). A fundamental component of a successful pest management strategy is a good knowledge of genetic diversity and structure of field populations. Insights into these aspects of the species' biology can help greatly, for example, in predicting geographic spread patterns, understanding the colonization and establishment potential, and determining appropriate geographical scales for effective treatments (Krafsur, 2005).

Although, in the past few years, population genetics of this species have been studied with different techniques, there have been speculations and conflicting reports about population structure, genetic diversity and their effects on the control program (see Azeredo-Espin & Lessinger, 2006). Richardson *et al.*, (1982) analyzed karyotypes in natural populations of *C. hominivorax* in North America and proposed that the species was a complex of reproductively isolated populations but subsequent investigations did not find evidence of any sub-structuring

(LaChance *et al.*, 1982; McInnis, 1983). Studies of genetic variation based on allozyme techniques also resulted in divergent conclusions. Krafur & Whitten (1993) and Taylor *et al.* (1996) analyzed populations from North and Central America and concluded that they constitute a single panmitic population. However, analysis of five Brazilian populations revealed a high geographical differentiation across south-eastern Brazil (Infante-Malaquias, 1999). Analyses of mitochondrial DNA markers revealed high levels of variability in *C. hominivorax* populations, but with different levels of population differentiation. Roehrdanz and coworkers (Roehrdanz & Johnson, 1988; Roehrdanz, 1989; Taylor *et al.*, 1991) analyzed populations from North and Central America and found a small divergence among mainland populations, in contrast with a high divergence between them and the Jamaican population; Infante-Vargas & Azeredo-Espin (1995) analyzed populations from southern Brazil and suggested that these populations were divergent. More recently, New World screwworm populations from Uruguay were analyzed by mtDNA PCR-RFLP and microsatellite markers (Lyra *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2007) and results suggested that the populations were very similar in the extreme south of the distribution, where mtDNA markers did not reveal variation and microsatellite markers revealed a small, but significant, variation.

There is no conclusive explanation for the discrepancies between different studies regarding the genetics of *C. hominivorax*, but one generic interpretation is that it results from the analyses of distinct populations and/or the use of different genetic markers.

From the above, it is clear that a more extensive study about genetic diversity and differentiation in this species throughout its geographical distribution, using a single genetic marker would greatly help in highlighting the evolutionary scenario of *C. hominivorax* populations. In the investigation reported here, we have undertaken an extensive survey of mtDNA PCR-RFLP in 34 *C. hominivorax* populations, in an attempt to characterize genetic variability and the patterns of its distribution across the species' current geographic range. We have included a discussion about the possible influences of several processes that might be acting to maintain the patterns observed and about the implications of results for establishing control programmes.

Material and Methods

Fly Samples and DNA extractions

A total of 883 individuals from 34 *C. hominivorax* populations in ten countries across almost all the species' current distribution (Table 1, fig. 1) were analyzed. Samples were obtained as third instars from wounded cattle, sheep, dogs or pigs, between January 2003 and June 2007, except the sample from Campo Grande-MS (Brazil), which comprised 12 adults collected in a trap. Collected larvae were fixed in 100% ethanol or allowed to pupate in sawdust and were taken to the laboratory for species identification (Guimarães *et al.*, 1983). The adults that emerged and the fixed larvae were used for DNA extractions. Samples from each wound were identified and DNA extractions from two or three individuals per wound were conducted. Total DNA from each individual was extracted with the phenol: chloroform method (Infante-Vargas & Azeredo-Espin 1995), with volumes adapted for microcentrifuge tubes. The extractions were stored at -20°C.

The Uruguayan populations analyzed in this study were the sum of samples collected in 2003 and analyzed by Lyra *et al.* (2005) together with new samples collected in 2004. Temporal analysis indicated that samples from the different years were not significantly different (data not show) and they were pooled. Samples from the Dominican Republic, as well as Ecuador, originated from a few sub-locations and were pooled in the analysis because of the small number of individuals sampled in each sub-location; the geographic references considered were from the locality with the highest number of individuals sampled.

PCR amplification and restriction procedures

PCR amplifications and restriction procedures were performed as described in Lyra *et al.* (2005) with some slight modifications. Briefly, two specific mtDNA regions were amplified using the UBC-insect mtDNA oligonucleotide set (Simon *et al.* 1994). One region including complete sequences of Cytochrome oxidase c subunits 1 and 2 (COI/COII: ~2360pb), which was amplified using the primers C1-J-2195 and L2-N-3014; and the other region including the complete control region and partial rRNA 12S sequences (A+T rich/12S: ~2100pb), which was amplified using the primers TM-N-193 and SR-J-14233. Standard PCR conditions were used as described in Lessinger & Azeredo-Espin (2000) and Litjens *et al.*, (2001).

To improve the amplification of some samples, the regions were amplified using a nested PCR, with two sets of primers in two distinct reactions for each region. Three new primers were used: two flanking the COI/COII region at the genes *ATP8* (A8-N-3931: 5'AAT TGG TGC TAT TTG AGG 3') and *tRNA-Trp* (TW-J-1287: 5'ACT AAT AGC CTT CAA AGC 3'); and one

downstream the 12S *rRNA* subunit, at the *tRNA-Val* gene (TV-J-14122: 5' TTC AAT GTA AAT GAA ATG C 3'). We used the TV-J-14022 with the N2-N-327 primer (Oliveira *et al.*, 2006), to amplify the A+T rich/12S region. An initial reaction was performed with the external primers for each region and the products of these amplifications were used as templates for the second reaction, as described above.

For the construction of the three new mtDNA oligonucleotides, the sequence data of homologous regions from the *tRNA-Trp*, *tRNA-Val* and *ATP8* genes of *C. hominivorax* and other Calliphoridae available in GenBank were aligned separately using Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). The primers were selected based on conserved aligned regions and the structural stabilities and thermodynamic properties of each primer were analyzed using Gene Runner software (Hastings Software Inc., Hastings on Hudson, NY). The nomenclature and relative position for these new primers were assigned according to Simon *et al.* (1994). The three primers were tested for different species of Calliphoridae and Muscidae (data not shown).

The PCR products of COI/COII were digested with the diagnostic restriction endonucleases *Ase* I and *Msp* I and A+T rich/12 fragments were digested with the restriction endonuclease *Dra* I, as described in Lyra *et al.* (2005). The fragments were separated by electrophoresis in 2.0% agarose gels, stained with ethidium bromide (EtBr) and photographed on Edas Kodak 290 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY); previously identified restriction fragment patterns were run on the gels as control. The size of the fragments was estimated by comparison with the molecular size standard DNA Ladder Plus 1Kb (12Kb to 100pb; Invitrogen, Carlsbad, CA) using regression analysis, carried out manually. Digestions with enzymes that produced different restriction patterns were repeated to confirm that the observed patterns do not result from partial digests. Fragments of less than 200 bp were not included in the analysis, resulting in a few inconsistencies that were either related to the sizes of the originally amplified PCR products or to the total size recovered from the sum of the digested fragments (Table 2A).

Diversity indices and population genetic structure

Data analyses were conducted as described in Lyra *et al.* (2005). For haplotype frequency estimations and genetic comparisons, each haplotype found in a wound was considered only once. This approach was taken to avoid a bias in the analysis caused by sampling the same mitochondria, since sibling larvae have a gregarious behavior (Lyra *et al.*, 2005), for this reason, the number of *C. hominivorax* individuals considered in the analysis of genetic variation was

reduced to 426 (Table 1). The population from Juangriego-Venezuela was not included in population differentiation analyzes because of the small number of samples obtained (just one wound sampled).

The genetic diversity within populations was interpreted using the estimates of haplotype diversity (H_s = probability that two randomly-chosen haplotypes will be different; Nei, 1987) and nucleotide diversity (π =the proportion of nucleotide sites that are different when any two haplotype sequences are randomly compared; Nei & Tajima, 1981), computed using the Restriction Enzyme Analyses Package software (REAP-McElroy *et al.*, 1992).

Population structure was assessed by calculating nucleotide divergence for all pairs of populations (Nei & Tajima, 1981; REAP software, McElroy *et al.*, 1992), Slatkin's linearized F_{ST} 's (Slatkin 1995) and analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), computed using ARLEQUIN version 3.01(Excoffier *et al.*, 2005). The relationship among populations was explored by constructing a UPGMA tree using MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) and with a multidimensional scaling analysis diagram (MSD, Statistica software, version 6.1, Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma), with both the matrix of nucleotide divergence and Slatkin's linearized F_{ST} 's. The partition of haplotype diversity between groups formed in this tree and MSD was investigated by AMOVA. The degree of isolation of populations, or between groups of populations, was interpreted using the Φ_{ST} parameter (Michalakis & Excoffier, 1996) and the significance of the variance components was tested by the non-parametric permutation method (10000 permutations, Excoffier *et al.*, 1992).

A Mantel test (Smouse *et al.*, 1986) was carried out to test for significant isolation by distance, when population subdivision was found. The test was conducted using matrices of geographic distance and nucleotide divergences between populations as input data and performed using ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005).

Results

Haplotype frequencies and within population diversity

The diagnostic restriction patterns for each mtDNA region and the composed haplotypes recorded are shown in Table 2. Amplifications of the A+T-rich/12S sequences showed size polymorphism, but little variation in restriction sites. Six different sizes of fragments were obtained and the commonest fragment (~2100bp) accounted for 99% of examined individuals. Other sizes appeared just once in a specific locality (~0.2% each) and the nature of the size

variation is still under investigation. Digestion of the A+T-rich/12S sequences with the enzyme *Dra* I produced seven diagnostic patterns (Table 2A). Patterns A and B were digestion products of the 2100 bp fragment (restriction site polymorphism), and patterns C, D, E, F and G were identified when the different size fragments were digested (fragment size polymorphism). Pattern A appeared in approximately 98.8% of the samples analyzed. The COI/COII sequences presented higher restriction site polymorphism than A+T-rich/12S but did not present size polymorphism. For this region, the *Msp* I enzyme yielded seven diagnostic patterns, while the *Ase* I enzyme presented two different patterns (Table 2A).

No evidence of heteroplasmy was noted in the specimens analyzed. Although *C. hominivorax* presents polymorphic restriction patterns for both mtDNA regions studied, the patterns obtained here do not overlap diagnostic restriction patterns obtained for the secondary screwworm, *Cochliomyia macellaria* F, by Litjens *et al.* (2001).

Eighteen different haplotypes were identified based on the restriction patterns obtained for each enzyme in the two mtDNA regions analyzed (Table 2B), providing a measure of diversity and discrimination between populations. Table 2B shows the frequency of each haplotype in the total sample and Table 3 shows the distribution and frequency of the haplotypes found in the different populations sampled. Fourteen out of the 18 haplotypes recorded were locally distributed and accounted for a very low proportion (~2.8 %, in total) of the individuals examined. The other four haplotypes were common between 17 or more populations. The commonest haplotype (H1) was found in all populations, except the Cuban populations, and accounted for 51% of the total sample. Haplotypes H3, H4 and H8 represented, respectively, 18.6 %, 13.6% and 14 % of the individuals examined (Table 2B). H3 was widely distributed among populations, H4 was present just in populations from South America (mainland haplotype) and Haplotype 8 was the most frequent in Cuban populations (83% to 100%), but was found in South American populations with low frequencies (~5.1%) (Table 3).

The estimates of gene diversity within populations (H_s and π) are shown in Table 3. Populations from the Caribbean, except Trinidad & Tobago, presented low levels of diversity, with high frequencies of just one haplotype. Higher levels of diversity were found both in populations from Venezuela (VBA) and Central-South Brazil (e.g. BSS and BFV).

Population structure

The population structure was revealed by AMOVA (Table 4) and represented in UPGMA tree and MDS Diagram (fig. 2). Nucleotide divergences ranged from $D=0$ to $D=0.0363$ (average

$D=0.00549 \pm 0.000001$), with higher divergences found between Caribbean islands populations or between them and mainland populations. Nucleotide divergences and linearized F_{st} s presented very similar results, Just as such just the UPGMA tree and MDS Diagram of linearized F_{st} s data are represented (fig. 2).

Analyses indicated a moderate and non-homogeneous level of genetic differentiation of *C. hominivorax* across its current geographical distribution. The Caribbean was the major area of variation between populations and South America showed a low population differentiation (Table 4, fig 2). Cuban populations were highly divergent (fig. 2) in relation to all other Caribbean populations and mainland populations. Populations from Jamaica and the Dominican Republic were more similar to each other and grouped with mainland populations (fig. 2A), but were marginal populations in the MSD diagram (fig 2B), revealing that they are a little different from the mainland population. The population from Trinidad and Tobago, despite being an island in the Caribbean Sea, was very similar to some of the mainland populations and appeared together with these populations in the UPGMA tree and MSD diagram. On the mainland, there was no clear pattern for population clusters, but the MSD diagram revealed some populations in a periferical distribution, or with little differentiation (Ecuador (ECO), Goiânia (BGO), Costa Rica city (BCR) and Pinheiro Machado (BPM)).

Based on the significance of AMOVA, isolation by distance was tested in the Caribbean and mainland. Caribbean results indicated that 22.2% of genetic differentiation between populations would be explained by distance (Mantel $r=0.47$, $P=0.0319$). On the mainland, no association was detected (Mantel $r=0.058$, $P=0.27$), indicating that the degree of population differentiation was not related to the extent of geographical distance between sampled locations.

Since low but significant differentiation was found between South American populations, and differentiation was not correlated to geographic distances, an exploratory analysis was conducted to identify the major area of variation in mainland. Populations were apportioned into different groups, according to their geographical region and an AMOVA was conducted for each group. The groupings were: North (including populations from Venezuela, Colombia, Ecuador and north region from Brazil), South (with populations from Uruguay, Paraguay and south and south-east Brazil) and Center (populations from Midwest Brazil). Results from AMOVA are shown in Table 4; only the center group presented significant variation between populations and the genetic variation was not correlated with geographical distance (Mantel test, $r = -0.089$, $p=0.5804$).

Discussion

Genetic diversity

This study on the New World screwworm fly is one of the few studies of genetic diversity and population structure of an insect pest across almost all its geographical distribution. These results showed high levels of mitochondrial DNA variability and a complex pattern of genetic variation distribution for this species.

PCR-RFLP analysis of mitochondrial regions, particularly COI/COII, was valuable and sufficient to provide information at the populational level for *C. hominivorax*, as previously suggested for the species (Litjens *et al.*, 2001; Lyra *et al.*, 2005), especially considering the geographical scale studied here. Although the A+T/12S region did not present high restriction site polymorphism, it presented remarkable size variation. Intra-specific size variation in the control region has been documented in different groups of insects (e. g. Rondan Dueñas *et al.*, 2002; Snäll *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2007) and the analysis of this variation has provided important data on the population structure of insect species (Mardulyn *et al.*, 2003; Townsend & Rand, 2004). For this reason, the mtDNA control region of *C. hominivorax* populations is being analyzing by DNA sequencing to establish whether it could be useful to characterize variation at the intra-specific level.

The genetic variability reported, herein, for *C. hominivorax* suggests that it is a highly polymorphic species and results obtained using mtDNA PCR-RFLP markers are consistent with conclusions reached using independently derived data on populations from North America, Central America, Brazil and Uruguay (Roehrdanz, 1989; Taylor *et al.*, 1996; Infante-Vargas & Azeredo-Espin, 1995; Lyra *et al.*, 2005). The level of genetic diversity with respect to mtDNA, observed for this species, falls well within the range expected for intra-specific variation (e.g. Martin & Simon, 1990; Chapco *et al.*, 1992) and is comparable to diversities found for other insect pests that are even more diverse (Estoup *et al.*, 1996; Baliraine *et al.*, 2004; Grapputo *et al.*, 2005).

Higher levels of genetic variability found within South American populations of *C. hominivorax*, in contrast with lower levels found in Caribbean islands, strongly reinforce the interpretation that South America represents the center of origin of the New World Screwworm fly (Infante-Vargas & Azeredo-Espin, 1995; Infante-Malachias *et al.*, 1999). However, the presence of highly diverse populations both in the Central-South Brazilian regions and in Venezuela hampers a more precise conclusion about the precise geographic origin of the species.

The low diversity indices found in Caribbean islands, except Trinidad and Tobago, may be explained by a general model of the founder event, followed by genetic drift (Hedrick, 2005). However, the current results are in contrast with the higher genetic diversity obtained for the Caribbean populations with microsatellite markers (Torres & Azeredo-Espin, this issue), revealing that some alternative explanations are needed to understand this more complex scenario of population structure in the Caribbean.

The lack of congruence between nuclear and mtDNA genetic diversity may arise as a result of some alternative hypotheses, for example: 1) a rapid increase in population size after a recent founder event with a small number of females would recover nuclear diversity but not mitochondrial diversity; 2) populations from islands may result from an ancient colonization, which also allows species to recover nuclear, but not mitochondrial, diversity; 3) island populations could also have arisen from multiple introductions of the same mtDNA haplotype. The complexity of pattern observed may be a result of different histories of *C. hominivorax* introduction for the different island studied (see discussion below) and, because of that, on the basis of our data we were not able to select one more probable hypothesis to explain the scenario of diversity found in the Caribbean

Population differentiation

Comparisons among New World screwworm populations revealed moderate subdivision on the geographical scale studied and that the distribution of variation is non-uniform. High levels of differentiation were found among Caribbean populations and between them and mainland populations, in contrast with the low subdivision found among mainland populations.

Results suggested that, in general, islands constitute independent evolutionary entities, connected by a greatly restricted gene flow. Nuclear data also support the conclusion from this study regarding the population structure for *C. hominivorax* in the Caribbean area (Torres & Azeredo-Espin, this issue).

An analogous situation of population structure between islands and mainland was found in other insect species (Estoup *et al.*, 1996; De La Ruá *et al.*, 2001; Shao *et al.*, 2004; Baliraine *et al.*, 2004) and geographic isolation was interpreted as the main cause of this genetic differentiation in islands. Indeed, inter-island and mainland geographic isolation probably plays a major role in causing the extremely high genetic differentiation among New World screwworm populations in the Caribbean islands. However, the Trinidad and Tobago population is a more

diverse population and in this case distance from mainland may be insufficient to prevent gene flow.

Cuban populations were the most differentiated populations sampled in this study. The four populations from Cuba were very similar to each other with respect to mtDNA markers, but presented some differentiation in relation to nuclear markers (Torres & Azeredo-Espin, this issue). This difference between results may reflect a possible unequal contribution of the sexes in mediating gene flow, probably mediated by longer female dispersion (Hightower *et al.*, 1965; Mayer & Atzeni, 1993) or it may also be a result of differences in the mode of inheritance and polymorphism of the markers, as previously suggested for Uruguayan New World screwworm populations (Torres *et al.*, 2007).

Since Cuban populations presented unexpectedly high frequencies of haplotype H8 (because it is a rare haplotype in other populations), low diversity indices and high genetic divergences, we are conducting fine-scale analyses with DNA sequences to obtain more conclusive data about the relationship between the Cuban and other populations. Results strongly suggest that the haplotype H8 from Cuba is different from those present in South American and other Caribbean populations (data not shown) and that mtDNA diversity is very small. More extensive studies are being conducted with these samples to raise the question as to whether the assemblage is endemic to Cuba or is a recent introduction.

Based on results obtained with mtDNA markers for diversity and population structure in Caribbean populations of *C. hominivorax*, it is proposed that islands have different histories of colonization. It is possible that the New World screwworm in Jamaica, Dominican Republic and Trinidad and Tobago has a south American origin (single or multiples introductions), while Cuban populations possibly originated from somewhere in Central or North America that was not sampled for this study. The Jamaican population was previously studied by Roehrdanz and Johnson (1988) and these authors also suggested a South American origin. An extensive and periodical investigation is needed in the Caribbean area to address a more precise conclusion about the possible scenario of different introductions.

In South America, this study found a general pattern of low populational subdivision, but also found a major area of genetic variation between mainland populations located in Midwest Brazil. Few studies have been previously conducted for South America populations and different results were obtained for population structure. In Brazil, populations mainly from São Paulo State, revealed moderate to high populational subdivision for New World screwworm (Infante-

Vargas & Azeredo-Espin, 1995, RFLP of mtDNA; Infante-Malachias *et al.* 1999, RAPD-PCR; Infante-Malachias, 1999, Allozymes). The New World screwworm populations from Uruguay were also analyzed by mtDNA PCR-RFLP and microsatellite markers (Lyra *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2007) and results suggested that the populations were very similar in the extreme south of its distribution.

The current study, in addition to these previous studies, strongly indicates that genetic variation in *C. hominivorax* populations is not distributed uniformly across the continent. Population structure for insect pests are being reported in different continents and are often associated with isolation by distance (Krafsur, 2002; Baliraine *et al.*, 2004). In this study, genetic differentiation between populations in the mainland could not be attributed to geographical distance, revealing a more complex pattern for population differentiation.

Different patterns for genetic differentiation on the continent have been discussed for other insect pests. In the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* L), Grapputo *et al.* (2005) suggested that the genetic diversity partitioning in the North American population was mainly the result of founder events during range expansion, agricultural management and insecticide application. Scataglini *et al.* (2006), working with boll weevil (*Anthonomus grandis* Bohmen) populations from South America, proposed that different populations were the result of recent invaders and ancient populations, isolated by events of historical fragmentation. In the same way as these insect pests, some alternative explanations to understand the population subdivision of the *C. hominivorax* population from South America are needed.

One possible cause for genetic diversity partitioning in the New World screwworm is the potential influence of human activities. Management policies to control this pest and strong selection imposed by the use of insecticides (Carvalho *et al.*, 2006) may partially explain differences in local populations. As *C. hominivorax* is mainly livestock associated, the movement of animals across landscapes may be an important but often overlooked process influencing the population dynamics of this insect pest. Other factors, such as seasonal regimes, events of extinction and re-colonization and local selection regimes may contribute to generate this complex pattern of variability distribution in some regions. Unfortunately, on the basis of the data from this study it was not possible to formulate a more precise scenario to explain the local differentiation and the results highlight the need to evaluate factors that may influence population structure, by fine-scale analysis and supplemental ecological data for example.

Finally, over the past few years, various studies have attempted to assess the population structure of *C. hominivorax* throughout its geographical distribution, however results were not concordant. Based on results of this study it is concluded that populations of *C. hominivorax* are diverse and structured with respect to mtDNA. The species presented a complex pattern of genetic distribution throughout the current range, with few isolated populations and some panmictic populations. The distinct patterns of genetic variation observed can be only explained by complex demography and their maintenance needs to be studied to consider the influences of several processes or a combination of them in the different regions and geographical scales studied.

Implications from the results for control programmes

The current study provides different scenarios to interpret patterns of population subdivision in *C. hominivorax* populations across its current distribution, going from isolated evolutionary units to non-differentiated populations. Considering the results of this study, some implications for the development of control programmes need to be discussed. The eradication programme of *C. hominivorax* in North and Central America, that over about 45 years implemented the integrated use of SIT, has been very successful (Vargas-Terán *et al.*, 2005) and, at present, the pest is restricted to several Caribbean islands and South America.

Some new efforts have been made in designing New World screwworm eradication programs in Cuba, Hispaniola and Jamaica (FAO 1999, 2003; Dyck *et al.*, 2005). However, in Cuba, only the first part of the eradication campaign programme was concluded and the release of sterile insects was not initiated because of diplomatic problems and the absence of donors (FAO 1999; García-Rodríguez, 2003). In Jamaica, the programme began releasing sterile flies in 1999, but by mid-2004 little progress had been made (Dyck *et al.*, 2005); although most problems encountered in the programme were attributed to several logistic factors, the importance of collecting baseline data on New World Screwworm population ecology and dynamics, before initiating sterile insect release, was recognized (Dyck *et al.*, 2005). Roehrdanz (1989) found extensive genetic diversity (>2%) between Jamaican and mainland populations of *C. hominivorax*, and it is still not known if this may have contributed to problems in the efficiency of the eradication programme in Jamaica (FAO, 2003; Dyck *et al.*, 2005).

Data presented here suggest that Caribbean islands may be an ideal location for the implementation of an eradication programme, since the population can be delimited into units that are relatively isolated from each other. Before initiating an sterile release programme,

however, it is important to establish the extent of genetic diversity and divergence that may disrupt the control programme, since we found different levels of genetic variation in populations analyzed.

New World screwworm populations from South America demonstrated low differentiation. The first implication of these result is that, since gene flow appeared high enough to maintain extensive genetic homogeneity among almost all populations in mainland, control programmes on small geographic scale are unlikely to be effective. On the other hand, this study found local differentiation for some Brazilian populations and little is known about Amazonian populations and whether the forest or Andes may be considered a geographic barrier, suggesting that fine-scale analysis is needed in this area to supplement our results.

For any control activities on the mainland, a strong effort in diverse areas, including extensive genetic studies on a more fine-scale, government and livestock producer involvement and personnel training, should be undertaken before the development and implementation of an eradication strategy in South America (see Dyck, Hendrichs & Robinson 2005).

Acknowledgements

We wish to thank Rosangela A. Rodrigues, Alessandra Staffocker and Maria Salete Couto for technical and laboratorial assistance, and Pablo Fresia for helpful discussion during various stages of this study and for helping to collect samples from Uruguay. We are also grateful to Alfredo Coronado, for kindly providing us with samples from Venezuela, René Garcia for providing samples from Caribbean islands, Colombia and Ecuador, and W.W. Koller for providing samples from Campo Grande-MS. We especially thank FAO/IAEA (Division of Vienna), FAO division in Colombia and Ecuador, “Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)” and “Servicios de Sanidad Agropecuaria (SESA)” from Ecuador, for helping in sample collection. M.L.L. was supported by fellowships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- grants n° 01/12528-2 and 03/13598-0). This work was supported by grants from FAO/IAEA (11822/RO), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FAPESP.

References

- Azeredo-Espin, A.M.L. & Lessinger, A.C. (2006) Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genetica*, **126**, 111-131.
- Baliraine, F.N., Bonizzoni, M., Guglielmino, C.R., Osir, E.O., Lux, S.A., Mulaa, F.J. Gomulski, L.M., Zheng, L., Quilici, S., Gasperi, G. & Malacrida, A.R. (2004) Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitis rosa* and *Ceratitis fasciventris* (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology*, **13**, 683-695.
- Carvalho, R.A., Torres, T.T. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2006) A survey of mutations in *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and molecular identification of mutant alleles. *Veterinary Parasitology*, **140**, 344-351.
- Chapco, W., Kelln, R.A. & MacFadyen, D.A. (1992) Intraspecific mitochondrial DNA variation in the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Heredity*, **69**, 547-557.
- De La Rúa, P., Galián, J., Serrano, J. & Moritz, R.F.A. (2001) Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*, **10**, 1733-1742.
- Dyck, V.A., Reyes Flores, J., Vreysen, M.J.B., Regidor Fernandez, E.E., Teruya, T., Baner, B., Gomez Riera, P., Lindquist, D. & Loosjes, M. (2005) Management of area-wide integrated pest management programmes that integrate the Sterile Insect Technique. Pp 524-542. In Dyck, V.A., Hendrichs, J., & Robinson, A.S. Eds. (2005) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson A.S. Eds. (2005) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J.M., Goudet, J. & Scholl, A. (1996) Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Molecular Ecology*, **5**, 19-31.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- (FAO) Food and Agriculture Organization of United Nations (1999) Programa de cooperación técnica. Control del gusano barrenador del ganado para apoyar el desarrollo agropecuario. Cuba. Relación final TCP/CUB/6613. FAO, Rome, Italy.
- (FAO) Food and Agriculture Organization of United Nations (2003) Programa de cooperación técnica. Control del gusano barrenador del Ganado. Haiti, Jamaica y República Dominicana. Relación final TCP/RLA/8927. FAO, Rome, Italy.
- García-Rodríguez, R. (2003) Erradicación de la mosca del gusano barrenador del ganado en la Isla de La Juventude, Cuba. Preparación del Caribe para la erradicación del gusano barrenador del ganado. Final report of expert mission, project RLA/5/044. Department of Technical Cooperation, IAEA, Vienna, Austria.

- Grapputo, A., Boman, S., Lindström, L., Lyytinen, A. & Mappes, J. (2005) The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology*, **14**, 4207-4219.
- Guimarães, J.H., Papavero, N. & do Prado, A.P. (1983) As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Revista Brasileira de Zoologia*, **1**, 239-416.
- Hall, M. & Wall, R. (1995) Myiasis of human and domestic animals. *Advances in Parasitology*, **35**, 256-333.
- Hedrick, P.W. (2005) Genetics of populations. 3rd ed. 737pp. Jones and Batlett Publishers, Inc.
- (IAEA/FAO) International Atomic Energy Agency/ Food and Agriculture Organization (2000) Genetic sexing and population genetics of screwworms. August 7-11, 2000. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- Hightower, B.G., Adans, A.L. & Alley, D.A. (1965) Dispersal of released irradiated laboratory-reared screwworm flies. *Journal of Economic Entomology*, **58**, 373-374.
- Infante-Malachias, M.E. (1999) Estrutura genética de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) da região sudeste do Brasil: análise através de três tipos de marcadores genéticos. PhD thesis, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, 122 p.
- Infante-Malachias, M.E., Yotoko, K. & Azeredo-Espin, A.M.L. (1999) Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil and Northern Argentina. *Genome*, **42**, 772-779.
- Infante-Vargas, M.E. & Azeredo-Espin, A.M.L. (1995) Genetic variability in mitochondrial DNA of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochemical Genetics*, **33**, 237-256.
- Klassen, W. & Curtis, C.F. (2005). History of the sterile insect technique. Pp 3-36. In Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson, A.S. Eds. (2005) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Krafsur, E.S. (2002) Population structure of tsetse fly *Glossina pallidipes* estimates by allozyme, microsatellite and mitochondrial gene diversities. *Insect Molecular Biology*, **11**, 37-45.
- Krafsur, E.S. (2005) Role of population genetics in the sterile insect technique. Pp 389-406. In Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson, A.S. Eds. (2005) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- 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.
- LaChance, L.E., Bartlett, A.C., Bram, R.A., Gagné, R.J., Graham, O.H., McInnis, D.O., Whitten, C.J., Seawright, J.A. (1982). Speculating on screwworm speciation. *Science*, **218**, 1142-1145.
- Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2000) Evolution and structural organization of the mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 71-80.
- Lindquist, D.A., Abusowa, M., & Hall, M.J.R. (1992) The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Medical and Veterinary Entomology*, **6**, 2-8

- Litjens, P., Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2001) Characterization of screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**, 183-188.
- Lyra, M.L., Fresia, P., Santo, G., Cristina, J., Klaczko, L.B. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2005) Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal of Medical Entomology*, **42**, 589-595.
- Mardulyn, P., Termonia, A. & Milinkovitch, M.C. (2003) Structure and evolution of the mitochondrial control region of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae): a hierarchical analysis of nucleotide sequence variation. *Journal of Molecular Evolution*, **56**, 38-45.
- Martin, A., & Simon, C. (1990) Differing levels of among population divergence in the mitochondrial DNA of periodical cicadas related to historical biogeography. *Evolution*, **44**, 1066-1080.
- Mayer, D.G. & Atzeni, M.G. (1993) Estimation of dispersal distances for *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Environmental Entomology*, **22**, 368-374.
- McElroy, D., Moran, .P, Bermingham, E. & Kornfield, I. (1992) Restriction Analysis Package-REAP, Version 4.0. University of Maine, Orono, ME.
- McInnis, D.O. (1983) Chromosomal variation in the screwworm: polymorphism or cryptic species? *The American Naturalist*, **122**, 840-842.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics*, **142**, 1061-1064.
- Nei, M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University. New York. NY.
- Nei, M. & Tajima, F. (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, **97**, 145-163.
- Oliveira, M.T., Rosa, A.C., Azeredo-Espin, A.M.L. & Lessinger, A.C. (2006) Improving access to the control region and tRNA gene clusters of Dipteran mitochondrial DNA. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 636-639.
- Oliveira, M.T., Azeredo-Espin, A.M.L. & Lessinger, A.C. (2007) Mitochondrial DNA control region of muscidae flies: Evolution and structural conservation in a dipteran context. *Journal of Molecular Evolution*, **64**, 519-527.
- Richardson, R.H., Ellison, J.R. & Averhoff, WW (1982) Autocidal Control of Screwworms in North America. *Science*, **215**, 361-370.
- Roehrdanz, R.L. (1989) Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochemical Genetics*, **27**, 551-569.
- 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.
- Rondan Dueñas, J.C., Panzetta-Dutari, G.M., Blanco, A. & Gardenal, C.N. (2002) Restriction fragment-length polymorphism of the mtDNA A+T-rich region as a genetic marker in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **95**, 352-258.
- Scataglini, M.A., Lanteri, A.A. & Confalonieri, V.A. (2006) Diversity of boll weevil populations in South America: A phylogeographic approach. *Genetica*, **126**, 353-368.

- Shao, Z.-Y., Mao, H.-X., Fu, W.-J., Ono, M., Wang, D.-S., Bonizzoni, M. & Zhang, Y.-P. (2004) Genetic structure of Asian populations of *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Heredity*, **95**, 46-52
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651-701.
- Slatkin, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- Smouse, P. E., Long, J. C. & Sokal, R.R. (1986) Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, **35**, 627-632.
- Snäll, N., Huoponen, K., Savontaus, M.L. & Ruohomäki, K. (2002) Tandem repeats and length variation in the mitochondrial DNA control region of *Epirrita autumnata* (Lepidoptera: Geometridae). *Genome*, **45**, 855-861.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Taylor, D.B., Hammack, L. & Roehrdanz, R.L. (1991) Reproductive compatibility and mitochondrial DNA restriction site analysis of the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*, from North Africa and Central America. *Medical and Veterinary Entomology*, **5**, 145-151.
- Taylor D.B., Szalanski, A.L. & Peterson II, R.D. (1996) A polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism technique for identification of screwworms (Diptera: Calliphoridae). *Medical and Veterinary Entomology*, **10**, 63-70.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**, 4876-4882.
- Torres, T.T., Lyra, M.L., Fresia, P. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2007) Assessing genetic variation in the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* populations from Uruguay. In Vreysen, M.J.B., Robinson, A.S. & Hendrichs, J. (Eds.), *Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands pp 183-192..
- Torres, T.T., & Azeredo-Espin, A.M.L. (*this issue*) Population structuring in New World screw-worm populations from the Caribbean: insights from microsatellite data. *Medical and Veterinary Entomology*
- Townsend, J.P. & Rand, D.M. (2004) Mitochondrial genome size variation in New World and Old World populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, **93**, 98-103.
- Vargas-Terán, M., Hofmann, H.C. & Tweddle, N.E. (2005) Impact of screwworm eradication programmes using insect sterile technique. p 629-650. In Dyck, V.A., Hendrichs, J., and Robinson A.S. (Eds) *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Wyss, J.H. (2000) Screwworm eradication in the Americas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **791**, 241-247.

Table 1. Geographic locations of *Cochliomyia hominivorax* populations sampled, populations code (Id code), and number of individuals analyzed.

Country	Location	ID Code	Latitude	Longitude	N samples (T/A)
CB	Pinar del Rio	CPR	22°25' N	83°41' W	14/6
	Ciego de Ávila	CCA	21°50' N	78°46' W	18/13
	Santiago de Cuba	CSC	20°01' N	75°49' W	17/13
	Ciro Redondo	CCR	21°53' N	82°54' W	14/11
DR	Santo Domingos	DRP	18°28' N	59°63' W	25/14
JM	Kingston	JAM	17°59' N	76°47' W	14/8
TeT	Puerto España	TET	10°40' N	61°28' W	22/12
VE	Encontrados	VEN	9°02' N	72°13' W	20/10
	Barquisimeto	VBA	10°03' N	69°19' W	23/11
	Juangriego	VJU	11°04' N	63°57' W	10/1
CO	Turbo	COT	8°05' N	76°43' W	35/15
EC	Sto Dom. de los Colorados	ECO	0° 15' S	79°10' W	29/13
BR	Santa Maria das Barreiras	BSM	08°52' S	49°42' W	26/20
	Cocalinhos	BCO	14°22' S	51°00' W	11/6
	Costa Rica City	BCR	18°32' S	53°07' W	25/5
	Goiânia	BGO	16°43' S	49°15' W	28/10
	Goianira	BGN	16°32' S	49°22' W	16/8
	Caiapônia	BCA	16°57' S	51°48' W	68/31
	Campo Grande	BCG	20°27' S	54°36' W	12/12
	S.S. do Paraíso	BSS	20°55' S	46°59' W	18/6
	Campinas	BCP	22°48' S	47°03' W	17/9
	Estiva	BES	22°27' S	46°01' W	42/18
	Carambeí	BCI	24°55' S	50°05' W	26/15
	Fagundes Varela	BFV	28°52' S	51°41' W	9/5
	Sto Antonio das Missões	BSA	29°04' S	56°19' W	22/11
	Pinheiro Machado	BPM	31°04' S	53°23' W	24/9
Py	Ybytymy	PYB	25°46' S	56°41' W	28/14
Uy*	Bañados de Medina	UBM	32°23' S	54°21' W	46/20
	Paso Muñoz	UPM	31°27' S	56°23' W	36/10
	San Antonio	UST	31°24' S	57°58' W	31/16
	Dayman	UDA	31°33' S	57°57' W	24/11
	Cerro Colorado	UCC	33°52' S	55°33' W	44/27
	Colonia	UCO	34°28' S	57°51' W	43/15
	Juaquín Suarez	UJS	34°44' S	56°02' W	46/21
Total					883/426

CB: Cuba, **DR:** Dominican Republic, **JM:** Jamaica, **T&T:** Trinidad and Tobago, **VE:** Venezuela, **CO:** Colombia, **BR:** Brazil, **PY:** Paraguay, **UY:** Uruguay. T/A: number of individuals sampled/ number of individuals considered for genetic comparisons between populations. *sum of data from Lyra *et al.*, 2005 and this work.

Table 2. A- Diagnostic restriction patterns obtained by PCR-RFLP of *Cochliomyia hominivorax*. Capital letters indicate polymorphic restriction patterns for each region. B-Composite haplotypes designed based on the restriction pattern obtained for each enzyme and their frequency in total sample.

A) Restriction Patterns							B) Haplotypes			
Region	Enzyme	Pattern	Fragments (bp)				Haplotype	<i>DraI</i>	<i>AseI</i>	<i>MspI</i> Freq (%)
A+T/12S	<i>DraI</i>	A	800	320	200	200	H1	A A C		51
		B	1000	320	200		H2	A A D		0.2
		C*	1800	320	200	200	H3	A B A		18.6
		D*	1700	320	200	200	H4	A B B		13.6
		E*	1650	320	200	200	H5	B A C		0.2
		F*	1900	320	200	200	H6	A B E		0.2
		G*	1300	320	200	200	H7	C A C		0.2
COI/COII	<i>AseI</i>	A	1100	460	350	220	H8	A A A		14
		B	1100	680	350		H9	A B C		0.2
	<i>MspI</i>	A	1500	480			H10	D B A		0.2
		B	1400	480			H11	A A F		0.2
		C	1500	300			H12	E A C		0.2
		D	870	680	300		H13	A B G		0.2
		E	1400	300			H14	A B H		0.2
		F	1100	550	300		H15	D A C		0.2
		G	850	750	480		H16	F B B		0.2
		H	1000	500	480		H17	B A A		0.2
							H18	G A A		0.2

* represent fragments obtained with the restriction of size polymorphic amplifications; fragments smaller than 200 bp were not considered.

Table 3. Genetic diversity and haplotype distribution within populations of *Cochliomyia hominivorax*. Population identification codes corresponding to localities given on Table 1.

Population		<i>Hs</i>	π	N° hap.	Haplotype Frequency
CB	CPR	0.2637 ± 0.14746	0.009022	2	H3 (17%), H8 (83%)
	CCA	0.0000 ± 0.00000	0.000000	1	H8 (100%)
	CSC	0.2831 ± 0.10948	0.009911	3	H3 (7.5%), H8 (85%), H17 (7.5%)
	CCR	0.1732 ± 0.10812	0.003468	2	H8 (90%), H18 (10%)
DR	DRP	0.1376 ± 0.08371	0.003536	2	H1 (93%), H8 (7%)
JM	JAM	0.2333 ± 0.12562	0.006189	2	H1 (88%), H8 (12%)
TeT	TET	0.5072 ± 0.04451	0.030616	2	H1 (59%), H3 (41%)
VE	VEN	0.3368 ± 0.10981	0.020527	2	H1 (80%), H3 (20%)
	VBA	0.7579 ± 0.06338	0.049380	5	H1 (40%), H3 (30%), H4 (10%), H14 (10%), H15 (10%)
	VJG	nd	nd	1	H10 (nd)
CO	COT	0.4046 ± 0.07765	0.024193	2	H1 (73%), H3 (27%)
EC	ECO	0.5415 ± 0.07503	0.017697	3	H1 (60%), H3 (8%), H8 (30%)
BR	BSM	0.6000 ± 0.07302	0.030486	4	H1 (60%), H3 (15%), H4 (10%), H8 (15%)
	BCO	0.7111 ± 0.08600	0.029129	3	H1 (33%), H3 (33%), H8 (33%)
	BCR	0.5455 ± 0.14361	0.021156	2	H1 (80%), H11 (20%)
	BCG	0.5072 ± 0.09287	0.025430	3	H1 (20%), H3 (40%), H4 (40%)
	BGO	0.6737 ± 0.04925	0.035128	3	H1 (37.5%), H3 (37.5%), H4(25%)
	BGN	0.7000 ± 0.05063	0.042586	3	H1 (68%), H3 (16%), H4 (10%), H8 (3%), H13 (3%)
	BCA	0.5119 ± 0.06748	0.032358	5	H1 (67%), H3 (25%), H8 (8%)
	BSS	0.5455 ± 0.06155	0.050644	2	H1 (50%), H4 (50%)
	BCP	0.6667 ± 0.07483	0.028079	3	H1 (55%), H3 (22.5%), H8 (22.5%)
	BES	0.5524 ± 0.04620	0.043660	3	H1 (56%), H3 (5%), H4 (39%)
	BCI	0.5241 ± 0.09216	0.034715	4	H1 (66%), H3 (7%), H4 (20%), H8 (7%)
	BFV	0.8000 ± 0.08884	0.040097	4	H1 (20%), H3 (40%), H4 (20%), H8 (20%)
	BSA	0.7273 ± 0.05051	0.035243	4	H1 (36.5%), H3 (36.5 %), H4 (9%), H8 (18%)
	BPM	0.7059 ± 0.06997	0.048979	4	H1 (33%), H3 (11%), H4 (44%), H16 (11%)
Py	PYB	0.6243 ± 0.07950	0.036381	4	H1 (57%), H3 (22 %), H4 (14%), H8 (7%)
Uy	UBM	0.7026 ± 0.03178	0.043842	4	H1 (40%), H2 (5%), H3 (30%), H4 (25%)
	UPM	0.5684 ± 0.08629	0.036196	3	H1 (60%), H3 (30%), H4 (10%)
	UST	0.6210 ± 0.07046	0.037881	4	H1 (56%), H3 (25%), H4 (13%), H7 (6%)
	UDA	0.5887 ± 0.11396	0.025067	5	H1 (64%), H3 (9%), H5 (9%), H8 (9%), H9 (9%)
	UCC	0.6569 ± 0.03814	0.042428	4	H1 (48%), H3 (18%), H4 (30%), H6 (4%)
	UCO	0.6161 ± 0.06221	0.045371	4	H1 (53%), H3 (7%), H4 (33%), H12 (7%)
	UJS	0.6504 ± 0.03128	0.037409	3	H1(38%), H3 (43%), H4 (19%)
			0.029482		
			±		
Average		0.5263 ± 0.00114	0.000006	3	

Hs: Haplotype diversity, π : Nucleotide diversity. N° hap.: Number of haplotypes found in each locality.

Table 4. AMOVA results obtained for the distribution of genetic variation among populations or groups of *Cochliomyia hominivorax*. See text for details about mainland population groups.

	Φ_{st}	p
All populations	0.1304	<0.00001
Caribbean	0.5234	<0.00001
South America (mainland)	0.0483	0.0058
North	0.0044	0.4663 ^{ns}
Center	0.1584	0.0049
South	0.0097	0.3055 ^{ns}
Caribbean vs mainland	0.1180	<0.00001

^{ns} Non significant values; p = p-value, significant values for population differentiation are in bold.



Figure 1. Map of South America and Caribbean with collecting localities for sampled populations of *Cochliomyia hominivorax* used in this study. Identification codes correspond to localities given in Table 1.

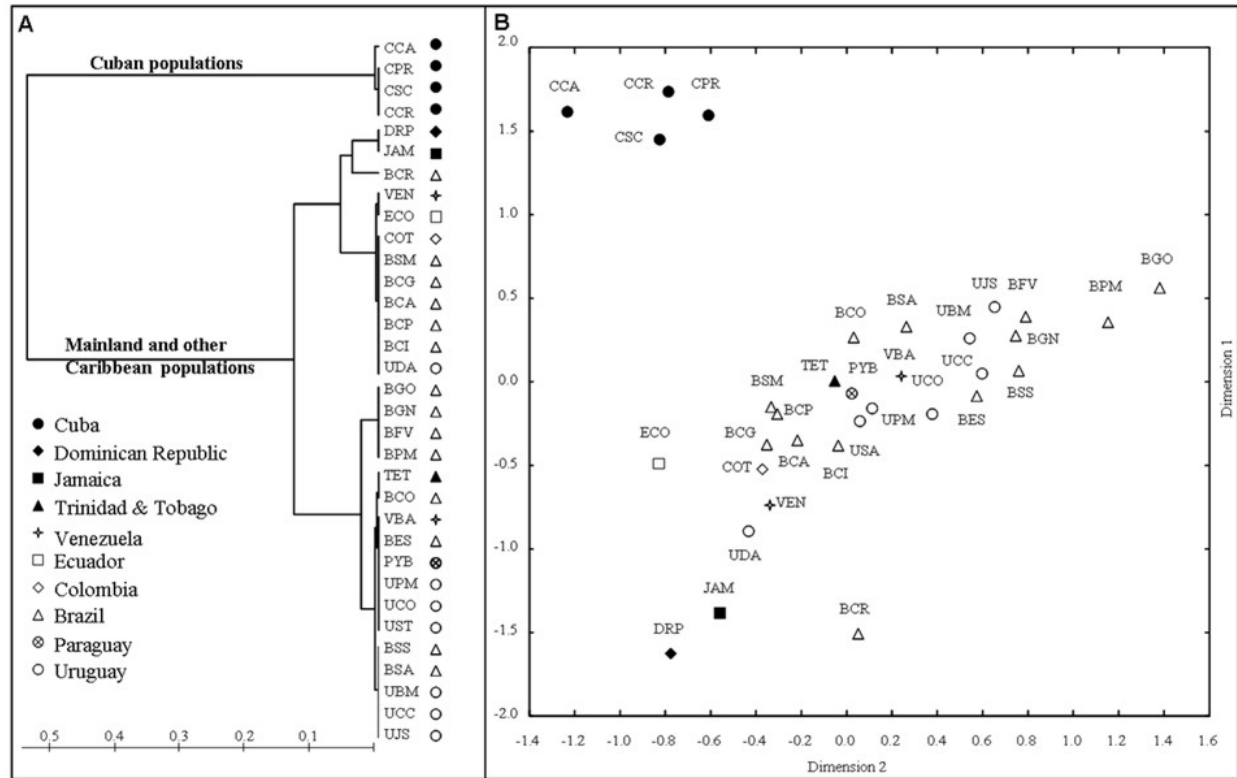


Figure 2. UPGMA tree (A) and MSD diagram (B) clustering *Cochliomyia hominivorax* populations, obtained with Slatkin's linearized F_{st} matrix. Populations from Caribbean are designed with full symbols and populations from mainland are designed with empty symbols (legend of symbols is presented in side A). Population identification codes correspond to localities given on Table 1.

6. “Caracterização da variação de tamanho da região controle do DNA mitocondrial de *cochliomyia hominivorax*”.

6.1 Introdução

Os trabalhos inicialmente feitos com a região controle do DNAm_t tiveram como objetivos a caracterização da organização estrutural e a detecção de possíveis sítios associados ao controle da replicação do DNAm_t. Em insetos essa região não codificadora possui um alto conteúdo de Adeninas (A) e Timinas (T) e por isso é muitas vezes denominada “região rica em A+T” (Fauron & Wolstenholme, 1976; Zhang & Hewitt, 1997). Nesta região já foram identificados possíveis promotores para transcrição do genoma mitocondrial (Lewis *et al.*, 1994) e, recentemente, Saito *et al.* (2005) identificaram em 4 espécies de *Drosophila*, uma de Lepidóptera, uma de Coleóptera e uma de Ortóptera, que a exata origem de início de replicação do DNAm_t está na região controle.

Essa região vem sendo utilizada como um marcador apropriado para se estudar polimorfismos genéticos e estrutura populacional de espécies (revisão em Zhang & Hewitt, 1997). A análise da variação da região controle em indivíduos de localizações geográficas distintas tem revelado informações importantes sobre a estrutura e a dinâmica das populações de diferentes espécies (Dotson & Beard, 2001; Mardulyn *et al.* 2003; Vila & Björklund, 2004, Chu *et al.*, 2003; Townsend & Rand, 2004).

Baseando-se na comparação de seqüências da região controle, Zhang *et al.* (1995) dividiram os insetos em dois grupos: O Grupo 1 compreende os insetos em que esta região contém dois domínios distintos, sendo um dos domínios conservado (Domínio A, adjacente ao gene para o tRNA-I) e o outro variável tanto em seqüência como em tamanho (Domínio B). Neste grupo estão as espécies de drosofilídeos (Zhang *et al.*, 1995) e também espécies da família Calliphoridae, como *C. hominivorax* (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000). O Grupo 2 compreende os insetos em que a região controle não pode ser dividida em domínios conservados e variáveis distintos. Nesse grupo estão, por exemplo, os mosquitos e borboletas (Zhang & Hewitt, 1997).

Em Zhang & Hewitt (1997) foram descritos alguns elementos estruturais (blocos de seqüência conservada - BSC) freqüentemente observados na região controle. A presença desses BSCs tem sugerido uma possível função biológica associada a estas regiões (Lewis *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Lessinger & Azeredo-Espin, 2000; Snäll *et al.*, 2002). Esses blocos (BSCs)

são caracterizados por serem: longos trechos de seqüências poli-T (poli-A), seqüências TA(A) repetidas em série, estruturas secundárias em forma de grampo (“stem and loop”) e curtos trechos ricos em G. Lessinger & Azeredo-Espin (2000), investigando o padrão de organização estrutural do domínio A de espécies causadoras de mífase, inclusive *C. hominivorax*, identificaram 8 sub-domínios específicos responsáveis por conferir o caráter conservado da região controle (A+T). Estes sub-domínios são consistentes com a descrição dos elementos estruturais de Zhang & Hewitt (1997).

A região A+T também é responsável pela maior parte da variação do genoma mitocondrial, tanto em tamanho como em seqüência (Zhang & Hewitt, 1997,). Seqüências repetidas em série ou duplicações/deleções de grandes seqüências de DNA estão mais comumente relacionadas com a diferença de tamanho da região controle de insetos (Lewis *et al.*, 1994; Zhang & Hewitt, 1997; Rondan Dueñas *et al.*, 2002; Snäll *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2007). Outra forma de variação nessa região foi identificada por Lessinger *et al.* (2004) e Junqueira *et al.* (2004) no gênero *Chrysomya*, que foi caracterizada por ser uma duplicação da seqüência do gene tRNA-I e porção do gene tRNA-Q.

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a variação de tamanho da região A+T de *C. hominivorax* identificada em alguns indivíduos da espécie (Lyra *et al.*, 2005; Lyra *et al.*, *in press*), buscando uma melhor compreensão da organização estrutural dessa região dentro da espécie. Também foi objetivo deste trabalho analisar o potencial dessa região como marcador genético para futuros trabalhos em análise de populações desta praga, através da caracterização do polimorfismo encontrado nos dois domínios distintos dessa região .

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Amostras

As amostras de *C. hominivorax* analisadas nesse trabalho foram previamente utilizadas nos trabalhos Lyra *et al.* (2005) e Lyra *et al.*, (*In press*) (Parte II, artigos 1 e 2, respectivamente). Foram analisados todos os indivíduos que apresentaram variação de tamanho na região A+T do DNAm^t e ainda alguns indivíduos com tamanho padrão da região (descrito por Lessinger & Azeredo-Espin, 2000) (tabela 6.1).

Tabela 6.1. Indivíduos analisados, localidades de origem da amostra, tamanho estimado da região A+T a partir da amplificação e haplótipos observados por PCR-RFLP. * Amostra com variação de tamanho na região A+T. # Lyra *et al.*, 2005; Lyra *et al.*, *in press*.

Amostra	Localidade	Tamanho A+T (estimado)	Haplótipo PCR-RFLP [#]
CCR1*	Ciro Redondo - Cb	~1700pb	H18 - GAA
CCR2	Ciro Redondo - Cb	~1200 pb	H8 - AAA
VJU1*	Juangriego-Ve	~2100 pb	H15 - DBA
VJU2	Juangriego-Ve	~1200 pb	H3 - ABA
VBA1*	Barquisimeto-Ve	~2100 pb	H10 - DAC
VBA2	Barquisimeto-Ve	~1200 pb	H1 - AAC
UST1*	San Antonio - Uy	~2200 pb	H7 - CAC
UST2	San Antonio - Uy	~1200 pb	H1 - AAC
UCO1*	Colonia- Uy	~2050 pb	H12- EAC
UCO2	Colonia- Uy	~1200 pb	H1 - AAC
UDA1	Daymán - Uy	~1200 pb	H5 - BAC
BPM1*	Pinheiro Machado - Br	~2300 pb	H16 - FBB
BPM2	Pinheiro Machado - Br	~1200 pb	H4 - ABB

Cb=Cuba; Ve=Venezuela; Uy=Uruguai; Br=Brasil

Para cada amostra com variação de tamanho identificada, a região A+T de todos os indivíduos da mesma ferida foram amplificados com o objetivo de identificar quantos indivíduos apresentavam a variação de tamanho. O número de indivíduos identificados com região A+T maior para cada localidade foi: Colonia-Uy (N=3), San Antonio-Uy (N=3), Barquisimeto-Ve (N=2), Juangriego-Ve (N=11), Ciro Redondo-Cuba (N=3) e Pinheiro Machado-Br (N=3). Apenas uma amostra de cada ferida foi escolhida para sequenciamento, para não ocorrer re-amostragem de mitocôndrias de mesma origem materna.

6.2.2 Verificação da variação de tamanho na região A+T

Para dar início ao trabalho, verificou-se se a variação de tamanho encontrada estava localizada realmente na região A+T do DNAm_t ou se não era devido a algum artefato da técnica de PCR. Para tanto duas estratégias foram utilizadas: A primeira envolveu a amplificação de um segmento com o par de “primers” N2-N-327 e SR-J-14941 (Oliveira *et al* 2006), adjacentes à região A+T; o primeiro se liga ao DNAm_t de *C. hominivorax* no gene da Dehidrogenase subunidade 2 (ND2), logo antes do conjunto de tRNAs que antecedem a região A+T, e o segundo se liga ao gene do RNA ribossômico12S (rRNA12S), logo após o último par de bases da região A+T. As amplificações e verificação dos fragmentos foram conduzidas conforme descrito para o fragmento da região controle utilizada na técnica de PCR-RFLP (“metodologia detalhada”). Todas as amplificações revelaram um único fragmento de aproximadamente 500pb (amostra de Cuba) a 1000pb (amostra de San Antonio-Uy) maior do que o tamanho padrão já descrito para a região controle de *C. hominivorax* (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000), indicando que a variação de tamanho estava localizada na região controle.

A segunda estratégia envolveu a análise por RFLP do DNAm_t total de algumas amostras, com o objetivo de certificar se a variação de tamanho não era devido a um artefato da técnica de PCR. O RFLP total só foi conduzido nas amostras do Uruguai e na amostra de Juangriego-Ve, pois estavam em melhor estado de conservação. Os procedimentos de RFLP total estão descritos no apêndice B deste trabalho. As amostras foram analisadas com 3 ou 4 enzimas e os padrões de restrição obtidos com as diferentes enzimas revelaram que o DNAm_t das amostras analisadas, tanto do Uruguai como da Venezuela, possuem aproximadamente 17kb (e não ~16 Kb, como o descrito para a espécie por Lessinger *et al.*, 2000). O resultado confirmou que a variação de tamanho encontrada não era decorrente de um artefato da técnica de PCR.

6.2.3 Amplificação, clonagem e sequenciamento da região A+T

A amplificação da região A+T dos indivíduos foi conduzida nas condições descritas em Litjens *et al.* (2001). Foram utilizados diferentes conjuntos de “primers” para se conseguir sequenciar toda a região: TI-N-24 (Simon *et al.* 1994) e SR-J-14941 (Oliveira *et al.*, 2006), SCR-A (5'-GACCAAAAATAAATTTTTGC-3') e SR-J-14941, e TI-N-24 e SCR-B (5'-CTATAAAGTTTAATGATTTC-3') (Figura 6.1).

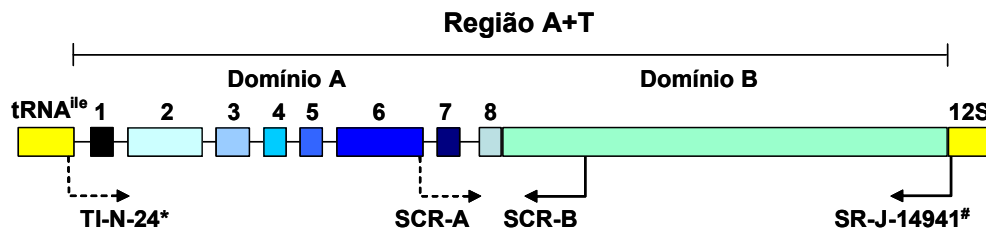


Figura 6.1. Representação da região A+T de *Cochliomyia hominivorax* descrita por Lessinger & Azeredo-Espin (2000) As setas indicam as posições de hibridização dos oligonucleotídeos. Domínio A: domínio conservado; números 1 a 8 representam blocos de sequência conservada (BCSI a BSCVIII); Domínio B: Domínio variável; tRNA-ile e 12S: genes flanqueados da região A+T, RNA transportador da isoleucina e rRNA subunidade 12S. * Simon et al 1994, # Oliveira *et al* 2006

Os “primers” SCR-A e SCR-B foram desenvolvidos neste trabalho e foram desenhados com o auxílio do programa “GeneRunner” (www.generunner.com). Os dois “primers” são internos a sequência da região A+T, sendo um localizado no Domínio A (SCR-A) e outro localizado no Domínio B (SCR-B) (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000).

A clonagem foi conduzida com os “Kits” “TOPO[®]-TA Cloning” ou “TA Cloning”, (Life Technologies/Invitrogen). Os produtos de PCR foram purificados através de diálise em filtro Millipore VM 0.05 μ m, com tampão de eluição 1 X TE pH 7.4; após a purificação, 2 a 4 μ l dos produtos de PCR foram adicionados à reação de ligação com o vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] e solução de sal; a transformação foi conduzida em células quimicamente competentes de *E. coli*; para cada fragmento clonado foram selecionadas de 15 a 20 colônias para extração plasmidial.

O sequenciamento automático das regiões amplificadas foi realizado em sequenciador ABI 377 ou ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com o protocolo otimizado de sequenciamento do “Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (ABI Prism[™], Perkin Elmer), com os “primers” específicos do plasmídeo (M13 direto ou M13 reverso). Para minimizar os erros provenientes da PCR, foram sequenciados no mínimo 3 clones nos dois sentidos para cada amostra; quando possível, procurou-se sequenciar clones provenientes de diferentes reações de amplificação. Em caso de dúvida sobre alguma base, foram sequenciados mais dois clones do fragmento.

Para cada uma das amostras que tiveram a região controle sequenciada, também foi sequenciado um fragmento do gene COII (segundo procedimento descrito no Parte II, item 7 desta tese). Esse procedimento teve o objetivo auxiliar na análise da relação entre os indivíduos

aqui amostrados e de fazer uma análise comparativa do polimorfismo encontrado na região A+T com o do gene COII, para avaliar de forma preliminar e exploratória a utilidade dessa região para futuros estudos populacionais.

6.2.4 Análise das seqüências

Os cromatogramas obtidos para cada amostra foram avaliados manualmente usando o programa FinchTV versão 1.4.0 (Geospiza Inc.) e as seqüências referentes às partes do vetor foram excluídas. O alinhamento automático das seqüências obtidas foi realizado através do programa de alinhamento múltiplo CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) e os alinhamentos foram ajustados manualmente no programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) pois o programa não pode encontrar o melhor ajuste. As seqüências dos diferentes clones de cada indivíduo foram alinhadas e comparadas para a construção de uma seqüência consenso. O programa Cap3 (Huang & Madan, 1999) foi utilizado para montagem das seqüências; a ocorrência de elementos repetidos nas regiões seqüenciadas foi investigada com o auxílio do programa DOTLET (Junier & Pagni 2000), baseado no alinhamento diagonal de pares de seqüências nucleotídicas.

A análise comparativa entre as seqüências foi realizada no programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). A relação entre as amostras foi explorada através da construção de árvores pelo método UPGMA (“Unweighted pair group method with arithmetic means” - Sneath & Sokal, 1973), utilizando-se distância p e re-amostragem (“bootstrap”) de 1000 repetições.

6.3 Resultados

A tabela 6.2 descreve o tamanho da região A+T de cada amostra de *C. hominivorax* seqüenciadas, bem como o tamanho de cada domínio característico dessa região. Ainda não foi possível concluir a caracterização das amostras de Pinheiro Machado-RS, Brasil (BPM1 e BPM2, tabela 6.1).

Em todas as outras amostras seqüenciadas foi possível identificar os dois domínios (A e B) da região A+T de *C. hominivorax* previamente descritos em Lessinger & Azeredo-Espin (2000). A maior variação de tamanho entre os indivíduos ocorreu no domínio A (tabela 6.2) e representa um aumento de 46% a 83% no tamanho total dessa região, quando comparada com a região A+T já descrita para a espécie (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000).

Tabela 6.2. Tamanho observado da região A+T do DNAm de *Cochliomyia hominivorax* dos indivíduos analisados. # Ch_GB: Amostra GeneBank, número de acesso: NC_002660.

Amostra	Domínio A (pb)	Domínio B (pb)	Total (pb)
CCR1	1183	535	1718
CCR2	628	559	1187
VJU1	1541	532	2063
VJU2	640	523	1163
VBA1	1525	538	2073
VBA2	639	529	1168
UST1	1623	537	2160
UST2	640	543	1183
UCO1	1505	540	2045
UCO2	639	546	1185
UDA1	643	537	1180
Ch_GB#	642	537	1179

A variação de tamanho encontrada entre os indivíduos com região A+T de tamanho padrão (tabela 6.2), se deu principalmente pela variação no número de bases nos blocos de seqüência conservada BCSI e BCSVIII do Domínio A (poli-T/poli-A) ou por pequenas inserções/deleções de algumas bases no Domínio B.

A grande diferença de tamanho na região controle das amostras CCR1, VJU1, VBA1, UST1 e UCO1, é devido a presença de 2 ou 3 regiões repetidas em série no Domínio A

(visualizadas no programa DOTLET). As amostras VJU1, VBA1, UST1 e UCO1 apresentaram exatamente o mesmo padrão de variação: 3 repetições em série dos BCSII a BCSVII, só variando a posição de início e fim das repetições nos diferentes indivíduos. A amostra CCR1 apresentou um padrão muito semelhante, mas com apenas duas repetições, sendo que a primeira repetição incluiu, além dos BSC II a BSCVII, um fragmento do BCSVIII (apenas 9pb do poli-A) e parte do Domínio B (66pb); e a repetição presente nessa amostra é idêntica a primeira, sendo a única diferença o número de bases presente no poli-A (BCSVIII = 27 pb). O padrão de variação encontrado está esquematizado na figura 6.2.

As variações encontradas entre as repetições do mesmo indivíduo e entre indivíduos diferentes estão descritas na tabela 6.3. A comparação entre as repetições de cada indivíduo revelou nível de variação muito baixo, sendo que as repetições do indivíduo de Colonia-Uy (UCO) e do indivíduo Barquisimeto-Ve são idênticas entre si, as do indivíduo de San Antonio-Uy (UST) e Juangriego-Ve (VJU) apresentaram apenas uma variação e as repetições de Ciro Redondo-Cb (CCR) foram idênticas, exceto pelo número de bases do BCSVIII. A variação encontrada entre as repetições de indivíduos diferentes foi maior do que entre a encontrada entre repetições do mesmo indivíduo, principalmente devido à posição de início e diferença de tamanho das repetições (Tabela 6.3, Figura 6.2).

Figura 6.2 - Esquema representando a variação de tamanho encontrada na região A+T de *Cochliomyia hominivorax*. Números 1 a 8 no domínio A representam os blocos conservados de sequência BCSI a BCSVIII. Tamanho de cada domínio ou repetição está indicado no esquema. A seta e número representam a posição de início das repetições. Amostras: Ch_GB (GenBank: NC_002660). As amostras estão descritas na tabela 6.2

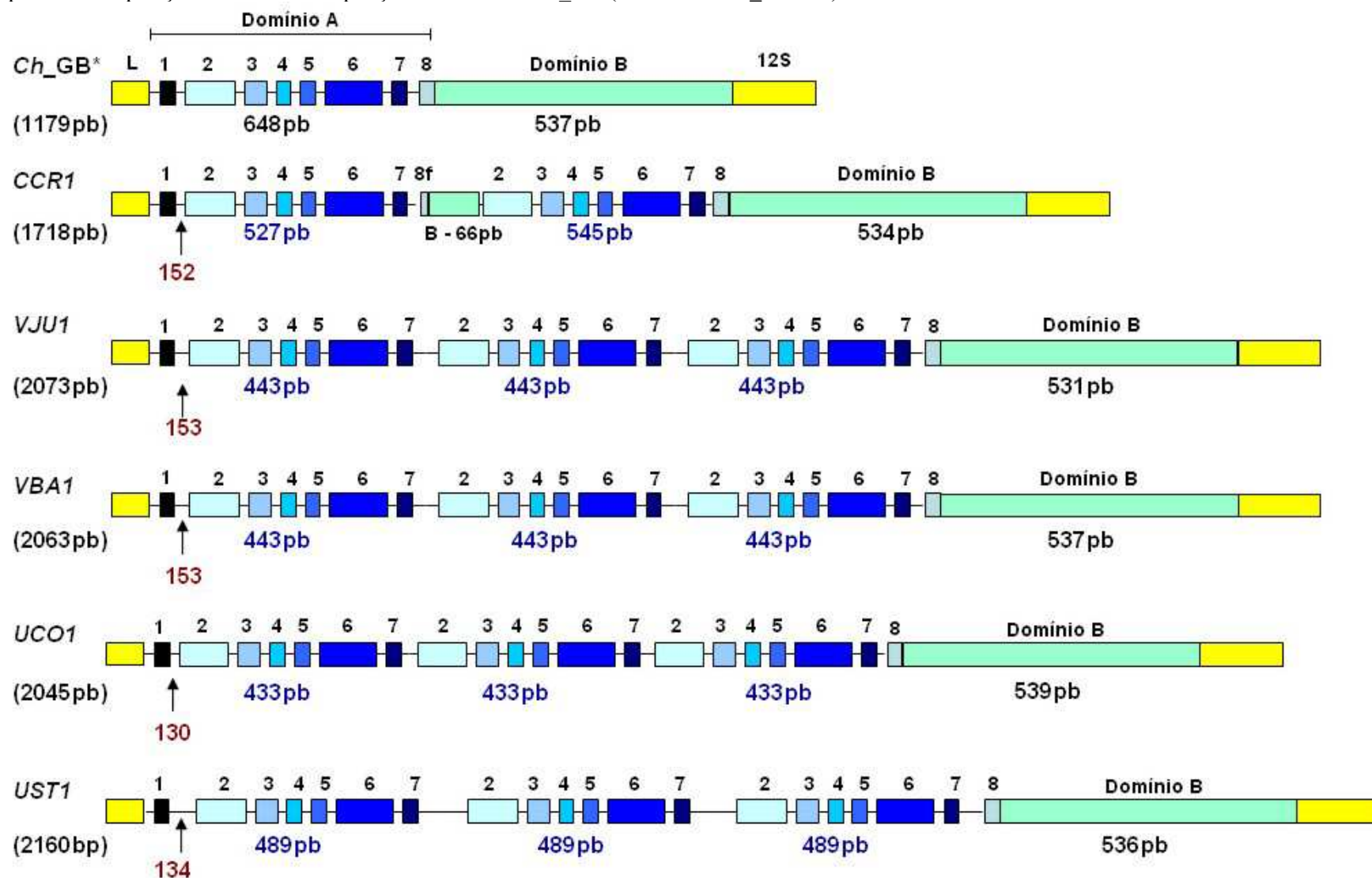


Tabela 6.3- Esquema de alinhamento das repetições das amostras de *C. hominivorax* com variação de tamanho na região A+T. Rep A, B e C: repetições de cada indivíduo; em verde, bases que variam entre repetições do mesmo indivíduo. Início e fim: posições relativas quando todas as repetições foram alinhadas (considerando inclusive “gaps”). Tam: Tamanho da repetição em cada indivíduo * amostra CCR1-Cuba apresenta diferença de 18 pares de base no BCSVIII: repetição A = 9 Adeninas (A) e repetição B = 27 Adeninas (A).

Amostra	Rep	Tam.	Início	Fim	Posição relativa do sítio variável					
					28	106	138	214	249	455
UCO1	A	433	1	433	G	A	A	C	A	
	B	433	1	433	G	A	A	C	A	
	C	433	1	433	G	A	A	C	A	
UST1	A	489	3	491	G	G	A	C	G	A
	B	489	3	491	A	G	A	C	G	A
	C	489	3	491	A	G	A	C	G	A
CCR1*	A	527	21	566	A	G	A	T	G	G
	B	545	21	566	A	G	A	T	G	G
VJU1	A	443	23	465	A	G	A	C	G	G
	B	443	23	465	A	G	G	C	G	G
	C	443	23	465	A	G	A	C	G	G
VBA1	A	443	23	465	A	G	A	C	G	G
	B	443	23	465	A	G	A	C	G	G
	C	443	23	465	A	G	A	C	G	G

A relação entre os indivíduos foi investigada pela construção de árvores utilizando: (I) as seqüências completas da região A+T, (II) somente as seqüências do domínio B da região A+T e (III) as seqüências do gene COII das amostras. A figura 6.3 apresenta as 3 árvores obtidas.

O padrão de relação entre os indivíduos, revelado pelas três árvores, é muito semelhante. É possível identificar que as amostras de Cuba (CCR1 e CCR2) são bem diferentes das outras amostras (Figura 6.3), porém não existe um padrão claro para a diferenciação entre as amostras da Venezuela e Uruguai. As amostras que apresentaram grande variação de tamanho, devido á presença de repetições em série de blocos do domínio A, aparecem em todos os ramos das árvores, sugerindo que não devem ter surgido de um evento único.

Com a análise do fragmento COII, foram identificadas 6 seqüências diferentes entre os 12 indivíduos analisados (9 sítios variáveis em 549 pares de base: divergência de 1,6%).

Na análise do Domínio B da região A+T cada indivíduo analisado apresentou uma seqüência única, portanto foram identificadas 12 seqüências distintas (20 sítios variáveis;

divergência de 3,4%). Além da variação de sítio o Domínio B apresenta uma região repetitiva de (TTA) que varia em número de repetições de 4 a 11 nas amostras analisadas (principal responsável pela variação de tamanho entre os indivíduos no Domínio B). A análise utilizando toda a região controle apresentou uma divergência menor do que apenas o Domínio B (2,4%; 30 sítios variáveis excluídas as partes repetitivas das seqüências de A+T maior).

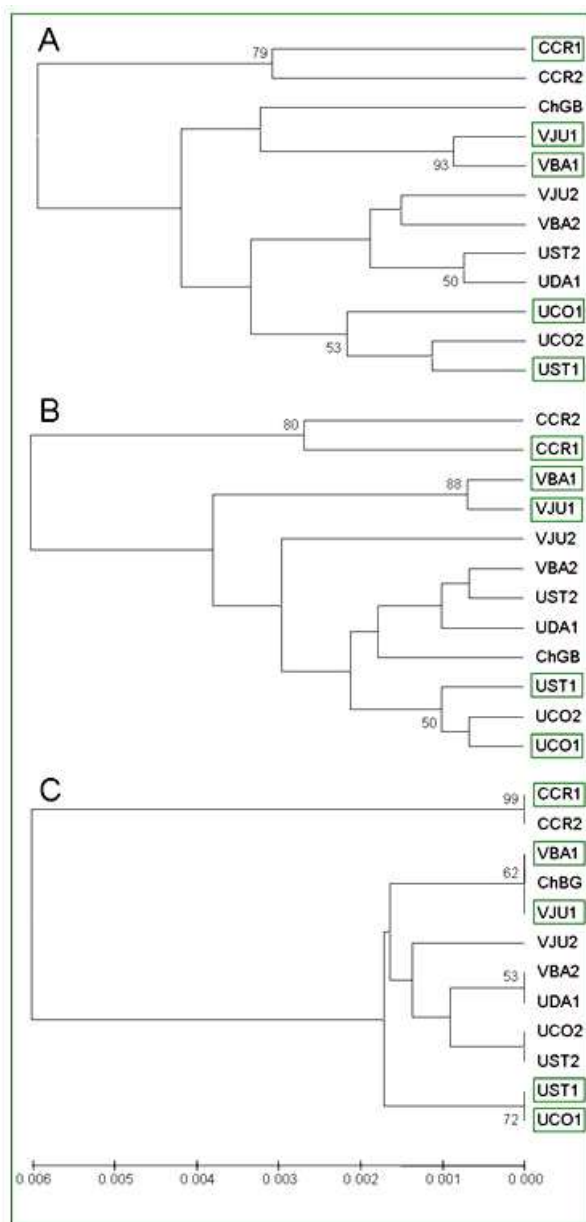


Figura 6.3- Árvores obtidas pelo método de UPGMA, representando relações entre indivíduos seqüenciados de *C. hominivorax*. Indivíduos com variação de tamanho na região A+T estão sinalizados com quadrados em cada uma das árvores. A-Árvore obtida com seqüência completa da Região A+T (1163-2160pb); B- Árvore obtida com seqüência do Domínio B da região A+T (523-559 pb); C- Árvore obtida com seqüência do gene COII (549 pb)

6.4 Discussão

6.4.1 Variação de tamanho da região A+T

Na região A+T do DNAm_t de insetos, a variação intra-específica de tamanho causada por um número variável de seqüências repetidas já foi observada em diversos grupos, entre eles: Díptera (Ex: Lewis *et al.*, 1994, Tsujino *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2007), Ortóptera (Zhang *et al.*, 1995), Coleóptera (Boyce *et al.*, 1989; Mardulyn *et al.*, 2003), Plecóptera (Schultheis *et al.*, 2002) e Lepidóptera (Snäill *et al.*, 2002). A presença de elementos repetidos na região controle do DNAm_t não é rara também em outros grupos de animais, como moluscos, grilos, abelhas, nematodos, mamíferos, aves e peixes (ver Lewin *et al.*, 1994)

Lewis *et al.* (1994) estudando a espécie *Drosophila melanogaster* identificaram dois blocos de seqüências, constituídos por elementos repetitivos: um bloco constituído por elementos de diferentes tamanhos (338-373pb) e que possuíam vários sítios variáveis (repetições do tipo I) e outro bloco constituído por elementos repetitivos com exatamente o mesmo tamanho e seqüências quase idênticas (repetições tipo II). O bloco de seqüências tipo II foi identificado entre os dois trechos de seqüência poli-T (ou poli-A complementar) e é formada por quatro repetições de 464 pares de base, cada uma contendo elementos conservados identificados em outras espécies de Drosofilídeos (blocos de seqüência conservado-BCS, caracterizados por Zhang & Hewitt, (1997)). Alguns anos mais tarde Tsujino *et al* (2002), identificaram repetições do tipo II em outras três espécies de *Drosophila* (*D. simulans*, *D. mauritiana* e *D. sechellia*).

A significativa variação de tamanho encontrada nesse trabalho, para a região A+T de *C. hominivorax*, é devido a presença de seqüências repetitivas dos blocos conservados BCSII a BCSVII, localizado entre os trechos de poli-A/poli-T. Essa variação é muito semelhante ao relatado por Lewis *et al* (1994) para *D. melanogaster* e Tsujino *et al* (2002) para outros Drosofilídeos, e portanto as repetições de *C. hominivorax* foram classificadas como tipo II também nessa espécie.

As amostras de *C. hominivorax* que apresentaram repetições do tipo II, e portanto grande variação de tamanho na região A+T, não apresentaram repetições dos trechos de seqüência poli-T (poli-A) (BCSI e BCSVIII) mas sim dos BCSII a BCSVII, previamente descritos em Lessinger & Azeredo-Espin (2000). Isso pode sugerir que os blocos BCSI e BCSVIII também estão diretamente envolvidos na sinalização do início da replicação e/ou controle da transcrição do DNAm_t na espécie *Cochliomya hominivorax*, como sugerido anteriormente para outras espécies

por Clary & Wolstenholme (1987), Lewis *et al.* (1994), Zhang *et al.* (1995), e mais recentemente identificado por Saito *et al.* (2005) para algumas espécies. A única ressalva a essa sugestão é o fato da amostra de Cuba (CCR1) apresentar duplicação parcial do BCSVIII, porém a sinalização pode depender da existência de trechos maiores de sequência poli-A, e não apenas dos 9 pares de base observados na repetição A de CCR1.

A presença de blocos de sequência conservada (BSC) na região controle do DNAm_t de diversas espécies é usualmente interpretada como regiões que possuem alguma função biológica na mitocôndria relacionada a replicação ou transcrição (ver Zhang & Hewitt, 1997). A variação intra-específica observada em *C. hominivorax* quanto à presença ou número de repetições que incluem os BSCII a BSCVII (variação intra-específica também observada em *D. simulans*, por exemplo- Tsujino *et al.*, 2002) pode sugerir que as possíveis funções associadas a esses BSCs sejam mais dependentes da estrutura secundária formada do que dos determinantes da sequência primária.

Os mecanismos que envolvem a formação dos elementos repetitivos de sequência de DNA ainda não estão claros. Eventos como (1) “escorregamento da polimerase durante a replicação replicação” (“replication slippage”) e (2) “recombinação homóloga” já foram citados na literatura como possíveis geradores dessas repetições (Almasan & Mishra, 1991; Lewis *et al.*, 1994; Fumagalli *et al.*, 1996). Dentre esses dois processos, o primeiro foi sugerido como possível hipótese para explicar a ocorrência das repetições em *Drosophila* (Lewis *et al.*, 1994); este processo poderia ocorrer se, no momento da replicação, a extremidade da fita não pareada do DNAm_t formasse uma estrutura secundária, que não permitiria um pareamento correto ao final da replicação, e poderia resultar na formação de 2 fragmentos idênticos consecutivos. A alta similaridade entre as repetições de *C. hominivorax*, que incluem blocos que eventualmente poderiam formar estrutura secundária, pode sugerir a ocorrência desse processo na geração das repetições nesta espécie.

A alta similaridade entre as repetições de um indivíduo, em contraste com a maior variação encontrada entre repetições de indivíduos diferentes, permite ainda diferentes interpretações sobre o evento de duplicação, independente do processo envolvido na formação das repetições: A comparação entre início e fim das repetições, bem como a conservação entre as repetições de um mesmo indivíduo, sugere que o evento de replicação pode ter ocorrido de forma independente nos indivíduos de cada localidade (ainda que os indivíduos com variação de tamanho da Venezuela sejam mais parecidos - Figura. 6.2, Tabela. 6.3).

A similaridade das repetições também pode ser devido ao evento de duplicação ser muito recente, porém pode-se imaginar que algum mecanismo, como evolução em concerto, pode ser responsável pela homogeneização das repetições nos indivíduos. As evidências para a existência, ou não, de um mecanismo como evolução em concerto não são claras, porém existência de um mecanismo como este já foi sugerido anteriormente por Mardulyn *et al.* (2003) quando compararam repetições existentes na região controle de besouros, e mais recentemente por Tatarenkov & Avise (2007), em "killifish" de manguezal (*Kryptolebias marmoratus*).

Embora existam alguns trabalhos sobre modelos de replicação do DNAm em insetos, ainda é necessário a obtenção de um maior conhecimento sobre este processo, como por exemplo direção e local de origem da replicação, bem como de todo o processo de transcrição, antes de se tirar conclusões sobre a função dos blocos de sequência conservada ou sobre o papel das repetições identificadas em *Cochliomyia hominivorax*.

6.4.2 Variação intra-específica

Em insetos, apesar de serem muitos os estudos para caracterização da organização estrutural e a detecção de sítios associados ao controle da replicação no DNAm, foi só nos últimos anos que essa região foi reconhecida como um marcador apropriado para se estudar polimorfismos genéticos e estrutura populacional de espécies (Dotson & Beard, 2001; Rondan Dueñas *et al.*, 2002; Mardulyn *et al.* 2003; Townsend & Rand, 2004; Vila & Björklund, 2004).

Os possíveis motivos para se negligenciar historicamente essa região do genoma para estudos populacionais de insetos, podem estar ligados a problemas técnicos em se obter amplificações boas ou sequências dessa região (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000; Dotson & Beard, 2001; Vila & Björklund, 2004). A falta de “primers” específicos para amplificação dessa região, o alto conteúdo de A+T, que dificulta a construção de “primers”, e a presença de elementos repetitivos estão entre os problemas técnicos envolvidos. Os avanços obtidos nas técnicas de sequenciamento, a construção de “primers” específicos para espécies ou grupo de espécies e a caracterização da região em diferentes espécies, identificando blocos de sequência conservados que podem auxiliar a construção de novos “primers” específicos, tem resolvido muito os problemas relacionados com o sequenciamento da região (ex: Lessinger & Azeredo-Espin, 2000; Oliveira *et al.*, 2006).

A variação de tamanho da região A+T tem sido uma importante estratégia para estudos populacionais. Por exemplo, Schultheis *et al.* (2002) estudando duas espécies do grupo Plecóptera, demonstraram que a presença de regiões repetidas na região controle do DNAm^t podem ser úteis na determinação de diferenciação genética entre as populações estudadas. Porém salientaram que o uso de repetições na região A+T em estudos populacionais pode depender da espécie analisada. Rondan Dueñas *et al* (2002) demonstraram que variações na região controle de *Aedes aegypti*, em tamanho ou sítios de restrição, é informativa para estudos populacionais, quando outros marcadores revelam pouco polimorfismo.

Em *C. hominivorax*, o polimorfismo de tamanho na região A+T é um evento relativamente raro (~1,0% Lyra *et al.*, *in press*) e, apesar de ser diferente entre as localidades, isso sugere que o uso das repetições (duplicações) da região A+T em estudos populacionais pode ser pouco informativo.

Por outro lado, a investigação da sequência da região A+T revelou alto polimorfismo, mesmo na análise de poucos indivíduos. Dos 12 indivíduos analisados, todos apresentaram uma sequência única. Quando foram comparadas as sequências do gene COII dos mesmos indivíduos, observamos apenas 6 sequências diferentes, revelando uma maior variação intra-específica na espécie.

Dentro da região A+T, o Domínio B apresentou maior variação de sítio entre todos os indivíduos, e por isso sugerimos que esta pode ser uma boa região para analisar a variação entre as populações. Uma vantagem da análise do Domínio B de *C. hominivorax* como marcador populacional é a existência de “primers” que facilitam sua amplificação e posterior sequenciamento. Por exemplo, isso pode ser feito com o uso do “primer” SCRA, descrito nesse trabalho, juntamente como o “primer” SR-J-14941 (Oliveira *et al.*, 2006).

Com esses resultados preliminares, concluímos que o uso da região A+T (Domínio B) associado a outro marcador como o COII, pode auxiliar como marcador molecular para investigação da variabilidade e a estrutura genética intra-específica de *C. hominivorax*, principalmente numa escala microgeográfica. Isso deve possibilitar a inclusão de mais informações para a construção de um cenário mais completo da complexidade da estrutura populacional já revelada para essa espécie (Lyra *et al.*, *in press*).

7. “*Cochliomyia hominivorax* em Cuba: Nova perspectiva sobre endemismo e introdução da praga no Caribe”.

7.1 Introdução

A região que compreende as grandes Antilhas (Cuba, Jamaica e “Hispaniola” - Haiti e República Dominicana) é a única região da América Central onde a presença da mosca da bicheira ainda é considerada um sério problema para saúde pública e animal (FAO 1999, 2003, Vargas-Téran *et al.*, 2005).

Essas ilhas tem sido o principal foco de atenção de projetos que envolvem controle e erradicação da praga pelo uso de SIT (Vargas-Téran *et al.*, 2005), não só por que a mosca causa grandes prejuízos para a pecuária, mas também por que a presença desta nas ilhas é um potencial risco para re-introdução de *C. hominivorax* nos países da América do Norte e Central que são considerados hoje livre da mosca da bicheira.

No ano de 1995, um projeto piloto para erradicação da mosca da bicheira em Cuba teve início na “Isla de la Juventud”, mas as atividades de liberação de mosca nunca foram iniciadas devido a problemas financeiros e diplomáticos (FAO 1999). Em 1998, o governo da Jamaica iniciou um programa de controle da praga utilizando a técnica do SIT, com assistência e cooperação dos governos dos Estados Unidos, México e da Agência Internacional de Energia Atômica (FAO 2003, Vargas-Téran *et al.*, 2005). Esse programa é o único caso problemático de erradicação de *C. hominivorax* envolvendo o SIT, sendo que pouco progresso se obteve até os dias atuais (Dyck, Reyes Flores *et al.*, 2005). Apesar do insucesso ter sido atribuído a problemas operacionais, foi reconhecida a necessidade de se obter mais informações sobre ecologia e dinâmica das populações naturais da mosca, que podem ser acessados indiretamente pelo uso de marcadores moleculares (Dyck, Reyes Flores *et al.*, 2005; Krafur, 2005).

Recentemente a diversidade e estrutura de populações de *C. hominivorax* no Caribe foi investigada por marcadores do DNAm (Lyra *et al.*, *in press*– Parte II, Artigo 2) e microssatélites (Torres & Azeredo-Espin, *in press*). Os resultados gerais obtidos nos dois trabalhos apontam para uma maior diferenciação populacional da espécie na região, o que favorece a implantação de programas de erradicação. Porém os dois trabalhos diferiram quanto às estimativas de diversidade, o que levou a formulação de hipóteses sobre a história evolutiva dessa praga na região do Caribe (detalhes em Lyra *et al.*, *in press*).

Dentre as populações estudadas, os dados de PCR-RFLP do DNAm_t (Lyra *et al.*, *in press*), revelaram que as populações de Cuba são as mais diferenciadas com relação as outras populações do Caribe e da América do Sul. A baixa diversidade encontrada nessas populações foi atribuída à alta frequência de um único haplótipo (H8 - 85%-100%), que se apresentou relativamente raro no continente Sul-Americano. A grande divergência entre as populações foi atribuída à ausência ou a baixa frequência do haplótipo H8 nas outras ilhas.

Baseado nos resultados obtidos com DNAm_t, Lyra *et al.* (*in press*) propuseram que as ilhas do Caribe tiveram diferentes histórias quanto a colonização pela praga. Foi proposto que a introdução de *C. hominivorax* na Jamaica, República Dominicana e Trinidad & Tobago teve origem Sul-Americana enquanto que as populações de Cuba possivelmente tiveram origem de outras populações, na América do Norte ou Central.

Tendo em vista os resultados obtidos para populações de *C. hominivorax* no Caribe, o presente trabalho teve como objetivo principal estudar as populações de Cuba, na tentativa de se obter um cenário mais claro sobre o sistema e a complexidade das relações entre as populações dessa praga nas ilhas do Caribe. Para tanto, tentou-se responder duas questões principais através do sequenciamento de um fragmento do gene COII do DNAm_t: (1) se o haplótipo H8 presente em amostras das localidades de Cuba é igual ao encontrado no continente e outras ilhas, (2) qual é a semelhança entre as amostras das ilhas e do continente com base nas seqüências de DNAm_t.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Amostras

Amostras haplótipo H8: As amostras utilizadas nesse trabalho foram selecionadas dentre as utilizadas no trabalho de Lyra *et al.* (*in press*; Parte II Artigo 2). Foram seqüenciadas 54 amostras de feridas diferentes, todas representadas como haplótipo 8 (H8) na análise de PCR-RFLP (Tabela 7.1).

Tabela 7.1 - Localidades amostradas com indivíduos de *Cochliomyia hominivorax* com haplótipo H8 de PCR-RFLP (Lyra *et al.*, *in press*). CB: Cuba; DR: República Dominicana; JM: Jamaica; EC: Equador; BR: Brasil, Py: Paraguai; Uy: Uruguai. N H8=número de amostras identificadas com o haplótipo H8, N seq= número de indivíduos seqüenciados.

	Localidade	Latitude	Longitude	N H8	N seq
CB	Pinar del Rio	22°25' N	83°41' W	10	9
	Ciego de Ávila	21°50' N	78°46' W	13	13
	Santiago de Cuba	20°01' N	75°49' W	7	5
	Ciro Redondo	21°53' N	82°54' W	9	6
DR	Santo Domingos	18°28' N	59°63' W	1	1
JM	Kingston	17°59' N	76°47' W	1	1
EC	S.D. de los Colorados	0°15' S	79°10' W	4	4
	S.M. das Barreiras	08°52' S	49°42' W	3	3
BR	Cocalinhos	14°22' S	51°00' W	2	1
	Caiaônia	16°57' S	51°48' W	2	2
	Campo Grande	20°27' S	54°36' W	1	1
	Campinas	22°48' S	47°03' W	2	2
	Carambeí	24°55' S	50°05' W	1	1
	Fagundes Varela	28°52' S	51°41' W	1	1
	S.A. das Missões	29°04' S	56°19' W	2	2
Py	Ybytymi	25°46' S	56°41' W	1	1
Uy	Dayman	31°33' S	57°57' W	1	1
Total				61	54

Outras amostras: Para fazer uma análise comparativa geral entre populações de Cuba e outras ilhas do Caribe e do continente, foram seqüenciadas algumas amostras representando os diferentes haplótipos mitocondriais identificados em Lyra *et al.*, (*in press*). A Tabela 7.2 indica o país de origem e o número de indivíduos analisados por localidade.

Além das amostras de populações naturais, foram analisados 12 indivíduos provenientes de 6 linhagens de laboratório mantidas na Biofábrica de *Cochliomyia hominivorax* do APHIS-USDA, Fargo, Dakota do Norte, EUA. Essas amostras foram oficialmente doadas pelo pesquisador Richard L. Roehrdanz (APHIS-USDA) para a Profª Ana Maria Lima de Azeredo-Espin na década de 90 e armazenadas em freezer -70°C até o momento da extração de DNA. As linhagens analisadas foram: (1) 009, proveniente do Texas, EUA, (2) “Cañas”, Cañas, Costa Rica, (3) OW87 de Orange Walk, Belize, (4) FC96 de Chiapas, México, (5) V81 de Veracruz, México e (6) Jam3B, Jamaica. Todas as amostras foram coletadas originalmente nas localidades indicadas e transferidas para a biofábrica (detalhes em Dev, La Chance & Whitten, 1986 e Roehrdanz, 1989). As amostras coletadas em populações da América do Norte e Central

continental foram obtidas antes da erradicação da espécie nos países e são as únicas que pudemos obter como representativas da diversidade das localidades citadas.

Antes do sequenciamento dessas amostras elas foram genotipadas quanto ao haplótipo de PCR-RFLP, seguindo o procedimento descrito em “metodologia detalhada”. As amostras apresentaram o haplótipo H8 de PCR-RFLP, exceto os dois indivíduos Jam3B que são haplótipo H1 (Tabela 7.2).

Tabela 7.2 - Número de indivíduos seqüenciados (N seq) e haplótipos mitocondriais amostrados por país.
* Haplótipos identificados em Lyra *et al.* (2005) e Lyra *et al.* (*in press*).

Localidades		N seq	Haplótipos mitocondriais*
América do Norte e Central	EUA	2	H8
	México (V81)	2	H8
	Mexico (FC96)	2	H8
	Belize (OW87)	2	H8
	Costa Rica (Cañas)	2	H8
Caribe	Cuba	4	H3, H17, H18
	Jamaica (Jam3B)	2	H1
	Jamaica	4	H1
	Rep Dom	5	H1
	Trin. & Tob	3	H1, H3
América do Sul	Colombia	4	H1, H3
	Venezuela	9	H1, H3, H4, H10, H14, H15
	Brasil	6	H1, H3, H4, H11, H13, H16
	Uruguay	11	H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H9, H12
	Paraguai	3	H1, H3, H4
Total		61	

7.2.2 Amplificação e sequenciamento

A região escolhida para investigação foi um fragmento do gene COII, onde foram mapeados alguns sítios de restrição das enzimas marcadoras. As reações de amplificação foram conduzidas utilizando-se o par de “primers” TL2-J-3034 e TK-N-3785 (Simon *et al.*, 1994), conforme descrito em Litjens *et al.* (2001). Os produtos da reação de amplificação foram verificados conforme descrito na “metodologia detalhada” (desse trabalho). Estes produtos de amplificação foram purificados utilizando-se o kit QIAquick® (Qiagen), segundo especificações do fabricante. O sequenciamento automático da região amplificada foi realizado em seqüenciador

ABI3700 (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo otimizado de sequenciamento do “Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (ABI PrismTM, Perkin Elmer), com os mesmos oligonucleotídeos usados na reação de amplificação (desta vez em reações diferentes).

Os cromatogramas obtidos para cada amostra foram avaliados manualmente usando o programa FinchTV versão 1.4.0 (Geospiza Inc.) e os valores das bases nucleotídicas foram estabelecidos usando o algoritmo do programa PHRED (Ewing *et al.*, 1998a,b) como está implementado no AMIGA (<http://amiga.cbmeg.unicamp.br/>, Feijão *et al.*, 2006). A sequência “consenso” de cada indivíduo foi montada com o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) levando-se em consideração os valores de qualidade de cada base nucleotídica.

7.2.3 Análise das seqüências

O alinhamento das seqüências obtidas foi realizado através do programa de alinhamento múltiplo ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Foram obtidos e analisados 549pb do gene COII de todos os indivíduos e os polimorfismos observados foram confirmados nos cromatogramas. As seqüências foram classificadas em haplótipos.

A relação entre os indivíduos foi explorada com o programa MEGA4 (Tamura *et al* 2007), através da construção de uma árvore pelo método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means” - Sneath & Sokal, 1973), com re-amostragem (“bootstrap”) de 1000 repetições e usando número de diferenças como medida de distância. A relação entre os haplótipos também foi analisada de forma exploratória através da construção de uma rede de relacionamento através do método de “análise de parcimônia estatística” (Templeton *et al.*, 1992) implementada no programa TCS versão 1.21 (Clement *et al.*, 2002). Nessa análise, os pares de haplótipos são unidos pelo menor número de diferenças definido por um limite de confiança de 95% em que as mudanças “homoplásicas” não são incluídas. As ambigüidades da rede de haplótipos obtida foi resolvidas seguindo as indicações propostas por Crandall & Templeton (1993).

7.3 Resultados

Dentre os 115 indivíduos analisados no total, foram identificados 35 haplótipos de sequência (Tabela 7.3) e 31 sítios polimórficos em 549 pb (diversidade 5,6%), sendo 10 sítios com substituições não sinônimas pontuais. A correspondência entre os haplótipos de sequência analisados e os haplótipos de PCR-RFLP está representada na tabela 7.3, bem como a região geográfica onde foram amostrados os haplótipos.

Dos 54 indivíduos analisados que representavam o haplótipo H8 de PCR-RFLP, foram obtidos 15 haplótipos de sequência em uma região de 549 pb do gene COII. Foram identificados 15 sítios polimórficos (diversidade 2,7%), e duas substituições não sinônimas pontuais. A figura 7.1 representa a árvore de relação entre os indivíduos analisados com haplótipo H8; foram identificados dois grandes grupos: (I) um formado pelas amostras H8 da América do Sul, juntamente com a da Jamaica e da República Dominicana – parte inferior da figura- e (II) outro formado pelas amostras H8 provenientes de Cuba – parte superior da figura.

Na análise conjunta de todos os indivíduos, os dois grandes grupos formados apenas com a análise do haplótipo H8 foram mantidos (Figura 7.2). No grupo I (quadrado azul, parte inferior da figura) foram agrupadas todas as amostras da América do Sul e das outras localidades do Caribe (Jamaica, República Dominicana e Trinidad & Tobago), e também as duas amostras de Cuba com haplótipos de PCR-RFLP H3 (Sequências 19 e 25 apontadas na figura 7.2). No grupo II foram agrupados, além das amostras de Cuba, as amostras provenientes da América do Norte e Central continental (amostras da biofábrica) – parte superior da figura marcada com quadrado verde.

Tabela 7.3. Haplótipos de sequência identificados (S), correspondência entre haplótipos de sequência e haplótipos PCR-RFLP (H) e região geográfica de ocorrência dos haplótipos. Amér. N e C: América do Norte e América Central continental (indivíduos da biofábrica); RDP: República Dominicana; JAM: Jamaica; T&T: Trinidad & Tobago; Amér. do Sul: América do Sul.

Seq	PCR-RFLP*	Amér. N e C	Caribe				Amér. Sul	Total
			CUBA	RDP	JAM	T&T		
S1	H8, H17	7	20					27
S2	H8		1					1
S3	H8	1						1
S4	H8, H18		8					8
S5	H8		1					1
S6	H8		1					1
S7	H8		1					1
S8	H8		1					1
S9	H8		1					1
S10	H8		1					1
S11	H8	2						2
S12	H1			1				1
S13	H1			1				1
S14	H1			2				2
S15	H1			1				1
S16	H1, H8						6	6
S17	H1						1	1
S18	H8						2	2
S19	H3		1					1
S20	H3					1		1
S21	H4, H16						2	2
S22	H4						1	1
S23	H6						1	1
S24	H9						1	1
S25	H3, H10, H13, H14, H15		1			1	9	11
S26	H3						1	1
S27	H1, H4, H8				1		8	9
S28	H1, H3				5	2	2	9
S29	H1, H5, H8						3	3
S30	H1				1			1
S31	H2						1	1
S32	H7, H8, H12						11	11
S33	H8						1	1
S34	H8			1				1
S35	H11						1	1
TOTAL		10	37	6	7	4	51	115

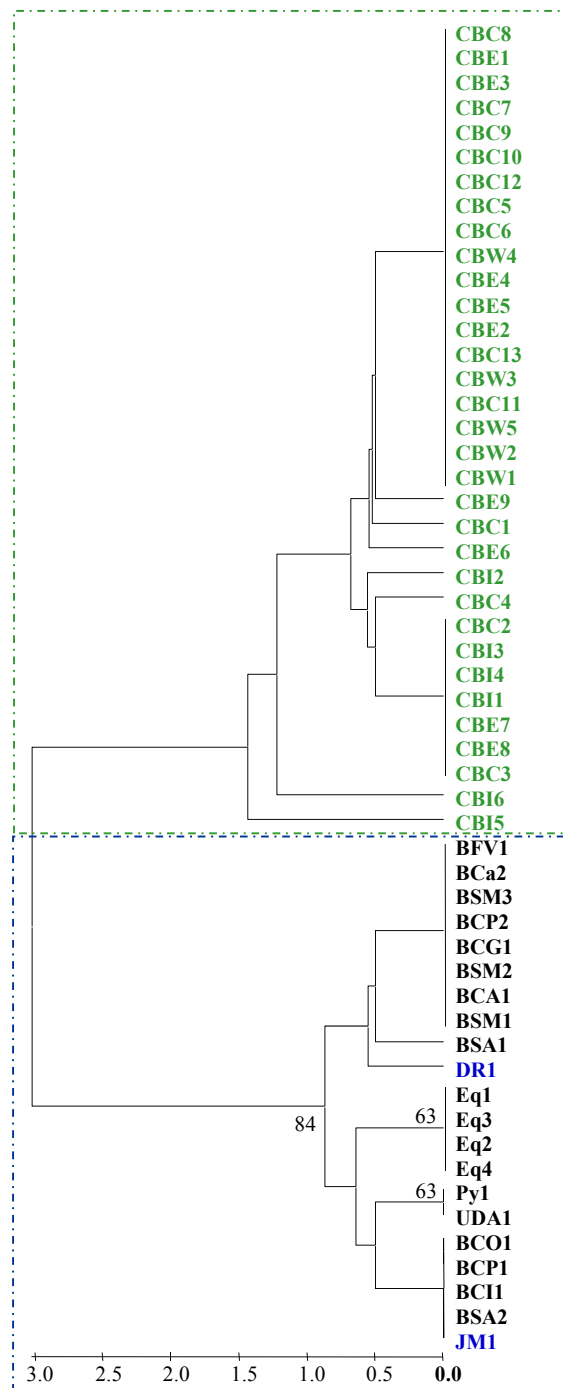


Figura 7.1- Árvore do gene COII, obtida pelo método UPGMA, para indivíduos de *Cochliomyia hominivorax* com haplótipo H8 de PCR-RFLP. Apenas os valores de bootstrap maiores que “50” foram mantidos nos ramos da árvore. Indivíduos em verde: amostras de Cuba; indivíduos em preto: amostras da América do Sul; indivíduos em azul: amostras da Jamaica e da República Dominicana. Os quadrados verde (superior) e azul (inferior) representam os dois grandes grupos identificados.

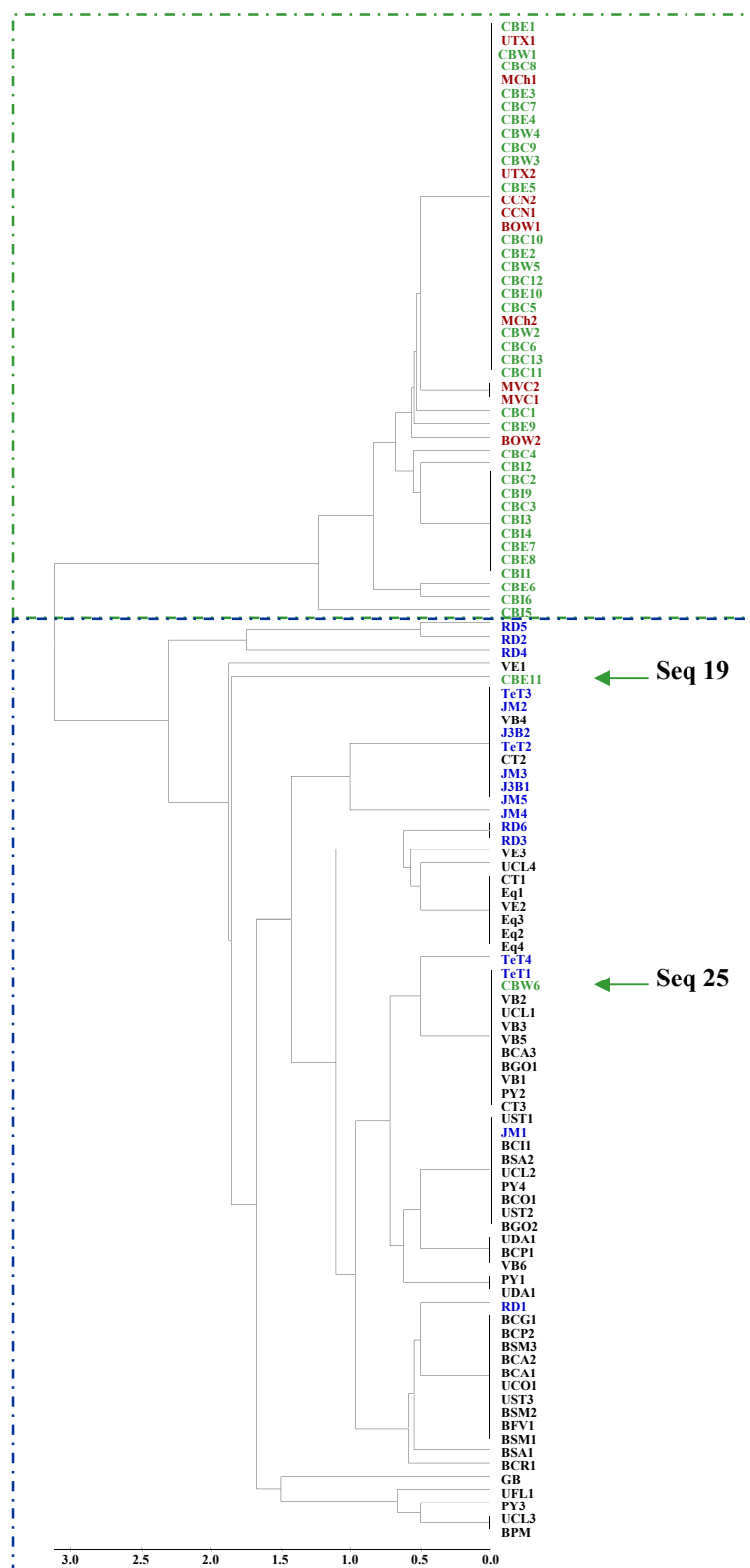


Figura 7.2- Árvore do gene COII obtida pelo método UPGMA, para todos os indivíduos de *C. hominivorax* analisados . Grupo I – quadrado inferior azul - amostras da América do Sul, Jamaica, República Dominicana, Trinidad e Tobago. Grupo II- quadrado superior verde- amostras de Cuba e biofábrica (exceto Jam3B); Setas indicam duas amostras de Cuba com haplótipo PCR-RFLP H3 (seq 19 e 25). Cores das amostras estão representadas segundo localidade descrita na tabela 7.3.

A figura 7.3 representa as relações entre todos os haplótipos de *C. hominivorax* identificados nas localidades amostradas. Nessa análise o padrão de estruturação dos dados foi mantido. Foi possível identificar dois clados bem distintos: um representado em azul (clado 1), onde aparecem as amostras da Jamaica, República Dominicana, Trinidad & Tobago e as da América do Sul, além de duas amostras de Cuba haplótipo PCR-RFLP H3 (haplótipos de sequência S19 e S25), e outro formado pelas outras amostras de Cuba e as amostras representativas da América do Norte e Central continental (clado 2).

Os haplótipos mais frequentes do clado 1 ocupam posições mais centrais na rede, exceto haplótipo S28 (principalmente amostras da Jamaica e Trinidad & Tobago - tabela 7.3), enquanto que amostras únicas ou mais raras ocupam posições periféricas. Nesse clado é possível visualizar um pequeno agrupamento (apontado em círculo com linha pontilhada em azul) que representa as amostras da República Dominicana. No clado 2, o haplótipo mais frequente é central na rede e representa tanto amostras de Cuba como da biofábrica. A distância entre os dois clados é de pelo menos 4 passos (ou 4 variações de sítio), e revela estruturação entre os dois grupos.

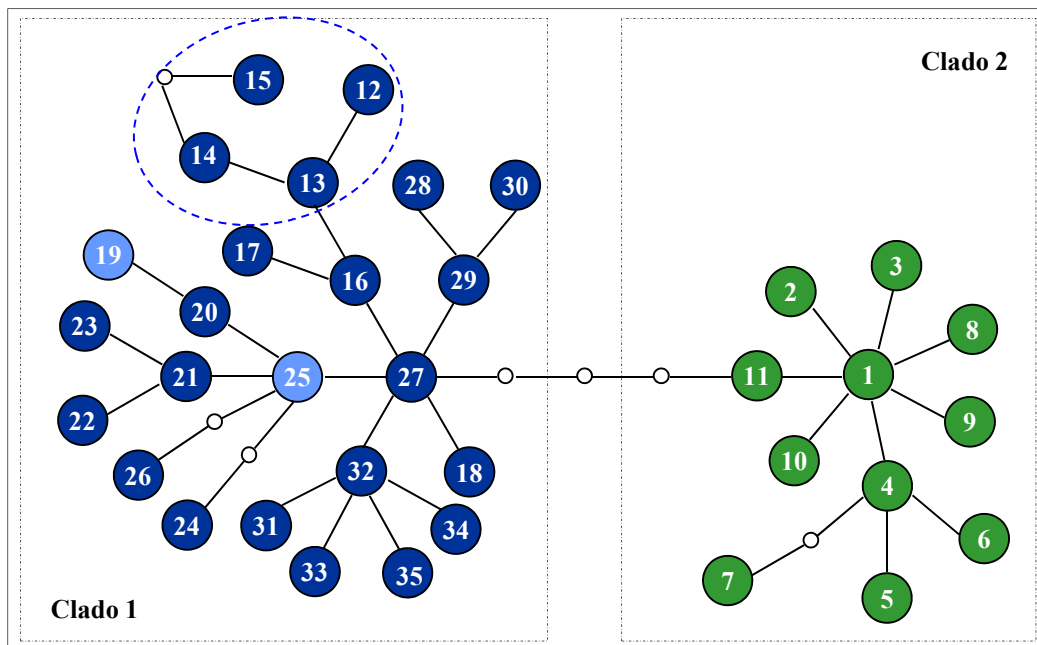


Figura 7.3- Rede de relação dos haplótipos identificados em *C. hominivorax*, construída usando o método de parcimônia estatística, com um limite de confiança de 95%. As linhas que unem os haplótipos representam um evento de mutação e os círculos vazios: haplótipos não amostrados. As linhas pontilhadas em preto representam a separação em dois clados. A linha pontilhada em azul, representa um agrupamento das amostras da República Dominicana. Haplótipos em azul claro no clado 1 também foram identificados em duas amostras de Cuba.

7.4. Discussão

Os dados apresentados aqui fortemente sugerem uma estruturação populacional que separa as amostras de Cuba das amostras de outras ilhas do Caribe, bem como da América do Sul. Esses dados corroboram os resultados anteriores obtidos com marcadores PCR-RFLP do DNAm_t (Lyra *et al.*, *in press*) e marcadores microssatélites (Torres & Azeredo-Espin, *in press*).

Poucos dados existem na literatura sobre a presença histórica da praga em Cuba. Os trabalhos de García Rodríguez (2003) e Vargas-Terán *et al.* (2005) apontam que a presença da espécie no país só foi registrada oficialmente em 1995, diferente do que é registrado por exemplo para a Jamaica onde a presença da espécie já havia sido relatada no século XVIII (Grainer, 1764). A presença de um haplótipo em alta frequência (S1) que está presente também no continente Norte e Centro Americano, pode sugerir que a introdução da espécie na ilha é decorrente de um efeito fundador relativamente recente (exemplificado como colonização de longa distância em Templeton, 1998); a presença de únicos e proximamente relacionados ao haplótipo S1 pode indicar um evento de expansão populacional rápida após efeito fundador (Hedrick, 2005).

O agrupamento entre as amostras de Cuba e América do Norte e Central continental sugere que as populações de Cuba podem ser originárias de populações dessas localidades, o que confirma a hipótese de diferentes origens de introdução no Caribe sugerida por Lyra *et al.* (*in press*). Os dois indivíduos de Cuba, que aparecem agrupados com as amostras do continente Sul-Americano e outras ilhas do Caribe, parecem revelar claramente a importância da interferência humana no processo de migração passiva dessa praga. As relações comerciais de compra e venda de animais vivos entre regiões e países, que eventualmente podem carregar espécimes da mosca, podem explicar a existência de haplótipos relacionados em localidades geográficas muito distintas. Por outro lado, não podemos descartar a possibilidade de que sejam haplótipos ancestrais residuais.

As amostras da República Dominicana, Jamaica e Trinidad & Tobago foram agrupadas com as amostras da América do Sul, corroborando a hipótese de diferentes histórias de introdução da espécie no Caribe sugerida em Lyra *et al.* (*in press*). A República Dominicana apresentou haplótipos únicos o que reforça o padrão de isolamento entre as ilhas encontrado anteriormente com marcadores microssatélite (Torres & Azeredo-Espin, *in press*).

Os resultados aqui apresentados revelam que o sequenciamento de regiões do DNAm_t na espécie *C. hominivorax*, pode auxiliar na compreensão da complexidade da distribuição da

diversidade genética principalmente em uma escala micro-geográfica e temporal. Esses resultados sugerem que novos estudos devem ser realizados, associando a escala temporal, micro-geográfica e sistemas de informação geográfica, na tentativa de se entender a história evolutiva dessa praga nas Américas e, talvez, permitir o uso dessa espécie como modelo para outras espécies pragas.

PARTE III

ABORDAGEM MORFOLÓGICA

“THE FLY

God in his wisdom made the fly

And then forgot to tell us why.”

(Frederic Ogden Nash)

8. ARTIGO 3

Lyra, ML, Hatadani, LM, Azeredo-Espin AML & Klaczko, LB. Wing size and shape variation in New World Screwworm Fly (Diptera: Calliphoridae): Sexual Dimorphism and population analyzes. *Em preparação*.

“Variação de tamanho e forma da asa na mosca da bicheira (Diptera: Calliphoridae): Dimorfismo sexual e análise preliminar de populações”

Resumo

Cochliomyia hominivorax, a mosca da bicheira, é um dos mais importantes parasitas de animais domésticos da região Neotropical. Marcadores moleculares têm sido usados com sucesso para a caracterização da variabilidade e estrutura de populações desta mosca, mas pouco se sabe sobre a variação morfológica. Os caracteres morfológicos podem refletir diretamente a ação da seleção natural, e o estudo desses pode fornecer informações importantes sobre as populações que em geral não podem ser obtidos com marcadores neutros em nível molecular. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de caracterizar a variação morfológica de asas de *C. hominivorax* e avaliar o potencial desse caráter para análises populacionais. Nos encontramos um dimorfismo sexual acentuado na espécie tanto para tamanho como forma da asa, esses dados foram interpretados como a existência de diferentes pressões seletivas no sexos e sugerimos que pode estar associado ao comportamento agressivo do macho. Foram identificadas significativas variações entre as populações analisadas, porém essas não puderam ser correlacionadas com as diferenças de latitude e temperatura. Os resultados preliminares sugerem que a morfologia da asa da espécie pode ser afetada pelas características da localidade ou do hospedeiro, já que é um parasita de animais endotérmicos, de maneira diferente do que ocorre em outras espécies de inseto. Nossos resultados demonstram que a variação de tamanho e forma da asa pode ser um caráter útil para o estudo de populações da mosca da bicheira.

SHORT COMMUNICATION

**Wing size and shape variation in New World Screwworm Fly (Diptera: Calliphoridae):
Sexual Dimorphism and population analyzes.**

Mariana L. Lyra^{1,2}, Luciane M. Hatadani², Ana Maria L. de Azeredo-Espin^{1,2} and Louis Bernard Klaczko²

¹Laboratório de Genética Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Running title: Lyra et al: Wing Variation in *Cochliomyia hominivorax*

Correspondence: Mariana Lúcio Lyra
Laboratório de Genética Animal
CBMEG – UNICAMP
Campinas, São Paulo, Brazil
P.O. Box 6010, CEP 13083-875
fone: 55- 19- 3521 11 41, fax: 55- 19- 3521 10 89
e-mail: marilyra@unicamp.br

Abstract

Cochliomyia hominivorax (Coquerel 1858), the New World screwworm fly, is one of the most important parasites of livestock in the Neotropical region and one of the most expensive to control and treat. Genetic markers have been used with success to provide information about population structure and genetic variability in *C. hominivorax*, but little is known about morphological variation in *C. hominivorax* populations. The present study was conducted to provide a morphological analysis of wing size and shape of *C. hominivorax* and evaluate the potential use of this morphological character for population variation studies. We found a striking sexual dimorphism in the species for both wing size and shape and suggested that it reflects a history of different selection pressures operating on males and females, possibly related to male behavior. We also found morphological variation between populations, which were not associated with latitude or temperature; these preliminary results suggested that *C. hominivorax* morphology might be affected by locality and/or host characteristics in a different manner to previous studies with other insect species, since it is a parasite of endothermic animals. Our results indicated that wing shape and size may be a reliable marker for population analyses in New World Screwworm.

Key words: New World Screwworm fly, sexual dimorphism, wing variation, populations.

Introduction

The New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel 1858 -Diptera: Calliphoridae) is a destructive obligate parasite of endotherm vertebrates that causes severe myiasis in hosts throughout the Neotropical region (Guimarães et al. 1983). The larvae of this species are only able to develop in nature on living tissues and this mode of infestation makes *C. hominivorax* one of the most important pests of livestock and one of the most expensive to control and treat, being responsible for substantial profit losses for cattle breeders (Hall and Wall 1995).

The historical range of this insect extends from southern United States to Argentina. This species has been successfully eradicated from North and most of Central America by the sterile insect technique (SIT), but still occurs in the Caribbean islands and South America (Wyss 2000, IAEA 2000).

Due to the substantial economic losses caused by *C. hominivorax* infested countries, international efforts have been aimed at designing programs to control and, eventually, eradicate this species from endemic areas (IAEA 2000). For a program of insect eradication by release of sterile insects to be successful, three criteria must be met (Mangan, 1986): (1) insects must be reared and sterilized in sufficient number and with quality; (2) sterile insects must be transported and released in the appropriate location in a manner that vigor is not lost and (3) the sterile male released must compete successfully with wild males and be reproductively compatible with females.

In order to accomplish third criteria, a good knowledge of genetic variation and population structure of target populations is a fundamental component and it can be accessed, for example, by the analyses of molecular marker and/or phenotypic variation.

In New World Screwworm fly, molecular markers have been used with success providing important information about population structure and genetic variability (e.g. Roerhdanz 1989, Infante-Vargas & Azeredo-Espin 1995, Taylor et al 1996; Infante-Malaquias *et al.*, 1999, Lyra *et al.*, 2005; Torres *et al.* 2007; Lyra *et al.*, *in press*), but, surprisingly, no morphological marker have been well characterized and little is still known about morphological variation in natural populations of *C. hominivorax* (Richardson et. al., 1982; Gagné & Peterson, 1982; Azeredo-Espin, 1987). Because phenotypic traits commonly represent direct targets to natural selection, their

study might provide interesting additional data about populations that could not be obtained with neutral markers at the molecular level.

Wing morphology differences among natural populations have been repeatedly documented in dipterans (e.g. Coyne and Beechan 1987, Imasheva et al. 1994, Bitner-Mathé et al. 1995, Alves and Beló 2002, David et al. 2003, Reigada and Godoy 2005). Not surprisingly, most of the literature on dipteran wing morphology variation concentrates on the genus *Drosophila*, in which latitudinal clines have been observed for body size in several species (Pfriem 1983, Hyytia et al. 1985, Imasheva et al. 1994, Huey et al. 2000, Collinge et al. 2006). Selective pressures acting on the formation of these clines are, in general, believed to be caused by temperature variation (Imasheva et al. 1994), although alternative explanations have been proposed (Santos et al. 2006).

The purpose of the present study was to provide a morphological analysis of wing size and shape of *C. hominivorax* and explore its potential for population variation analyses.

Materials and Methods

Cochliomyia hominivorax were obtained as third instar larvae from different wounded sheep, dogs or cattle between 2003 and 2005. Geographic locations of the thirteen areas sampled and the number of individuals analyzed are shown in table 1. The two most distant collections sites (Caiapônia-Br and Colonia-Uy) covered a distance of approximately 2040 Km and all collections were carried out in the summer.

Collected larvae were taken to the laboratory for species identification and allowed to pupate in sawdust. The pupae were maintained at constant temperature (25 °C) and humidity (70%) and the adults that emerged were frozen 24 hours after emergence. The right wing of each fly was removed and mounted on a slide under a coverslip and wing images were captured via a video camera coupled to a microcomputer. The TPSdig software (Rohlf, 2004) was used to obtain cartesian coordinate data of four landmarks (Fig.1). Size was estimated by measuring wing length (distance between points A and B in Fig.1), whereas shape was computed as the ratio between wing width (distance between points C and D) and length. Each wing was measured different times to ensure repeatability.

Temperature data for each area was obtained from the weather station adjacent to collection site. Whenever these data were not available (Cerro Colorado-Uy and Paso Muñoz-

Uy), the average between the temperature data of the two nearest weather service stations was considered for the analyses. Temperature values used were the average of the summer in which we made the collection.

Analyses of morphometric data were performed by univariate approaches in Minitab14 software. Means, standard errors and confidence intervals (95%) were estimated. ANOVA was used to ascertain any differences between sexes or localities. Discriminant analysis was conducted with size and shape to identify sexes. Regression analyses were carried out in exploratory analyses to examine the association between population traits and the geographic or climatic variable (latitude and temperature).

Geometric morphometric methods were explored in an aim to identify local variation in wings. Results obtained were very similar than those obtained with traditional methods and, because of that, just the last one were chosen for results exposition since there are more intuitive.

Results and Discussion

Sexual Dimorphism

Table 2 describes the mean wing length and the mean wing ratio (width/length) for males and females in *C. hominivorax*. We found a significant variation between sexes for both wing size and shape (table 3). Discriminant analyses correctly assigned 99,5% of specimens to their groups (sexes). The analysis revealed a striking sexual dimorphism in the species (Fig. 2). Males are approximately 15% bigger than females and have narrower wings, when compared with the wings of females (table 2).

Differences between males and females are common in animals and have been the subject of discussion for numerous evolutionary biologists since Darwin's (1871) first investigations (e.g. Maynard Smith 1978, Andersson 1994, Fairbairn 1997). Sexual dimorphism has been studied in relation to physiology, ecology and behavior and the two main types of explanation for its evolution are natural and/or sexual selection or intra-specific niche divergence (Lande 1980, Shine 1989).

In insects, females are usually larger than males (e.g. Huey et al. 2006), probably due to a fecundity advantage for larger females. A larger male size is rare and is believed to be favored in a competition context among males, such as fight for females or territory, or when males carry

females during nuptial flight (see Andersson 1994, David et al. 2006a). Our work found that *C. hominivorax* exhibits a significant sexual dimorphism for wing size in which males are significantly larger than females, suggesting the existence of selective pressures other than female fecundity advantage in this species, possibly related to male behavior. Even though adult flies of *C. hominivorax* are often difficult to observe in nature, Guillot et al. (1978) and Krafur (1978) were able to observe an aggressive behavior in field *C. hominivorax* males, showing that they are territorial and have a striking behavior towards screwworms, and even towards other species of small insects. The observation of larger males than females would agree with adaptive interpretations mentioned previously, although other factors are probably related to the dimorphism. In addition, screwworm females mate only once (Crystal 1967), a fact that could reinforce sexual selection and increase competition among males.

Results reported here also found a significant sexual dimorphism for wing shape in *C. hominivorax* (males have narrower wings when compared to females). Sexual shape dimorphism is less understood than size dimorphism, but is believed to arise from ecological causes or natural selection, that is, to adapt each sex to different ecological niches (Shine 1989, Andersson 1994, Bonduriansky 2006). Although there is no direct evidence for the functional significance of shape variation in *C. hominivorax*, it seems reasonable to suppose that the differences in foraging habitats and behavior, reproductive activities and flight agility or resistance may influence the shape dimorphism observed in *C. hominivorax*, as has been proposed for other species (e.g. Sivinski and Dodson 1992, Bonduriansky 2006). More detailed studies of sex dimorphism in relation to social behavior and life history are needed to understand the meaning of the variation found and to confirm and/or generalize these tentative conclusions.

Population variation

We also found a significant variation among localities for wing size and shape (table 3). Since sexual dimorphism for size and shape was present, we separated sexes for the analysis of differences between localities (Fig. 3). The smallest males and females were found in the locality of São Sebastião do Paraíso-MG (BSS), Brazil, while the largest were found in Juaquin Suarez-Can (UJS), Uruguay (Fig. 3). The greatest size difference between sexes was found in San Antonio-Sal (UST), Uruguay (17%) and the smallest was found in Juaquin Suarez-Can (UJS), Uruguay (9%).

Differences found for female wing sizes and shape could not be related to variation in temperature or latitude (none of the regressions were significant; data not shown). Results for males were similar to those obtained for females, except for regression of size in latitude ($R^2 = 1\%$; $p=0.041$). Variation in wing shape was not significantly correlated to size in females, but presented a significant correlation for males ($R^2 = 4.8\%$; $p< 0.000$).

Temperature is an important factor influencing size in ectotherms (Atkinson and Sibly 1997), concerning both genetic variation and phenotypic plasticity. Numerous studies documented intraspecific geographic variation in wing size and shape, particularly in the genus *Drosophila*, in which the existence of latitudinal clines is often thought to be caused by temperature as the selective pressure (e.g. Imasheva et al. 1994, Bitner-Mathé et al. 1995, Gilchrist 2001, Alves and Beló 2002, Collinge et al. 2006, David et al. 2006b) and appear as positive correlations between latitude and wing size. Phenotypic plasticity occurs in the same direction and is expected to produce larger sizes in flies developing under lower temperatures than in those growing under higher temperatures (Robertson 1987, Thomas 1993, Partridge et al. 1994, Crill et al. 1996, Imasheva et al. 2000, Pétavy et al. 2001, Azevedo et al. 2002, David et al. 1994, 1997, 2006b). In addition to temperature, phenotypic variability in size is believed to be influenced by differences in larval feeding conditions (David et al 2006b). Wing shape variation in natural populations is less studied than size (Hoffmann and Shirriffs 2002) and there is not a common explanation, or pattern, for the differences found (Imasheva et al. 1994, Hass and Tolley 1998, Hoffmann and Shirriffs 2002).

In *C. hominivorax*, wing size and shape were not associated with latitude or temperature. Although they differed among populations, we were not able to find a pattern for the variation. Male wing size presented significant correlations with latitude and wing shape, but the amount of the variation explained by the variables was very small (1% and 4.8%, respectively).

The comparison of our results and previous studies is difficult because most of them focus on species whose larval development is influenced by variations in local temperature. *Drosophila* larvae often feed on rotting materials (such as fruit or cacti) and are subject to most of the environmental temperature fluctuations and also depend on larval crowding conditions.

Since *C. hominivorax* is an obligate parasite of ectotherms, all larval stages develop in an almost constant environment inside the host, regardless of its geographical location and we should expect little variation in developmental temperature and larval crowding effects. Hence, it should not be surprising that we did not find a correlation between wing size and latitude or

temperature, since latitude would probably influence size through temperature effects, which were not supposed to have a major variation among localities. Therefore, *C. hominivorax* larvae seem to be affected by temperature and nutrition in a different way than insects that are not parasite of endothermic animals, and both locality and host characteristics, such as host nutritional aspects and body temperature, need to be considered to understand the size and shape variation in this species. Naturally we cannot ignore the possible effect of genetic drift and historic phenomena.

Although our results showed morphological differences between *C. hominivorax* populations, it should be considered carefully when studying population structure. To address questions like: how much of the variation is due to plasticity or genetic differences, or how temperature and host characteristics affect morphological variation, we need to conduct more detailed, specific and controlled experiments.

Based on preliminary results presented here, we suggested that wing variation is a good morphological marker for studying population variation in *C. hominivorax*, and suggest that morphological variation studies might greatly help in the design of future control programs.

Acknowledgements

The authors thank Rosangela A. Rodrigues for valuable technical and laboratorial assistance, Maria Salete Couto for maintaining the screwworm colonies and P. Fresia for help in collecting the samples in Uruguay. M.L.L. was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 01/12528-2 and 03/13598-0). This work was supported by grants from FAPESP, CNPq and the International Atomic Energy Agency (IAEA, grant 11822/RO).

References Cited

- Alves, S. M., and M. Bélo. 2002. Morphometric variation in housefly, *Musca domestica* (L.) with latitude. *Genetica* 115: 243-251.
- Andersson, M. B. 1994. Sexual selection. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Atkinson, D., and R. M. Sibly. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends Ecol. Evol.* 12: 235-239.
- Azeredo-Espin, A. M. L. 1987. Análise cariotípica, Morfométrica e de Compatibilidade Sexual em linhagens brasileiras de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Ph.D. dissertation. University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

- Azevedo, R. B., V. French, and L. Partridge. 2002. Temperature modulates epidermal cell size in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 48: 231-237.
- Bitner-Mathé, B. C., A. A. Peixoto, and L. B. Klaczko. 1995. Morphological variation in natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence chromosome inversions. *Heredity* 75: 54-61.
- Bonduriansky, R. 2006. Convergent Evolution of Sexual Shape Dimorphism in Diptera. *Jour. Morph.* 267: 602-611.
- Collinge, J. E., A. A. Hoffmann, and S. W. McKechnie. 2006. Altitudinal patterns for latitudinally varying traits and polymorphic markers in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *J. Evol. Biol.* 19: 473-482.
- Coyne, J. A., and E. Beechan. 1987. Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117: 727-737.
- Crill, W. D., R. B. Huey, and G. H. Gilchrist. 1996. Within and between-generation effects of temperature on the morphology and physiology of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 50: 1205-1218.
- Crystal, M. M. 1967. Reproductive behavior of laboratory reared screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) *J. Med. Entomol.* 4: 443-450.
- Darwin, C. 1871. *The descent of man and selection in relation to sex*. Ed. John Murray, London.
- David, J. R., B. Moreteau, J. P. Gauthier, G. Petavy, A. Stockel, and A. G. Imasheva. 1994. Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in *Drosophila melanogaster*: an isofemale lines analysis. *Genet. Sel. Evol.* 26: 229-251.
- David, J. R., P. Gibert, E. Gravot, G. Petavy, J. P. Morin, D. Karan, and B. Moreteau. 1997. Phenotypic plasticity and developmental temperature in *Drosophila*: analysis and significance of reaction norms of morphometrical traits. *J. Therm. Biol.* 22: 441-451.
- David, J. R., P. Gibert, S. Mignon-Grasteau, H. Legout, G. Pétavy, C. Beaumont, and B. Moreteau. 2003. Genetic variability of sexual size dimorphism in natural population of *Drosophila melanogaster*: an isofemale-line approach. *J. Genet.* 82 (3): 79-88.
- David, J. R., L. O. Araripe, B. C. Bitner-Mathé, P. Capy, B. Goñi, L. B. Klaczko, H. Legout, M. B. Martins, J. Voudibio, A. Yassin, and B. Moreteau. 2006a. Sexual dimorphism of body size and sternopleural bristle number: a comparison of geographic populations of an invasive cosmopolitan dosophilid. *Genetica* 128: 109-122.
- David, J. R., H. Legout, and B. Moreteau. 2006b. Phenotypic plasticity of body size in a temperate population of *Drosophila melanogaster*: when the temperature-size rule does not apply. *J. Genet.* 85: 9-23.
- Fairbairn, D. J. 1997. Allometry for sexual size dimorphism: patterns and process in coevolution of body size in males and females. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28: 659-687.
- Gabaj, M. M., and W. N. Beesley. 1989. America screwworm fly in Lybia. *Vet. Rec.* 124: 152.
- Gagné, R.J. and R.D. Peterson II. 1982. Physical changes in the genitalia of males of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), caused by mating. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 574: 578

- Gilchrist, G. W., R. B. Huey, and L. Serra. 2001. Rapid evolution of wing size cline in *Drosophila subobscura*. *Genetica* 112-113: 273-286.
- Guillot, F. S., H. E. Brown, and A. B. Broce. 1978. Behavior of sexually active male screwworm flies. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 71(2): 199-201.
- Guimarães. J.H., N. Papavero, and A.P. Prado. 1983. As miíases na região Neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1: 239-416.
- Hall, M., and R. Wall. 1995. Myiasis of human and domestic animals. *Adv. Parasitol* 35: 256-333.
- Hass, H. L., and K. A. Tolley. 1998. Geographic variation of wing morphology in three Eurasian populations of the fruit fly, *Drosophila lummei*. *J. Zool. Lond.* 245: 197-203.
- Hoffmann, A. A., and J. Shirriffs. 2002. Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata*. *Evolution* 56(5): 1068-1073.
- Huey, R. B., G. W. Gilchrist, M. L. Carlson, D. Berrigan, and L. Serra. 2000. Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. *Science* 287: 308-309.
- Huey, R. B., B. Moreteau, J.C. Moreteau, P. Gibert, G. W. Gilchrist, A. R. Ives, T. Garland Jr., and J. R. David. 2006. Sexual size dimorphism in a *Drosophila* clade, the *D. obscura* group. *Zoology* 109: 318-330.
- Hyttia, P., P. Cappy, J. R. David, and R. S. Singh. 1985. Enzymatic and quantitative variation in European and African populations of *Drosophila simulans*. *Heredity* 54: 209-217.
- (IAEA/FAO) International Atomic Energy Agency/Food and Agriculture Organization. 2000. Genetic sexing and population genetics of screwworms. August 7-11. 2000. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- Imasheva, A. G., O. A. Bubli, and O. E. Lazebny. 1994. Variation in wing length in Eurasian natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 72: 508-514.
- Imasheva, A. G., B. Moreteau, and J. R. David. 2000. Growth temperature and genetic variability of wing dimensions in *Drosophila*: opposite trends in two sibling species. *Genet. Res.* 76: 237-247.
- Infante-Malachias. M. E., K. S. C. Yotoko, and A. M. L. Azeredo-Espin. 1999. Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from southeastern Brazil and northern Argentina. *Genome* 42: 772-779.
- Infante-Vargas, M. E., and A. M. L. Azeredo-Espin. 1995. Genetic Variability in Mitochondrial DNA of Screwworm. *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). from Brazil. *Biochem. Genet.* 33: 737-756.
- Krafsur, E. S. 1978. Aggregation of male screwworm flies, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) in South Texas (Diptera-Calliphoridae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 80 (2): 164-170.
- Krafsur, E. S. 2005. Role of population genetics in the sterile insect technique, pp. 389-406. In V. A. Dyck, J. Hendrichs and A. S. Robinson (eds.), *Sterile insect technique: Principles and Practice in area-wide integrated pest management*, Springer, Netherlands.
- Lande, R. 1980. Sexual dimorphism, sexual selection and adaptation in phylogenetic characters. *Evolution* 34: 292-305.

- Lindquist, D.A., M. Abusowa, and M.J.R. Hall. 1992. The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med Vet Entomol* 6: 2-8
- Lyra, M. L., P. Fresia, S. Gama, J. Cristina, L. B. Klaczko, and A. M. L. Azeredo-Espin. 2005. Analysis of Mitochondrial DNA Variability and Genetic Structure in Populations of New World Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *J. Med. Entomol.* 42 (4): 589-595.
- Lyra, M.L, Klaczko, L.B & Azeredo-Espin A.M.L. Complex pattern of genetic distribution in populations of the New World Screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Med. Vet. Entomol. In press.*
- Maynard Smith, J. 1978. The evolution of sex. Cambridge university press, Cambridge.
- Partridge, L., B. Barrie, K. Fowler, and V. French. 1994. Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution* 48: 1269-1276.
- Pétavy, G., B. Moreteau, P. Gibert, J. P. Morin, and J. R. David. 2001. Phenotypic plasticity of body size in *Drosophila*: effects of a daily periodicity of growth temperature in two sibling species. *Physiol. Ent.* 26: 351-361.
- Pfriem, P. 1983. Latitudinal variation in wing size in *Drosophila subobscura* and its dependence on polygenes of chromosome O. *Genetica* 61: 221-232.
- Reigada, C., and W. A. C. Godoy. 2005. Seasonal fecundity and body size in *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera : Calliphoridae). *Neot. Entomol.* 34 (2): 163-168
- Richardson, R. H., J. R. Ellison, and W. W. Averhoff. 1982. Autocidal control of screwworms in North America. *Science* 215: 361-370.
- Robertson, F. W. 1987. Variation of body size within and between wild populations of *Drosophila buzzatii*. *Genetica*, 72: 111-125.
- Roehrdanz, R. L. 1989. Intraspecific Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm Fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochem. Genet.* 27 (9-10): 551-569.
- Rohlf, F.J. 2004. TPSDig software for windows version 1.4. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Book (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- Rohlf, F.J. 2005. TPSRegr for windows version 1.31. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Book (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- Santos, M., W. Cespedes, J. Balanya, V. Trotta, F.C.F. Calboli, A. Fontdevila, and L. Serra. 2006. Temperature-related genetic changes in laboratory populations of *Drosophila subobscura*: evidence against simple climatic-based explanations for latitudinal clines. *Am. Nat.*, 165: 258-273.
- Shine, R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *Q. Rev. Biol.*, 64 (4): 419-461.
- Sivinski, J. M., and G. Dodson. 1992. Sexual Dimorphism in *Anastrepha suspense* (Loew) and other Tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae): Possible rule of developmental rate, fecundity and dispersal. *Jour. Insect Behav.* 5 (4): 491-506.

- Taylor, D. B., A. L. Szalanski, and R. D. Peterson II. 1996. Mitochondrial DNA variation in Screwworm. *Med. Vet. Entomol.* 10: 161-169.
- Thomas, R. H. 1993. Ecology of body size in *Drosophila buzzatii*: untangling the effects of temperature and nutrition. *Ecol. Entomol.* 18: 84-90.
- Torres, T. T. 2006. Variabilidade Genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): uma nova perspectiva através de marcadores microssatélites. Ph.D. dissertation. University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.
- Torres, T. T., M. L. Lyra, P. Fresia and A. M. L. Azeredo-Espin. 2007. Assessing Genetic Variation in the New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* Populations from Uruguay, *In* Vreysen, M.J.B., A.S. Robinson, and J. Hendrichs (Eds.), *Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands (in press).
- Wyss, J. H. 2000. Screwworm Eradication in the Americas. *Ann. NY Acad. Sci.* 791: 241-247.
- Zelditch, M. L., D. L. Swiderski, H. D. Sheets, and W. L. Fink. 2004. *Geometric Morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier Academic Press, London, UK.

Table 1. Geographic locations of the sampled areas and number of *Cochliomyia hominivorax* individuals analyzed. ID: population identification code. F: Females; M: Males; # average temperatures in summer.

	Local	ID	Lat (S)	Long (W)	Temp (°C) #	F	M	Total
Br	Caiapônia – GO	BCA	16°57'	51°48'	25.26	44	52	96
	S. S. do Paraíso - MG	BSS	20°55'	46°59'	23.06	17	15	32
	Caraguatatuba - SP	BCT	23°37'	45°24'	27.32	23	21	44
	Carambeí – PR	BCI	24°55'	50°05'	22.52	12	12	24
	Fagundes Varela - RS	BFV	28°52'	51°41'	21.64	24	24	48
	Pinheiro Machado - RS	BPM	31°34'	53°23'	23.55	22	15	37
Uy	San Antonio - Sal.	UST	31°20'	57°50'	24.33	11	24	35
	Paso Muñoz - Sal.	UPM	31°27'	56°23'	24.33	17	31	48
	Dayman - Pay.	UDA	31°33'	57°57'	23.37	15	7	22
	Cerro Colorado - Flo.	UCC	33°52'	55°33'	23.33	23	28	51
	Bañados de Medina- C.L.	UBM	32°23'	54°21'	22.27	22	22	44
	Colonia - Col.	UCO	34°28'	57°51'	22.60	27	21	48
	Juaquín Suarez - Can.	UJS	34°44'	56°02'	22.03	11	44	55
Total						268	316	584

Table 2. Mean wing length and mean wing ratio (width/length) in *Cochliomyia hominivorax*. N= number of individuals analyzed; SE= standard error; CI 95%: Confidence interval.

		Length (mm)	Ratio(width/Length)
		Mean ± SE (CI 95%)	Mean ± SE (CI 95%)
Females	268	5.012 ± 0.020 (4.972 - 5.052)	0.513 ± 0.001 (0.511 - 0.514)
Males	316	5.786 ± 0.026 (5.735 - 5.837)	0.456 ± 0.001 (0.455 - 0.457)

Table 3. Results of ANOVA on wing length and on wing ratio (width/length) for *Cochliomyia hominivorax* populations.

	Length			Ratio (width/length)		
	df	F	P	df	F	P
Sex	1	454.45	<0.001	1	3998.6	<0.001
Local	13	14.21	<0.001	13	14.45	<0.001
Sex X Local	13	1.21	0.274	13	1.92	0.03

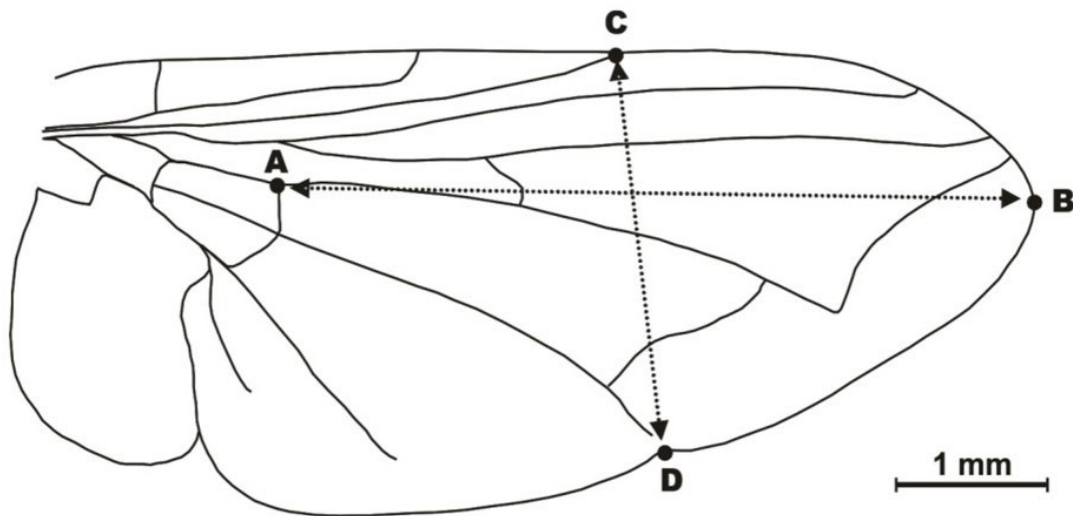


Figure 1. Wing of *Cochliomyia hominivorax* showing landmarks, considered as reference for making measurements. A-->B: Length; C-->D: Width.

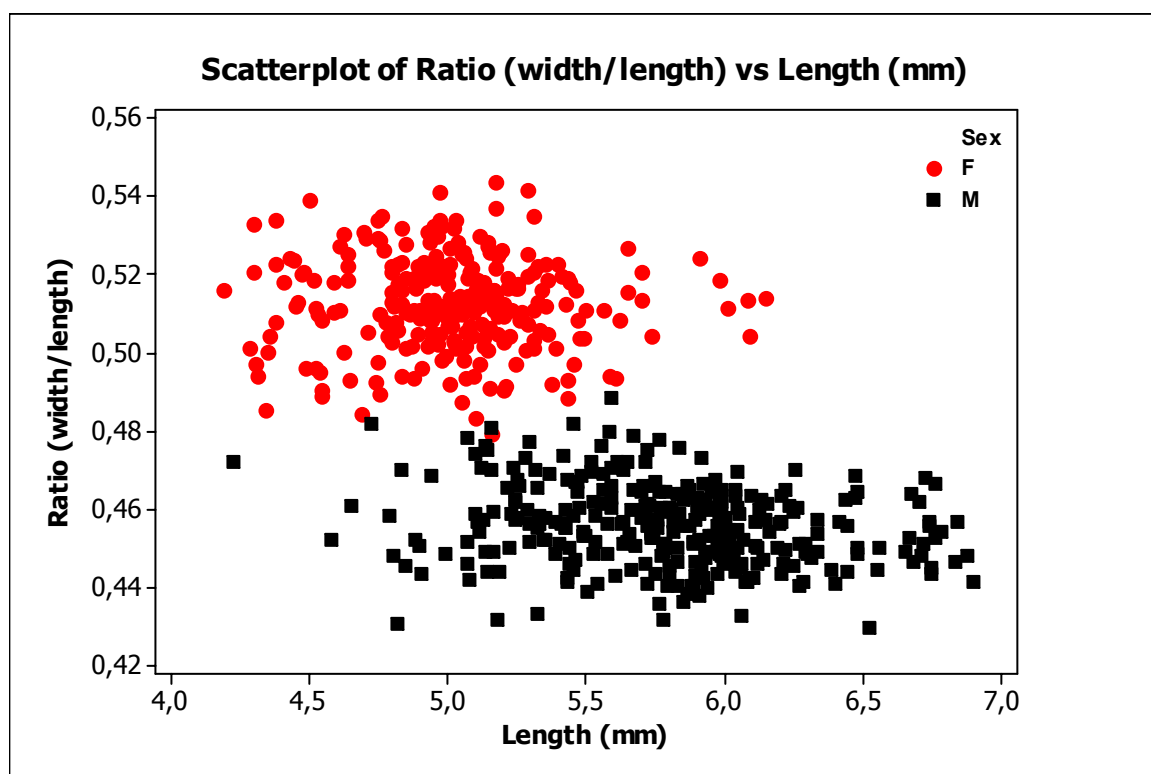


Figure 2. Relationship between wing length (mm) and wing ratio (width/length) in males and females of *Cochliomyia hominivorax*. Females: red circles; Males: black squares.

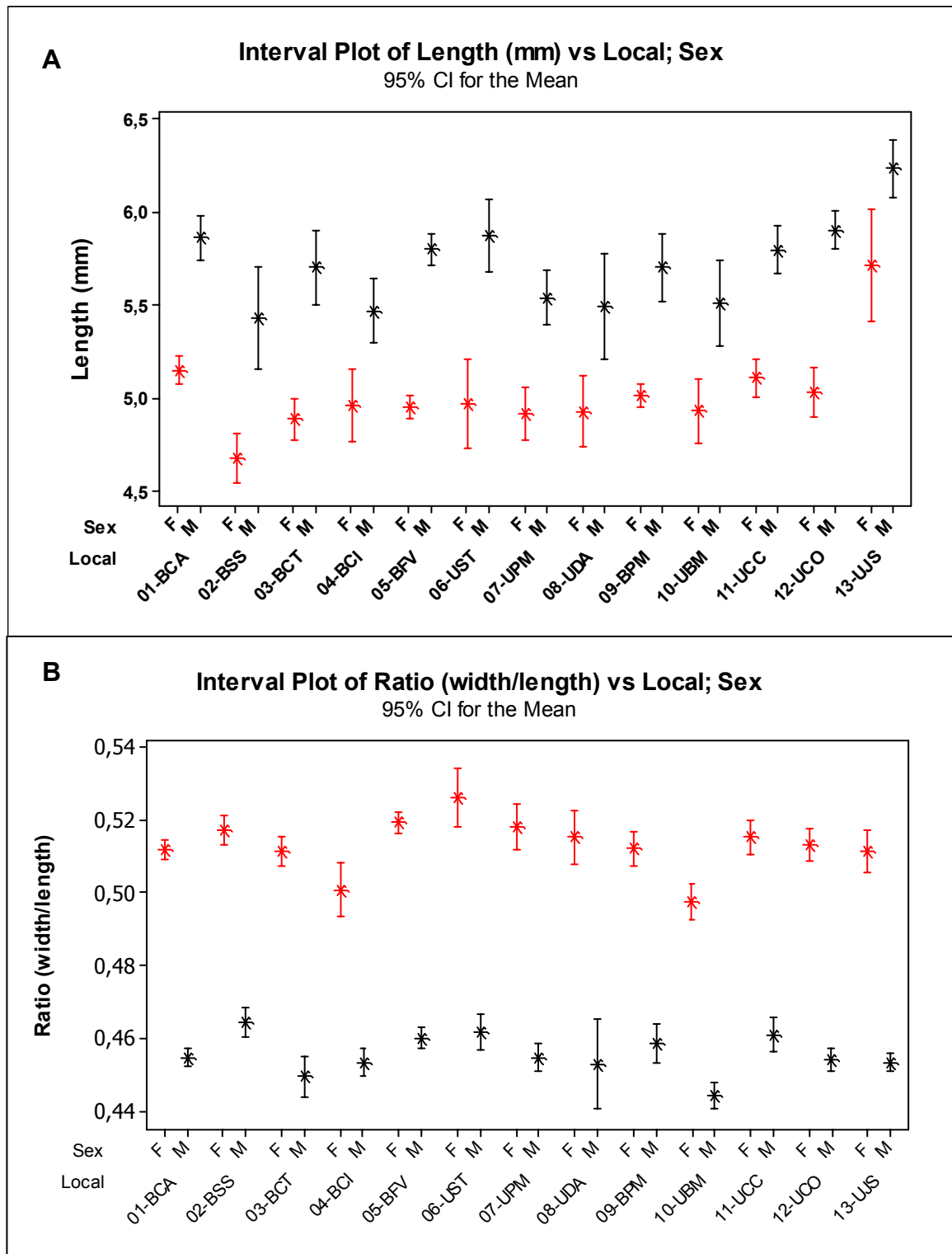


Figure 3. Interval Plot of wing length (A) and wing ratio (Width/Length) (B) for *Cochliomyia hominivorax* populations. F: Female (red); M: Male (black). Local: Identification codes correspond to localities given on Table 1.

9. “Morfometria Geométrica como ferramenta para identificação de *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*”

9.1. Introdução

Cochliomyia macellaria (Fabricius, 1775) é um agente causador de miíases secundária morfológicamente muito similar a *Cochliomyia hominivorax* (Guimarães *et al.*, 1983). As larvas dessa espécie possuem hábito exclusivamente necrófago e são encontradas geralmente associadas a carcaças, lixo urbano ou fezes, porém podem ser encontradas em feridas de mamíferos juntamente com *C. hominivorax*, onde se alimentam dos tecidos necrosados (Guimarães *et al.*, 1983; Zumpt, 1965).

Devido a características como sobreposição na distribuição geográfica entre *C. macellaria* e *C. hominivorax*, similaridade morfológica, co-existência das espécies na mesma ferida e potencial de prejuízo que *C. hominivorax* representa para pecuaristas, a rápida e correta identificação dessas duas espécies é muito importante.

Métodos baseados em marcadores moleculares para identificação de *C. hominivorax* e *C. macellaria* foram desenvolvidos com sucesso (Taylor *et al.*, 1996; Litjens *et al.*, 2001), porém os métodos atuais para identificação baseados em morfologia do adulto são relativamente restritos a especialistas, já que a identificação de adultos é principalmente baseada na genitália do macho, coloração e diferenças de polinosidade no quinto tergito (FAO, 1993).

Na literatura, já existem descritos alguns trabalhos para identificação de espécies de insetos através da morfologia da asa (Houle *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2004; Hatadani & Kłaczko, 2008). Com base nesses trabalhos e nos resultados obtidos para variação de tamanho e forma da asa, descritos para *C. hominivorax* nessa tese (Lyra *et al.*, em preparação; Parte III, Artigo 3), o objetivo deste trabalho foi testar se era possível identificar as duas espécies usando técnicas de morfometria geométrica, visando a criação de um método prático, rápido e barato para identificação de adultos das duas espécies.

9.2. Amostras e análises

As amostras de *C. hominivorax* foram coletadas como larvas de terceiro instar em diferentes feridas de animais domésticos, conforme descrito em “metodologia detalhada”. As amostras de *C. macellaria* foram coletas em carcaça de animais mortos (cavalos e bois), colocadas em serragem para se transformarem em pupa e levadas para o laboratório para identificação. A localização geográfica das áreas amostradas para cada espécie e o número de indivíduos analisados estão descritos na tabela 9.1.

Tabela 9.1. Localização geográfica das áreas amostradas e número de indivíduos de *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* analisados. Br: Brasil; Uy: Uruguai; F: Fêmeas; M: Machos

	Localidade	Lat. (S)	Long. (O)	F	M	Total
<i>Cochliomyia hominivorax</i>				235	246	481
Br	Caiaipônia - GO	16°57'	51°48'	19	24	43
	Caraguatatuba - SP	23°37'	45°24'	22	19	41
	Carambeí - PR	24°55'	50°05'	11	11	22
	Fagundes Varela - RS	28°52'	51°41'	23	25	48
	Pinheiro Machado - RS	31°04'	53°23'	22	15	37
	São Seb. do Paraíso - MG	20°55'	46°59'	17	15	32
Uy	Bañados de Medina- C.L.	32°23'	54°21'	21	21	42
	Cerro Colorado - Flo.	33°52'	55°33'	22	23	45
	Colonia - Col.	34°28'	57°51'	27	21	48
	Juaquín Suarez - Can.	34°44'	56°02'	15	20	35
	San Antonio - Sal.	31°24'	57°58'	19	23	42
	Paso Muñoz - Sal.	31°27'	56°23'	17	29	45
<i>Cochliomyia macellaria</i>				59	60	119
Br	Goiânia - GO	16°43'	49°15'	20	20	40
	Mogi-Guaçu - SP	22°22'	46°56'	19	20	39
Uy	Colonia - Col.	34°28'	57°51'	20	20	40

A manutenção dos indivíduos, obtenção e análise dos dados de variação morfológica foram conduzidas conforme descrito em “metodologia detalhada”. As diferenças de tamanho entre sexos e espécies foram testadas por ANOVA e as diferenças de forma foram testadas por MANOVA, conduzidas no programa MiniTab14. Análise discriminante foi conduzida na variável de forma para identificação de espécies e sexos. A análise de deformações relativas (“Relative warps analysis” - RWA) foi utilizada para ilustrar as diferenças de forma.

9.3 Resultados

Foram identificadas variações significativas entre espécies e sexos tanto para tamanho como forma da asa. A tabela 9.2 descreve os resultados obtidos para ANOVA no tamanho da asa e MANOVA no formato da asa de *Cochliomyia hominivorax* e *C. macellaria*.

Tabela 9.2. Resultados de ANOVA no tamanho do centróide e MANOVA nos componentes não-uniformes das deformações parciais (“partial warps”) para *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*.

	Tamanho do Centróide (ANOVA)		“Partial warps” (MANOVA)	
	F	P	F	P
Espécies (sp.)	12,34	<0,001	119,78	<0,001
Sexos	60,87	<0,001	110,83	<0,001
sexos X sp.	111,94	<0,001	30,01	<0,001

O tamanho do centróide diferiu significativamente entre sexos e espécies (Figura 9.1). Em *C. hominivorax*, machos apresentaram asas maiores do que as fêmeas (~12%; machos, TCmédio = 749,95 mm (CI 95%, 742,59 - 758,32); fêmeas, TCmédio = 671,80 (CI 95%, 665,88 - 677,71)) e em *C. macellaria*, machos apresentaram asas menores do que as fêmeas (~2%, TCmédio = 690,04 mm (CI 95%, 685,44 - 694,64); fêmeas, TCmédio = 701,85 mm (CI 95%, 694,16 - 708,54)). O tamanho da asa, sozinho, não é suficiente para diferenciar sexos e espécies, porém a sobreposição de tamanho, considerando o intervalo de confiança (CI) é mínima (Figura 9.1).

Na análise de variação de forma, o primeiro eixo de deformações relativas (RW1) foi responsável por 60,1% da variação e com este é possível separar os sexos e o RW2 representou 9,3% da variação, e separa espécies (Figura 9.2). A análise discriminante conduzida na variável de forma pôde classificar corretamente 100% das amostras, revelando que a forma da asa pode ser utilizada para identificação tanto das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, como para identificar os sexos dentro das espécies.

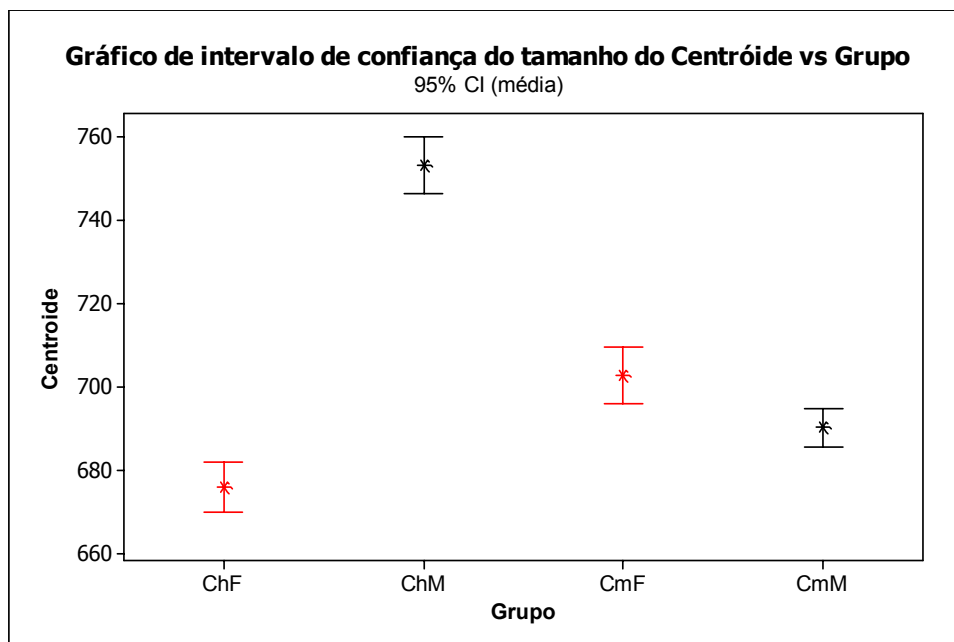


Figura 9.1- Gráfico do tamanho médio do centróide dos indivíduos de *Cochliomyia hominivorax* e *C. macellaria*. * representa a média; ChF: Fêmeas *C. hominivorax*; ChM: Machos *C. hominivorax*; CmF: Fêmeas *C. macellaria*; CmM: Machos *C. macellaria*.

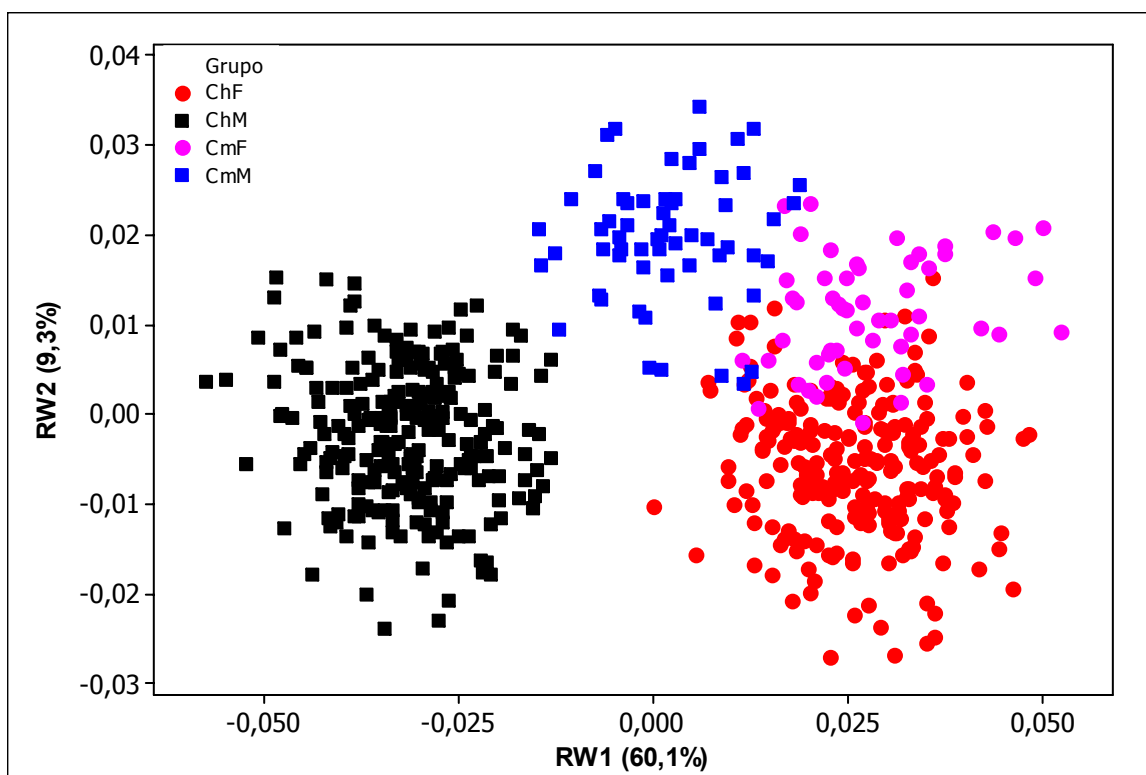


Figura 9.2- Gráfico de RW1 (60,1%) vs RW2 (9,3%) em *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*. ChF: *C. hominivorax* fêmeas, ChM: *C. hominivorax* machos, CmF: *C. macellaria* fêmeas, CmM: *C. macellaria* machos.

9.4. Discussão

9.4.1 Morfometria geométrica como ferramenta para identificação das espécies

Os resultados descritos aqui demonstram que a morfologia de asa é um bom carácter para ser utilizado em identificação de amostras de *C. hominivorax* e *C. macellaria*, podendo ser utilizado para monitorar a presença e expansão de *C. hominivorax* em áreas infestadas e não infestadas. Nossos resultados sugerem que as deformações parciais poderiam ser utilizadas como base para criação de um teste rápido para distinguir as duas espécies mais abundantes do gênero *Cochliomyia*.

A maior vantagem de um teste de identificação baseado na variação de forma da asa é a facilidade e velocidade em que se pode obter o material. A obtenção de dados para a realização de uma baseada na variação de forma da asa é relativamente mais barato e rápido que os métodos baseados em marcadores moleculares (requerendo apenas lâminas para montagem das asas, que podem ser reutilizadas, e uma câmara acoplada a microcomputador para obtenção das imagens, já que os programas para obtenção e análise dos dados são livres). Esses dados podem ser facilmente coletados de indivíduos adultos vivos ou espécimes preservados em museu, e ainda dezenas de asas podem ser digitalizadas e analisadas no mesmo dia (ex: Houle *et al.*, 2003). Porém a maior desvantagem de um teste baseado em forma da asa é que ele apenas pode ser usado em indivíduos adultos e com asas intactas (ou quase intactas).

9.4.2 Breve discussão sobre dimorfismo sexual

O dimorfismo sexual de tamanho é um carácter fenotípico presente em grande parte dos animais e tem sido extensamente estudado em insetos (ex: Maynard Smith, 1978; Michod & Levin, 1988; Bitner-Mathé *et al.*, 1995; Fairbairn, 1997; Imasheva *et al.*, 2000; David *et al.*, 2003). Apesar de muito comum, o dimorfismo sexual de tamanho não segue uma regra geral: as fêmeas podem ser maiores ou menores do que os machos. Usualmente as interpretações dessa variação de tamanho procuram explicar estratégias adaptativas da espécie, envolvendo tanto seleção sexual como seleção natural, que podem resultar em vantagens ecológicas (David *et al.*, 2003). Estudos com *Drosophila* sp. revelam que as fêmeas são em geral maiores do que os machos; a interpretação mais comum desse resultado é que esse carácter deve ser favorecido pela seleção natural pois são as fêmeas que botam ovos, porém não existe uma interpretação consenso (David *et al.*, 2003).

Em *C. macellaria*, espécie na qual as fêmeas são maiores do que os machos, essa diferença poderia ser interpretada de forma semelhante ao que acontece em *Drosophila*. Já em *C. hominivorax*, os machos são maiores do que as fêmeas; isso poderia ser interpretado, por exemplo, como evidência de um comportamento de competição entre os machos; dessa forma a seleção natural poderia favorecer a existência de machos maiores. Por outro lado também devem ser considerados os comportamentos sexuais das fêmeas das duas espécies para entender os padrões de dimorfismo observado, uma vez que fêmeas de *C. hominivorax* só copulam com um único macho, enquanto que não existem evidências de monogamia em fêmeas de *C. macellaria* (para mais detalhes ver discussão em Lyra *et al.*, em preparação; Parte III, Artigo 3). Interpretações sobre seleção sexual e dimorfismo como esta já foram sugeridas anteriormente (Ex: Lande, 1980; Michod & Levin, 1988; Székely, 2004). Os resultados obtidos evidenciam a necessidade da existência estudos mais aprofundados sobre os hábitos ecológicos dessas espécies, tanto em condições de laboratório como no campo.

A relação entre dimorfismo sexual e tamanho dos indivíduos foi analisada comparando-se a distância de procrustes (Rohlf, 1990) entre o consenso de macho e fêmeas com o tamanho do centróide médio da espécie. Foi evidente que a espécie na qual os machos são maiores (*C. hominivorax*) o dimorfismo sexual foi maior. Esta observação está de acordo com a regra de “Rensch” (em Székely, 2004), que postula que dimorfismo sexual aumenta com o tamanho do corpo quando machos são maiores do que as fêmeas e diminui quando estes são menores. A regra de “Rensch” é um padrão macro-ecológico atribuído normalmente a diferenças em seleção sexual que já foi observado em diversos táxons, incluindo aracnídeos, lagartos, cobras, tartarugas e primatas (Farbairn, 1997; Székely, 2004).

As correlações genéticas entre sexos são em geral grandes para caracteres morfológicos e análises teóricas e empíricas predizem uma taxa de evolução lenta para dimorfismo sexual de tamanho (Lande, 1980). A diferença significativa de tamanho e forma apontadas nesse trabalho entre as espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria*, pode ser mais uma evidência da existência de fortes fatores seletivos direcionando as adaptações ecológicas principalmente dentro da espécie *C. hominivorax*, que podem ter acelerado a evolução do dimorfismo sexual dentro do gênero. Nesse sentido essas espécies podem ser um bom modelo para estudos mais aprofundados sobre o surgimento e manutenção dessa variação sexual.

PARTE IV

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

10. DISCUSSÃO GERAL

10.1 Diversidade Genética e estrutura de populações da mosca da bicheira

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados com o objetivo de acessar a variabilidade genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax*, a mosca da bicheira. O trabalho aqui apresentado é até o momento o mais amplo estudo da variabilidade genética e distribuição da diversidade em populações naturais da espécie, incluindo a análise de 34 populações, desde o Caribe até o Uruguai.

Os resultados obtidos revelaram altos níveis de variabilidade mitocondrial e um padrão complexo de distribuição da variabilidade genética na espécie.

As populações da região do Caribe apresentaram os menores índices de diversidade genética com relação ao DNAmT, exceto Trinidad & Tobago, e alta estruturação populacional (ver Lyra *et al.*, *in press* - Parte II, Artigo 2). A baixa variabilidade genética, alta frequência de um haplótipo particular e os valores de distância genética relativamente altos entre as ilhas analisadas, pode sugerir que as populações de cada localidade amostrada sejam originárias de um evento fundador (Hendrick, 2005).

Torres & Azeredo-Espin (*in press*) estudaram as mesmas populações da região do Caribe através de marcadores microssatélites e obtiveram resultados que corroboram o padrão de alta estruturação revelado pelos marcadores de DNAmT, porém identificaram índices moderados de diversidade genética.

O contraste entre os dados de diversidade genética obtidos com marcadores do DNAmT e marcadores microssatélites para populações de *C. hominivorax* da região do Caribe, revela a necessidade de explicações alternativas e/ou complementares em relação a um simples modelo de evento fundador para a compreensão desse cenário. A diferença observada entre os marcadores, que possuem diferentes modos de herança e níveis de polimorfismo, pode sugerir, por exemplo: 1- uma rápida expansão do tamanho efetivo da população após evento fundador, permitindo a recuperação da diversidade nuclear e não da diversidade mitocondrial; 2- ou as populações das ilhas são originárias de colonizações antigas, o que também teria permitido uma recuperação mais rápida da diversidade nuclear e não mitocondrial; 3- as populações das ilhas podem ser originárias de múltiplas introduções de um mesmo haplótipo mitocondrial.

A grande estruturação populacional observada no Caribe, tanto com marcadores de DNAm quanto nucleares (Lyra *et al.*, *in press*; Torres & Azeredo-Espin, *in press*), sugere que as ilhas constituem unidades evolutivas independentes conectadas por reduzido fluxo gênico. Os dados obtidos com seqüenciamento do gene COII de algumas amostras corroboram esse resultado (Parte II, item 7).

Situações análogas de estruturação populacional entre ilhas e continente já foram identificadas anteriormente para outras espécies de insetos (Estoup *et al.*, 1996; De La Ruá *et al.*, 2001; Shao *et al.*, 2004; Baliraine *et al.*, 2004), e o isolamento geográfico é interpretado como a principal causa dessa diferenciação. Em *C. hominivorax*, o isolamento geográfico pode ser também a principal causa da grande diferenciação populacional. No caso da localidade de Trinidad & Tobago, onde as populações são mais diversas, a distância entre continente e ilha pode ser insuficiente para prevenir o fluxo gênico.

Os dados obtidos com seqüenciamento do gene COII para as amostras das ilhas do Caribe e continente Sul americano (ver Parte II, item 7), juntamente com dados de análise por PCR-RFLP do DNAm, revelaram grande diferenciação genética das populações de Cuba com relação às outras populações analisadas do Caribe e América do Sul.

Os resultados obtidos com marcadores de DNAm sugerem diferentes histórias de colonização para as diferentes ilhas do Caribe, o que torna mais complexo o padrão de distribuição genética observado para a espécie na região. Dada as semelhanças entre amostras de Cuba e amostras referenciais de populações da América do Norte e Central continental, é possível que as populações de Cuba sejam originárias de populações dessas regiões (ver capítulo 1, item 4.4), enquanto que as amostras das outras ilhas analisadas do Caribe parecem ter origem de populações da América do Sul. Roehrdanz & Johnson (1988) analisaram amostras da Jamaica e sugeriram uma possível origem da população na América do Sul, o que corrobora a hipótese acima apresentada. Uma análise mais extensiva e periódica na região do Caribe pode ajudar na obtenção de dados mais robustos que confirmem essa hipótese.

Na América do Sul, em contraste com os resultados obtidos para as populações do Caribe, os dados obtidos com a análise do DNAm revelam alta diversidade genética e diferenciação populacional pequena.

Os maiores índices de diversidade genética identificados para as populações da América do Sul, em contraste com os baixos índices encontrados no Caribe reforçam a interpretação que a

América do Sul representa o possível centro de origem da espécie, como sugerido anteriormente por Infante-Malachias (1999) e Infante-Malachias *et al.* (1999).

No Uruguai, os resultados obtidos com análise da variabilidade mitocondrial (Lyra *et al.*, 2005) e com marcadores microssatélites (Torres *et al.*, 2007), revelaram alta diversidade genética nas populações e sugeriram que as populações de *C. hominivorax* são muito similares no extremo sul da distribuição da espécie, sendo que os dados mitocondriais não identificaram variação entre as populações e os marcadores microssatélites revelaram pequena, porém significativa, variação. A pequena diferença de resultados obtidos entre os marcadores foi interpretada de duas maneiras: 1- os resultados refletem a contribuição diferencial dos sexos em mediar fluxo gênico; ou 2- diferenças no modo de herança e taxas de mutação dos marcadores (Torres *et al.*, 2007).

A análise conjunta de todas as populações da América do Sul através de marcadores do DNAm, incluindo as populações do Uruguai, Paraguai, Brasil, Venezuela, Equador e Colômbia, revelou pequena, mas significativa, diferenciação populacional para *C. hominivorax*. A distribuição da variação é caracterizada pela presença de muitas populações panmítica e poucas populações localmente diferenciadas (Lyra *et al.*, 2005; Lyra *et al.*, *in press*).

Torres (2006) realizou um estudo da variabilidade das populações de *C. hominivorax* na América do Sul, incluindo 21 populações (7 populações do Uruguai, 13 do Brasil e uma da Venezuela). Os resultados obtidos revelaram baixa diferenciação populacional, o que é concordante com o resultado geral obtido para a América do Sul com marcadores do DNAm (Lyra *et al.*, *in press*). Por outro lado, a comparação entre os pares de populações baseado nos marcadores microssatélites não revelou populações localmente diferenciadas, diferente do que aconteceu para os dados mitocondriais (que identificam poucos pares de populações mais diferenciados entre si).

Diferenciação populacional de insetos no continente é muitas vezes associada a isolamento por distância (ex: Krafur, 2002; Baliraine *et al.*, 2004), mas diferentes interpretações para padrões distintos de estruturação genética também têm sido sugeridas. Por exemplo, Grapputo *et al.* (2005), estudando a distribuição da diversidade genética de *Leptinotarsa decemlineata* (besouro da batata do Colorado) na América do Norte, sugeriu que a estrutura populacional observada foi principalmente devido a eventos fundadores durante a expansão territorial da espécie, formas de manejo da agricultura e aplicação de inseticidas. Scatagliini *et al.* (2006), trabalhando com populações da América do Sul de *Anthonomus grandis* (bicudo do

algodoeiro), propuseram que as populações eram resultados de invasões recentes e também antigas, isoladas por eventos de fragmentação de habitat.

Em populações de *C. hominivorax* da América do Sul a diferenciação genética não pode ser explicada pela distância geográfica, o que sugere que hipóteses alternativas para interpretação do padrão observado também precisam ser consideradas.

Nas regiões em que se observa populações panmíticas para DNAm_t e pouca variação entre as populações com marcadores microssatélites, as diferenças entre os marcadores, quanto a modo de herança e quantidade de polimorfismo apresentado, e migração diferencial entre os sexos parece explicar bem o padrão observado, como sugerido para as populações do Uruguai (Torres *et al.*, 2007).

Por outro lado, a observação de populações localmente diferenciadas quando ao DNAm_t e pouco diferenciadas para marcadores microssatélites leva à interpretações diferentes quanto a dinâmica das populações analisadas. Nesse caso, as diferenças entre os resultados obtidos com os diferentes marcadores poderiam ser explicadas, por exemplo, por flutuações no tamanho efetivo da população (populações demograficamente instáveis). Eventos de drástica redução no tamanho da população seguido de uma rápida expansão podem levar à recuperação da variabilidade nuclear (que pode mascarar um efeito gargalo) e à não recuperação da variabilidade mitocondrial (Nei *et al.*, 1975; Jonhson *et al.*, 2003), já que o tamanho efetivo mitocondrial é menor e o efeito gargalo deve ser mais drástico para esse marcador.

Variações no tamanho populacional podem ser causadas por variações sazonais. Phillips *et al.*, 2004, identificaram grande variação no tamanho das populações de *C. hominivorax* no Panamá, correlacionado com as estações secas e chuvosas. Torres (2006) realizou uma análise de variação temporal da diversidade de *C. hominivorax* no Uruguai e identificou variação significativa entre os anos.; os resultados obtidos sugeriram que deve haver eventos de extinção, expansão populacional rápida e recolonização local atuando na formação do padrão da diversidade genética na espécie.

Além das variações sazonais de temperatura e umidade, o uso intermitente de inseticidas em algumas localidades pode influenciar as populações locais de mosca da bicheira. Carvalho e colaboradores (Carvalho *et al.*, 2006, Carvalho *et al.*, *in press*) identificaram mutações no gene da Esterase em *C. hominivorax* que podem estar relacionadas com a resistência a inseticidas.

Como *C. hominivorax* é principalmente associada a animais domésticos, o deslocamento de regiões de pecuária também pode ser um fator importante que influencia a dinâmica de

populações da espécie na América do Sul. Ainda, é importante observar que a diminuição na diversidade genética mitocondrial em algumas localidades pode resultar de adaptação dos indivíduos a diferentes pressões seletivas do ambiente.

Os resultados aqui apresentados sugerem que diferentes fatores estão atuando na formação e manutenção do padrão de distribuição da diversidade genética observada, porém com base nos dados não é possível escolher entre um ou mais fatores para a criação de hipóteses mais concretas. Nesse sentido a associação entre marcadores moleculares e morfológicos aparece como alternativa para melhor entender a dinâmica populacional responsável pela estrutura genética da espécie. Estudos micro-geográficos e temporais utilizando, por exemplo, seqüenciamento de regiões específicas do DNAm (Ex: COII ou Domínio B da região A+T, Parte II, itens 6 e 7), além de marcadores nucleares, podem ser uma estratégia para se obter mais informações sobre eventos históricos e demográficos que influenciam a dinâmica de populações de *C. hominivorax*.

Diante do padrão de distribuição da variabilidade genética de *C. hominivorax* no Caribe e América do Sul observado nesse trabalho, algumas considerações em relação à implementação de programas de controle baseadas em SIT podem ser feitas.

Os dados sugerem que as ilhas do Caribe podem ser um local ideal para implementar programas de controle baseado em SIT, uma vez que as populações se apresentam como unidades relativamente isoladas uma das outras. Porém, antes de se iniciar um programa de erradicação com liberação de insetos estéreis, é importante avaliar a extensão da diversidade e divergência genética entre as linhagens selvagens e de laboratório que pode influenciar no sucesso do programa.

Na América do Sul, as populações de *C. hominivorax* apresentaram pequena diferenciação sugerindo que o fluxo gênico deve ser suficiente para manter a homogeneidade genética. Dessa forma um programa de controle em pequena escala geográfica não deve ser efetivo e, portanto, antes do desenvolvimento e implementação de uma estratégia de erradicação baseado na liberação de insetos são necessários grandes esforços envolvendo por exemplo, o envolvimento dos governos e produtores dos diferentes países, treinamento de pessoal e estudos genéticos em menor escala (ver Dyck, Hendrichs & Robinson 2005).

10.2 Mosca da bicheira como modelo para estudo de pragas

O atual cenário para distribuição da variabilidade genética em *C. hominivorax* revela que existe um padrão complexo para distribuição da diversidade genética da espécie ao longo de sua atual distribuição geográfica, e que diferentes fatores atuam para a formação e manutenção desse padrão. Torres (2006) sugeriu em seu trabalho que a dinâmica das populações de *C. hominivorax* se encaixa em um modelo de metapopulações, pelo menos em uma escala micro-geográfica. Esse modelo postula que existe um conjunto de sub-populações e estas são locais e efêmeras, estão sujeitas a extinção, re-colonização, podem sofrer crescimento ou redução, podem sofrer ação da seleção natural e estão ligadas por fluxo gênico (Wakeley, 2004). Alguns autores têm utilizado esse modelo para explicar a dinâmica de populações em espécies de importância médica ou econômica (Massonet *et al.*, 2002; Israely *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos com marcadores mitocondriais, quando contrastados com os dados de microssatélites para as mesmas populações, sugerem uma dinâmica envolvendo expansão e redução populacional, eventos de colonização e populações ligadas por fluxo gênico. Desta forma, o modelo de metapopulações, como proposto por Torres (2006) pode ser adequado para interpretar o padrão de distribuição da diversidade nesta espécie, pelo menos para algumas localidades.

Por outro lado, os resultados obtidos por análise de DNAm, sugerem que a interferência humana pode ser um fator importante para a dinâmica populacional de *C. hominivorax*, podendo interconectar populações distantes não consideradas no modelo de metapopulações. A dispersão no ambiente não é um atributo só da espécie e, no caso de *C. hominivorax*, o movimento de rebanhos, o uso de inseticidas, e a alteração no ambiente, por exemplo, podem influenciar na dinâmica dessas populações.

Ainda podemos considerar eventos de expansão populacional ou de distribuição relacionados à introdução de grandes criações de gado nas Américas no século XVI, para interpretar a atual distribuição da diversidade genética.

Nesse sentido, o desenvolvimento de modelos específicos para essa praga, que considerem a distribuição atual e histórica, as diferenças sazonais, a dinâmica micro-geográfica, e principalmente a influência humana, podem auxiliar muito na compreensão mais geral da distribuição genética da espécie e, quem sabe, possam também ser utilizados como modelos para outras espécies pragas. O uso de sistemas de informação geográficos (SIG) para combinar essas e

outras informações relevantes, advindas de estudos de genética de populações, ecologia da paisagem ou estatística espacial, pode auxiliar na criação de um modelo mais complexo que melhor explique os padrões de distribuição da variação genética no espaço (Manel *et al.*, 2003; Holderegger & Wagner, 2006; Storfer, 2007).

As abordagens moleculares e morfológicas foram realizadas de forma independente neste trabalho, já que o primeiro tinha a intenção de fazer um amplo estudo da distribuição da diversidade e segundo teve como objetivo caracterizar a variação morfológica da asa, para ser usada como marcador morfológico para diferenciar as populações da espécie. Esse é o primeiro trabalho a caracterizar especificamente a variação morfológica da asa da espécie e avaliar a utilidade desse marcador para futuros estudos populacionais.

Os dados obtidos para variação morfológica da asa sugerem que esta estrutura pode ser utilizada tanto em estudos de variação intra-específicos quanto interespecíficos. Foi possível identificar variação morfológica entre as localidades amostradas, o que pode sugerir a existência de pressões seletivas locais levando a diferenciação das populações. Nesse sentido, a investigação da correlação entre variação morfológica e marcadores moleculares que evoluem de forma mais rápida (ex: microssatélites) (Avisé 2004) pode fornecer informações muito valiosas no sentido de identificar populações estruturadas, o que pode interferir no sucesso de programas de erradicação da espécie *C. hominivorax*.

O trabalho aqui apresentado obteve informações importantes para a criação de um novo cenário da distribuição da diversidade genética de *C. hominivorax* na América do Sul e Caribe, bem como abre uma nova perspectiva para o estudo da variação morfológica em populações da mosca da bicheira. Em conjunto com os recentes trabalhos publicados para a espécie, este trabalho auxilia na construção de um amplo quadro sobre a complexidade da história evolutiva desta praga na sua atual distribuição geográfica e sugere que mais estudos, em escala micro-geográfica e temporal, podem ajudar a fazer dessa mosca um modelo para estudo de espécies pragas.

11. CONCLUSÕES

- A espécie *Cochliomyia hominivorax* apresenta estrutura populacional e alta diversidade mitocondrial ao longo da atual distribuição geográfica.
- A técnica de PCR-RFLP do genoma mitocondrial é informativa para o estudo da diversidade e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax*.
- O padrão de distribuição da diversidade mitocondrial é complexo.
- As ilhas do Caribe apresentam diferentes histórias evolutivas para populações de *Cochliomyia hominivorax*, envolvendo forte estruturação, diferentes eventos fundadores e provavelmente diferentes origens das populações.
- O sequenciamento de um fragmento do gene COII indica que o haplótipo mitocondrial de Cuba é distinto da América do Sul, e que as populações dessa ilha são originárias da América do Norte ou América Central continental.
- A pequena estruturação observada na América do Sul não pode ser explicada por isolamento por distância. A dinâmica populacional da espécie no continente devem envolver redução ou aumento populacional decorrente das técnicas de manejo ou variações ambientais.
- A região do Caribe e a América do Sul devem ser consideradas de formas distintas quanto às estratégias de manejo e controle da praga.
- A região A+T do DNA mitocondrial apresenta variação de tamanho decorrente da presença de duplicações dos blocos de sequência conservada no domínio A. O polimorfismo encontrado no domínio B sugere que a análise desta região pode auxiliar estudos populacionais em escala micro-geográfica.
- A asa é uma estrutura anatômica potencial para o estudo da variação morfológica entre populações de *C. hominivorax*.
- A espécie apresenta grande dimorfismo sexual em relação à asa e variação entre as populações.
- A variação de forma da asa pode ser utilizada para identificação rápida das espécies *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*. Isso pode auxiliar o monitoramento de re-introdução de *C. hominivorax* em áreas livres dessa mosca.

- A diferença grande entre dimorfismo sexual das duas espécies sugere que *Cochliomyia hominivorax* esteja sofrendo forte seleção, talvez por comportamento agressivo do macho e/ou comportamento monogâmico da fêmea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC (2007) Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. <http://www.abiec.com.br/>
- Almasan, A. & Mishra, N.C. (1991) Recombination by sequence repeats with formation of suppressive or residual mitochondrial DNA in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **88**, 7684-7688.
- Alves, S. M., & Bélo, M. (2002) Morphometric variation in housefly, *Musca domestica* (L.) with latitude. *Genetica*, **115**, 243-251.
- Avice J.C. (2000) Phylogeography: the history and formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avice, J.C. (2004) Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA.
- 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 (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.
- Azeredo-Espin, A.M.L. & Lessinger, A.C. (2006) Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genetica*, **126**, 111-131.
- Baker, C.S., Medrano-Gonzalez, L., Calambokidis, J., Perry, A., Pichler, F., Rosenbaum, H., Straley, J.M., Urban-Ramirez, J., Yamaguchi, M., & Von Ziegeler, O. (1998) Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among humpback whales in the North Pacific. *Molecular Ecology*, **7** (6), 695-707.
- Baliraine, F.N., Bonizzoni, M., Guglielmino, C.R., Osir, E.O., Lux, S.A., Mulaa, F.J. Gomulski, L.M., Zheng, L., Quilici, S., Gasperi, G. & Malacrida A.R. (2004) Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitis rosa* and *Ceratitis fasciventris* (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology*, **13** (3), 683-695.
- Baumgartner, D.L & Greenberg, B. (1985). Distribution and medical ecology of the blow flies (Diptera: Calliphoridae) of Peru. *Annals of the Entomological Society of America*, **78**, 565-587.
- Bitner-Mathé, B.C., Peixoto, A.A. & Klaczko, L.B. (1995) Morphological variation in natural population of *Drosophila mediopunctata*: altitudinal cline, temporal changes and influence chromosome inversions. *Heredity*, **75**, 54-61.
- Bitner-Mathé, B.C & Klaczko, L.B. (1999) Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: temporal and microgeographical variation. *Genetica*, **105**, 35-42.
- Bookstein, F.L. (1989) Principal warps: Thin-plate splines and the decomposition of deformation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, **11**, 567-585.
- Bookstein, F.L. (1991) Morphometric tools for landmark data. Cambridge University press, Cambridge, UK.

- Boore, J.L. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, **27**, 1767-1780.
- Boyce, M.T, Zwick M.T. & Aquadro, C.F. (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, **123**, 825–836.
- Brito, R.A., Manfrin, M.H, & Sene, F.M. (2002) Nested Cladistic Analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **22** (1), 131-143.
- Broce, A.B. (1985) Myiasis producing flies. Pp 83-100. In: Williams, R.E., Hall, R.D., Broce, A.B., & Scholl, P.L. (Eds), *Livestock Entomology*, Wiley, New York.
- Carvalho, R.A., Torres, T.T. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2006) A survey of mutations in *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and molecular identification of mutant alleles. *Veterinary Parasitology*, **140**, 344-351.
- Carvalho, R.A, Torres, T.T., Paniago M.D.G., & Azeredo-Espin, A.M.L. Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly *Cochliomyia hominivorax*. *Medical and Veterinary Entomology*. In press.
- Chow, S., Okamoto, H., Miyabe, N., Hiramatsu, K., & Barut, N. (2000) Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Molecular Ecology*, **9** (2), 221–227.
- Chu, K.H., Li, C.P., Tam, Y.K., & Lavery, S. (2003) Application of mitochondrial control region in population genetics studies of shrimp *Panaeus*. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 120-122.
- 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. *Journal of Molecular Evolution*, **25**, 116-125.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657–1659.
- Collinge, J.E., Hoffmann, A.A. & McKechnie, S.W. (2006) Altitudinal patterns for latitudinally varying traits and polymorphic markers in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 473-482.
- Coquerel, C. (1958) Note sur des larves appartenant a une nouvelle espèce de Diptère. *Annales de la Société Entomologique de France*, **27**, 171-176
- Coyne, J.A., & Beechan, E. (1987) Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* , **117**, 727-737.
- Crandall, K.A. & Templeton, A.R. (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, **134**, 959-969.
- Crystal, M.M. (1967) Reproductive behavior of laboratory reared screwworm flies (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, **4**, 443-450.
- Cushing, E.C.& Patton, W.S. (1933) Studies on the higher Diptera of medical and veterinary importance, *Cochliomyia hominivorax*, sp. nov., the screwworm fly of the New World. *Annals of Tropical Medical Parasitology*, **27** (4), 539-551

- David, J.R., Gibert, P., Mignon-Grasteau, S., Legout, H, Pétavy, G., Beaumont, C. & Moreteau, B. (2003) Genetic variability of sexual size dimorphism in natural population of *Drosophila melanogaster*: an isofemale-line approach. *Journal of Genetics*, **82** (3), 79-88.
- De La Rúa, P., Galián, J., Serrano, J. & Moritz, R.F.A. (2001) Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*, **10**, 1733–1742.
- De León, D. & Fox, I. (1980) Canine *minima* myiasis in Puerto Rico - a case report. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*, **64**, 126-128.
- Dear, J.P. (1985) A revision of the New World Chrysomyini (Diptera:Calliphoridae). *Revista Brasileira Zoologia*, **3**, 109-169.
- Dev, Y., LaChance, L.E. & Whitten, C.J. (1986) Polytene chromosomes, karyotype correlations and population cytology of the primaryscrewworm fly. *Journal of Heredity*, **77**,427-434.
- Dixon, E. B. 1962. Wing variations found in screw-worm flies, *Cochliomyia hominivorax* and three other Calliphoridae (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America*, **55**, 210-212.
- Dotson, E.M. & Bear, C. B. (2001) Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chags disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Molecular Biology*, **10**, 205-215.
- Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson A.S. Eds. (2005) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Dyck, V.A., Reyes Flores, J., Vreysen, M.J.B., Regidor Fernandez, E.E., Teruya, T., Baner, B., Gomez Riera, P., Lindquist, D. & Loosjes, M. (2005) Management of Area-wide integrated pest management programmes that intergrate the Sterile Insect Technique. Pp 524-542. *In* Dyck, V.A., Hendrichs, J., & Robinson, A.S. Eds. (2005) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- El-Azazy, O.M.E.(1992) Observations on the New World screwworm fly in Libya and the risk of its entrance into Egypt. *Veterinary Parasitology*, **42**, 303-310
- Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J.M., Goudet, J. & Scholl, A. (1996) Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Molecular Ecology*, **5** (1), 19-31.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. & Green, P. (1998a) Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, **8**, 175-185.
- Ewing, B. &Green, P. (1998b). Error Probabilities II. Phred. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using. *Genome Research*, **8**, 186-194.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.

- Fairbairn, D.J. (1997) Allometry for sexual size dimorphism: patterns and process in coevolution of body size in males and females. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**, 659-687.
- (FAO) Food and Agriculture Organization of United Nations (1993) Manual for the control of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), vol 2. Guide for the identification of flies in the genus *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae). FAO, Rome, Italy.
- (FAO) Food and Agriculture Organization of United Nations (1999) Programa de cooperación técnica. Control del gusano barrenador del ganado para apoyar el desarrollo agropecuario. Cuba. Relación final TCP/CUB/6613. FAO, Rome, Italy.
- (FAO) Food and Agriculture Organization of United Nations (2003) Programa de cooperación técnica. Control del gusano barrenador del Ganado. Haiti, Jamaica y República Dominicana. Relación final TCP/RLA/8927. FAO, Rome, Italy.
- (FAO) Food and Agriculture Organization of United Nations (2007) Agriculture Department: Animal production and Health division.
<http://www.fao.org/AG/AGAInfo/home/en/home.html>.
- FAOSTAT (2007) FAO integrated database. <http://faostat.fao.org/>
- Fauron, C. M.-R. and D. R. Wolstenholme. 1976. Structural heterogeneity of mitochondrial DNA molecules within the genus *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **75**, 3623-3627.
- Feijão, P.C., Neiva, L.S., Azeredo-Espin, A.M.L. & Lessinger, A.C. (2006) AMIGA: The Arthropodan Mitochondrial Genomes Accessible database. *Bioinformatics*, **22**, 902-903.
- Ferreira, M.J.M. (1983) Sinantropia de Calliphoridae (Diptera) em Goiânia, Goiás. *Revista Brasileira de Biologia*, **43**, 199-210.
- Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L. & Hausser, J. (1996) Origin and Evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 31-46.
- Gabaj, M.M & Beesley, W.N. (1989) American screwworm fly in Libya. *Veterinary Record*, **124**, 152.
- Gagné, R.J. & Peterson II, R.D. (1982) Physical changes in the genitalia of males of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), caused by mating. *Annals of the Entomological Society of America*, **75**, 574-578.
- García-Rodríguez, R. (2003) Erradicación de la mosca del gusano barrenador del ganado en la Isla de La Juventude, Cuba. Preparación del Caribe para la erradicación del gusano barrenador del ganado. Final report of expert mission, project RLA/5/044. Department of Technical Cooperation, IAEA, Vienna, Austria.
- 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 management of negros. London VI, pp 875.
- Grapputo, A., Boman, S., Lindström, L., Lyytinen, A. & Mappes, J. (2005) The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology*, **14** (14), 4207-4219.

- Guglielmone, A.A., Gimeno, E., Idiart, J., Fisher, W.F., Volpogni, M.M., Quaino, I., Anziani, O.S., Flores, S.G. & Warnke, O. (1999). Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestation in cattle. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 323-328.
- Guillot, F.S., Brown, H.E. & Broce, A.B. (1978) Behavior of sexually active male screwworm flies. *Annals of the Entomological Society of America*, **71**(2), 199-201.
- Guimarães. J.H., Papavero, N. & Prado, A.P. (1983) As miíases na região Neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Revista Brasileira de Zoologia*, **1**, 239-416.
- Guimarães, J.H. & Papavero, N. (1999) Myiasis in man and animals in the neotropical region. Plêiade/FAPESP. 308pp.
- Hall, D.G. (1948) The Blowflies of North America. Thomas Say Foundation, Baltimore. 477 pp.
- Hall, M., & Wall R. (1995). Myiasis of human and domestic animals. *Advances in Parasitology* **35**, 256-333.
- Hall, M.J.R., Edge, W., Testa, J.M., Adams, Z.J.O. & Ready P.D. (2001) Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, occurs as two geographical races. *Medical and Veterinary Entomology*, **15** (4), 393-402.
- Hatadani, L.M. & Klaczko, L.B. (2008) Shape and size variation on the wing of *Drosophila mediopunctata*: influence of chromosome inversions and genotype-environment interaction. *Genetica*, **133**, 335-342.
- He, M. & Haymer, D. (1999) Genetic relationships of populations and the origins of new infestations of the Mediterranean fruit fly. *Molecular Ecology*, **8**, 1247-1257
- Hedrick, P.W. (2005) Genetics of populations. 3rd ed. (737pp). Jones and Batlett Publishers, Inc.
- Holderegger, R. & Wagner, H.H. (2006) A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecology*, **21**, 793-796.
- Houle, D., Mezey, J., Galpern, P. & Carter, A. (2003) Automated measurement of *Drosophila* wings. *BMC Evolutionary Biology*, **3**, 25-37
- Huang, X. & Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, **9**, 868-877.
- Huey, R.B., Gilchrist, G.W., Carlson, M.L., Berrigan, D. & Serra, L. (2000) Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. *Science*, **287**, 308-309.
- Hyytia, P., Capy, P., David, J.R., & Singh. R.S. (1985). Enzymatic and quantitative variation in European and African populations of *Drosophila simulans*. *Heredity*, **54**, 209-217.
- (IAEA/FAO) International Atomic Energy Agency/Food and Agriculture Organization. (2000). Genetic sexing and population genetics of screwworms. August 7-11. 2000. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- (IBGE) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2005) Produção da pecuária municipal 2005. *Ficha Técnica*, **33**. 38 pp.
- (IBGE) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2007) Indicadores de produção pecuária. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/>

- Imasheva, A.G., Bubli, O.A. & Lazebny, O.E. (1994) Variation in wing length in Eurasian natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, **72**, 508-514.
- Imasheva, A.G., Moreteau, B. & David, J.R. (2000) Growth temperature and genetic variability of wing dimensions in *Drosophila*: opposite trends in two sibling species. *Genetic Research*, **76**, 237-247.
- Infante-Malachias, M.E. (1999) Estrutura genética de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) da região sudeste do Brasil: análise através de três tipos de marcadores genéticos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil, 122 p.
- Infante-Malachias, M.E., Yotoko, K.S.C. & Azeredo-Espin, A.M.L. (1999) Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from southeastern Brazil and northern Argentina. *Genome* **42**, 772-779.
- Infante-Vargas, M.E. & Azeredo-Espin, A.M.L. (1995) Genetic Variability in Mitochondrial DNA of Screwworm. *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochemical Genetics*, **33**, 737-756.
- Israely, N.; Ziv, Y. & Galun, R. (2005) Metapopulation Spatial-Temporal distribution patterns of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in a patchy environment. *Annals of the Entomological Society of America*, **98** (3), 302-308.
- Ittig, R.E.G & Gardenal, C.N. (2002) Haplotype diversity of the mitochondrial DNA D-Loop region in *Calomys musculus* (Rodentia, Muridae) detected by PCR-RFLP. *Biochemical Genetics*, **40** (9/10), 293-302.
- Johnson, J.A., Bellinger, M.R., Toepfer, J.E. & Dunn, P.O. (2004) Temporal changes in allele frequencies and low effective population size in greater prairie-chickens. *Molecular Ecology*, **13**, 2617-2630
- Junier, T & Pagni, M. (2000) Dotlet: diagonal plots in a Web browser. *Bioinformatics Applications Note* **16** (2), 178-179.
- Junqueira, A.C.M, Lessinger, A.C., Torres, T.T., Silva, F.R., Vettore, A.L., Arruda, P. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2004). The mitochondrial genome of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphoridae). *Gene*, **339**, 7-15.
- Kaufman, G. & Wasserman, M. (1957). Effects of irradiation on the screwworm, *Callitroga hominivorax* (Cof.). *University of Texas Publications*, **5721**, 246-259.
- Klassen, W. & Curtis, C.F. (2005). History of the sterile insect technique. Pp 3-36. In Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson, A.S. Eds. (2005) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Knipling, E.F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, **48**, 459-462.
- Krafsur, E.S. (1978) Aggregation of male screwworm flies, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) in South Texas (Diptera-Calliphoridae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **80** (2), 164-170.

- Krafsur, E.S. (2002) Population structure of tsetse fly *Glossina pallipes* estimates by allozyme, microsatellite and mitochondrial gene diversities. *Insect Molecular Biology*, **11** (1), 37-45.
- Krafsur, E.S. (2005) Role of population genetics in the sterile insect technique, pp. 389-406. In V. A. Dyck, J. Hendrichs and A. S. Robinson (eds.), *Sterile insect technique: Principles and Practice in area-wide integrated pest management*, Springer, Netherlands.
- Krafsur, E. S. & Whitten, C. J. 1993. Breeding structure of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) in Colima, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, **30** (2), 477-480
- LaChance, L.E., Bartlett, A.C., Bram, R.A., Gagne, R.J., Graham, O.H., McInnis, D.O., Whitten, C.J. & Seawright, J.A. (1982) Mating types in screwworm populations? *Science*, **218**, 1142-1145.
- LaChance, L.E. & Whitten, C.J. (1986) Cytogenetic studies of screwworm (Diptera: Calliphoridae) populations from southern Mexico and Jamaica. *Annals of the Entomological Society of America*, **79**, 792-798.
- Lande, R. 1980. Sexual dimorphism, sexual selection and adaptation in phylogenetic characters. *Evolution*, **34**, 292-305.
- Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2000) Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 71-80.
- Lessinger, A.C., Junqueira, A.C.M., Lemos, T.A., Kemper, E.L., da Silva, F.R., Vettore, A.L., Arruda, P. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2000). The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Molecular Biology*, **9**, 521-529.
- Lessinger, A.C., Junqueira, A.C.M., Conte, F.F. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2004) Analysis of conserved duplicated tRNA in the mitochondrial genome of blowflies. *Gene*, **339**, 1-6.
- Lewis, D.L, Farr, C.L, Farquhar, A.L. & Kaguni, L.S. (1994). Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, **11**, 523-538.
- Litjens, P., Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin A.M.L. (2001) Characterization of screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**, 183-188
- Lyra, M.L & Azeredo-Espin, A.M.L. (2002). Variação genética do DNA mitocondrial da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), na América do Sul. Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética, p.64 de 17 a 20 de setembro de 2002, Águas de Lindóia, SP
- Lyra, M.L., Fresia, P., Gama, S., Cristina, J., Klaczko, L.B. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2005) Analysis of Mitochondrial DNA Variability and Genetic Structure in Populations of New World Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal of Medical Entomology*, **42** (4), 589-595.
- Lyra, M.L, Klaczko, L.B & Azeredo-Espin A.M.L. Complex pattern of genetic distribution in populations of the New World Screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Medical and Veterinary Entomology*. *In press*.

- Lyra, M.L, Hatadani, L.M, Azeredo-Espin A.M.L. & Klaczko, L.B Wing size and shape variation in New World Screwworm Fly (Diptera: Calliphoridae): Sexual Dimorphism and population analyzes. *Em preparação*.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**(4),189-197.
- Mardulyn, P., Termonia, A. & Milinkovitch, M.C. (2003) Structure and evolution of the mitochondrial control region of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae): a hierarchical analysis of nucleotide sequence variation. *Journal of Molecular Evolution*, **56**, 38-45.
- Massonnet, B., Leterme, N., Simon, J.C., Weisser, W.W. (2002) Metapopulation structure of the specialised herbivore *Macrosiphoniella tanacetaria* (Homoptera, Aphididae). *Molecular Ecology*, **11**: 2511–2521.
- Maynard Smith, J. (1978) The evolution of sex. Cambridge University Press, Cambridge.
- McElroy, D., Moran, .P, Bermingham, E. & Kornfield, I. (1992) Restriction Analysis Package-REAP, Version 4.0. University of Maine, Orono, ME.
- McInnis, D.O. (1983) Cromosomal variation in the Screwworm: polymorphism or cryptic species? *The American Naturalist*, **122**, 840-842.
- McInnis, DO. (1981) Cytogenetics of a local population of *Cochliomyia hominivorax*, from northeastern Mexico. *Annals of the Entomological Society of America*, **76**, 628.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics*, **142**, 1061-1064.
- Michod, R.E. & Levin, B.R. (eds). (1988) The Evolution of sex. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Monteiro, L.R. & Reis, S.F. (1999) Princípios de Morfometria Geométrica. Editora Holos.
- Moraes, E.M., Manfrin, M.H., Laus, A.C., Rosada, R.S., Bomfin, S.C. & Sene, F.M. (2004) Wing shape heritability and morphological divergence of the sibling species *Drosophila mercatorum* and *Drosophila paranaensis*. *Heredity*, **92**, 466–473.
- Narang, S.K. & Degrugiller, M.E. (1995). Genetic fingerprint of 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. NY.
- Nei, M., Maruyama, T. & Chakraborty, R. (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**,1-10.
- Nei, M. & Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **76** (10): 5269-5273.
- Nei, M. & Tajima, F. (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, **97**, 145-163.

- Oliveira, M.T., Azeredo-Espin, A.M.L. & Lessinger, A.C. (2007) Mitochondrial DNA control region of muscidae flies: Evolution and structural conservation in a dipteran context. *Journal of Molecular Evolution*, **64**, 519-527.
- Oliveira, M.T., Rosa, A.C., Azeredo-Espin, A.M.L. & Lessinger, A.C. (2006) Improving access to the control region and tRNA gene clusters of Dipteran mitochondrial DNA. *Journal of Medical Entomology*, **43**(3), 636-639.
- Pfriem, P. (1983) Latitudinal variation in wing size in *Drosophila subobscura* and its dependence on polygenes of chromosome O. *Genetica*, **61**, 221-232.
- Phillips, P.L., Welch, J.B. & Kramer, M. (2004) Seasonal and Spatial distribution of adults Screwworms (Diptera: Calliphoridae) in Panama canal area, Republic of Panama. *Journal of Medical Entomology*, **41**(1), 121-129.
- Rawlins, S.C. (1985) Current trend in screwworm myiasis in the Caribbean. *Veterinary Parasitology*, **18**, 241-250.
- Reigada, C. & Godoy, W.A.C. (2005) Seasonal fecundity and body size in *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera : Calliphoridae). *Neotropical Entomology*, **34** (2), 163-168.
- 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) Mating types in Screwworm populations? *Reply Science*, **218**, 1143-1145.
- Ricklefs R.E. & Miles D.B. (1994). Ecological and evolutionary inferences from morphology: an ecological perspective. In: Wainwright PC, Reilly SM (eds) Ecological morphology: integrative organismal biology. University of Chicago Press, Chicago.
- Rocha, U.F. (1956) O verdadeiro nome da mosca “Bicheira” (Diptera: Calliphoridae). *Boletim de Industria Animal*, **15**, 53-58.
- Roe, A.D. & Sperling, F.A.H. (2007) Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: An integrative approach. *Molecular Ecology*, **16**, 3617-3633.
- Roehrdanz, R. L. (1989). Intraspecific Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm Fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochemical Genetics*, **27** (9-10), 551-569.
- 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.
- Rohlf, F. J. (1990) Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**, 299-316.
- Rohlf, F.J. (1998) TPSRelw for windows version 1.17. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- Rohlf, F.J. (2004) TPSDig software for windows version 1.4. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- Rohlf, F.J. (2005) TPSRegr for windows version 1.31. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).

- Rondan Dueñas, J.C., Panzetta-Dutari, G.M., Blanco, A. & Gardenal, C.N. (2002) Restriction fragment-length polymorphism of the mtDNA A+T-rich region as a genetic marker in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **95**, 352–258.
- Saito, S., Tamura, K. & Aotsuka, T. (2005) Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, **171**, 1695-1705.
- Sanetra, M. & Crozier, R.H. (2003) Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, **12** (9), 2281–2295.
- Scataglini, M.A., Lanteri, A.A. & Confalonieri, V.A. (2006) Diversity of Boll Weevil populations in South America: A phylogeographic approach. *Genetica*, **126**, 353–368.
- Scheiner, S.M. (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 35-68.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2000). Arlequin ver. 2.01. Software for population genetics data analyses. Genetics and Biometry Laboratory. Departament of Anthropology and Ecology. University of Geneva, Switzerland.
- Schultheis, A.S., Weigt, L.A. & Hendricks, A.C (2002) Arrangement and structural conservation of the mitochondrial control region of two species of Plecoptera: utility of tandem repeat-containing regions in studies of population genetics and evolutionary history. *Insect Molecular Biology*, **11** (6), 605-610.
- Sereno, J. R. B., Catto, J. B., Sereno, F. T. P. S. (1996). Prevenção de miíases umbilicais em bezerros criados extensivamente no Pantanal através da utilização de ivermectina. *Comunicado técnico – Embrapa Pantanal* **16**, 1-5.
- Shao, R. & Barker, S.C. (2007) Mitochondrial genomes of parasitic arthropods: implications for studies of population genetics and Evolution. *Parasitology*, **134** (2), 153-168.
- Shao, Z.-Y., Mao, H.-X., Fu, W.-J., Ono, M., Wang, D.-S., Bonizzoni, M. & Zhang, Y.-P. (2004) Genetic Structure of Asian Populations of *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Heredity*, **95**(1), 46–52.
- Sindan, 2008. Compêndio de produtos veterinários - SINDAN (www.cpv.com.br).
- Simon, C. McIntosh, C & Deniega, J. (1993). Standard Restriction Fragment Length Analysis of the mitochondrial genome is not sensitive enough for phylogenetic analysis or identification of 17-year Periodical Cicada broods (Hemiptera: Cicadidae): The potential for a new technique. *Annals of the Entomological Society of America*, **86** (3), 228-238.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651-701.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- Smouse, P.E., Long, J.C. & Sokal, R.R. (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, **35**, 627-632.

- Snäll, N., Huoponen, K., Savontaus, M.L. & Ruohomäki, K. (2002) Tandem repeats and length variation in the mitochondrial DNA control region of *Epirrita autumnata* (Lepidoptera: Geometridae). *Genome*, **45**, 855-861.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy. *WH Freeman Press*, San Francisco.
- Storfer, A., Murphy, M.A., Evans, J.S., Goldberg, C.S., Robinson, S., Spearl, S.F., Dezzani, R., Delmelle, E., Vierling, L. & Waits, L.P. (2007) Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity*, **98**, 128-142.
- Székely, T., Freckleton R.P. & Reynolds, J.D. (2004): Sexual selection explains Rensch's rule of size dimorphism in shorebirds. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **101**, 12224-12227.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**(8), 1596-1599.
- Tatarenkov, A. & Avise, J.C. (2007). Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **274** (1619), 1795-1798.
- Taylor D.B. & Peterson II, R.D. (1994) Population genetics variation in Primary and Secondary Screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **87** (5), 626-633
- Taylor D.B., Szalanski, A.L. & Peterson II, R.D. (1996) A polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism technique for identification of screwworms (Diptera: Calliphoridae). *Medical and Veterinary Entomology*, **10**, 63-70.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A. & Sing, C.F. (1992). A Cladistic Analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram Estimation. *Genetics*, **132**, 619-633.
- Templeton, A.R. (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7** (4), 381-397.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**, 4876-4882.
- Torres, T.T. (2006) Variabilidade Genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): uma nova perspectiva através de marcadores microssatélites. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.
- Torres, T.T., Lyra, M.L., Fresia, P. & Azeredo-Espin. A.M.L. (2007). Assessing Genetic Variation in the New World Screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, populations from Uruguay, In Vreysen, M.J.B., A.S. Robinson, and J. Hendrichs (Eds.), Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Torres, T.T., & Azeredo-Espin, A.M.L. Population structuring in New World Screw-worm populations from the Caribbean: insights from microsatellite data. *Medical and Veterinary Entomology*. In press.

- Townsend, C.H.T. (1915) New Generic Name for the Screw-worm Fly. *Journal Washington Academy of Sciences*, **5**, 646.
- Townsend, J.P. & Rand, D.M. (2004) Mitochondrial genome size variation in New World and Old World populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, **93**, 98-103.
- Tsujino, F., Kosemura, A., Inohira, K., Hara, T., Otsuka, Y.F., Obara, M.K., & Matsuura, E.T. (2002) Evolution of the A+T-rich region of mitochondrial DNA in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, **55**, 573-583.
- Valle, J. S. & Azeredo-Espin, A. M. L. 1995. Mitochondrial DNA Variation in Two Brazilian Populations of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Brazilian Journal of Genetics*, **18** (4), 521-526.
- Vargas-Teran ,M., Hursey B.S., & Cunningham E.P. (1994). Eradication of the screwworm from Libya using the Sterile insect technique. *Parasitology Today*, **10**(3), 119-122.
- Vargas-Terán, M., Hofmann, H.C. & Tweddle, N.E. (2005) Impact of Screwworm eradication programmes using insect sterile technique. p 629-650. In Dyck, V.A., Hendrichs, J., and Robinson A.S. (Eds) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Vila, M. & Björklund, M. (2004) The utility of the neglected mitochondrial control region for evolutionary studies in Lepidoptera (Insecta). *Journal of Molecular Evolution*, **58**, 280-290
- Wakeley, J. (2004) Metapopulation model for historical inference. *Molecular Ecology*, **13**, 865-875.
- Wells, J.D., & Sperling, F.A.H. (1999) Molecular Phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera:Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, **36**, 222-226.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. & Fink, W.L. (2004) Geometric Morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press, London, UK.
- Zhang, D-X, Szymura, J.M. & Hewitt, G.M. (1995). Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **40**, 382-391.
- Zhang, D.X. & Hewitt, G.M. (1997) Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**, 99-120.
- Zumpt, F. (1965) Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworths, London, UK.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Torres, T.T., **M.L. Lyra**, P. Fresia & A.M.L. Azeredo-Espin. (2007). Assessing Genetic Variation in the New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* Populations from Uruguay. In Vreysen, M.J.B., A.S. Robinson, and J. Hendrichs (Eds.), Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

“Variação Genética em populações da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*, no Uruguai”

Resumo

A mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*, é uma importante praga na região Neotropical pois as larvas dessa espécie causam miíases severas em animais de sangue quente. Essa espécie representa um sério problema para a pecuária em toda a sua atual distribuição geográfica, que inclui parte do Caribe e toda a América do Sul (exceto Chile). O conhecimento sobre a extensão e a distribuição da diversidade genética de *C. hominivorax* é importante para a caracterização das populações e pode contribuir para futuras decisões em relação a estratégias de controle. Esse artigo descreve a análise da variabilidade genética e estrutura de populações da mosca da bicheira no Uruguai, através do uso de dois diferentes marcadores, DNA mitocondrial e microssatélites.

Assessing Genetic Variation in New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* Populations from Uruguay

T. T. TORRES, M. L. LYRA, P. FRESIA and A. M. L. AZEREDO-
ESPIN

*Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG)
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), PO Box 6010,
Campinas, SP, Brazil*

ABSTRACT The New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) is an important parasitic insect pest in Neotropical regions. New World screwworm myiasis is caused by the larval stage of the fly infesting tissues of warm-blooded vertebrates. This species represents a serious threat to the livestock sector across its current distribution, which includes part of the Caribbean and all of South America (except for Chile). Knowledge of the extent and distribution of genetic variability of *C. hominivorax* is of great interest for the description of populations and for contributing to future strategies of control. This paper describes the analysis of genetic variability and structure of New World screwworm populations in Uruguay using two different molecular markers, mitochondrial DNA and microsatellites.

KEY WORDS New World screwworm, genetic differentiation, mitochondrial DNA, microsatellites

1. Introduction

The New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), one of the most important parasitic insect pests of warm-blooded vertebrates, causes invasive myiasis and is responsible for important economic losses to livestock rearing. The current distribution of the New World screwworm includes part of the Caribbean and all of South America (except for Chile). This species has been successfully eradicated from North and Central America using an area-wide approach involving the sterile insect technique (SIT) (Wyss 2000, Vargas-Terán et al. 2005). In 1988, the pest was introduced into Libya, but its spread to livestock and wildlife in the rest of Africa and the Mediterranean region was prevented by a successful SIT campaign using sterile flies shipped from the mass-rearing facility in Tuxtla-Gutiérrez, Mexico (Lindquist et al. 1992, Vargas-Terán et al. 1994).

In South America, however, this pest continues to affect the development of the livestock sector and wider economic development. An international effort is underway to evaluate the feasibility of eradicating the New World screwworm from endemic areas of the Caribbean and South America and to prevent invasions into screwworm-free areas. This involves *inter alia* collecting data on the damage and costs associated with control and on the distribution and density of the fly in these regions.

With respect to the latter, there have been speculations and conflicting reports about the existence of non-interbreeding populations and their possible effects on the control programme but to date there is no evidence that this situation exists (LaChance et al. 1982). To maximize the effectiveness of an eradication programme, it is essential to confirm that such populations do not exist in these new regions and to characterize the genetic variability of



Figure 1. The *Cochliomyia hominivorax* collection sites in Uruguay.

target populations. Knowledge of the genetic structure of New World screwworm populations will also be useful for identifying their actual and potential routes of gene flow and thereby improve the implementation of area-wide approaches to control this insect pest.

In the past, Krafur and Whitten (1993) examined isozyme loci in 11 Mexican New World screwworm populations and their estimate of Wright's F_{ST} (Wright 1965) was not significantly different from zero. They concluded, therefore, that screwworm populations in Mexico belonged to a single panmictic population. Taylor et al.

(1996) also used isozyme loci to study two Brazilian populations and compared the results with previous data from Costa Rica (Taylor and Peterson 1994) and partial data from Mexico (Krafur and Whitten 1993). They also concluded that New World screwworm forms a single panmictic population.

However, subsequent analyses of four Brazilian populations using different types of molecular markers in the mitochondrial and nuclear genomes, suggested a different pattern of substructuring. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) suggested that these

Table 1. Field-collected samples of *Cochliomyia hominivorax* in Uruguay.

Location	Number of individuals	Latitude	Longitude	Altitude (metres)
Bañados de Medina, Cerro Largo	24	32°23' 00 S	54° 21' 00 W	51
Cerro Colorado, Florida	29	33°52' 00 S	55° 33' 00 W	96
Colonia del Sacramento, Colonia	15	34°20' 00 S	57° 86' 67 W	213
Dayman, Paysandú	19	31°33' 00 S	57° 57' 00 W	27
Joaquín Suárez, Canelones	15	34°44' 01 S	56° 02' 12 W	203
Paso Muñoz, Salto	21	31°27' 00 S	56° 23' 00 W	55
San Antonio, Salto	15	31°24' 00 S	57° 58' 00 W	41

populations probably belonged to a single evolutionary lineage interconnected by reduced gene flow (Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995). The random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) technique was also used to detect genetic polymorphism and to select genetic markers to discriminate six Brazilian populations and one population from northern Argentina (Infante-Malaquias et al. 1999). In general, results from both mitochondrial and RAPD analyses were concordant in suggesting divergence among New World screwworm populations. Analysis of five Brazilian populations by means of isozyme loci revealed a high geographical differentiation across south-eastern Brazil with relatively low gene flow (Infante-Malaquias 1999).

One possible explanation for the discrepancies between the different data is that different levels of substructuring were present in different locations. Infante-Malaquias et al. (1999) suggested that South America could be the centre of origin of this species, explaining the high variability and the population structure found there whereas the homogenous populations of North America were possibly formed by a founder effect.

It is clear from the above that the available information is insufficient to infer patterns of genetic variation and structure among New World screwworm populations throughout their geographical range. Therefore, an effort was made to add to the body of information available on these aspects by using mtDNA and microsatellites to analyse the genetic variability and structure of Uruguayan populations of the New World screwworm.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling of New World Screwworm in Uruguay

New World screwworm samples were obtained from seven distinct geographic locations in Uruguay with distances between them ranging from 50 to 418 kilometres (Fig. 1, Table 1). Larvae were collected directly from

infested wounds in sheep, cattle and dogs in January 2003. Sampling of related individuals was avoided by choosing wounds in different animals and/or farms and by classifying larvae from the same wound by instar.

Larvae were transferred to the laboratory and reared until the pupal stage under standardized conditions (Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995) or fixed in 100% ethanol. Genomic DNA was extracted either from single adults, pupae or larvae using a phenol-chloroform procedure (Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995).

2.2. Mitochondrial DNA as a Molecular Marker

Diverse aspects related to the structure and evolution of mtDNA, such as simple and uniform organization, lack of recombination, maternal inheritance and high rate of nucleotide sequence evolution, have made it a valuable marker for estimating intraspecific genetic variability (Avice 1994).

RFLP analysis of mtDNA was previously used for New World screwworm populations and revealed a high level of genetic variation (Infante-Vargas and Azeredo-Espin 1995, Taylor et al. 1996). However, restriction analysis of mtDNA polymerase chain reaction products (PCR-RFLP) provides a faster and simpler method and has successfully been used for population analyses (Ross et al. 1997, Dueñas et al. 2002).

2.2.1. Mitochondrial DNA Variability in New World Screwworm Populations in Uruguay

Lyra et al. (2005) used mtDNA PCR-RFLP to examine the genetic variability among the seven Uruguayan populations sampled. Two regions of the mtDNA, the control region (A+T/12S) and subunits 1 and 2 of the cytochrome oxidase (*cox1/cox2*), were amplified and digested with the restriction endonucleases *Dra* 1 (A+T/12S), *Ase* 1 and *Msp* 1 (*cox1/cox2*).

Among the populations, nine haplotypes were observed. The mean nucleotide diversity (π) was 0.0229 and the haplotype diversity (H_s)

was 0.6355, indicating high mtDNA variability. The similarity index (F) was high (96.7%) and the estimate of nucleotide divergence between populations (δ) was very low (0.00055), suggesting a high similarity among samples from the different locations. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed no evidence of population differentiation, indicating that New World screwworm forms a single panmictic population in Uruguay. Lyra et al. (2005) suggested that the distribution of New World screwworm in the extreme south of the species' occurrence and the fact that there are no geographical barriers or important climatic differences between studied regions were responsible for the lack of differentiation in Uruguay.

2.3. Microsatellite Markers

Microsatellites, or simple sequence repeats, are short sequences made up of a single motif with no more than six bases that is tandemly repeated (Goldstein and Schlötterer 1999). They are found in large numbers and are relatively evenly spaced throughout the genome of every eukaryotic organism analysed so far.

Among the several classes of molecular markers, microsatellite loci stand out as co-dominant markers with a high number of alleles per locus, high polymorphism and a high heterozygosity value. Due to these features, variation in these co-dominant markers has been increasingly used as the marker of choice to investigate questions regarding population structure, gene flow and mating systems even in populations which have low levels of allozyme and mitochondrial variation. The recent isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for New World screwworm (Torres et al. 2004, Torres and Azeredo-Espin 2005) enables genetic variability and population structure of this pest in Uruguay to be investigated.

2.3.1. Microsatellite Amplification and Genotyping of New World Screwworm Populations in Uruguay

Ten previously characterized microsatellite markers (Torres et al. 2004) were used in this

study. The primer sequences and the procedures for microsatellite amplifications and analyses of PCR products were described by Torres et al. (2004).

2.4. Data Analyses

The number and frequency of alleles, the allele size range and the observed (H_O) and the unbiased expected (H_E) (Nei 1978) heterozygosities under Hardy-Weinberg equilibrium were determined per locus for each location. The software Micro-checker 2.2.0 (Van Oosterhout et al. 2004) was used to test for technical artefacts such as null alleles, stuttering and large allele dropout. Each locus and population was tested for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium expectations using exact tests implemented in GENEPOP, a population genetics software for exact tests and ecumenicism (Raymond and Rousset 1995). Genotypic linkage disequilibrium among all pairs of loci within each site was investigated using Fisher's exact test as implemented in GENEPOP. An unbiased estimate of the exact probability was obtained using the Markov chain algorithm (Guo and Thompson 1992). Two indices of genetic differentiation were estimated between the localities, F_{ST} and R_{ST} , the former based on the absolute frequencies of alleles (Weir and Cockerham 1984) and the latter estimated from the sum of the squared number of repeat differences (Slatkin 1995). An unbiased estimate of F_{ST} , θ was calculated using the FSTAT computer programme (Goudet 1995). The significance of pairwise F_{ST} estimates was tested by permuting genotypes among populations (Goudet et al. 1996). The overall estimate of R_{ST} , ρ_{ST} was calculated using RSTCALC, a PC-based programme for performing analyses of population structure, genetic differentiation and gene flow using microsatellite data (<http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/rst/rst.html>). Significance levels for simultaneous statistical tests were corrected using the sequential Bonferroni method (Rice 1989). The isolation-by-distance model of population genetic structure was tested by

linear regression of pairwise $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ against the natural logarithm of the geographical distance between population pairs (Rousset 1997).

3. Results and Discussion

3.1. Microsatellite Variation

The number of alleles and the expected and observed heterozygosity per locus and per population are given in Table 2. Analysis of 138 New World screwworm genotypes revealed a moderate degree of polymorphism across the seven sampling locations. Ten loci were used in the first analysis, but the locus *CH02* presented some ambiguous, non-reproducible patterns. For this reason, it was excluded from the statistical analysis.

For the nine microsatellite loci analysed, the number of alleles detected per locus and per population ranged from 2 to 10, with an average of 6 (Table 2). The observed heterozygosity (H_O), varied from 0.19 to 0.91 and the expected heterozygosities (H_E) varied from 0.37 to 0.87 (Table 2).

Significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (exact probability test, $P < 0.05$) was recorded for all sampling localities. In all cases, departures from expectations were due to an excess of homozygotes. Among the possible factors that might account for these deviations is the Wahlund effect, since the samples were collected from different farms at each location. However, such effects should be apparent in most of the loci across populations, which was not the case for this data set. Another factor that could also have caused the observed deviations is the presence of null alleles. These result from mutations such as substitutions, insertions, or deletions in one or both priming sites preventing the binding of the DNA strand and primers (Callen et al. 1993) and non-amplification of the allele. At the population level this can lead to a misinterpretation of the number of heterozygotes and consequently of Hardy-Weinberg deviations. Only the locus *CH10* presented a significant number of null alleles

and the analysis excluding this locus was not significantly altered. Furthermore, these results are being confirmed by the preliminary analysis of new populations using these loci and additional loci (Torres and Azeredo-Espin 2005). The occurrence of demographic changes that affected New World screwworm populations may therefore be the main cause of the observed homozygote excess. These in turn could have arisen from decreases in temperature and humidity in the Uruguayan winter and/or persistent insecticide treatment which can cause mass-population mortality and local extinction of New World screwworm populations.

Linkage disequilibrium was found in only two of 252 comparisons among the loci and populations analysed, but no common pair of loci showed non-random associations in all the populations (data not shown).

3.2. Interpopulation Variability

Most variation was found within rather than between populations and the seven populations exhibited remarkably similar allele distributions. This is consistent with the results found by the PCR-RFLP of the mtDNA.

Two measures of interpopulation genetic differentiation were used in this study (F_{ST} and R_{ST}). The global multilocus estimate of R_{ST} was 0.015 and of F_{ST} was 0.031. Both estimates, although low, were numerically very similar and significantly different from zero ($P < 0.05$, for R_{ST} and $P < 0.001$, for F_{ST}), suggesting that little differentiation exists among these populations.

The relationship between local populations was tested by calculating pairwise F_{ST} estimates because it was demonstrated that F_{ST} yields the better estimate when the number of loci is small (< 10) or the sample size is small (Gaggiotti et al. 1999). F_{ST} estimates between populations ranged from -0.0005 to 0.0853 (Table 3) and for five of the ten population pairs were significantly different from zero at the 0.05 level.

These low levels of substructuring could be attributed to the high dispersal capacity of

Table 2. Genetic diversity in *Cochliomyia hominivorax* from seven localities in Uruguay.

Locus		Dayman 2N = 38	S. Antonio 2N = 42	Colonia 2N = 30	B. Medina 2N = 48	Suarez 2N = 30	C. Colorado 2N = 58	P. Muñoz 2N = 30
CH01	N _a	6	6	5	6	5	6	5
	H _O	0.3158	0.4762	0.5333	0.5833	0.6667	0.5517	0.5333
	H _E	0.6230*	0.7607*	0.7517	0.6809	0.6943	0.6031	0.7126*
CH05	N _a	5	5	6	7	4	7	5
	H _O	0.6316	0.5238	0.7333	0.4167	0.5333	0.5172	0.8000
	H _E	0.5874	0.6190	0.6667	0.6755*	0.4483	0.6636*	0.7747
CH09	N _a	4	4	4	7	2	6	5
	H _O	0.3333	0.4500	0.5333	0.7917	0.2000	0.5357	0.5333
	H _E	0.3762	0.4423	0.5724	0.7216	0.3701	0.6227	0.6299*
CH10	N _a	6	6	6	6	4	5	6
	H _O	0.3684	0.1905	0.2000	0.2917	0.6000	0.4000	0.4000
	H _E	0.6344*	0.5912*	0.7885*	0.7101*	0.6598	0.5167*	0.5011*
CH11	N _a	5	10	9	8	9	7	7
	H _O	0.6111	0.6190	0.7333	0.6364	0.6667	0.4286	0.4000
	H _E	0.6159	0.7317	0.7816	0.8245*	0.8276*	0.7247*	0.6943*
CH12	N _a	8	8	8	8	5	9	7
	H _O	0.8333	0.7143	0.6000	0.9167	0.6000	0.7241	0.8000
	H _E	0.8476*	0.8479*	0.8736	0.8475	0.6460	0.8100	0.7931
CH14	N _a	7	7	6	6	6	6	5
	H _O	0.5789	0.4762	0.6000	0.5217	0.6000	0.5714	0.5333
	H _E	0.8179*	0.6690*	0.7356	0.6135	0.6989	0.8013*	0.6713
CH15	N _a	7	7	6	6	3	6	5
	H _O	0.5556	0.4762	0.5333	0.3750	0.2667	0.2759	0.4000
	H _E	0.8302*	0.7607*	0.7862	0.7943*	0.5080*	0.7828*	0.7310*
CH20	N _a	7	7	5	7	5	6	4
	H _O	0.3684	0.4762	0.5333	0.5000	0.8000	0.6897	0.5333
	H _E	0.7084*	0.7120	0.6414	0.6835*	0.7540	0.7048*	0.6920
All	Mean N _a	55	59	55	61	43	58	49
loci	Mean H _O	0.5107	0.4892	0.5556	0.5592	0.5481	0.4816	0.5481
	Mean H _E	0.6723*	0.6816*	0.7331*	0.7279*	0.6230*	0.6922*	0.6889*

N_a, number of allelesH_E, expected heterozygosityH_O, observed heterozygosity.* denotes a significant ($\alpha = 0.05$) deviation from Hardy-Weinberg equilibrium

New World screwworm, since migration is assumed to prevent genetic differentiation at neutral markers (Agis and Schlötterer 2001). However, the analysed populations showed no isolation by distance ($P = 0.6115$). Since restricted migration results in positive correla-

tion between geographical and genetic distance (Slatkin 1993), simple migration models may not be sufficient to explain the low differentiation between New World screwworm populations. One factor that could be responsible for this pattern of genetic differentiation

Table 3. F_{ST} estimates for all *Cochliomyia hominivorax* population pairwise comparisons.

Study area	Salto	Colonia	B. Medina	Suarez	C. Colorado	Paso Muñoz
Dayman	0.0080 ^{NS}	0.0171 ^{NS}	0.0194 ^{NS}	0.0497*	0.0209 ^{NS}	0.0281 ^{NS}
Salto		0.0112 ^{NS}	0.0111*	0.0709*	0.0201*	0.0240*
Colonia			-0.0005 ^{NS}	0.0675*	0.0200 ^{NS}	0.0378*
B. Medina				0.0853*	0.0163 ^{NS}	0.0334*
Suarez					0.0664*	0.0533*
C. Colorado						0.0399*

NS, not significant

* significant at the 5% nominal level after standard Bonferroni corrections

is the passive migration of larvae by the movement of infested animals. However, an alternative explanation can be considered as responsible for the low differentiation and the lack of isolation by distance. It was noted (Slatkin 1993) that the absence of isolation by distance could be indicative of a recent recolonization event. Considering the hypothesis of mass-mortality by climatic conditions or insecticide treatment, a recolonization by a large founder population could cause a demographic turnover if this population spread rapidly over Uruguay during climatically favourable seasons. In this case, a very similar allele distribution would be expected over the country. To test this hypothesis it is necessary to compare Uruguayan New World screwworm samples collected during different hot/rainy seasons, as well as samples from intermediate and central populations which can be acting as stable sources of New World screwworm for recolonization events.

4. Conclusions

Information about patterns of genetic variation, structure and gene flow is needed before investing in large-scale efforts to control insect pests. This information can, to a large extent, be assessed using modern molecular techniques. Mitochondrial and microsatellite markers have helped to provide this information for New World screwworm populations in Uruguay.

The results presented here and elsewhere by Lyra et al. (2005) suggest that the seven populations from Uruguay are very similar, sharing homogenous haplotype (for mtDNA) and allele (for microsatellites) distributions. Although the mtDNA data indicate that this species forms a single panmictic population in Uruguay, results from microsatellite analysis yielded low, but significant, levels of subdivision between populations. These results can be explained by differences in the modes of inheritance of the two markers since the effective population size of mtDNA is only one quarter that of nuclear DNA (Sanetra and Crozier 2003). These differences, however, can also be explained by sex-biased gene flow among these populations. This would suggest that levels of female-mediated gene flow are slightly higher than male levels; consequently, mtDNA markers showed less structuring than the microsatellite polymorphisms. While Mayer and Atzeni (1993) described higher dispersal rates for New World screwworm females, this should be further investigated since microsatellite data also suggested that restricted migration might not play a significant role in population differentiation.

The results presented here provide some baseline data on genetic variation to which other New World screwworm populations can be compared. Analysis of other populations throughout its geographical distribution would determine if similar patterns of genetic variation and gene flow are observed and lay

the groundwork for future control strategies against this livestock pest.

5. Acknowledgements

The authors thank R. Rodrigues for valuable technical assistance and J. Dargie and two anonymous reviewers for helpful discussions and comments on an earlier draft of this manuscript. This work was supported by grants to AMLAE from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant 03/01458-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant 471132/01-2) and the International Atomic Energy Agency (IAEA, grant 11822/RO). TTT was supported by a fellowship from FAPESP (grant 02/00035-4).

6. References

- Agis, M., and C. Schlötterer. 2001. Microsatellite variation in natural *Drosophila melanogaster* populations from New South Wales (Australia) and Tasmania. *Molecular Ecology* 10: 1197-1205.
- Avice, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Callen, D. F., A. D. Thompson, Y. Shen, H. A. Phillips, R. I. Richards, J. C. Mulley, and G. R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite marker. *American Journal of Human Genetics* 52: 922-927.
- Dueñas, J. C. R., G. M. Panzetta-Dutari, A. Blanco, and C. N. Gardenal. 2002. Restriction fragment length polymorphism of the mtDNA AT-rich region as a genetic marker in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95: 352-358.
- Gaggiotti, O. E., O. Lange, K. Rassmann, and C. Gliddon. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology* 8: 1513-1520.
- Goldstein, D., and C. Schlötterer. 1999. Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Goudet, J. 1995. Fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- Goudet, J., M. Raymond, T. de Meeüs, and F. Rousset. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144: 1933-1940.
- Guo, S. W., and E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Infante-Malaquias, M. E. 1999. Estrutura Genética de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) da região sudeste do Brasil: análise através de três tipos de marcadores genéticos. Ph.D. Dissertation. State University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil.
- Infante-Vargas, M. E., and A. M. L. Azeredo-Espin. 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochemical Genetics* 33: 237-256.
- Infante-Malaquias, M. E., K. S. C. Yotoko, and A. M. L. Azeredo-Espin. 1999. Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from southeastern Brazil and northern Argentina. *Genome* 42: 772-779.
- Krafsur, E. S., and C. J. Whitten. 1993. Breeding structure of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) in Colima, Mexico. *Journal of Medical Entomology* 30: 477-480.
- LaChance, L. E., A. C. Bartlett, R. A. Bram, R. J. Gagne, O. H. Graham, D. O. McInnis, C. J. Whitten, and J. A. Seawright. 1982. Mating types in screwworm populations. *Science* 218: 1142-1143.
- Lindquist, D. A., M. Abusowa, and M. J. R. Hall. 1992. The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Medical and Veterinary Entomology* 6: 2-8.
- Lyra, M. L., P. Fresia, S. Gama, J. Cristina, L. B. Klaczko, and A. M. L. Azeredo-Espin. 2005. Analysis of mitochondrial DNA vari-

- ability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal of Medical Entomology* 42: 589-595.
- Mayer, D. G., and M. G. Atzeni. 1993.** Estimation of dispersal distances for *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Environmental Entomology* 22: 368-374.
- Nei, M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995.** GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Rice, W. R. 1989.** Analyzing table of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ross, K. G., M. J. B. Krieger, D. D. Shoemaker, E. L. Vargo, and L. Keller. 1997.** Hierarchical analysis of genetic structure in native fire ant populations: results from three classes of molecular markers. *Genetics* 147: 643-655.
- Rousset, F. 1997.** Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.
- Sanetra, M., and R. H. Crozier. 2003.** Patterns of population subdivision and gene flow in the ant *Nothomyrmecia macrops* reflected in microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* 12: 2281-2295.
- Slatkin, M. 1993.** Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Slatkin, M. 1995.** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Taylor, D. B., and A. L. Peterson II. 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., A. L. Peterson II, and G. Moya-Borja. 1996.** Population genetics and gene variation in screwworms (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochemical Genetics* 34: 67-76.
- Torres, T. T., and A. M. L. Azeredo-Espin. 2005.** Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes* 5: 815-817.
- Torres, T. T., R. P. V. Brondani, J. E. Garcia, and A. M. L. Azeredo-Espin. 2004.** Isolation and characterization of microsatellite markers in the new world screw-worm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Notes* 4: 182-184.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, and P. Shipley. 2004.** MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Vargas-Terán, M., B. S. Hursey, and E. P. Cunningham. 1994.** The eradication of the screwworm from Libya using the sterile insect technique. *Parasitology Today* 10: 119-122.
- Vargas-Terán, M., H. C. Hofmann, and N. E. Tweddle. 2005.** Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique, pp. 629-650. *In* Dyck, V. A., J. Hendrichs, and A. S. Robinson (eds.), *Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1965.** The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Wyss, J. H. 2000.** Screw-worm eradication in the Americas - overview, pp. 79-86. *In* Tan, K. H. (ed.), *Proceedings: Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests. International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests, and the 5th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 28 May-5 June 1998, Penang, Malaysia. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia.*

APÊNDICE B

“*Cochliomyia hominivorax* da América do Sul X *C. hominivorax* da Líbia: É possível inferir a possível origem da infestação com base nos haplótipos de DNAm?”

1. Introdução

Em março de 1988 *Cochliomyia hominivorax* foi identificada pela primeira vez fora das Américas, na cidade de Trípoli, Líbia (El-Azazy, 1989; Gabaj & Beesley, 1989). Evidências de infestações por esta praga em ovelhas, gado, camelos, cachorros e até humanos, alertaram autoridades locais para a necessidade de conter a expansão desta mosca.

Estudos baseados no alto custo de manejo e controle da praga nas Américas revelaram que a presença desta espécie na Líbia poderia ter conseqüências sociais e econômicas devastadoras para o país e para outras localidades da África e do mediterrâneo (Palca, 1990; FAO, 1992). Além do impacto social-econômico decorrente da introdução dessa praga, também foi apontado um possível impacto ecológico, tanto para animais selvagens como para espécies que competem pelo mesmo nicho.

Os resultados desses estudos levaram o governo da Líbia, juntamente com a FAO e outros órgãos da Organização das Nações Unidas, a investir fortemente em um programa de erradicação desta espécie da África baseado na técnica do SIT (esterilização em massa de insetos). Esta técnica foi utilizada com sucesso na erradicação de *C. hominivorax* do sul dos Estados Unidos, México e de alguns países da América Central (Wyss, 2000; Vargas-Terán *et al.*, 2005), e em 1992 o governo da Líbia pode declarar oficialmente que o país estava livre da mosca da bicheira, sendo este um dos programas mais bem sucedidos com relação ao controle desta praga.

Apesar do sucesso em erradicar esta espécie do Norte da África, parte da história da introdução de *C. hominivorax* no velho mundo permanece desconhecida. A origem da infestação ainda é tema de discussão até os dias atuais.

O primeiro autor a sugerir uma possível origem da infestação de *C. hominivorax* na Líbia foi W.N. Beesley (1991). Esse autor sugeriu que as moscas poderiam ser originárias do Uruguai, onde a mosca sempre foi um problema da pecuária, devido à existência de relações comerciais

envolvendo a compra e venda de grandes cargas de ovelhas vivas entre os dois países. Porém até hoje não se havia realizado uma comparação entre amostras das duas localidades.

Taylor *et al* (1991) foram os primeiros a analisar amostras da Líbia com marcadores RFLP total do DNA mitocondrial e compararam com dados previamente obtido para América do Norte e Central (Roehrdanz 1989). Os autores identificaram que um único haplótipo composto na Líbia, que não havia sido descrito para nenhuma localidade analisada, e portanto sugeriram que a origem da infestação provavelmente era de algum lugar fora da América do Norte e Central. Mais tarde, Taylor *et al.* (1996) realizaram um estudo de PCR-RFLP do DNAm_t de diferentes localidades da América Central e do Sul. Neste estudo também não encontraram um haplótipo idêntico ao da Líbia, porém identificaram amostras parecidas no Brasil e Caribe e concluíram que a origem mais provável da amostra da Líbia era da América do Sul.

Narang & Degrugillier (1995) analisaram amostras da Líbia, Costa Rica, Belize e Brasil (Rio de Janeiro) por RFLP Total e PCR-RFLP do DNAm_t e sugeriram uma possível origem de infestação na América do Sul, baseado na semelhança das amostras obtidas.

O objetivo desse trabalho foi analisar amostras do Uruguai através da técnica de RFLP e fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos anteriormente por outros autores, na intenção de fornecer novos dados para tentar esclarecer a origem da infestação de *C. hominivorax* na Líbia.

2. Material e Métodos

2.1 RFLP total do DNAm_t do Uruguai

Amostras: As amostras do Uruguai foram previamente utilizadas para a análise da variação populacional de *C. hominivorax* no país através da técnica de PCR-RFLP do DNAm_t (Lyra *et al.*, 2005) e a escolha das amostras para análise por RFLP total foi realizada com base nos resultados obtidos. Com o objetivo de amostrar diferentes mitocôndrias, amostrou-se diferentes feridas e diferentes haplótipos dentro da mesma ferida.

Foram analisados 57 indivíduos em 36 feridas, nas sete populações do Uruguai (Juaquín Suarez: N=8; Bañados de Medina N=6; Colonia: N=8; Cerro Colorado: N=11. Daymán: N=8; Paso Muñoz: N=8 e San Antonio: N=8).

Digestão por endonucleases de restrição: O DNA total de *C. hominivorax* foi digerido com 4 enzimas de restrição diagnósticas: *Hae*III (GG/CC), *Hind*III (A/AGCTT), *Msp*I (C/CGG), *Pvu*II

(CAG/CTG). As digestões foram realizadas com uma enzima de cada vez seguindo condições recomendadas pelos fabricantes (Gibco-BRL e Pharmacia) utilizando-se 6-8 μ l de DNA (aproximadamente 2.5U/ μ g). As reações foram interrompidas pela adição de 4 μ l de uma solução contendo Ficol, SDS, azul de bromofenol e xilenocianol.

As amostras digeridas foram aplicadas em um gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, e submetida à corrida de eletroforese com voltagem de aproximadamente 20V por 16-18 horas. No gel foram aplicados os padrões de tamanhos moleculares DNA Φ X174/*Hae*III e λ /*Hind*III (Gibco-BRL) para posterior estimativa dos tamanhos dos fragmentos. O DNA foi transferido para uma membrana de Nylon Hybond-N (Armstrong) seguindo a técnica de “Southern Blot” (Southern, 1975). Digestões que produziram novos padrões foram repetidas para confirmação do resultado.

Hibridação: Para a visualização dos fragmentos de DNA as membranas foram hibridadas com o DNA mitocondrial de uma sonda heteróloga de *Cochliomyia macellaria* ou de *Haematobia irritans*, previamente marcada com α P³² (sonda radioativa ou “quente”) ou com digoxigenina (sonda “fria”) (Infante-Vargas & Azeredo-Espin, 1995), segundo a disponibilidade de materiais para realização do experimento. O tamanho dos fragmentos foi estimado por análise de regressão conduzida manualmente, comparando os tamanhos dos fragmentos com os marcadores de peso molecular Φ X174/*Hae*III e λ /*Hind*III.

2.2 Análise dos dados

A análise dos dados foi feita de forma comparativa com os resultados obtidos anteriormente por diferentes autores.

Os dados de RFLP total do DNAm_t de *C. hominivorax* foram comparados com os resultados obtidos por: Roehrdanz & Johnson (1988) - linhagens de laboratório provenientes do México, Texas e Jamaica; Roehrdanz (1989) - linhagens de laboratório provenientes do Texas, México, Guatemala, Costa Rica e Jamaica; Taylor *et al.* (1991) - amostra de Belize (Linhagem OW87) e Líbia; Narang & Degruglier (1995) - Amostra Belize, Costa Rica, Brasil (Rio de Janeiro) e Líbia; Infante-Vargas & Azeredo-Espin (1995) - Amostras do Brasil de Adamantina-SP, Amparo-SP, Botucatu-SP e Caraguatatuba-SP; Lyra & Azeredo-Espin (2002) - Goiânia-GO e Manaus-AM. Foram comparados apenas os padrões das enzimas comuns a todos os trabalhos.

A comparação com os dados de PCR-RFLP do DNAm_t foi realizada entre os trabalhos de Taylor *et al.* (1996) - amostras da Costa Rica, Caribe, Brasil (Rio Grande do Sul) e Líbia. ; Narang & Degruglier (1995) - Amostra Belize, Costa Rica, Brasil (Rio de Janeiro) e Líbia; Lyra *et al.* (2005) - Uruguai e Lyra *et al.* (*in press*) - América do Sul e Caribe. Para essa comparação apenas o fragmento contendo a região COI/COII foi utilizado pois é a única comum entre os trabalhos.

Narang & Degruglier (1995) identificaram pela técnica de PCR-RFLP que a enzima *Hpa* I não digeriu o fragmento amplificado de COI/COII na Líbia e no Brasil, porém digeriu o fragmento de amostras da Costa Rica e Belize. Para poder fazer uma comparação direta com esse resultado, selecionamos um total 68 indivíduos de diferentes localidades do Uruguai, Brasil, Venezuela e República Dominicana para proceder a uma digestão com a enzima *Hpa* I. Além dessas amostras foi incluída a amostra OW87 (Belize), proveniente da Biofábrica de Fargo (EUA), e utilizada no trabalho de Narang & Degruglier (1995) para ser utilizada como referência.

3. Resultados

Os padrões de restrição obtidos pela técnica de RFLP total do DNAm_t foram compilados na tabela 1. Nessa tabela todos os padrões para as enzimas comuns obtidos nos trabalhos anteriores (ver descrito em material e métodos) e também os padrões obtidos para as amostras do Uruguai (em negrito na tabela 1). Os padrões **I** da enzima *Hae*III, **H** de *Hind* III, **K** de *Msp* I e **E** de *Pvu* II foram identificados na restrição da amostra UST1 (San Antonio, Uruguai), caracterizada por ter a região A+T do DNAm_t maior (ver Parte II, 6); o tamanho do DNAm_t dessa amostra foi estimado em 17kb (~1000 pb maior do que DNAm_t de *C. hominivorax* já descrito -Lessinger *et al.*, 2000).

Com base nos fragmentos de restrição, foram construídos haplótipos compostos para os indivíduos. Para facilitar a análise comparativa, uma nova denominação de cada haplótipo foi estabelecida, porém foram respeitados os padrões de restrição obtidos (para detalhes da nomenclatura original vide cada trabalho específico). Os haplótipos compostos encontrados em cada localidade estão descritos na tabela 2.

Tabela 1- Padrões de restrição obtidos pela digestão do DNA mitocondrial de *C. hominivorax*. Os padrões da América do Norte e Central foram descritos por Roehrdanz e Johnson (1988), Roehrdanz, (1989). Os padrões da Líbia foram descritos por Taylor *et. al.* (1991) e Narang & Degrugillier (1995); Os padrões da América do Sul foram descritos nos trabalhos de Infante-Vargas & Azeredo-Espin (1995), Narang & Degrugillier (1995), Lyra & Azeredo-Espin (2002). Os padrões do Uruguai descritos desse trabalho estão juntos com os da América do Sul, sendo que os padrões exclusivos do Uruguai estão em negrito. ** descreve um padrão de restrição que só foi identificado em uma única amostra do Brasil por Narang & Degrugillier (1995).

Enzimas	Padrões	América do Norte e Central	América do Sul	Líbia
<i>HaeIII</i>	A	7.5, 4.8, 2.0, 1.1, 0.8	7.5, 4.8, 2.0, 1.1, 0.8	---
	B	7.5, 7.0, 1.1, 0.8	7.5, 7.0, 1.1, 0.8	7.5, 7.0, 1.1, 0.8
	C	8.6, 4.8, 2.0, 0.8	---	---
	D	7.5, 5.9, 2.0, 0.8	---	---
	E	---	8.2, 7.5, 1.1, 0.8	---
	F	---	7.5, 3.0, 2.0, 1.8, 1.1, 0.8	---
	G	---	9.0, 7.0	---
	H	---	7.5, 5.9, 2.0	---
	I	---	8.6, 7.0, 1.1, 0.8	---
<i>HindIII</i>	A	6.8, 4.2, 3.3, 0.52, 0.5, 0.45	6.8, 4.2, 3.8, 0.6, 0.5	---
	B	7.7, 6.8, 0.52, 0.5, 0.45	8.0, 6.8, 0.8	---
	C	5.5, 4.2, 3.3, 1.3, 0.52, 0.5, 0.45	---	---
	D	6.8, 4.0, 3.8, 0.52, 0.5, 0.45	6.8, 3.8, 3.6, 0.6	6.8, 4.0, 3.8, 0.52, 0.5, 0.45
	E	6.8, 4.0, 3.0, 0.8, 0.52, 0.5, 0.45	6.8, 4.2, 3.1, 0.7, 0.6	---
	F	5.5, 4.2, 3.0, 1.3, 0.52, 0.5, 0.45, 0.3	---	---
	G	5.5, 3.2, 2.8, 1.3, 0.52, 0.5, 0.45	---	---
	H	---	7.9, 4.2, 3.8, 0.6, 0.5	---
<i>MspI</i>	A	5.0, 4.9, 4.2, 1.4	5.0, 4.8, 4.2, 1.3	5.0, 4.9, 4.2, 1.4
	B	6.1, 5.0, 4.2	6.1, 5.2, 3.8, 1.3	---
	C	4.7, 4.7, 4.5, 1.0, 0.35	---	---
	D	5.0, 4.8, 2.3, 1.8, 1.3	---	---
	E	5.6, 5.0, 4.9	6.1, 5.2, 4.9	---
	F	---	5.2, 5.0, 3.8, 1.3	---
	G	---	5.2, 4.2, 3.8, 1.5	---
	H	---	6.6, 5.2, 4.2	---
	I	---	6.7, 4.2, 4.0	---
	J	---	5.0, 4.2, 3.8, 1.3	---
	K	---	6.0, 5.0, 5.2, 1.3	---
<i>PvuII</i>	A	7.8, 3.0, 2.9, 0.87, 0.57	7.8, 3.0, 2.9, 0.87, 0.57**	7.8, 3.0, 2.9, 0.87, 0.57
	B	7.8, 3.0, 2.9, 1.4	---	---
	C	---	9.0, 3.0, 2.9, 0.8, 0.6	8.8, 3.0, 2.9, 0.87, 0.57
	D	---	9.0, 5.9, 0.8, 0.6	---
	E	---	10.0, 3.0, 2.9, 0.8, 0.6	---

Tabela 2: Haplótipos mitocondriais compostos identificados para indivíduos de *C. hominivorax*. URU: Uruguai, BRA: Brasil, EUA: Estados Unidos, MEX: Mexico, GUA: Guatemala, CoR: Costa Rica, BEL: Belize, LIB: Líbia. * Amostras caracterizadas nesse trabalho; I: Infante-Vargas & Azeredo-Espin (1995), L: Lyra & Azeredo-Espin (2002), N: Narang & Degrugillier (1995), R: Roehrdanz (1989), T: Taylor *et. al.* (1991). Em negrito, haplótipos exclusivos do Uruguai identificados nesse trabalho, Sublinhado e em itálico, haplótipo da Líbia. ** Esse haplótipo composto só foi identificado uma única vez em amostra do Brasil por Narang & Degrugillier (1995).

Enzimas					Localidades (Trabalho de referência)								
Hap	<i>Hae</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Pvu</i> II	URU (*)	BRA (I, L, N)	EUA (R)	MEX (R)	GUA (R)	CoR (R)	JAM (R)	BEL (T, N)	LIB (T, N)
H1	A	A	G	C									
H2	B	A	A	C									
H3	B	A	A	D									
H4	B	B	A	C									
H5	B	A	F	C									
H6	A	A	E	C									
H7	E	A	A	C									
H8	B	A	E	C									
H9	A	D	G	C									
H10	B	D	A	C									
H11	A	A	A	C									
H12	A	A	F	C									
H13	A	D	A	C									
H14	G	A	A	C									
H15	B	A	H	C									
H16	A	A	J	C									
H17	A	A	I	C									
H18	H	A	I	C									
H19	I	H	K	E									
H20	B	A	A	A									
H21	A	A	A	A									
H22	B	B	B	A									
H23	C	A	A	A									
H24	B	C	B	A									
H25	A	C	A	A									
H26	A	A	D	A									
H27	A	D	C	B									
H28	D	F	A	A									
H29	A	E	C	B									
H30	A	A	E	A									
H31	A	A	B	A									
H32	A	D	A	A									
<u>H33</u>	<u>B</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>A</u>		**							

Taylor *et al.* (1996) e Lyra *et al.* (*in press*) utilizarão a enzima *Msp* I para digestão do fragmento COI/COII do DNAm. Taylor *et al.* (1996) identificam 2 padrões distintos nas amostras (que foram denominados A e C no trabalho de Lyra *et al.*, *in press*), sendo que o padrão C foi identificado nas amostras da Líbia e nas amostras da República Dominicana, Trinidad e Tobago e Brasil. O outro padrão (A) foi identificado em amostras provenientes da Costa Rica, Cuba, Trinidad & Tobago e Brasil. Lyra *et al.* (*in press*) identificaram os dois padrões em todos os países da América do Sul analisados, bem como na República Dominicana, Trinidad & Tobago e Jamaica (só não foi identificado em Cuba).

Das amostras escolhidas para análise por PCR-RFLP nesse trabalho, com o intuito de comparar com os resultados obtidos por Narang & Degruglier (1995), apenas a amostra OW87 apresentou digestão do fragmento amplificado. Esse resultado também não auxilia na identificação da origem das amostras provenientes da Líbia.

4. Discussão

A análise dos padrões de restrição obtidos com as diferentes enzimas e dos haplótipos compostos obtidos para os indivíduos de *C. hominivorax* revela que continua difícil prever a origem exata da infestação da Líbia.

O haplótipo composto identificado para as amostras da Líbia (BDAA) parece ser quase que exclusivo (Tabela 2), em comparação com todas as amostras já analisadas dos países da América do Sul, Norte ou Central. Apesar de Narang & Degruglier (1995) terem identificado o mesmo haplótipo em uma única amostra Brasileira, proveniente do Rio de Janeiro, esse haplótipo não foi identificado para nenhum outro trabalho com amostras Sul Americanas que incluíram um número muito mais expressivo de indivíduos analisados (Esse trabalho, N=57-Uruguai; Infante-Vargas & Azeredo-Espin (1995), N=405 - Brasil, Lyra & Azeredo-Espin (2002), N=61-Brasil).

Quando analisados separadamente cada padrão de restrição obtido para as diferentes enzimas, não foi possível obter nenhum cenário mais claro que pudesse auxiliar na interpretação da origem de introdução. Os padrões de restrição obtidos com as enzimas *Msp* I e *Hae* III para as amostras da Líbia (A e B, respectivamente), estão presentes em amostras da América do Sul, do Norte e Central; o padrão D da enzima *Hind* III, que aparece nas amostras da Líbia, é mais raro porém está presente no México, na Costa Rica e na localidade de Caraguatatuba no Brasil (Infante-Vargas & Azeredo-Espin, 1995). O padrão A da enzima *Pvu*II, por sua vez, é o mais

freqüente nas amostras nas América do Norte e Central (Tabela 2) porém só foi identificado por Narang & Degrugillier (1995) no Brasil.

Comparando-se os resultados obtidos por PCR-RFLP não foi possível identificar nenhum padrão que auxilie na identificação da origem da introdução na Líbia.

As amostras do Uruguai analisadas aqui foram comparadas com os trabalhos que caracterizaram amostras na Líbia (Taylor *et al* 1991; Narang & Degrugillier, 1995) e com trabalhos realizados com amostras Brasileiras (Infante-Vargas & Azeredo-Espin, 1995, Lyra & Azeredo-Espin, 2002). O haplótipo da Líbia não foi identificado em nenhuma amostra Uruguiaia (Tabela 2), nem mesmo os padrões de restrição D e A para as enzimas *Hind* III e *Pvu*II, respectivamente. Os resultados aqui obtidos sugerem que a infestação na Líbia pode não ter origem no Uruguai, ao contrario do que foi sugerido no trabalho de Beesley (1991), porém não é possível sugerir outra localidade como possível origem dessas amostras.

Os resultados aqui apresentados somam informação aos trabalhos anteriores por incluir pela primeira vez dados do Uruguai e fazer uma análise compilando todos os dados genéticos obtidos na tentativa de se inferir a origem da infestação de *C. hominivorax* na Líbia. Porém, da mesma forma que os trabalhos anteriores, não chega a resultados conclusivos.

Com base nos dados aqui apresentados, sugerimos que apenas a análise de fragmentos de restrição não é suficiente para se estudar a possível origem da introdução da praga na África.. Nesse sentido, a análise de seqüências específicas do DNAm_t pode ser uma abordagem mais sensível e detalhada para estudos da possível origem da infestação.

5. Referências

- Beesley, W.N. (1991) The New World screwworm fly in North Africa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **85**, 173-179.
- El-Azazy, O.M.E. (1989) Wound myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in Libya. *Veterinary Record*, **124**, 103.
- (FAO) Food and Agriculture Organization of United Nations (1992). The New World Screwworm eradication program. North Africa 1988-1992. 192pp.
- Gabaj, M.M & Beesley, W.N. (1989) American screwworm fly in Libya. *Veterinary Record*, **124**, 152.
- Infante-Vargas, M.E. & Azeredo-Espin, A.M.L. (1995) Genetic Variability in Mitochondrial DNA of Screwworm. *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochemic Genetics*, **33**, 737-756.

- Lyra, M.L. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2002). Variação genética do DNA mitocondrial da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), na América do Sul. Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética, p.64 de 17 a 20 de setembro de 2002, Águas de Lindóia, SP
- Lyra, M.L., Fresia, P., Gama, S., Cristina, J., Klaczko, L.B. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2005) Analysis of Mitochondrial DNA Variability and Genetic Structure in Populations of New World Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal of Medical Entomology*, **42** (4), 589-595.
- Lyra, M.L, Klaczko, L.B & Azeredo-Espin A.M.L. Complex pattern of genetic distribution in populations of the New World Screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Journal of Medical Entomology*. In press.
- Narang, S.K. & Degrugiller, M.E. (1995) Genetic fingerprint of screwworm (Diptera: Calliphoridae) infestation in North Africa by mitochondrial DNA markers. *Florida Entomologist*, **78** (2), 294-304.
- Palca, J. (1990) Libya gets unwelcome visitor from the west. *Science*, **249**, 117-118.
- Roehrdanz, R. L. 1989. Intraspecific Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm Fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochemical Genetics*, **27** (9-10), 551-569.
- 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.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, **98**, 503-517
- Taylor, D.B., Hammack, L. & Roehrdanz, R.L. (1991) Reproductive compatibility and mitochondrial DNA restriction site analysis of the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*, from North Africa and Central America." *Medical and Veterinary Entomology*, **5** (2), 145-151.
- Taylor D.B., Szalanski, A.L. & Peterson II, R.D. (1996) A polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism technique for identification of screwworms (Diptera: Calliphoridae). *Medical and Veterinary Entomology*, **10**, 63-70.
- Vargas-Terán, M., Hofmann, H.C. & Tweddle, N.E. (2005) Impact of Screwworm eradication programmes using insect sterile technique. p 629-650. In Dyck, V.A., Hendrichs, J., and Robinson A.S. (Eds) *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Wyss, J.H. (2000) Screwworm Eradication in the Americas. *Annals of the New York Academy of Science*, **791**, 241-247.