

Universidade Estadual de Campinas



Ana Carolina Martins Junqueira

TILIZAÇÃO DO ADNA PARA ESTUDOS GENÉTICO-EVOLUTIVOS
RELACIONADOS A INTRODUÇÃO E DISPERSÃO DE
Chrysomya putoria (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) NO BRASIL

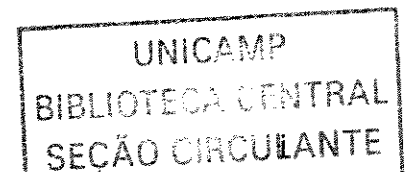
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ana Carolina Martins
Junqueira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Campinas - SP
2002

UNICAMP



UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	J/UNICAMP
	J968u
V	EX
TOMBO BC/	53492
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 14,00
DATA	30/09/03
Nº CPD	

-010210.290735

CM00182588-5

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

J968u

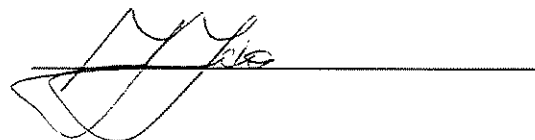
Junqueira, Ana Carolina Martins

Utilização do aDNA para estudos genético-evolutivos relacionados à introdução e dispersão de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil/ Ana Carolina Martins Junqueira. -- Campinas, SP:[s.n.], 2002.

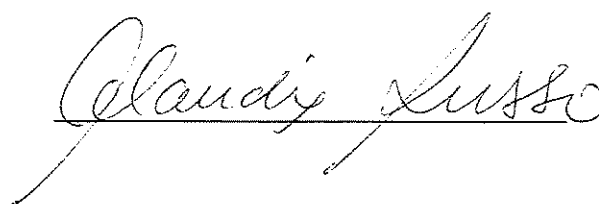
Orientadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Diptera. 2. DNA mitocondrial. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

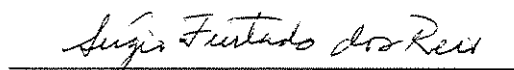
Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin



Profa. Dra. Claudia Augusta de Moraes Russo



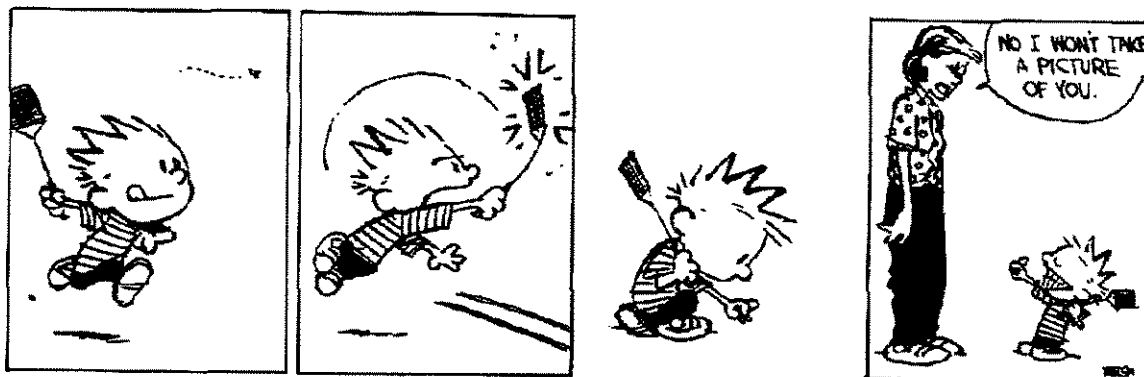
Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis



Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

874 5 7800

DEDICATÓRIA



Com toda justiça, dedico este trabalho a todas as moscas que fielmente participaram da tese. Sem estes pequenos insetos, que são detestados por tantos, o trabalho jamais poderia ter sido concluído e novas idéias também não teriam surgido...

“OS INSETOS”

Parecem rochas mas são ninhos de cupins
Parecem frutos mas são colméias
Parecem nuvens mas são enxames
Parecem longe mas são pequenos
Parecem mortos mas estão quietos
Parecem terra mas estão vivos
Parecem letras nos livros
Parecem inofensivos
Parecem grandes mas estão perto
Parecem lerdos mas estão quietos
Parecem ser mas são incertos

Arnaldo Antunes

“Cada um sabe a dor e a delícia de ser o que é”

Caetano Veloso

“Se é difícil prever o futuro, às vezes é
igualmente difícil reconstituir o passado”

François Jacob

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e exemplo profissional Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, por me incentivar e estimular durante a iniciação científica e mestrado, por me ensinar a viver a ciência na alegria e na tristeza, por me perceber e me fazer crescer nesse mundo das moscas e da genética molecular, por me dar a liberdade de seguir meus passos e estimular minha vida científica de uma maneira muito especial, por saber dar valor e respaldo aos resultados obtidos sempre pensando mais alto, por me deixar voar quando foi preciso, por fazer meus olhos brilharem e simplesmente por acreditar em mim.

À Ana Cláudia Lessinger, que sempre esteve ao meu lado na bancada, me orientando, me disciplinando e me servindo como exemplo de uma grande cientista. Em especial, agradeço pelas grandes discussões e cumplicidades científicas e pessoais, sejam elas na bancada do laboratório ou na mesa do Bar das Coxinhas.

À Rosângela Rodrigues, ou simplesmente “Rô”, pelo cuidado especial com minhas amostras e sequências e por estar sempre presente quando mais precisamos. Agradeço também por abastecer a gaveta das bolachas, que tantas vezes foram a minha salvação no almoço e no jantar.

À Salete, por manter a criação de moscas e cuidar delas como se fossem suas “filhinhas”, garantindo o sucesso das coletas e dos resultados obtidos no laboratório. Agradeço também a paciência de sempre deixar um café quentinho para todos nós!

À Tati, por estar sempre interessada nos resultados e tão atenciosa às discussões e sugestões.

À Mari, pela disposição em querer ajudar e pelas discussões a respeito da fascinante área do “ancient DNA”.

À Ize, ao Túlio e ao Joan, por criarem um ambiente tão bom e descontraído no Lab, trocando informações e abertos a sugestões.

Ao Mário Constantino Filho, pelas ajudas preciosas nas coletas e nas atividades de campo.

Ao Prof. Dr. Cláudio Carvalho, por me receber na Universidade Federal do Paraná e contribuir com as amostras tão bem preservadas da coleção entomológica do Departamento de Entomologia.

À Profa. Dra. Cristina Esposito, por me acolher na Universidade Federal do Pará e me ajudar nas coletas e identificação de *C. putoria*, além das valiosas discussões a respeito da dinâmica das populações desta espécie. Agradeço também as doações de espécimes de califorídeos do Museu Paraense Emílio Goeldi.

À Profa. Dra. Lígia Borges e seus alunos Paulo, Marina, Antônio e Luciano, por me auxiliarem na coleta realizada na Fazenda Experimental da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Ao Alberto, por sua atenção, respaldo e receptividade na coleta feita na Universidade Federal da Bahia e por fazer questão de me apresentar à sua cidade, Salvador.

À Profa. Dra. Denise Pamplona, pelas amostras cedidas pelo Museu Nacional do Rio de Janeiro.

Ao Dr. Paraluppi, por enviar as amostras de califorídeos da sua coleção entomológica na Universidade Federal do Amazonas e no Instituto de Pesquisas da Amazônia.

À Profa. Dra. Cláudia A. de Moraes Russo, por ter discutido a tese e pelas sugestões atenciosas durante a pré-banca e também depois dela.

Ao Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis, por ter aceito participar da banca prévia, ainda que a distância.

Ao Prof. Dr. Gonçalo Amarante Pereira, pelas discussões durante o decorrer da minha formação científica e acadêmica, desde o início da graduação.

À Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki ter participado da análise desta tese.

Aos meus grandes amigos da turma 96, Carlinha, Michele, Tati, Paula, Rachel, Renata Nitta, Victor, Thiago e Patrick pelas discussões científicas, pelo interesse no meu trabalho, por sempre estarem torcendo por mim e por serem, todos, tão carinhosos. Também não posso esquecer das boas “baladas” e dos momentos de expressão de uma verdadeira amizade.

À Joana, minha amiga tão especial para todos os momentos. Agradeço por saber me entender tão bem e me dar incondicionalmente seu ombro quando precisei. Agradeço pelas broncas, elogios, sugestões e até por repicar colônias de bactérias num sábado à noite. Agradeço por acreditar em mim e torcer sempre, criando uma relação de respeito, admiração e amizade que certamente vai durar para toda vida. Porque em seu coração as coisas simples têm a dimensão da grandeza...

Ao meu Pedro, por ser um amigo de verdade e confiar em mim; por ser um exemplo de competência e ambição que te fazem um ser iluminado. Pela beleza de se deixar desvendar e, principalmente, de me deixar participar deste processo. Por me ouvir calado quando era do silêncio que eu precisava e por se expressar seguramente quando eram as suas palavras que eu queria ouvir.

À Carolina, por toda sua sinceridade e por sermos amigas fiéis ao que sentimos. Agradeço pelos bons momentos que te fizeram ser muito especial para mim, por ser uma pessoa realmente confiável e admirável.

À Marina, por retomarmos nossa amizade que havia parado no tempo. Por sabermos aceitar as diferenças com maturidade e fazer delas o ponto de partida para nossa “nova-velha” amizade.

Ao Thiago, pelas brigas, discussões e principalmente pelos momentos da reconciliação (um verdadeiro advogado!); por expressar seu carinho e atenção nos momentos certos e por ser tão divertido quando quer.

Ao Léo, pela atenção com meu trabalho e pelos apelidos inusitados. Nunca me esquecerei das noites varadas para terminar com tanto talento e carinho “meu

primeiro pôster", que ainda hoje é motivo de elogios dos transeuntes do corredor do Lab de Genética Animal.

Ao André, por sempre estar interessado no meu trabalho e pelas discussões a respeito dos rumos da pós-graduação. Pelo carinho durante o início das minhas descobertas profissionais e por ser uma referência de seriedade.

Ao Fer, pelas gargalhadas e cervejas noite afora. Por ser sempre autêntico e saber demonstrar seu carinho por mim dentro de sua timidez intrínseca e por ser alguém dotado de uma inteligência grandiosa, capaz de discutir tantos assuntos com interesse e sinceridade.

Ao Ed, por compartilhar os interesses comuns e me ouvir atenciosamente, mesmo quando todos os outros já tinham cansado dos meus assuntos biológicos.

Ao Gui, por compartilhar as angústias e ter se tornado um verdadeiro psicólogo. Agradeço também pelas memoráveis viagens para Itamambuca, sempre regadas a cerveja e muita diversão.

Ao Preg, pelo seu indescritível "jeito preg de ser".

Ao Dú Cano, Dudu, Ri, Brunão, Marcelo, Alê e todos os outros amigos que sempre estiveram presentes com muito bom humor e que sem dúvida contribuíram para minha formação e descontração.

À Laurinha, que me entendeu nos momentos de tensão, tentando me acalmar. Por tudo que você é e pela força e coragem que sempre demonstrou ter; por aprender a se interessar por meu trabalho e por ser sempre a minha irmãzinha.

Ao Luis, meu irmão e companheiro misterioso durante toda vida. Agradeço por ter começado a brigar menos comigo por causa do computador e pelas confidências culturais.

À Bába, que cuidou de mim desde que eu nasci com tanto carinho e atenção, sempre preocupada com meu bem estar e com minhas preferências alimentares. Por acompanhar minha trajetória e acreditar que minha dedicação terá frutos. Por todas as velinhas acendidas, por trás da torcida incondicional.

À minha mãe, Helena, que sempre tentou aceitar meu ritmo maluco e compreender minhas decisões. Agradeço especialmente por ter me acolhido na sua asa quando eu precisei e por ter me ajudado a alçar vôo quando quis aprender a voar. Agradeço por todo carinho e atenção que eu nem sempre soube valorizar, mas que sempre tive a consciência de que foram, são e sempre serão essenciais para minha formação. Por me admirar e ser um exemplo de dedicação. Por sempre ter sido uma verdadeira mãe.

Ao meu pai, Laurindo, que sempre me estimulou e foi um referencial de inteligência e competência. Agradeço por cuidar tão bem de mim e me alcançar com seu silêncio-falado. Agradeço pelas dicas de leitura, pelos artigos deixados no meu quarto, pelas valiosas discussões e sugestões durante toda minha vida e formação profissional.

À Fapesp, pela concessão da bolsa de mestrado, que propiciou a execução deste trabalho. Processo nº 00/00423-9.

ÍNDICE	PÁGINA
RESUMO	1
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	
1. Introdução das espécies de <i>Chrysomya</i> no Novo Mundo	6
2. Acesso ao “Ancient DNA”	13
2.1. Degradação do DNA	14
2.2. Recuperação e caracterização do aDNA	18
3. A região A+T do DNA mitocondrial	19
OBJETIVOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Amostras de <i>C. putoria</i>	24
2. Extração do DNA: Isolamento do DNA genômico através de DNAzol™	30
3. Amplificação por PCR da região A+T	32
4. Clonagem e Minipreparação plasmidial	35
4.1. Clonagem “Sureclone”	35
4.1.1. <i>Purificação e quantificação</i>	35
4.1.2. <i>Ligação</i>	36
4.1.3. <i>Transformação</i>	38
4.2. Clonagem “TOPO®-TA Cloning”	38
4.2.1. <i>Ligação</i>	39
4.2.2. <i>Transformação</i>	41
4.3. Seleção de colônias recombinantes	41
4.4. Minipreparação plasmidial por lise alcalina para sequenciamento	42
5. Sequenciamento	43
6. Análises das sequências	44
RESULTADOS	
1. Coletas	48
2. Acesso à região controle	49

2.1. Evidências para a duplicação do tRNA ^{Ile} .	52
3. Acesso à Região Controle de <i>C. putoria</i> .	60
4. Caracterização do domínio A	60
4.1. Utilização do domínio A como marcador molecular: identificação espécie-específica.	64
5. Variabilidade genética em <i>C. putoria</i>	76
DISCUSSÃO	
1. Coletas	85
2. Acesso à região controle do mtDNA	87
2.1. Duplicação do tRNA ^{Ile}	89
3. Acesso à Região Controle de <i>C. putoria</i>	91
4. Caracterização do domínio A	93
4.1. Composição nucleotídica	93
4.2. Blocos de Sequência Conservada	95
4.3. Análise da diversidade nucleotídica e abordagem filogenética: identificação espécie-específica.	96
5. Avaliação da variabilidade em <i>C. putoria</i>	102
6. Perspectivas para análise da variabilidade genética de <i>Chrysomya putoria</i>	109
CONCLUSÕES	113
ANEXO I	114
ANEXO II	123
REFERÊNCIAS	160

RESUMO

Chrysomya putoria Wiedmann foi a primeira espécie de mosca varejeira do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae), proveniente do Velho Mundo, detectada no continente Americano. Esta espécie, nativa da África, inicialmente foi registrada em Curitiba (Paraná, Brasil) no final de 1975, dispersando-se rapidamente por outros estados brasileiros e países da América do Sul. *C. putoria* tem grande importância médica, sanitária e forense, uma vez que se alimenta e se reproduz em lixo, material orgânico em decomposição e fezes, além de ocasionar miíase secundária em homens e animais e atuar como vetor mecânico de patógenos. O uso de marcadores moleculares do mtDNA constitui uma abordagem eficiente na recuperação da informação genética de espécimes preservados em museus e coleções entomológicas, uma vez que seu alto número de cópias permite o aumento das chances de amplificação do DNA degradado. A região controle é a maior região não-codificadora do mtDNA e está associada à origem de replicação e à regulação da transcrição neste genoma. A região controle completa de *C. putoria* foi amplificada, clonada e sequenciada, apresentando um tamanho total de 1008 pb e um conteúdo de bases A+T de 88,6%. A caracterização desta região permitiu a identificação de dois domínios, A e B, que foram amplificados em duas reações de PCR separadas, após o desenho de oligonucleotídeos específicos. A análise da sequência do domínio B indicou a existência de uma cópia completa do tRNA^{leu}, possibilitando a caracterização de uma duplicação deste gene

inserida no domínio B. Por outro lado, a amplificação de ~500 pb do domínio A permitiu a comparação temporal e geográfica de espécimes preservados em museus e amostras recém-coletadas de populações brasileiras de *C. putoria*, além de possibilitar a delimitação de blocos de sequência conservados previamente descritos para outras espécies de insetos. O conteúdo A+T do domínio A foi de 91%, em média, para as 27 amostras analisadas. Devido ao tamanho amplificado do domínio A, foi possível amplificar esta região para 18 espécimes preservados em museus e alinhar a sequência nucleotídica primária entre estas amostras e entre outras espécies de Calliphoridae, contribuindo para a análise da variabilidade genética intra e interespecífica de moscas varejeiras. A baixa variabilidade genética detectada em populações brasileiras de *C. putoria* pode ser relacionada tanto à importância funcional e estrutural dos CSBs descritos no domínio A quanto ao gargalo populacional sofrido por esta espécie durante sua recente introdução no Brasil. O alinhamento de sequências do domínio A e as análises filogenéticas permitiram a identificação espécie-específica de espécimes de *C. albiceps*, que haviam sido previamente identificados como *C. putoria*, indicando que os marcadores moleculares, tais como os do mtDNA, podem ser eficientemente empregados para o diagnóstico espécie-específico de moscas de importância sanitária e forense. A caracterização detalhada e o melhor entendimento de estruturas e da evolução molecular de uma sequência de DNA podem gerar valiosas informações para sua utilização

como marcador molecular, além de esclarecer os limites do emprego do domínio A como um marcador em insetos. A produção de dados de sequências para diferentes espécies tem se mostrado útil para análises comparativas, disponibilizando uma fonte promissora de marcadores polimórficos para estudos populacionais e filogenéticos de grupos relacionados.

ABSTRACT

Chrysomya putoria Wiedmann (Diptera: Calliphoridae) was the first blowfly species from the *Chrysomya* genus to be detected in the New World. It was probably introduced into Brazil around 1975 with the influx of Portuguese refugees from Africa. *C. putoria* has spread rapidly in Brazil and other countries of South America, representing a species of medical, sanitary and forensic importance, since the adults feed and breed in carrion, latrines, feces, cadavers and are potential vectors of some virus and enteric pathogens among people living under substandard conditions of sanitation and nutrition. The use of mtDNA molecular markers is a reliable approach to recover the genetic information of museum preserved specimens, since its high-copy number increases the chances of amplification of damaged DNA. The control region is the major noncoding region of mtDNA and is associated to the transcription and replication origin of this genome. The complete control region of *C. putoria* has been cloned and sequenced, presenting a total length of 1008 bp and a significant bias towards A+T content (88,6%). The characterization of the complete control region sequence allowed the identification of two distinct subregions: the conserved A domain and a hypervariable B domain, that could be recovered in two separated PCR reactions after specific primers designing. After the B domain sequence analysis, it was possible to report a complete tRNA^{Leu} duplication inserted in this subregion. In the other hand, the efficient amplification of ~500 bp of the control region A domain allowed the

comparative temporal and geographical analysis of museum-preserved and fresh samples of Brazilian populations of *C. putoria*. The A+T content of the A domain was 91% in average for the 27 specimens analyzed and the described conserved sequence blocks was delimited for *C. putoria* species. Due to its short length, the A domain was efficiently amplified by PCR for 18 museum specimens and the primary nucleotide sequences could be aligned to other Calliphoridae species, improving the variability analysis for this region among blowflies. The low genetic variability detected in the A domain of *C. putoria* Brazilian populations could be related to the functional and structural importance of the CSBs located in this subregion, observed in a wide number of insect species. The lack of genetic variability also could be related to the bottleneck during the recent introduction of *C. putoria* into Brazil. The alignment of the A domain sequences and the phylogenetic analysis provided a tree that allowed the species-specific identification of *C. albiceps* specimens that have been previously identified as *C. putoria*, showing that molecular markers can be efficiently employed to identify forensically important flies. The yielding of DNA sequence data for a variety of taxa at different levels of phylogenetic separation would be useful for comparative analysis, providing a promising source of polymorphic markers for population genetics and phylogenetic reconstruction of closely related taxa.

INTRODUÇÃO

1. Introdução das espécies de *Chrysomya* no Novo Mundo

Os dípteros da família Calliphoridae são popularmente conhecidos como moscas varejeiras e podem ser considerados como uma das famílias de insetos mais comuns do mundo, tendo em vista sua ampla distribuição e por ocorrerem nos mais diferentes ambientes (Baumgartner and Greenberg, 1984; Esposito, 1999). Pont (1980) registrou a ocorrência de 1020 espécies de califorídeos em todas as regiões biogeográficas, sendo que 80% dessas e 60% dos 150 gêneros reconhecidos são restritos ao Velho Mundo. A região Afrotropical possui a fauna mais rica de dípteros califorídeos, com 300 espécies e 40 gêneros (Shewell, 1987).

A fauna de dípteros califorídeos na região Neotropical é conhecida por apresentar um reduzido número de espécies, incluindo menos de 100 espécies e quatro subfamílias de Calliphoridae: Mesembrinellinae, Toxotarsinae, Calliphorinae e Chrysomyinae (Shewell, 1987). As duas primeiras famílias são exclusivamente Neotropicais, enquanto as duas últimas distribuem-se amplamente em todas as regiões biogeográficas. Chrysomyinae é bem representada no mundo todo, sendo formada por duas tribos: Phormiini, ocorrendo em áreas temperadas e boreais; e Chrysomyiini, típica de áreas tropicais e subtropicais (Dear, 1985).

O gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae), compreende cerca de 12 espécies de moscas varejeiras provenientes de regiões tropicais e subtropicais do Velho Mundo. Até recentemente as

espécies deste gênero eram restritas aos trópicos do Velho Mundo, mas em meados da década de 70 detectou-se pela primeira vez a presença de quatro espécies do gênero *Chrysomya* no Novo Mundo (Imbiriba *et al.*, 1977; Guimarães *et al.*, 1978; Guimarães *et al.*, 1979; Jirón, 1979, revisão em Baumgartner, 1993).

A espécie *Chrysomya putoria* Wiedmann (Figura 1a) foi detectada em Curitiba (PR) no final de 1975 (Imbiriba *et al.*, 1977), sendo coletada também durante todo o ano de 1976. Esta espécie não havia sido coletada em armadilhas até então, apesar da constante monitoração. A investigação subsequente de regiões urbanas como São Paulo, Campinas e Santos revelaram que além da *C. putoria* estavam presentes também duas outras espécies: *Chrysomya albiceps* Wiedmann (Figura 1b), cuja distribuição original compreendia da Índia à África do Sul e *Chrysomya megacephala* Fabricius (Figura 1c), nativa da região Oriental e Australasiana (Guimarães *et al.*, 1978; Azeredo-Espin and Pavan, 1983; Greenberg, 1988; Guimarães e Papavero, 1999). Estas três espécies foram coletadas principalmente em lixos, carnes em decomposição, peixes expostos em mercados abertos e fezes (Laurence, 1986).

Os eventos históricos e evolutivos relacionados à introdução e dispersão destas três espécies no Brasil ainda são questionáveis, embora a hipótese mais aceita seja a de que *C. putoria* e *C. albiceps* possam ter chegado ao Brasil a partir de navios de refugiados angolanos acompanhados por animais domésticos (cabras, aves, cachorros, etc.) que

foram transportados, trazendo também estas espécies para o Brasil (Guimarães *et al.*, 1979; Laurence, 1988; Azeredo-Espin and Pavan, 1983).

A família Calliphoridae apresenta grande importância médica, sanitária, econômica e forense por incluir espécies causadoras de míases. Zumpt (1965) definiu o termo míase como infestações de vertebrados vivos por larvas de dípteros que, pelo menos por algum período do desenvolvimento, alimentam-se de tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de suas substâncias corporais líquidas ou do alimento por ele ingerido. Deste modo, as míases primárias são provocadas por larvas que parasitam feridas recentes em hospedeiros vivos e as secundárias por larvas que atacam os tecidos necrosados.

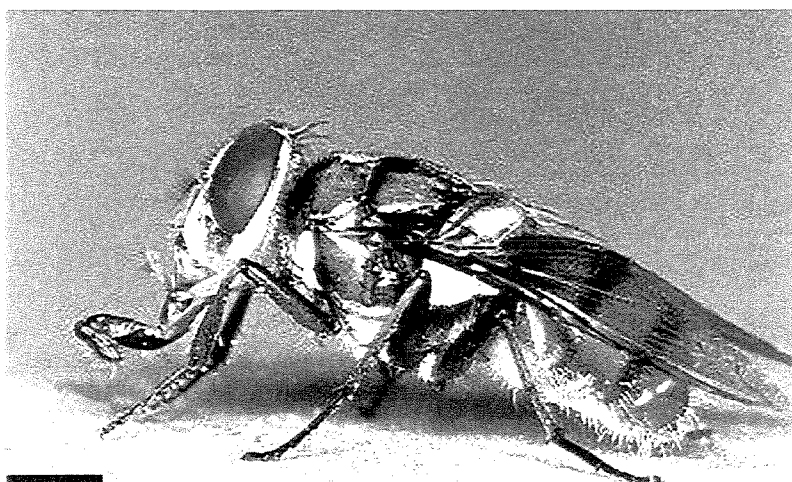
Nas áreas tropicais e subtropicais das Américas existem dois grupos principais de moscas causadoras de míases pertencentes à família Calliphoridae, incluindo a espécie praga da pecuária *Cochliomyia hominivorax* Cocquerel (mosca da bicheira), responsável por causar míases primárias. Além desta, existem espécies do gênero *Chrysomya* e *Lucilia*, de importância médico-sanitária e causadoras de míases secundárias.

C. putoria é uma espécie comum de mosca varejeira nativa da África, que ocorre desde a Tanzânia até o Congo (Zumpt, 1965). Esta espécie pode agir como vetor mecânico de patógenos (Greenberg, 1971), além de ocasionar míase secundária em homens e animais (Zumpt, 1965). Tanto a espécie *C. putoria* como *C. megacephala* e *C. albiceps* são eusinantrópicas

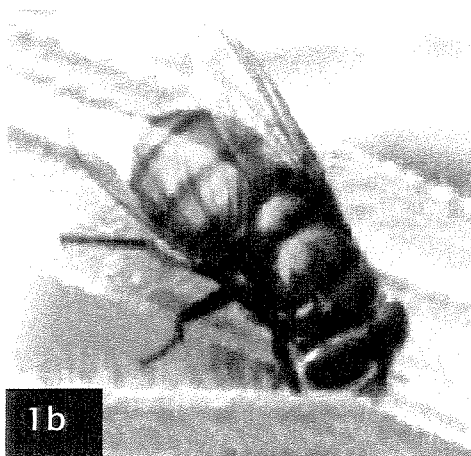
e transportam patógenos como o poliovírus tipos 1, 2 e 3, *Salmonella*, *Shigella*, *Entamoeba* e ovos de tênia, entre outros (Greenberg, 1971).

Recentemente, estas três espécies introduzidas de *Chrysomya* também têm sido consideradas de grande importância para a entomologia forense no Brasil (Salviano *et al.*, 1996; Souza & Linhares, 1997), uma vez que os insetos são os primeiros animais a detectarem um cadáver (Carvalho *et al.*, 2000). Os califorídeos, em particular, representam uma família dominante na colonização faunística de um corpo em decomposição, corroborando com a hipótese de que carcassas animais representam um substrato básico como fonte de proteínas para o desenvolvimento dos ovos e também para a reprodução destas espécies (Souza and Linhares, 1997; Anderson, 2000; Wells and Sperling, 2001, Stevens and Wall, 2001).

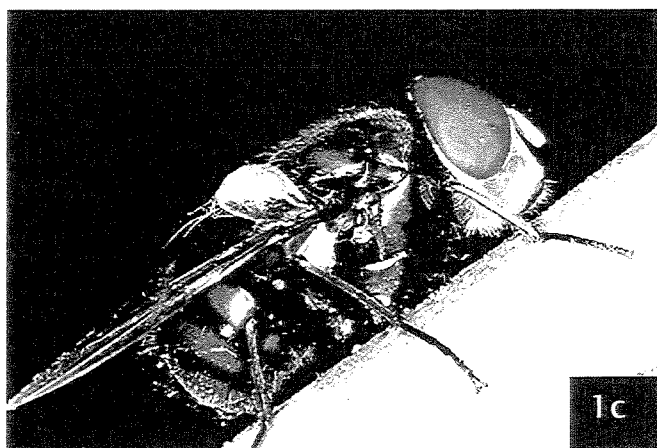
É importante também destacar que estudos realizados com *Sarcophaga carnaria* (Diptera: Sarcophagidae), uma das espécies causadoras de miíases na Europa, indicaram que as larvas alimentadas com cérebro de “hamsters” infectados com encefalopatia espongiiforme (doença da “vaca louca”) são capazes de transmitir o prion para “hamsters” não infectados, mesmo após a morte das mesmas. Estes resultados são especialmente relevantes no caso de transmissão da doença para bovinos (Post *et al.*, 1999) por diferentes espécies causadoras de miíase, como as do gênero *Chrysomya*, uma vez que são comumente encontradas em carcassas animais, incluindo as humanas.



1a



1b



1c

Figura 1: As moscas varejeiras pertencentes ao gênero *Chrysomya* são espécies comumente encontradas em mercados e latrinas na África e Ásia. Atualmente três das quatro espécies introduzidas no Novo Mundo são encontradas no Brasil: *Chrysomya putoria* (1a), *Chrysomya albiceps* (1b) e *Chrysomya megacephala* (1c).

Uma questão interessante refere-se ao *status* taxonômico de *C. putoria*, uma vez que alguns autores consideram que esta espécie represente uma variedade fenotípica de *C. chloropyga*, denominada *C. chloropyga putoria* (Laurence, 1988; Dear, 1985). Por outro lado, alguns taxonomistas descreveram diferenças morfológicas entre *C. putoria* e *C. chloropyga*, considerando-as como duas espécies separadas que ocupam nichos diferentes na natureza (Zumpt, 1965; Greenberg, 1971; Laurence, 1988; Hall, comunicação pessoal). Neste trabalho, *C. putoria* e *C. chloropyga* serão consideradas como duas espécies distintas.

A quarta espécie de *Chrysomya* introduzida nas Américas é a *C. rufifacies*, originalmente nativa de regiões Australasianas e áreas do Pacífico. A espécie foi encontrada pela primeira vez em 1978 na Costa Rica em cadáver humano (Jirón, 1979), de onde se dispersou para o México e Estados Unidos. Após a introdução desta espécie na Costa Rica verificou-se um grande decréscimo populacional da espécie *Lucilia eximia* (Wiedmann), anteriormente dominante nesta região. Com a expansão de *C. megacephala*, a redução da espécie nativa se agravou, passando de 86 para 6% do total de moscas varejeiras coletadas, enquanto que as duas espécies introduzidas aumentaram de 0 para 90% (Baumgartner, 1993).

Um fenômeno parecido com este vem sendo verificado no Brasil após a introdução das espécies de *Chrysomya*. Devido ao alto potencial de competição e dispersão, estas moscas vêm deslocando populações de espécies nativas que competem pelos mesmos substratos de alimentação e

reprodução, como por exemplo *Cochliomyia macellaria* Fabricius (Esposito, 1997, Esposito 1999). As espécies *Co. macellaria* e *L. eximia* são componentes importantes da entomofauna necrófila da América do Sul, mas nas últimas décadas tem se verificado o deslocamento e até o desaparecimento dessas espécies nativas em várias cidades brasileiras em que foram previamente registradas (Linhares, 1979; Linhares, 1981). Isso tem ocorrido devido ao impacto causado pelas espécies de *Chrysomya* introduzidas (Espósito, 1997; Esposito, 1999).

Em coletas realizadas a partir do final de 1975 foi possível analisar o decréscimo populacional de *Co. macellaria*, que anteriormente era a espécie mais comum em centros urbanos. Apenas três anos após a introdução de espécies de *Chrysomya*, *C. putoria* já era a espécie mais coletada com armadilhas em São Paulo, Curitiba, Santa Catarina e Rio de Janeiro. Entre 1978 e 1979 esta mesma espécie já havia se dispersado pelo Brasil, atingindo o Pará, Bahia, Mato Grosso e Rio Grande do Sul. Em 1980, *C. putoria* já podia ser encontrada no Amazonas, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Peru, Colômbia e Argentina.

A introdução das espécies de *Chrysomya* no Novo Mundo foi documentada por coletas através de iscas e armadilhas a partir dos primeiros registros, mas ainda é questionável se este processo envolveu um único ou múltiplos eventos de introdução, assim como as prováveis rotas seguidas por estas espécies na região Neotropical.

A obtenção de marcadores genético-moleculares, tais como os do DNA mitocondrial (mtDNA) consiste em uma estratégia eficiente para realizar uma análise temporal da variabilidade genética de *C. putoria* a partir dos primeiros registros no Brasil até a atualidade.

2. Acesso ao “Ancient DNA”

Com os avanços das técnicas de biologia molecular, nas últimas décadas tornou-se possível acessar macromoléculas remanescentes em fósseis e amostras preservadas em museu. A detecção destes compostos orgânicos em tecidos antigos abriu uma ampla área de pesquisa, uma vez que o acesso a estas moléculas evidencia a possibilidade de se estudar a evolução em nível molecular. A utilização de tecnologias de clonagem molecular impulsionou esta área a partir da década de 80, criando subsídios para se acessar o “ancient DNA” (aDNA).

O termo “ancient DNA” refere-se a qualquer vestígio de DNA de organismos mortos, incluindo amostras de poucos dias a fósseis de milhões de anos (Herrmann & Hummel, 1992; Poinar & Poinar, 1994).

O acesso ao aDNA pode permitir uma medição direta de mudanças temporais durante a história evolutiva de uma espécie que até hoje só podiam ser inferidas através de estudos genético-evolutivos de populações atuais. A observação do passado genético de uma espécie é de grande importância para o entendimento e reconstrução de passos evolutivos. Além disso, análises moleculares de espécimes de museu podem

complementar estudos de relações filogenéticas e questões biogeográficas que são comumente confusas devido à limitada caracterização genética de espécies e populações ao longo do tempo (Roy *et al.*, 1994).

A monitoração temporal da variabilidade genética de *C. putoria* relaciona-se a uma importante questão que refere-se ao estudo do passado genético desta espécie, incluindo aspectos evolutivos sofridos ao longo dos eventos de introdução e dispersão da espécie no Brasil e América do Sul. A recuperação efetiva de sequências de regiões do mtDNA de amostras bem preservadas e conservadas em museus consiste em uma estratégia eficaz, capaz de dar subsídios para a inferência de possíveis rotas migratórias, além de permitir a monitoração da variabilidade genética intraespecífica.

2.1. Degradação do DNA

O DNA é uma molécula quimicamente instável que sofre degradação espontânea principalmente através de hidrólise e oxidação.

A hidrólise causa desaminação das bases nucleotídicas e clivagem das ligações base-açúcar, criando lacunas na continuidade das cadeias do DNA (Lindahl, 1993). Os principais tipos de danos hidrolíticos são a desaminação e a depurinação. Estes sítios falhos que sofreram perda de bases enfraquecem as cadeias da dupla-hélice, causando quebras que fragmentam o DNA em pedaços cada vez menores (Cano, 1996 e Austin, 1998).

A oxidação ocasiona modificações químicas de bases nucleotídicas e eventualmente pode levar à destruição do anel formado por bases e resíduos de açúcar na molécula de DNA (Lindahl, 1993). Na Figura 2 pode-se observar os sítios preferenciais para os ataques hidrolíticos e oxidativos na molécula de DNA.

O sofisticado sistema de reparo do DNA previne que os ataques hidrolíticos e oxidativos danifiquem o material genético de organismos vivos. Após a morte, a atividade de reparo cessa e o DNA sofre degradação espontânea. O reduzido tamanho de moléculas intactas de aDNA demonstram que uma das formas de danos é a quebra de cadeias. Uma grande parte dos danos pode ser causada por processos autolíticos que ocorrem rapidamente após a morte. Além disso, “cross-links” e outros danos desconhecidos estão indubitavelmente presentes (Thomas and Pääbo, 1993). As chances do DNA desprotegido “sobreviver” são pequenas, a menos que existam condições especiais de preservação (Austin *et al.*, 1997, Dean and Ballard, 2001).

Embora estas condições possam aumentar as chances de “sobrevivência” do DNA, a estrutura química da dupla-hélice é suscetível aos danos sofridos ao longo do tempo e o conteúdo informativo da molécula certamente é afetado (Cano, 1996). Estudos recentes têm demonstrado que o DNA recuperado de espécimes preservados apresenta-se reduzido a fragmentos de algumas centenas de pares de base (Lindahl, 1993; Pääbo, 1989).

Assim sendo, a preservação e proteção de amostras são passos cruciais para que o DNA possa ser futuramente recuperado. De acordo com vários trabalhos acerca da recuperação de aDNA de vários organismos, a “sobrevivência” do aDNA parece ser muito menos influenciada pela idade do espécime do que pelas condições em que foram preservados (Pääbo, 1989; Post *et al.*, 1993, Handt *et al.*, 1994; Phillips and Simon, 1995; Cano, 1996; Höos, 1996; Kelman and Moran, 1996; Cooper *et al.*, 2001; Haddrath and Baker, 2001, Junqueira *et al.*, 2002). Em particular, estabilizar as condições que otimizam a conservação da estrutura primária do DNA é um ponto crítico, já que as análises comparativas de sequências nucleotídicas constituem a maior parte de estudos moleculares nesta área. Eglinton and Logan (1991) verificaram que a rápida dessecação após a morte, a quelação de íons de cobre e outros metais, a proteção contra luz UV e o acondicionamento dos espécimes em baixas temperaturas e ambiente alcalino favorecem a preservação do DNA.

O método pelo qual os espécimes foram mortos também afeta a quantidade e a qualidade do DNA. Dillon *et al.* (1996) mostraram que espécimes de insetos mortos em vapor de acetato de etila proporcionam uma baixa quantidade de DNA recuperado. Outros fatores extrínsecos como método de fixação e a maneira de acondicionamento das amostras também têm efeitos consideráveis, mas variam de acordo com o hábito dos curadores (Thomas, 1994).

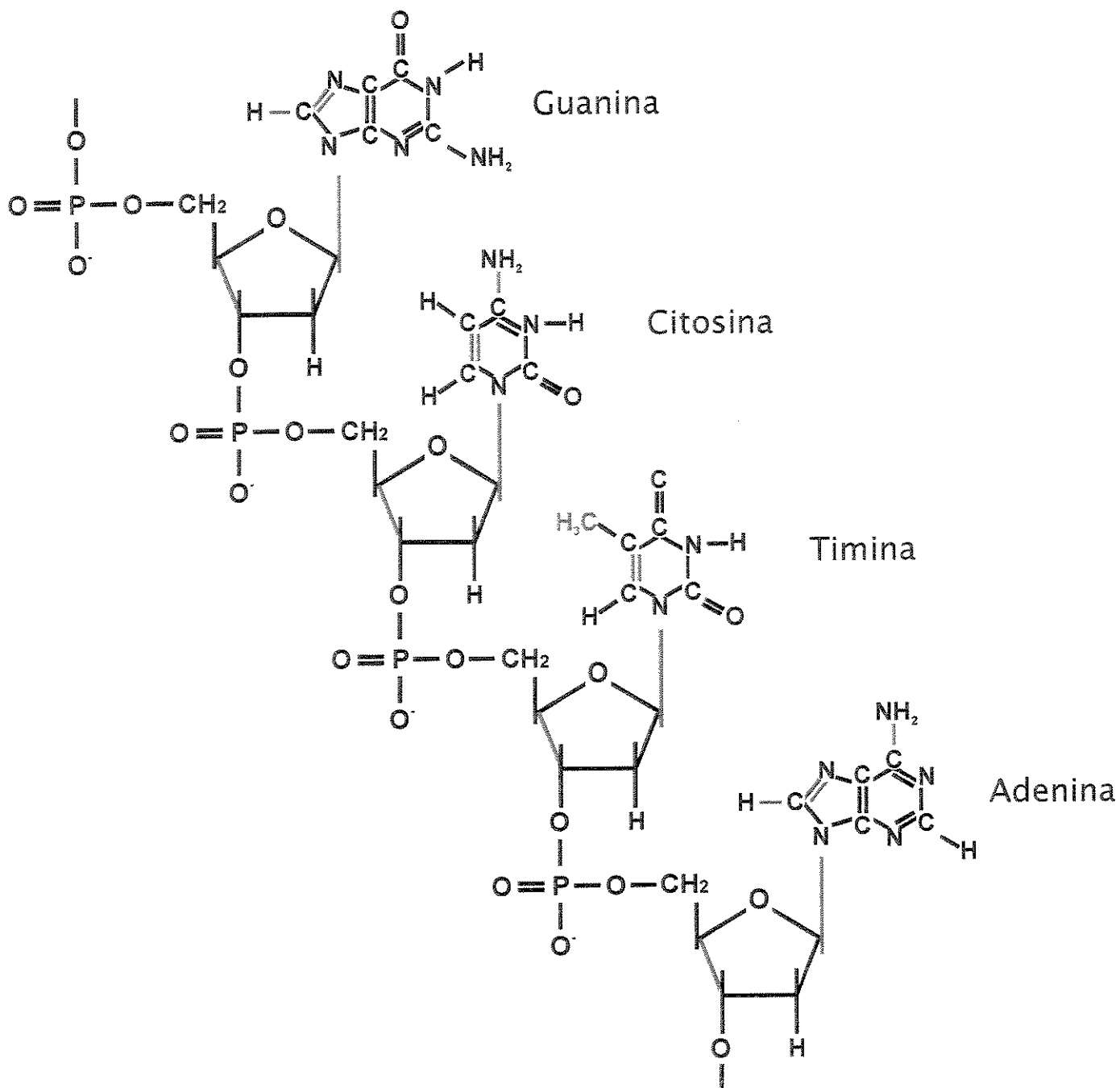


Figura 2: Sítios suscetíveis aos danos hidrolíticos (em vermelho) e oxidativos (em azul) nos nucleotídeos guanina, citosina, timina e adenina.

2.2. Recuperação e caracterização do aDNA

As técnicas utilizadas para análises do aDNA são decorrentes do fato de que o DNA extraído de tecidos preservados encontra-se geralmente muito degradado, fragmentado e presente em baixo número de cópias. Por esta razão, uma das técnicas mais adequadas para análises moleculares de espécimes de museu é a "Polymerase Chain Reaction" (PCR). Associada a novas e refinadas técnicas para extração de biomoléculas, essa tecnologia representa uma ferramenta poderosa para análises moleculares do aDNA. Tradicionalmente, inferências a respeito de mudanças de macromoléculas ao longo do tempo são realizadas através de análises comparativas de diferenças intra e interespecíficas de espécies atuais. O advento da PCR possibilitou a recuperação de sequências de DNA de tecidos preservados em coleções de museus e de materiais fósseis. Isto abriu a possibilidade de incluir taxa ancestrais nos estudos evolutivo-moleculares através da análise de mudanças genéticas em populações ao longo do tempo (Thomas and Pääbo, 1993).

No entanto, apesar da aplicação dessa técnica sensível, geralmente não é possível obter produtos de amplificação longos, o que restringe o estudo com aDNA a pequenas sequências e/ou uso de pares de "primers" que amplificam fragmentos sobrepostos, para obtenção de sequências mais longas (Handt, 1994). O típico aDNA fragmentado não sofre separação em duas cadeias contínuas durante a desnaturação inicial no PCR e sim em pequenos fragmentos, minimizando as chances de que os

dois "primers" utilizados hibridem-se no mesmo fragmento de DNA, dificultando sua amplificação (Pusch, 1998).

Neste sentido, a seleção de sequências gênicas a serem amplificadas é um passo crucial, uma vez que as chances da amplificação de sequências de espécimes de museu ocorrer aumentam à medida que o tamanho da sequência diminui. Via de regra, recomenda-se que o par de "primers" escolhido amplifique uma região de interesse $\leq 200\text{pb}$ (Cano, 1996). A presença desta região em múltiplas cópias na célula também aumenta sua probabilidade de amplificação, por isso a escolha de sequências de regiões do mtDNA consiste em uma alternativa eficiente e importante para elevar as chances de amplificação (Roy *et al.*, 1994 e Cano, 1996), uma vez que apresenta grande número de cópias por célula.

3. A região A+T do DNA mitocondrial

O mtDNA é um marcador molecular muito empregado em diversos estudos evolutivos em animais, incluindo inferência filogenética, identificação da provável origem de espécies, filogeografia, análises de dinâmica e estrutura populacional e evolução molecular (Avice, 1994; Zhang and Hewitt, 1997). O genoma mitocondrial animal tem sido utilizado extensivamente por ser uma molécula dupla-fita circular relativamente compacta com um tamanho médio de 16kb, contendo 37 genes (13 codificadores de proteínas, 22 para tRNAs e 2 para rRNAs) na maioria dos animais, apresentando uma grande conservação de conteúdo e estrutura. A

herança predominantemente materna, a alta taxa de substituição e relativa facilidade de amplificação enzimática através de “primers” universais também são características que contribuem para a utilização deste genoma em estudos moleculares (Wolstenholme, 1992; Avise, 1994; Ballard and Kreitman, 1995).²²

A maior região não codificadora do mtDNA animal, denominada de região controle, foi objeto de numerosos estudos em vertebrados, possibilitando a identificação de sítios de início de transcrição e uma origem de replicação (Chang and Clayton, 1984; Shadel & Clayton, 1997). Em invertebrados esta região foi menos estudada, mas os sítios potenciais para o início da transcrição no crustáceo *Artemia franciscana* foram localizados (Carrodegua and Vallejo, 1997).

Em insetos esta região possui um alto conteúdo de Adeninas (A) e Timinas (T), podendo ter um desvio na composição nucleotídica que chega a 96% de As e Ts, sendo também denominada de região rica em A+T. Esta região é a responsável pela maior parte da variação do genoma mitocondrial tanto em tamanho como em sequência (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000). Estudos vêm demonstrando que inserções e deleções na região controle de *Drosophila* são amplos e frequentes, ocorrendo também uma rápida alteração nucleotídica primária (Clary & Wolstenholme, 1987).

Em *Drosophila*, Goddard and Wolstenholme (1980) mapearam uma característica regulatória localizada na região A+T de várias espécies, associada à origem unidirecional da replicação do genoma. Nesta região,

uma estrutura secundária “stem and loop” tem sido ligada à síntese da segunda fita, por analogia com mamíferos (Clary and Wolstenholme, 1987).

Baseando-se na comparação de sequências da região controle, dividiu-se os insetos em dois grupos. O Grupo 1 compreende os insetos em que esta região contém dois domínios diferentes, como entre espécies de *Drosophila*. Um dos domínios é conservado (adjacente ao gene para o tRNA^{lle}) e o outro é variável tanto em sequência como em tamanho. Repetições *in tandem* ocorrem em ambos os domínios. O Grupo 2 compreende os insetos em que a região controle não pode ser dividida em domínios conservados e variáveis distintos, como em louva-a-deus, mosquitos e borboletas (Clary and Wolstenholme, 1987; Zhang and Hewitt, 1997).

Em espécies da família Calliphoridae foi possível identificar duas subregiões com taxas de substituição nucleotídica distintas: uma subregião com sequências conservadas que possivelmente abrigam a origem de replicação do genoma mitocondrial; e outra com sequências altamente variáveis (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000). Deste modo, os califorídeos pertencem ao Grupo 1.

Os trabalhos inicialmente feitos com o sequenciamento da região controle caracterizaram a organização estrutural e a detecção de possíveis sítios associados ao controle da replicação do mtDNA. Mais recentemente esta região vem sendo utilizada também como um marcador apropriado para se estudar polimorfismos genéticos e estrutura populacional de

espécies que contêm uma cópia da região conservada em composição nucleotídica (Chang and Clayton, 1984; Carrodegua and Vallejo, 1997; revisão em Zhang & Hewitt, 1997).

OBJETIVOS

Neste trabalho foi conduzida a análise da região controle do mtDNA de *C. putoria*, com os seguintes objetivos:

- Recuperar a informação genética de espécimes preservados em museus e coleções entomológicas através da extração eficiente do aDNA, da amplificação e sequenciamento da região controle do mtDNA de *C. putoria* de várias localidades brasileiras;
- Analisar a variabilidade genética temporal em *C. putoria*;
- Avaliar o potencial do domínio A da região controle do mtDNA como marcador molecular para análises de variabilidade genética em amostras de várias localidades brasileiras de *C. putoria*;
- Verificar a aplicação do domínio A da região controle como marcador genético para diagnóstico espécie-específico.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostras de *C. putoria*

As coletas de *C. putoria* foram realizadas com armadilhas descritas por Linhares (1979, 1981) e Esposito (1999), consistindo em latas pintadas de preto com orifícios na base –para a entrada de moscas atraídas pela isca atrativa em seu interior – e um cone de cartolina preta encaixado na parte superior. Um saco plástico foi preso à parte superior da lata com o cone, onde as moscas ficaram presas durante o intervalo de coleta. Ao saco plástico foi amarrado um barbante, que possibilitou que as armadilhas fossem penduradas em galhos de árvores a cerca de 60 cm do chão (Figura 3a).

Utilizou-se também um outro tipo de armadilhas confeccionadas e comercializadas como “mata-moscas”. Adaptações ao uso desta armadilha permitiram a utilização das mesmas como armadilhas para coleta. Esta armadilha consiste em uma tampa plástica com orifícios para a entrada de moscas, à qual é preso um saco plástico contendo a isca (Figura 3b). Da mesma forma que a armadilha anterior, esta foi pendurada em galhos de árvores a cerca de 60 cm do chão.

Como isca utilizou-se peixe ou pulmão bovino em decomposição, deixados por 24 horas em temperatura ambiente (Figura 4a), de acordo com o descrito por Espósito (1999). Em uma das coletas (Goiânia) coletou-se também em cadáver bovino (Figura 4b).

Os adultos foram identificados em microscópio estereoscópico Zeiss STEMI SV8 e acondicionados em gaiolas apropriadas na câmara de criação (Figura 5), que foi mantida a 25°C (\pm 1°C) e 70% de umidade relativa. Para estimular a postura de ovos pelas fêmeas no laboratório, colocou-se um rato aberto em decomposição. As posturas de ovos foram mantidas neste substrato e as larvas que eclodiram se alimentaram dele até se transformarem em pupas. Nesta fase os indivíduos foram utilizados para extrações de DNA, ou congelados em freezer -70° C para futuras extrações.

As coletas de *C. putoria* foram realizadas na região de Campinas (SP) em janeiro e março de 2001, São João da Boa Vista (SP) em janeiro de 2001, Pirassununga (SP) em abril de 2001, Belém do Pará (PA) em fevereiro de 2001, Goiânia (GO) em outubro de 2001 e Salvador (BA) em novembro de 2001.

As amostras de *C. putoria* preservadas em museus consistiram principalmente em adultos secos de coleções entomológicas. Os espécimes foram obtidos de coleções entomológicas do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Museu de Zoologia da USP (MZ-USP), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Universidade Federal do Amazonas (UFA) e da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

O mapa da Figura 6 mostra os locais onde foi possível amostrar espécimes de *C. putoria* no Brasil, incluindo as coletas realizadas, museus e coleções entomológicas que cederam espécimes preservados.

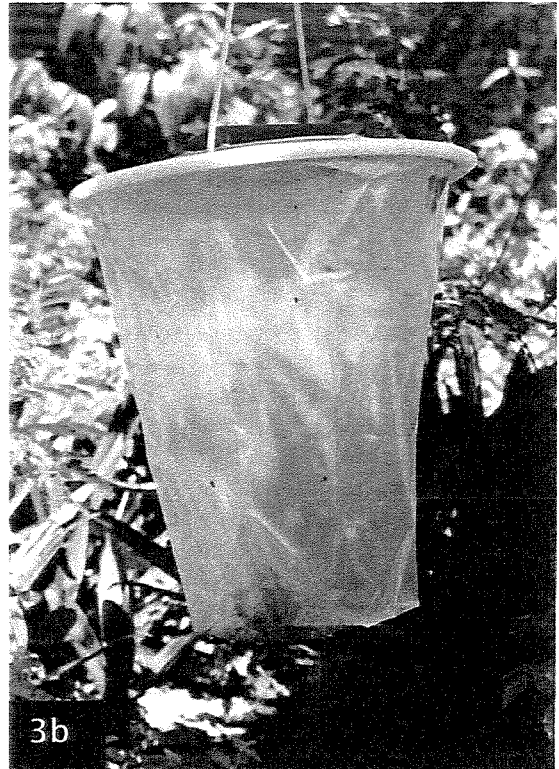


Figura 3: (a) Armadilha de lata preta, utilizada para a captura de moscas – descritas por Linhares (1979, 1981) e Esposito (1999). (b): armadilha comercializada e adaptada para a coleta de moscas.

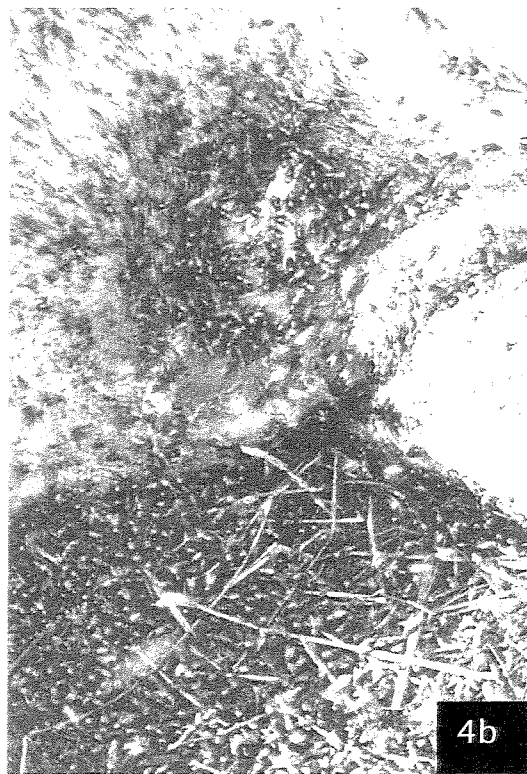
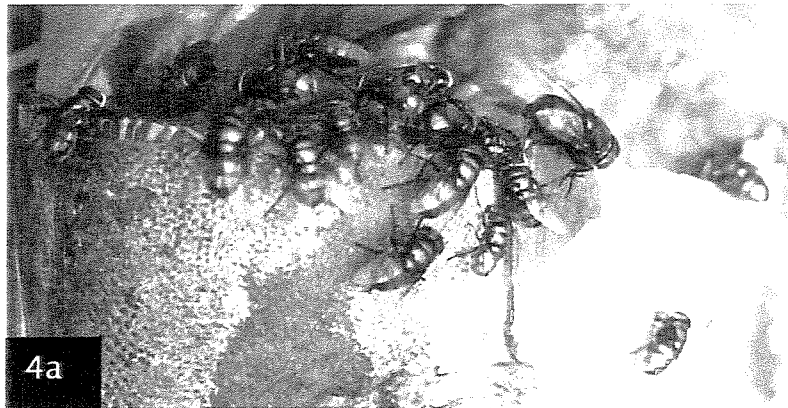


Figura 4: (a) Isca de peixe em decomposição utilizada para a coleta de dípteros calorídeos. (b): Detalhe de cadáver bovino com dípteros calorídeos pousados. O substrato é utilizado para a reprodução de adultos e alimentação das larvas.

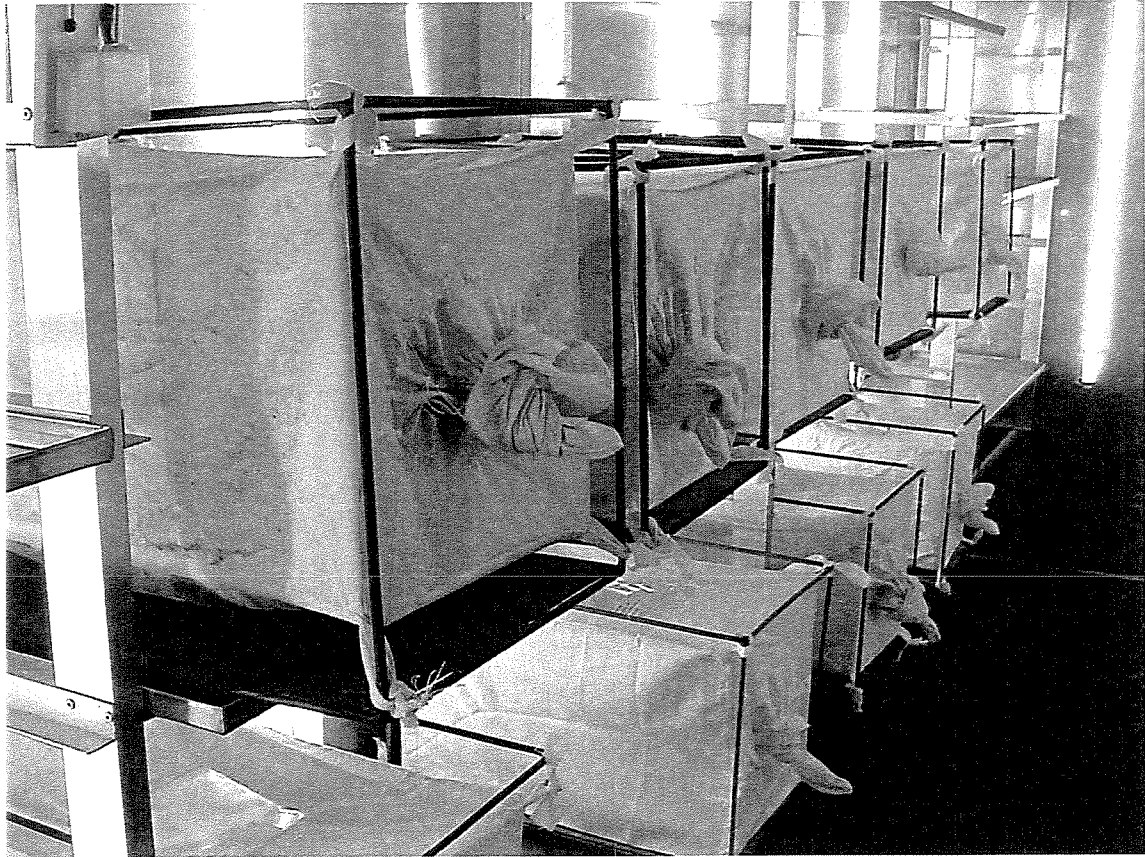




Figura 5: Câmara de criação com as gaiolas utilizadas para reprodução dos adultos e criação das larvas de *C. putoria*. A câmara é mantida a $25^{\circ}\text{C} (\pm 1^{\circ}\text{C})$ e 70% de umidade relativa.



Figura 6: Locais de coletas realizadas e proveniência das amostras de museus. O símbolo  designa locais de coleta e o símbolo  designa amostras provenientes de museus e coleções entomológicas.

2. Extração do DNA: Isolamento do DNA genômico através de DNAzol™

Os espécimes adultos foram lavados em água destilada e tiveram suas asas retiradas para minimizar fontes de contaminação. A seguir, foram submetidos a extração de DNA com o reagente DNAzol® (Gibco-BRL), de acordo com o protocolo otimizado por Junqueira *et al.* (2002): as amostras foram separadas individualmente em tubos eppendorf de 1,5 ml contendo 0,5 ml de DNAzol® e macerados com homogeneizador. Em seguida adicionou-se 0,5 ml de DNAzol® e misturou-se por inversão. O homogeneizado foi sedimentado por centrifugação em microcentrífuga a 16.000 X *g* por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf.

A precipitação do DNA foi feita a partir da adição de 0,5 ml de Etanol 100% gelado e cada amostra foi misturada por inversão. Após 5 minutos em temperatura ambiente as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação a 16.000 X *g* por 2 minutos a temperatura ambiente. O “pellet” de DNA obtido foi lavado uma vez com a adição de 1,0 ml de Etanol 95% e submetido à centrifugação a 16.000 X *g* por 1 minuto a temperatura ambiente. Cada “pellet” foi então ressuspendido em 50µl de 1 X TE (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA) e acondicionado em “freezer” -20°C para futuras análises. A Figura 7 mostra um esquema da extração de DNA através do reagente DNAzol®.

Para extrações de DNA do tórax dos espécimes a quantidade inicial de DNAzol foi reduzida a um quarto da utilizada em espécimes inteiros. Os

volumes de Etanol 100 e 95% também sofreram a mesma redução. Esta modificação está relacionada à sugestão do fabricante de que deve-se utilizar 1 ml de DNAzol® para cada 25 a 50 mg de tecido.

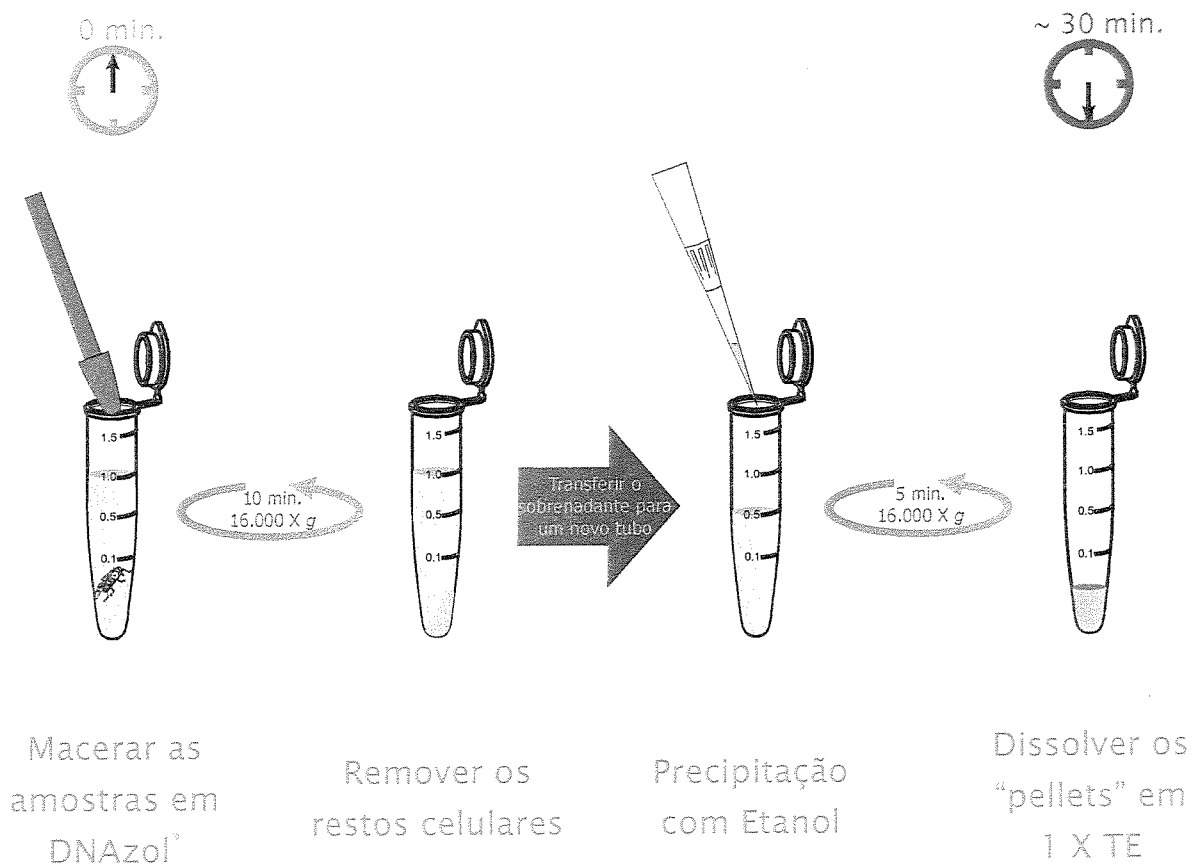


Figura 7: Esquema da extração de DNA total com o reagente DNAzol®. Devido ao menor número de passos, perde-se uma menor quantidade de DNA, possibilitando a recuperação eficiente do DNA de amostras preservadas em museus.

3. Amplificação por PCR da região A+T

As reações foram preparadas para 25 μ l, contendo 1 X Tampão para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1.25 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada deoxinucleosídeo trifosfato (dNTP), 0.5 μ M de cada oligonucleotídeo e 1.25 U de *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL/Life Technologies).

Os programas de amplificação consistiram em um ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, 40 ciclos que incluíam as fases de desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, hibridação dos oligonucleotídeos entre 43 e 50°C e alongação da cadeia durante 1 minuto e 15 segundos a 72°C. Um último ciclo de alongação a 60°C por 10 minutos foi também adicionado.

Para a padronização das reações de PCR utilizando-se “primers” universais de insetos (“UBC Insect mtDNA oligonucleotide set”) descritos por Simon *et al.* (1995), inicialmente utilizou-se extrações de DNA de amostras recém coletadas ou de amostras preservadas em “freezer” -70°C. Devido a resultados não satisfatórios obtidos com a utilização destes oligonucleotídeos universais, desenhou-se oligonucleotídeos para conduzir uma melhor análise da região A+T de *C. putoria* (Tabela 1).

Um sério problema que deve ser relevado na análise do aDNA é que o uso do PCR permite a amplificação de pequenas quantidades de moléculas de DNA, tornando possível a amplificação de DNA contaminante de fontes modernas. Os danos causados ao aDNA reduzem o número de moléculas intactas que podem servir como molde para a DNA polimerase.

Além disso, os danos às moléculas-molde podem fazer com que a polimerase “estacione”, diminuindo o ritmo de amplificação do aDNA nos primeiros ciclos da PCR. Conseqüentemente, poucas moléculas modernas e intactas de DNA que podem contaminar o espécime são preferencialmente amplificadas (Thomas and Pääbo, 1993). Entretanto, este problema é contornável se os oligonucleotídeos utilizados diminuïrem ou eliminarem a amplificação do DNA contaminante. A fim de garantir a qualidade das condições das reações de PCR e a análise dos resultados, sempre foram conduzidas reações-controle. Ao controle positivo foi adicionado DNA intacto de amostras de espécimes atuais, servindo como parâmetro da eficácia da reação. Ao controle negativo não se adicionou DNA, com o objetivo de avaliar a esterilização e pureza dos reagentes empregados na reação. Autoclavar os reagentes apenas diminui a quantidade de DNA e por isso não é uma maneira apropriada para remover possíveis contaminantes. Por esta razão, utilizou-se também a irradiação com luz UV, que tem sido utilizada e sugerida como um método de destruição do DNA contaminante (Golenberg *et al.*, 1990). Outro cuidado adotado consistiu na utilização de jogo de pipetas e ponteiros exclusivos, além de reagentes aliquotados exclusivamente para amplificação do DNA de amostras preservadas em museu, com a finalidade de evitar a contaminação das reações de PCR. Por fim, a condução das reações em fluxo laminar também ajudou a evitar possíveis contaminações que poderiam estar presentes no ambiente.

Tabela 1: Sequências dos pares de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região controle do mtDNA de *C. putoria*. Os oligonucleotídeos CmegA e CmegAR foram desenhados para melhorar a qualidade das amplificações desta região.

Tamanho do produto de PCR da região controle do mtDNA	Sequências dos pares de oligonucleotídeos	
~1200 pb da região A+T	ATTACCCTATCAAGGTAA (TI-N-24)	GCTGGCACCGAATTTTGTC (SR-J-14776)
800-1000 pb da região A+T	ATGATATTCTTAACTGGATT (C meg A)	GCTGGCACCGAATTTTGTC (SR-J-14776)
~500 pb da região A+T	ATTACCCTATCAAGGTAA (TI-N-24)	AATCCAGTTAAGAAATATCAT (Cmeg AR)

Os produtos da reação de amplificação foram aplicados em gel de agarose 2.0% em tampão 1 X TAE (40 mM Tris - Acetato, 1 mM EDTA) para corrida eletroforética a cerca de 80 Volts por aproximadamente 1 hora. A seguir o gel foi corado com Brometo de Etídeo (EtBr), exposto à luz UV (Midrange/300nm) e fotografado em sistema de câmera instantânea Polaroid MP4+ e filme Polaroid 667. No gel também foi aplicado um marcador de peso molecular (ϕ X174/*Hae*III) com a finalidade de inferir os tamanhos dos fragmentos de mtDNA amplificados por PCR.

4. Clonagem e Minipreparação plasmidial

4.1. Clonagem “Sureclone”

Inicialmente utilizou-se o “Kit” de Ligação SureCLone (Amersham-Pharmacia Biotech) para a clonagem dos fragmentos amplificados por PCR. O procedimento utilizado neste “kit” consiste em retirar o dATP adicionado pela *Taq* DNA Polimerase às terminações 3' dos produtos de PCR, através da atividade exonucleásica 3'-5' do fragmento Klenow da DNA polimerase I. Concomitantemente, a T4 polinucleotídeo quinase fosforila os fragmentos gerados por PCR para que eles possam ser ligados ao vetor de clonagem pUC18 *Sma*I/BAP, esquematizado na Figura 8.

4.1.1. Purificação e quantificação

A purificação dos produtos de PCR foi conduzida com o objetivo de remover a DNA polimerase residual e os produtos inespecíficos gerados durante a reação de amplificação, além de possíveis concentrações

inibitórias de outros elementos presentes no tampão de PCR que podem afetar a atividade enzimática da ligase (Lessinger, 1998). Um total de 10 μ l de cada amostra de PCR foi purificado através de diálise em filtro Millipore VM 0.05 μ m em contato com tampão de eluição 1 X TE pH 7.4, durante 20 minutos.

A quantificação dos produtos foi feita a partir da comparação da intensidade de bandas dos produtos amplificados com o marcador de peso molecular λ /*Hind*III (5ng/ μ l) em um gel de agarose 2,0% corado com EtBr e visualizado em transiluminador UV. Foram utilizados 60 a 100 ng de DNA na reação de ligação.

4.1.2. Ligação

As reações de retirada dos dATPs das extremidades 3' e de fosforilação do produto de PCR foram conduzidas de acordo com as instruções do fabricante, permanecendo em incubação por 30 minutos a 37°C. Seguiu-se com uma extração rápida com Fenol/Clorofórmio e então uma purificação em colunas MicroSpin com Sephacryl S-200.

Para a reação de ligação, foram utilizados 2 μ l de DNA purificado na reação anterior juntamente com 50ng de vetor defosforilado, 2X tampão de ligação, 200mM de DTT e 6.2 U de T4 DNA ligase, para um volume final de 20 μ l. As reações foram incubadas por cerca de 3 horas a 16°C e então transformadas.

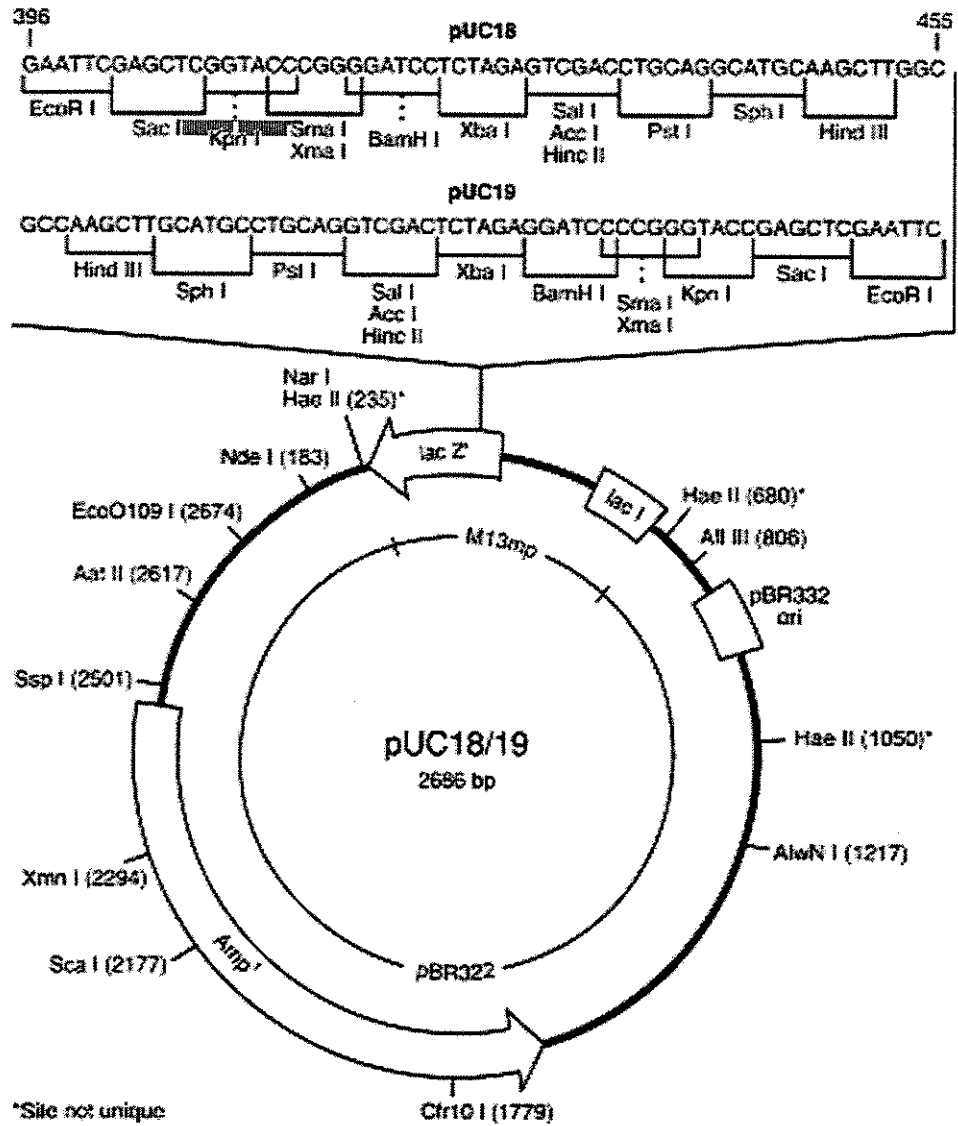


Figura 8: Mapa do plasmídeo pUC18 *Sma*/BAP, utilizado na clonagem dos fragmentos de PCR através do "kit" SureClone.

4.1.3. Transformação

A reação de transformação foi realizada de acordo com o método de transformação química com CaCl_2 e PEG 6000 (Sambrook, 1985). Inicialmente, 5 μl da reação de ligação foram misturados a 15 μl de tampão de transformação (10X KCM -1M KCl, 0.3M CaCl_2 , 0.5M MgCl_2) e então adicionados a 100 μl de células competentes da linhagem DH10B de *E. coli*. A mistura permaneceu incubada no gelo por 30 minutos e logo após em temperatura ambiente por 10 min. A seguir adicionou-se 1 ml de meio de cultura LB (Luria Bertani) líquido (Tryptona 10 g/l, Extrato de levedura 5 g/l, NaCl 10 g/l), e incubou-se a 37°C por 50 min. Foram plaqueados 100 μl de células transformadas em meio LB sólido (Tryptona 10 g/l, Extrato de levedura 5 g/l, NaCl 10 g/l e ágar 15 g/l) contendo o antibiótico ampicilina 50 $\mu\text{g/ml}$ e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β galactosídeo) 40 mg/ml. As placas foram incubadas invertidas a 37°C “overnight” em estufa para o crescimento de colônias.

4.2. Clonagem “TOPO[®]-TA Cloning”

Devido à descontinuidade na comercialização do “kit” de ligação SureClone por causa de problemas de contaminação no lote dos plasmídeos pUC18 da Amersham-Pharmacia, foi necessário estabelecer e otimizar outra estratégia de clonagem para os produtos de PCR. Nesse sentido, optou-se pela utilização de um “kit” de clonagem mais rápido e eficiente.

O “Kit” Topo[®]-TA cloning (Life Technologies/Invitrogen) utiliza uma estratégia de clonagem para inserção direta de produtos de PCR amplificados com a *Taq* DNA polimerase em um vetor plasmidial. O plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Figura 9) está linearizado com uma 3´-timidina (T) para a “clonagem TA” e possui a topoisomerase I covalentemente ligada.

A *Taq* possui a atividade da terminal transferase, que adiciona uma deoxiadenosina (A) à extremidade 3´ de produtos de PCR. O vetor linearizado deste kit possui um resíduo de deoxitimidina na porção 3´, permitindo que o inserto de PCR se ligue eficientemente ao vetor.

A topoisomerase I do vírus *Vaccinia* se liga à dupla hélice do DNA em sítios específicos e cliva as ligações fosfodiéster depois da seqüência 5´-CCCTT em uma cadeia. A energia da ligação quebrada é conservada pela formação de uma ligação covalente entre o fosfato 3´ da cadeia clivada e um resíduo Tyr-274 da topoisomerase I. A ligação entre o DNA e a enzima pode ser subsequente atacada pela hidroxila 5´ da cadeia clivada originalmente, revertendo a ligação e liberando a topoisomerase.

4.2.1. Ligação

Após purificar os produtos de PCR com a mesma metodologia descrita no item 4.1.1, cerca de 80 ng dos produtos de PCR foram adicionados à reação de ligação com o vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] e solução de sal (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂). A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 min e em seguida colocada em gelo até a transformação.

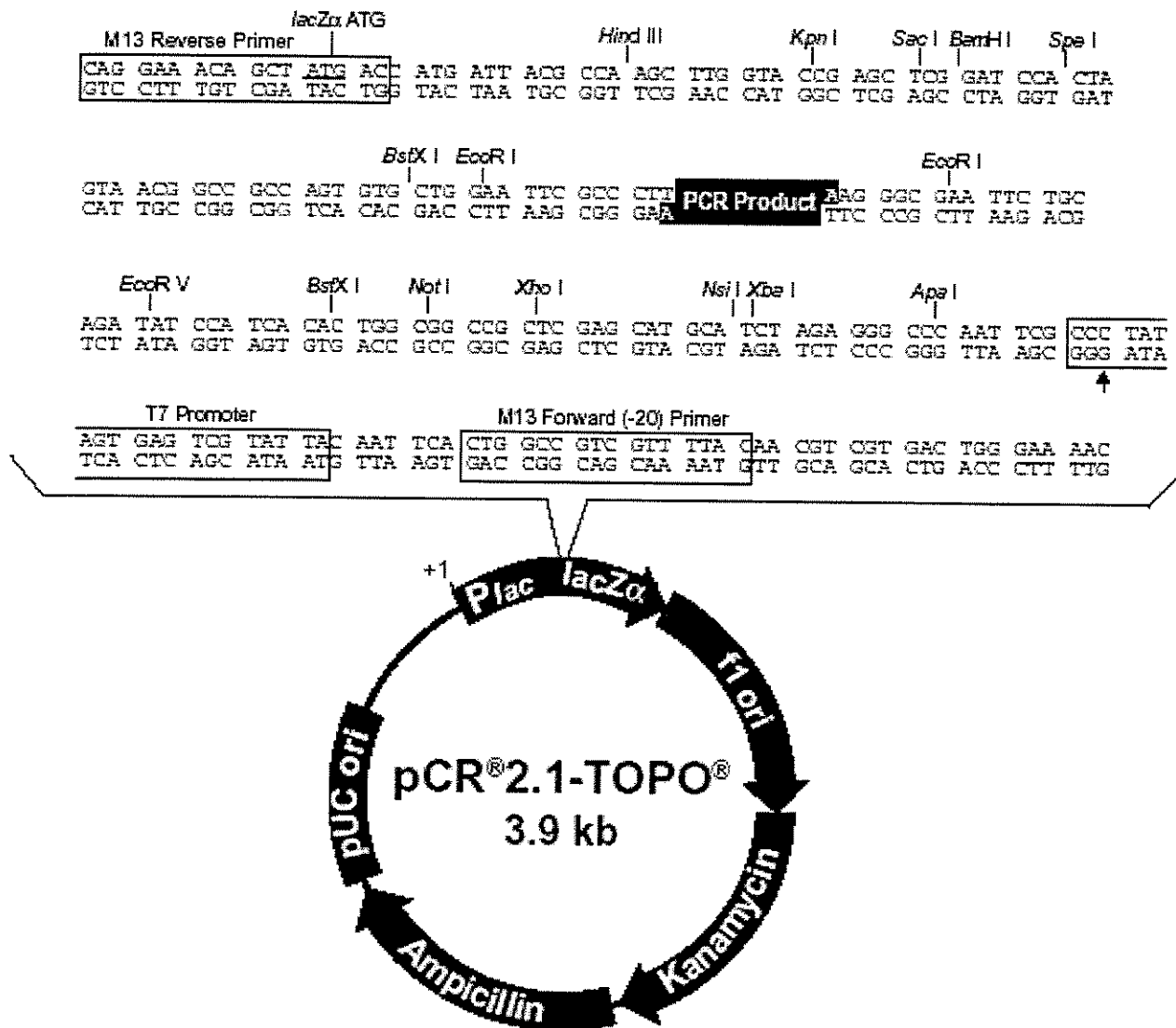


Figura 9: Mapa do plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®], utilizado na clonagem dos fragmentos de PCR através do “kit” TOPO[®]-TA cloning

4.2.2. Transformação

Para cada produto de PCR a ser clonado foram adicionados 2 μ l da reação de ligação às células quimicamente competentes de *E. coli*. As células foram incubadas em gelo por 30 min e a seguir foram deixadas em banho a 42°C por exatos 30 segundos. Foram então imediatamente resfriadas em gelo e 250 μ l de SOC (2 % Triptona, 0.5% Extrato de Levedura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glicose) foram adicionados. Por fim, os tubos foram deixados na posição horizontal por 1 h em “shaker” (200 rpm) a 37°C. Um total de 50 μ l foram plaqueados em meio LB com Ampicilina e X-Gal. As placas foram incubadas invertidas a 37°C “overnight” para crescimento das colônias.

4.3. Seleção de colônias recombinantes

As colônias que contêm o vetor de clonagem com o inserto são incapazes de codificar a β -galactosidase devido à inserção do produto de PCR no meio do gene *lac Z*, inativando o fragmento amino-terminal desta enzima. Deste modo as bactérias transformadas com o plasmídeo recombinante geram colônias brancas que não degradam o substrato do meio. Por outro lado, bactérias que não foram transformadas são capazes de produzir a β -galactosidase, degradando o substrato do meio e formando colônias azuis na presença de X-Gal. Portanto, colônias possivelmente recombinantes e as não recombinantes são facilmente diferenciadas.

4.4. Minipreparação plasmidial por lise alcalina para sequenciamento

O DNA plasmidial foi isolado para verificação da presença do inserto específico para cada região e para a eliminação dos falso-positivos. Este procedimento consiste em inocular cada colônia isolada em 3 ml de meio LB líquido contendo 5 μ l de ampicilina 50 μ g/ml a 37°C “overnight” em agitação constante a 300 rpm. Foram transferidos 1,5 ml de cultura para um tubo eppendorf que foi centrifugado por 1 minuto a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o mesmo processo foi repetido para o restante da cultura. As bactérias foram ressuspensas em 300 μ l de P1 (50mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA pH 8,0; RNase 100 μ g/ml) com a ajuda de vórtex e foram adicionados 300 μ l de P2 (200mM NaOH; 1% SDS). A mistura foi feita por inversão dos tubos, que posteriormente foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. 300 μ l de P3 (Acetato de Potássio 3M pH 5,5) foram adicionados e misturados por inversão. Os tubos foram centrifugados em microcentrífuga a 13000 rpm por 10 minutos a 14°C e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. Adicionou-se 400 μ l de isopropanol a cada tubo, que foram novamente centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o descarte dos sobrenadantes, foram adicionados 700 μ l de Etanol 70% que foram misturados por inversão e centrifugados a 13000 rpm durante 5 minutos. Por fim o Etanol foi descartado e o “pellet” liofilizado e ressuspensado em 20 μ l de H₂O filtrada em sistema Milli Q e posteriormente autoclavada.

Para visualizar a presença dos insertos nas colônias escolhidas para miniprep, os plasmídeos pUC18 BAP/*Sma*I foram posteriormente digeridos com as endonucleases de restrição *Bam* HI e *Eco* RI por duas horas, que flanqueiam o sítio de inserção do produto de PCR (Figura 8). Os plasmídeos pCR[®]2.1–TOPO[®], por outro lado, foram digeridos apenas com a endonuclease de restrição *Eco*RI, uma vez que possui dois sítios de restrição para esta enzima, flanqueando o sítio de inserção do produto de PCR (Figura 9). As digestões foram visualizadas em gel de agarose 2.0% corados com EtBr.

5. Sequenciamento

O sequenciamento automático das regiões amplificadas foi conduzido em sequenciador ABI Prism–Perkin Elmer modelo 377, de acordo com o protocolo otimizado de sequenciamento do “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (ABI Prism™, Perkin Elmer), contendo 3 µl do “Ready–Reaction Mix”, 800 ng de DNA e 5 pmol de um dos oligonucleotídeos universais para plasmídeos (M13 Reverse, com a sequência AACAGCTATGACCATGATTAC, ou o M13 Forward, com a sequência GTAAAACGACGGCCAGTGAA).

A reconstrução de sequências antigas precisa levar em conta o efeito dos danos causados ao DNA durante a amplificação via PCR. A terminação prematura da extensão dos “primers” pode ocasionar uma recombinação *in vitro* (“Jumping PCR”), fazendo com que as moléculas resultantes sejam

quimeras. Baseado nestes resultados, é essencial que múltiplos clones de cada amplificação sejam sequenciados (Thomas and Pääbo, 1993). Para minimizar os erros provenientes do PCR e de alterações que o aDNA pode conter, foram sequenciados em média 3 clones nos dois sentidos para cada espécime cujo DNA foi eficientemente extraído e amplificado. Quando possível, procurou-se sequenciar clones provenientes de diferentes reações de amplificação.

6. Análises das sequências

As sequências das amostras de *Chrysomya* foram analisadas primeiramente no programa Chromas 2.21 (Technelysium Pty Ltd), que possibilita a visualização dos eletroferogramas obtidos pelo sequenciador automático, assim como a edição das sequências, retirando-se as partes referentes ao vetor utilizado.

Para a busca por padrões de similaridade e/ou homologia em bancos de sequências registradas e disponíveis para consulta (Genbank e EMBL) foi utilizado o aplicativo BLASTN (Altschul *et al*, 1997).

Para a predição da estrutura secundária de tRNA foi utilizado o tRNAscan-SE 1.1 (Lowe, 1997).

A busca por sítios de restrição nas sequências foi feita através do programa WebCutter 2.0 (Heiman, 1997).

O alinhamento automático das sequências obtidas foi feito através do programa de alinhamento múltiplo CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) e as correções necessárias foram realizadas manualmente.

Para a busca por motivos conservados nas sequências utilizou-se os programas MEME 3.0 (“Multiple EM for Motif Elicitation”, Bailey and Elkan, 1994) e MAST 3.0 (“Motif Alignment and Search Tool”, Bailey and Gribskov, 1998).

A análise das sequências alinhadas foi realizada através do programa DnaSP versão 3.53 (Rozas e Rozas, 1999). Este programa permite a detecção de sítios polimórficos e permite que a diversidade nucleotídica π (número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências) seja calculada, considerando as correções na comparação de cada pareamento. Além disso, pode-se realizar a análise das sequências através do “sliding-window test”, que permite que se calcule a diversidade nucleotídica, entre outros parâmetros, ao longo de uma região do DNA. Neste método, uma “janela” que corresponde a um segmento da sequência de DNA a ser analisada, se move ao longo da sequência em um determinado número de passos. O parâmetro é calculado para cada janela e o valor é assinalado no ponto médio da mesma. Os resultados do “sliding-window test” podem ser visualizados em um gráfico ou tabela, de acordo com o parâmetro escolhido para o cálculo.

O cálculo da diversidade nucleotídica ao longo das sequência foi realizado com uma janela de 50 pb e passos a cada 5 pb.

Para inferências filogenéticas foi utilizado o programa PAUP* (“Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods”, Swofford, 2000), capaz de estimar a taxa de substituição e divergência genética entre as populações e realizar a inferência de árvores filogenéticas.

A reconstrução filogenética foi feita utilizando-se o método de máxima parcimônia (MP). Este método baseia-se em um princípio bastante familiar para a ciência de um modo geral: a navalha de Occam. De acordo com este princípio, a hipótese mais simples para explicar os dados obtidos é preferida em detrimento das mais complicadas. Em geral, métodos de inferência filogenética por MP selecionam árvores que minimizem o número de passos evolutivos requeridos para explicar um determinado conjunto de dados (Swofford *et al.*, 1996; Nei and Kumar, 2000). Para a análise filogenética, isto significa que a árvore que possuir um menor número de mudanças (substituições) para explicar os dados do alinhamento é a mais parcimoniosa. Na MP não há a fase de cálculo de distância, sendo que as árvores são calculadas diretamente dos dados do alinhamento. Entretanto, esta metodologia requer muito mais tempo quando se usa a busca exaustiva de árvores, uma vez que o computador precisa reconstruir todas as árvores possíveis para “escolher” a(s) árvore(s) com um número mínimo de mudanças, que é(são) chamada(s) de árvore(s) mais parcimoniosa(s). Para contornar este problema do tempo, existem também algoritmos heurísticos de reconstrução filogenética, mas é preciso lembrar que, nestes casos, a árvore final pode ser subótima.

Para as árvores obtidas utilizou-se uma busca heurística em que a árvore-núcleo foi gerada a partir do algoritmo “stepwise addition” e a seguir as árvores mais parcimoniosas foram determinadas por “branch-swapping”, utilizando-se o critério “tree bisection reconnection”, em que a árvore núcleo é quebrada em duas subárvores, que são reconectadas por um par de ramos diferentes dos originais. Este procedimento é repetido até que todos os pares possíveis de ramos dessas subárvores sejam unidos e a melhor árvore dentre as testadas seja definida (Swofford *et al.*, 1996; Miyaki *et al.*, 2001).

Entretanto, uma busca utilizando-se o método “Branch-and-Bound” (BB) também foi realizada para que fosse possível comparar as árvores obtidas por este método e por um algoritmo heurístico. O BB é um algoritmo exato para identificar todas as árvores ótimas, que se parece com uma busca exaustiva, mas requer um menor tempo de execução (Hendy and Penny, 1982; Swofford, 1996).

A visualização e edição das árvores filogenéticas foram realizadas com o programa TreeView (Page, 1996), uma vez que a interface do PAUP* não permite a edição e impressão de árvores com boa qualidade.

RESULTADOS

1. Coletas

As coletas realizadas em Belém, Campinas, Pirassununga, São João da Boa Vista, Goiânia e Salvador indicaram uma grande diferença na quantidade de adultos capturados de *C. putoria* nas diversas localidades, uma vez que em algumas cidades esta espécie parece estar sofrendo grande decréscimo populacional.

Em Belém, a grande maioria dos espécimes capturados neste trabalho com as armadilhas utilizadas foi da espécie *C. putoria*. Resultados de coletas anteriores também demonstraram a predominância desta espécie nas regiões urbanas de Belém (Esposito, 1999).

Nas cidades de Pirassununga e São João da Boa Vista foi possível coletar a espécie *C. putoria*, juntamente com as duas outras espécies do gênero existentes no Brasil. Coletou-se também outros califorídeos em grande abundância, como espécies dos gêneros *Lucilia* e *Hemilucilia*.

As coletas realizadas na região de Campinas e Goiânia não tiveram sucesso na captura de espécimes de *C. putoria*, mas verificou-se que *C. albiceps* é a principal espécie coletada nestas regiões, seguida por *C. megacephala*. Na região urbana de Salvador coletou-se apenas um espécime de *C. putoria*, sendo novamente *C. albiceps* e *C. megacephala* as espécies mais coletadas. No entanto, nestas três localidades foi possível coletar a espécie *Co. macellaria*, que a partir do final da década de 70, devido à introdução das espécies de *Chrysomya*, sofreu um grande

decréscimo populacional e um provável deslocamento em algumas localidades onde predominava. Embora este trabalho não tenha como objetivo caracterizar a dinâmica populacional de califorídeos nas regiões em que as coletas foram realizadas, foi possível verificar uma significativa alteração neste parâmetro biológico quando se compara as espécies nativas e introduzidas. Esta dinâmica parece estar sendo alterada no Brasil e precisa ser acompanhada, uma vez que tratam-se de moscas nativas e introduzidas de importância médica e forense.

2. Acesso à região controle

Inicialmente utilizou-se os oligonucleotídeos universais TI-N-24 e SR-J-14776 (Tabela 1), com a finalidade de recuperar toda região controle de *C. putoria* de amostras recém coletadas. O emprego destes “primers” para outras espécies de dípteros das famílias Calliphoridae e Oestridae recuperou eficientemente a região controle destas espécies e por esta razão eles também foram empregados inicialmente neste trabalho, na tentativa de amplificar completamente esta região do mtDNA de *C. putoria*.

Entretanto, a amplificação por PCR de espécimes *C. putoria* resultou em bandas que correspondiam a ~300 pb (Figura 10) ao invés dos 1200 pb esperados previamente. Mesmo alterando-se as condições iniciais de amplificação (temperatura de hibridação dos “primers”, temperatura de extensão dos “primers” e concentração de reagentes na reação), a banda de aproximadamente 300 pb sempre predominou.

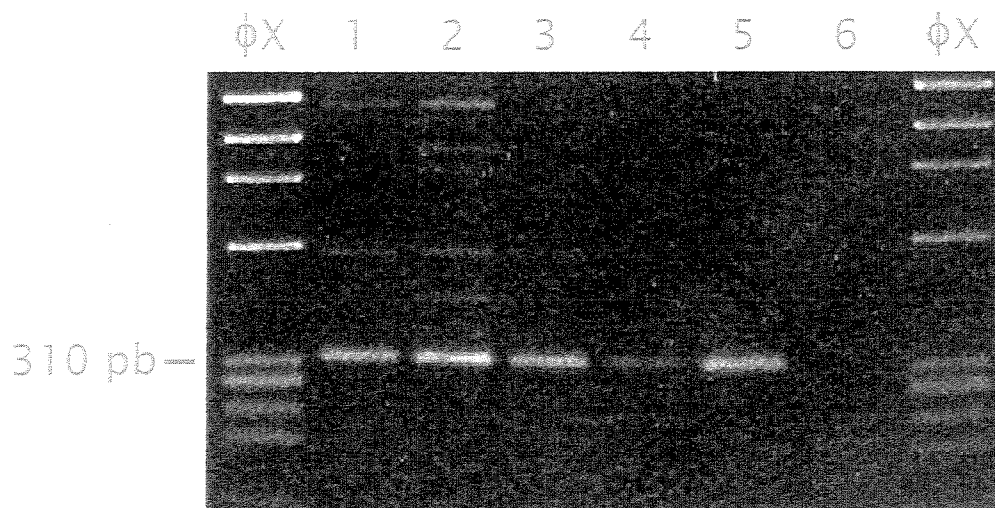


Figura 10: Tentativa de amplificação da região A+T de *C. putoria*. A região esperada de cerca de 1000 pb não foi amplificada, e sim uma de aproximadamente 300 pb. ϕX = marcador de peso molecular ϕX -174; 1 a 5 = fragmento de ~300 pb de *C. putoria*; 6 = Controle negativo do PCR.

Embora existam regiões controle de 350 pb descritas para espécies de Lepidoptera (Taylor *et al.*, 1993), este tamanho é incomum em Diptera, principalmente quando considera-se que a espécie do mesmo gênero *C. megacephala* apresentou a região controle com aproximadamente 1000 pb.

As ampliações da mesma região para *C. albiceps* também resultaram em um amplicon de ~300 pb, enquanto que em *C. megacephala* foram visualizadas duas bandas, sendo uma de aproximadamente 1200 pb e outra de 300 pb com intensidades semelhantes.

Os fragmentos de ~300 pb de *C. putoria* foram então sequenciados com o objetivo de caracterizar esta região. A busca por similaridades com sequências depositadas no GenBank revelou duas regiões com alta identidade, ambas em *C. megacephala*: uma região de 300 pb que compreendia parte do tRNA^{Ile} (sítio de anelamento do "primer" TI-N-24) e parte do início do domínio A da região A+T; e outra região descrita como parte do domínio B da região A+T. Portanto, parte da sequência de ~300 pb apresentou similaridade com os dois domínios da região controle de *C. megacephala*. Ao analisar as sequências depositadas no GenBank similares à do fragmento de ~300 pb, foi possível verificar que ambas se tratavam da sequência do tRNA^{Ile} contida no "primer" TI-N-24. Estes resultados levaram a indícios de que este oligonucleotídeo estivesse se hibridando em mais de um sítio durante a reação de amplificação da região controle.

2.1. Evidências para a duplicação do tRNA^{Ile}.

Uma vez que o “primer” TI-N-24 se hibrida no tRNA^{Ile}, este resultado sugeriu que este gene pudesse estar duplicado no mtDNA e inserido no domínio B da região controle das espécies de *Chrysomya* analisadas.

Baseado na caracterização prévia da região controle de *C. megacephala* conduzida por Lessinger and Azeredo-Espin (2000), foi possível acessar a sequência completa desta região (GenBank, nº de acesso AF151386) e revisar a análise desta sequência, detectando-se que o tRNA^{Ile} possui uma cópia adicional no domínio B da região controle.

De acordo com os resultados das ampliações das regiões controle de *C. putoria* e *C. albiceps* e da sequência do fragmento de ~300 pb, a duplicação do tRNA^{Ile} também pôde ser predita para estas duas outras espécies do gênero, sendo a causa das dificuldades de amplificação. A Figura 11 esquematiza a utilização dos “primers” universais e os dois sítios de hibridação do “primer” TI-N-24, ocasionando a amplificação do produto de ~300 pb ao invés do produto esperado de ~1200 pb.

Com a finalidade de comprovar e posicionar a duplicação nas espécies de *Chrysomya*, foi necessário desenhar oligonucleotídeos baseados na sequência de *C. megacephala*, que está disponível no GenBank (nº de acesso AF151386). Estes novos oligonucleotídeos foram desenhados de maneira a permitir a amplificação de cada um dos domínios separadamente, com o objetivo de conduzir uma melhor caracterização da região controle de diferentes amostras populacionais de *C. putoria*.

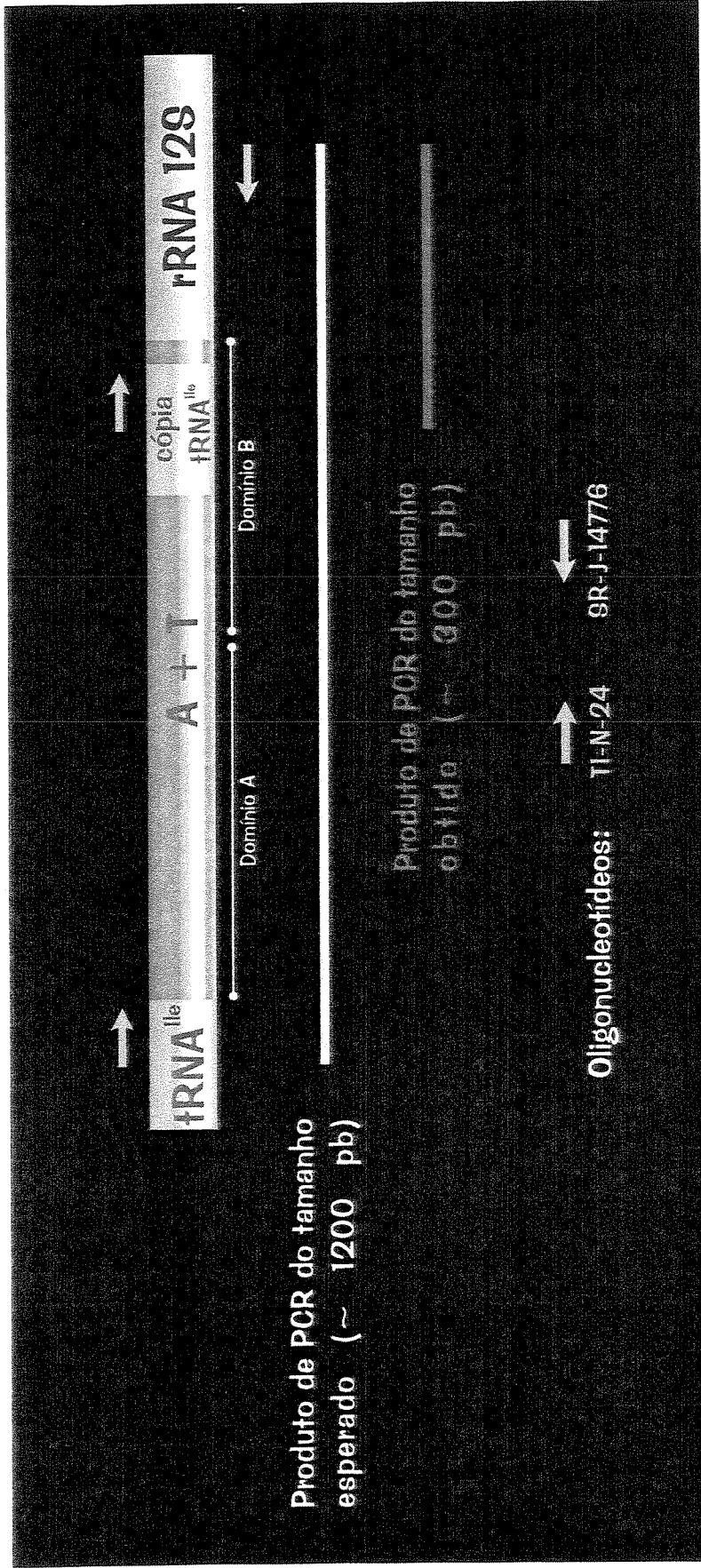


Figura 11: Regiões amplificadas pelos oligonucleotídeos indicados, considerando-se a duplicação do tRNA^{Ile}. Os oligonucleotídeos se hibridaram nas duas cópias do tRNA, ocasionando a amplificação preferencial do produto de 300 pb (em vermelho) ao invés do produto esperado de 1200 pb (em verde).

Além desta estratégia, o sequenciamento completo do genoma mitocondrial de *C. putoria* (nº de acesso no GenBank: AF 352790, Junqueira *et al.*, em preparação) também foi realizado, objetivando-se analisar a estrutura deste genoma para esta espécie, assim como possíveis rearranjos em outras regiões do mtDNA. Com o sequenciamento completo do mtDNA de *C. putoria* foi possível posicionar a duplicação do gene para o tRNA^{Ile} no genoma mitocondrial e adicionar outras sequências adjacentes a esta duplicação que também estão repetidas.

A amplificação de sequências da região controle com os “primers” desenhados (Cmeg A e Cmeg AR, que são complementares –Tabela 1) combinados com “primers” universais já utilizados TI-N-24 e SR-J-14776, em reações independentes, recuperaram a região controle completa em dois fragmentos adjacentes, relacionados aos domínios A e B das espécies de *Chrysomya*. Um esquema da amplificação e regiões de hibridação das combinações de “primers” utilizados pode ser visualizado na Figura 12.

A variação de tamanho nas sequências homólogas amplificadas para as três espécies de *Chrysomya* é evidente para *C. albiceps* em relação às duas outras espécies (Figura 13), podendo ser utilizada como marcador genético espécie-específico. Além disso, a amplificação do fragmento de ~300 pb é uma evidência indireta da presença da duplicação do tRNA^{Ile}, podendo ser empregada como controle na busca por esta duplicação em outras espécies de *Chrysomya* e espécies relacionadas.

A amplificação, clonagem e sequenciamento dos domínios A e B para as três espécies de *Chrysomya* comprovou a cópia completa do tRNA^{Ile} inserida no domínio B da região controle.

Análises comparativas entre as sequências dos dois tRNAs^{Ile} de *C. putoria* indicaram 100% de identidade entre eles, sugerindo que a cópia inserida na região controle possa ser funcional. Além disso, a análise da estrutura secundária da repetição do tRNA^{Ile} resultou em uma típica configuração “cover leaf” (Figura 14), com o mesmo anti-códon (GAU) utilizado por *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) (Lessinger *et al.*, 2000; Junqueira *et al.*, em preparação).

Como citado anteriormente, além da sequência para o tRNA^{Ile}, outras sequências adjacentes a esta duplicação também estão repetidas. Estas sequências adjacentes incluem uma repetição de 36 nucleotídeos correspondentes ao tRNA^{Gln} de um lado e outros 19 nucleotídeos do início do domínio A da região controle do outro lado da cópia para o tRNA^{Ile} em *C. putoria* (Figura 15) (Lessinger, 2002; Lessinger *et al.*, em preparação, Junqueira *et al.*, em preparação).

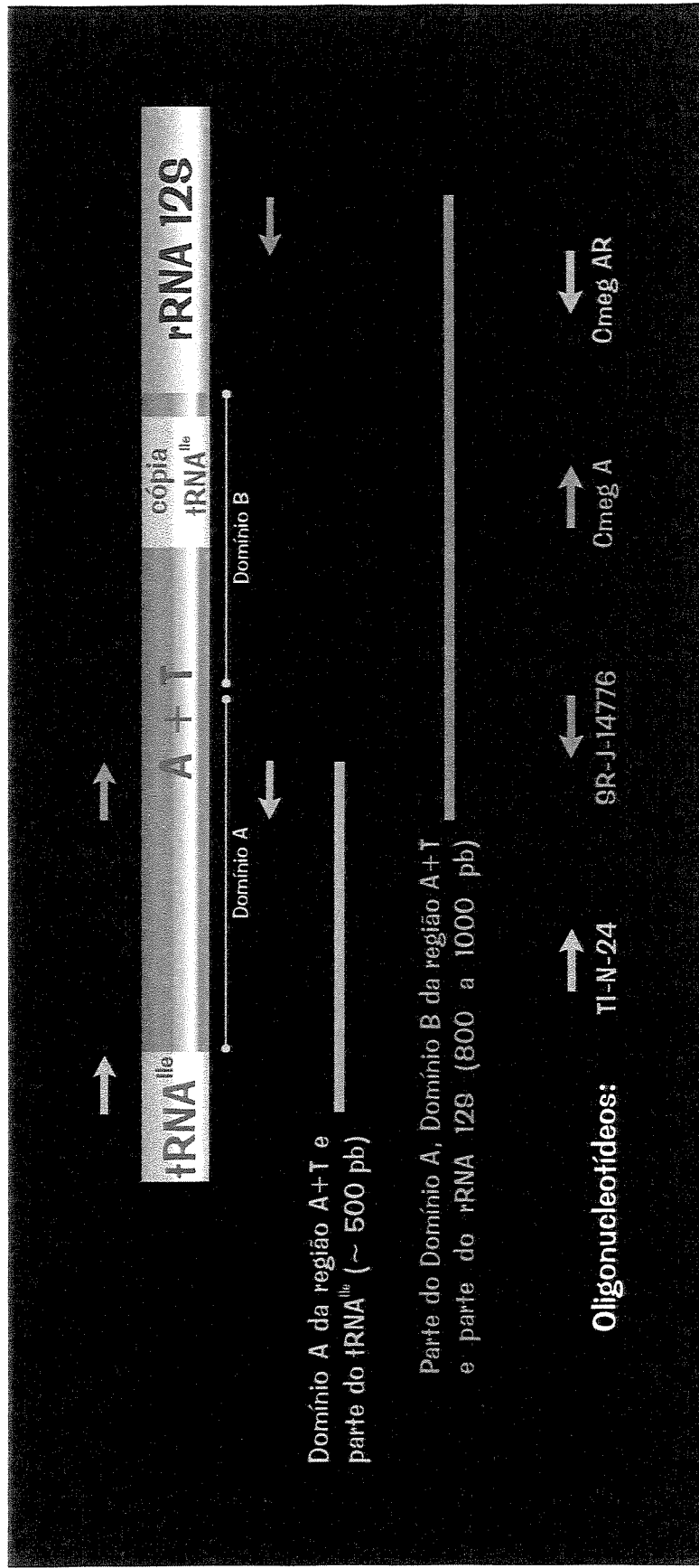


Figura 12: Regiões amplificadas pelos oligonucleotídeos indicados, recuperando-se a região A+T completamente em dois fragmentos adjacentes. A combinação de TI-N-24 e Cmeg AR produz um fragmento de ~500 pb e a amplificação com os oligonucleotídeos Cmeg A e SR-J-14776 produz um fragmento de ~800 pb para *C. putoria*.

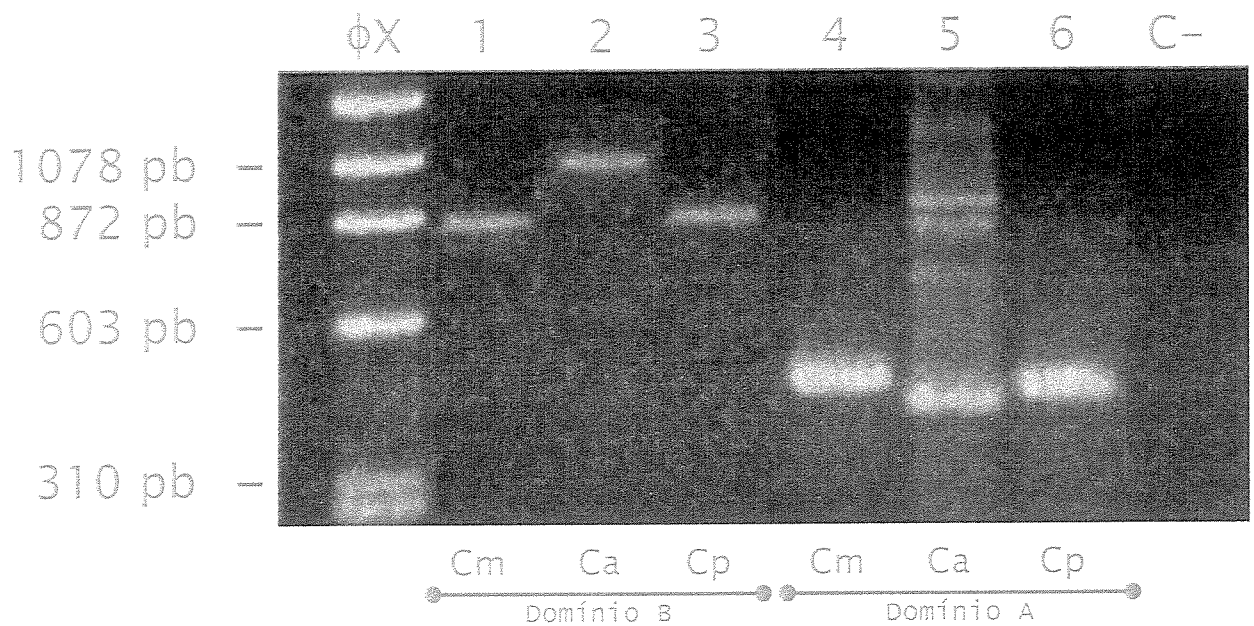


Figura 13: Produtos de amplificação dos domínios A e B em reações de PCR distintas utilizando-se a combinação dos “primers” desenhados com os “primers” universais. Cm = *C. megacephala*, Ca = *C. albiceps* e Cp = *C. putoria*. ϕX = marcador de peso molecular ϕX -174; C- = controle negativo.

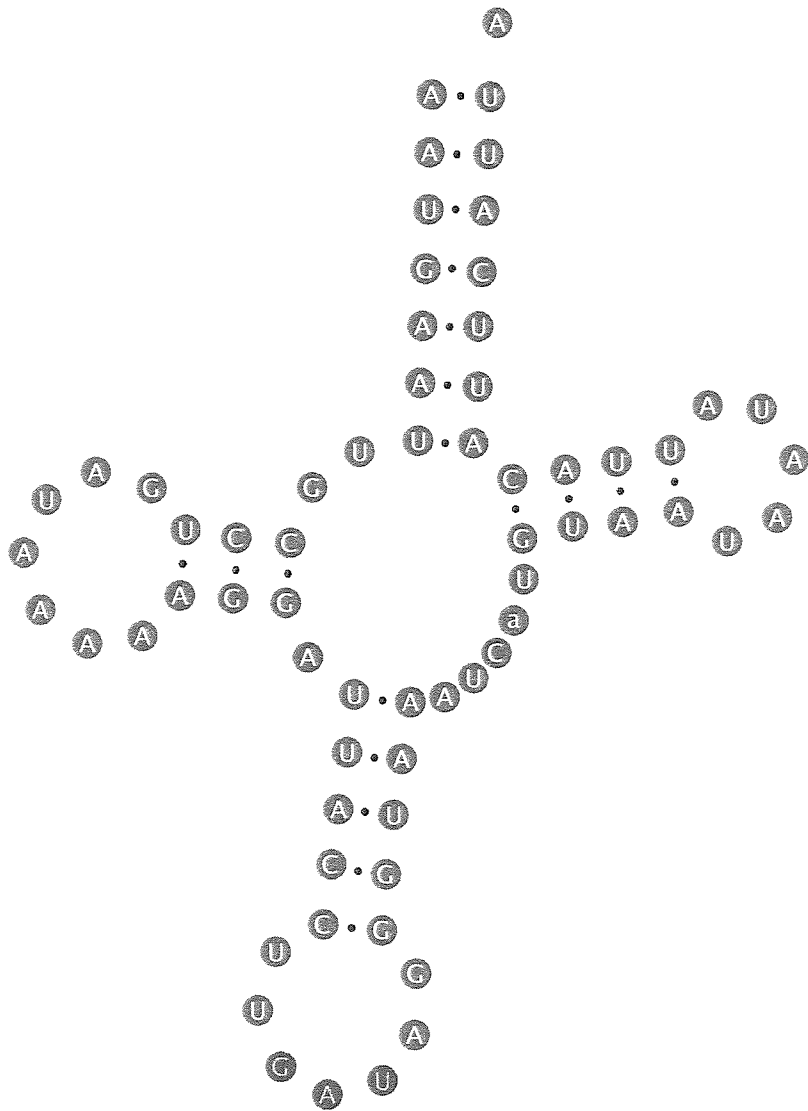


Figura 14: Estrutura secundária da cópia do tRNA^{Ile}, predita através do programa tRNA scan-SE. Em letras amarelas e fundo vermelho estão destacados os nucleotídeos que fazem parte do anticódon do tRNA^{Ile}.

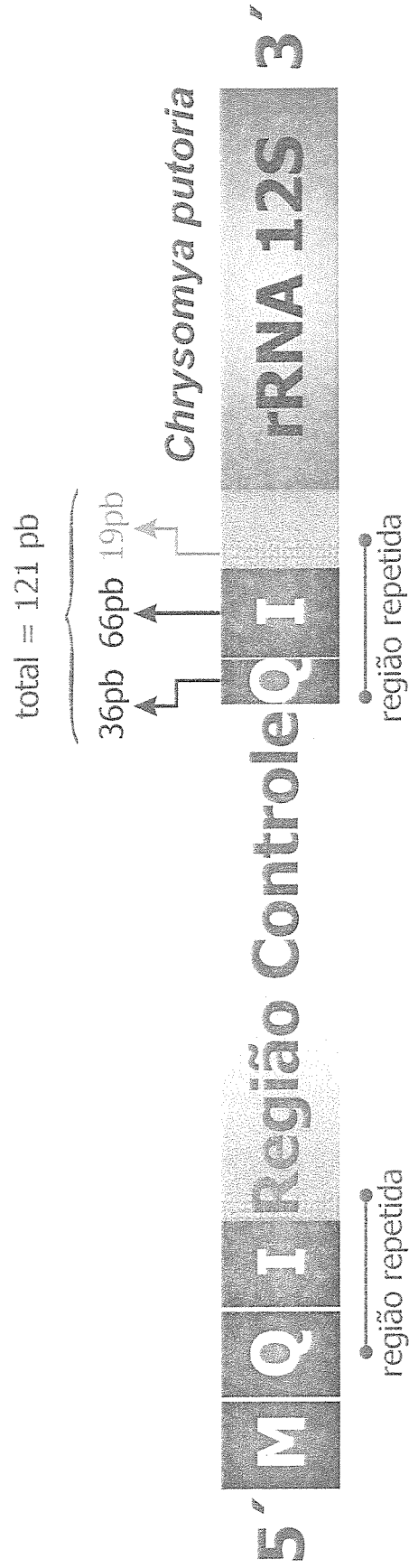


Figura 15: Esquema da região controle e seqüências adjacentes de *C. putoria*, indicando as regiões de duplicação parcial do tRNA^{Gln} (Q), duplicação completa do tRNA^{Met} (I) e duplicação do início do domínio A da região controle (delimitada por círculos azuis). M = tRNA^{Met}.

3. Acesso à Região Controle de *C. putoria*.

Após a padronização da amplificação dos domínios A e B da região controle de amostras frescas e congeladas, todas as amostras de museus que tiveram seu DNA extraído foram submetidas à amplificação. De um total de 39 amostras de museus, nenhuma apresentou a amplificação do domínio B (oligonucleotídeos CmegA/SR-J-14776 -Tabela 1), com cerca de 870 pb. Por outro lado, o emprego dos oligonucleotídeos TI-N-24 e CmegAR (Tabela 1) para a amplificação do domínio A, com cerca de 500 pb, gerou bandas nítidas para 17 amostras de museus (Tabela 2, Figura 16). Amostras frescas e congeladas em freezer -70°C apresentaram amplificações tanto para o domínio A quanto para o domínio B (Figura 13).

4. Caracterização do domínio A

A partir da clonagem dos produtos amplificados por PCR foi possível obter as sequências do domínio A da região controle das amostras listadas na Tabela 2. Através dos oligonucleotídeos utilizados recuperou-se em média 390.8 nucleotídeos referentes ao domínio A da região controle, além de 49 pb correspondentes ao gene do tRNA^{lle} (sítio de hibridação do oligonucleotídeo TI-N-24 e fim do tRNA^{lle}) e 20 pb correspondentes à sequência do oligonucleotídeo CmegAR. A composição de bases nas sequências das amostras que apresentaram amplificação pode ser vista na Tabela 3. Como o esperado, a quantidade de bases A e T nesta região é alto, atingindo na média 91% das bases.

Tabela 2: Relação das amostras sequenciadas, incluindo os adultos provenientes de diferentes museus e amostras frescas (cujo DNA foi extraído logo após a coleta) e congeladas em freezer -70°C .

AMOSTRA	DATA DE COLETA	LOCALIDADE	PRESERVAÇÃO
A 033	2000	S. João da Boa Vista (SP)	Pupa -70°C
A 054	1987	Manaus (AM)	Adulto seco
A 173	2001	Pirassununga (SP)	Adulto fresco
A 174	2001	Pirassununga (SP)	Adulto fresco
A 175	2001	Pirassununga (SP)	Adulto fresco
A 181	1996	Vilhena (RO)	Adulto seco
A 182	1993	Ponta Grossa (RS)	Adulto seco (patas)
A 186	1977	Campinas (SP)	Adulto seco
A 187	1977	Campinas (SP)	Adulto seco
A 188	1986	Vilhena (RO)	Adulto seco
A 189	1998	Belem (PA)	Adulto seco
A 190	1998	Belem (PA)	Adulto seco
A 191	1998	Belem (PA)	Adulto seco
A 193	1998	Belem (PA)	Adulto seco
A 194	1998	Belem (PA)	Adulto seco
A 195	1998	Belem (PA)	Adulto seco
A 201	1984	Vicosa (MG)	Adulto seco
A 202	1986	Vilhena (RO)	Adulto seco
A 203	1986	Vilhena (RO)	Adulto seco
A 204	1984	Vicosa (MG)	Adulto seco
A 212	1998	S. Corêa (RS)	Adulto seco
A 213	2001	Belem (PA)	Adulto -70°C
A 220	2001	Belem (PA)	Adulto -70°C
A 222	2001	Belem (PA)	Adulto -70°C
A 223	2001	Belem (PA)	Adulto -70°C
A 224	2001	Salvador (BA)	Adulto fresco

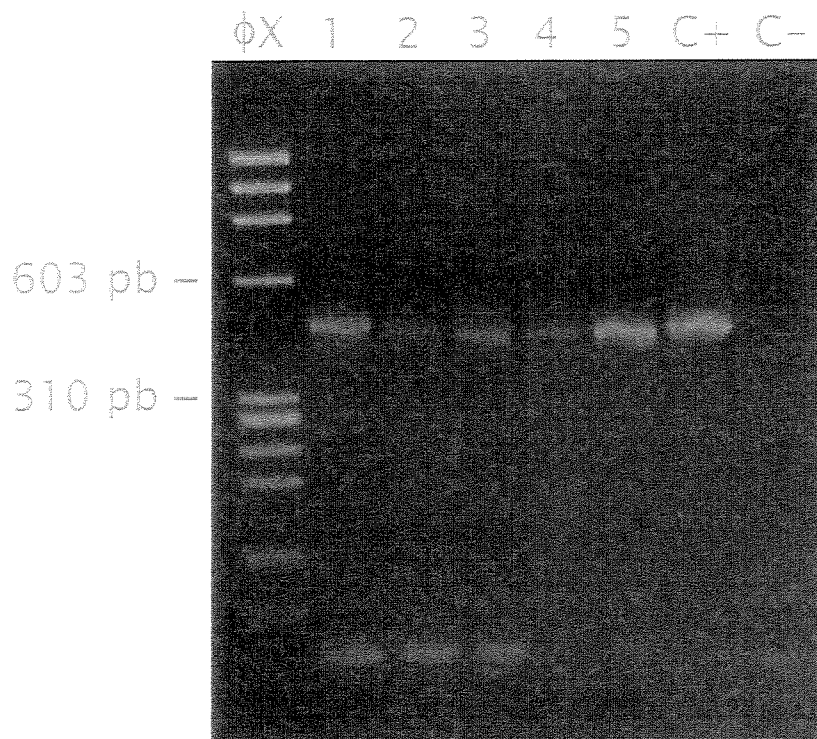


Figura 16: Produtos de amplificação do domínio A da região A+T de amostras de museus de *C. putoria*. 1 = A194, 2 = A195, 3 = A201, 4 = A202, 5 = A203 (ver Tabela 2); C+ = controle positivo; C- = controle negativo; ϕ X = marcador de peso molecular ϕ X 174.

Tabela 3: Composição nucleotídica (em porcentagem) e tamanho total (em pares de base) das amostras sequenciadas. A nomenclatura das amostras refere-se ao número da extração realizada, à localidade da amostra e ao ano de coleta das mesmas.

AMOSTRAS	T	C	A	G	TOTAL
A191Belém98	49.1	5.8	41.8	3.3	395
A201Vicososa84	49.1	5.8	41.8	3.3	395
A174Pirassununga01	49.1	5.8	41.8	3.3	395
A203Vilhena86	48.6	6.1	42.0	3.3	395
A0335JoãoBoaVista01	49.2	5.8	41.7	3.3	396
A220Belém01	49.2	5.8	41.7	3.3	396
A175Pirassununga01	49.0	5.8	41.9	3.3	394
A204Vicososa84	49.1	5.8	41.8	3.3	395
A190Belém98	49.0	5.8	41.9	3.3	394
A181Vilhena86	49.5	5.6	41.4	3.5	396
A189Belém98	49.5	5.6	41.4	3.5	396
A188Vilhena86	49.2	5.8	41.9	3.0	396
A202Vilhena86	49.6	5.3	41.8	3.3	395
A223Belém01	49.9	5.3	41.8	3.0	395
A224Belém01	49.6	5.8	41.6	3.0	399
A222Belém01	49.7	5.3	41.9	3.0	394
A182PontaGrossa93	49.0	5.6	42.1	3.3	392
A193Belém98	49.5	5.6	41.7	3.3	396
A194Belém98	49.1	5.6	41.8	3.5	395
A195Belém98	49.1	5.6	41.8	3.5	395
A219Belém01	49.2	5.6	41.7	3.5	396
A54Manaus87	48.7	5.8	41.9	3.5	396
A173Pirassununga01	50.4	4.9	40.6	4.1	367
A187Cps77	50.7	4.7	40.8	3.8	365
A186Cps77	50.4	4.7	41.0	3.9	363
A217Scoretea98	50.1	5.1	40.7	4.0	371
MEDIA	49.4	5.6	41.6	3.4	390.8

A comparação das sequências alinhadas das amostras listadas na Tabela 2 permitiu a caracterização estrutural dos diferentes blocos conservados de sequência (CSBs) presentes no domínio A da região A+T. A partir dos CSBs descritos para outras espécies de Calliphoridae e uma espécie de Oestridae (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000), foi possível delimitar estes blocos nestas amostras (Figura 17).

A delimitação destes blocos conservados também foi re-confirmada a partir da análise das sequências nos programas MAST 3.0 (“Motif Alignment and Search Tool”, Bailey and Gribskov, 1998) e MEME 3.0 (“Multiple EM for Motif Elicitation”, Bailey and Elkan, 1994), que reconhecem padrões de conservação nucleotídica em sequências.

4.1. Utilização do domínio A como marcador molecular: identificação espécie-específica.

A partir da análise das sequências alinhadas na Figura 17, é possível identificar visualmente regiões de maior variação ao longo da sequência do domínio A. Para verificar esta variação realizou-se o “sliding-window test”, com a finalidade de buscar sítios polimórficos ao longo das sequências.

Analisando-se as 26 sequências do domínio A com um total de 400 sítios, considerou-se um total de 359 sítios na análise (excluindo-se os espaçamentos –“gaps”– originados a partir do alinhamento), dos quais 52 são polimórficos. Os resultados do “sliding-window test” identificaram um total de 13 haplótipos e demonstraram que a diversidade nucleotídica (P_i) não é a mesma ao longo das sequências (Figura 18).


```

1 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
TTTAAAGTTA TTTAAATTTT TGAATTGAAT ATTTTATTA ATTTAATAAT TAAAAATAGT TAAAAAAA AGTTTAAAAA TTTATTTATA
.....
A194Belém98 .....
A195Belém98 .....
A219Belém01 .....
A54Manaus87 .....
A203Vilhena86 .....
A193Belém98 .....
A191Belém98 .....
A201Viçosa84 .....
A174Pirassununga01 .....
A033SJBV01 .....
A220Belém01 .....
A175Pirassununga01 .....
A204Viçosa84 .....
A190Belém98 .....
A182PontaGrossa93 .....
A181Vilhena86 .....
A189Belém98 .....
A202Vilhena86 .....
A188Vilhena86 .....
A222Belém01 .....
A223Belém01 .....
A224Belém01 .....
A173Pirassununga01 .....
A187Cps77 .....
A186Cps77 .....
A217Scorrea98 .....

```

Figura 17- continuação

A194Belém98	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111112	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222
A195Belém98	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778
A219Belém01	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
A54Manaus87	ATTTATTTAA	TTTAGATAAT	TAAAAATTGC	ATATATATAT	ATATATATA	-ATTTATATA	TATTTATICA	TATATTTATA	TATATTTATA	TATATTTATA	TATATTTATA	TATATTTATA
A203Vilhena86
A193Belém98
A191Belém98
A201Viçosa84
A174Pirassununga01
A033SJBV01
A220Belém01
A175Pirassununga01
A204Viçosa84
A190Belém98
A182PontaGrossa93
A181Vilhena86
A189Belém98
A202Vilhena86
A188Vilhena86
A222Belém01
A223Belém01
A224Belém01
A173Pirassununga01
A187Cps77
A186Cps77
A217Scorrea98

CSB II

Figura 17 -- continuação

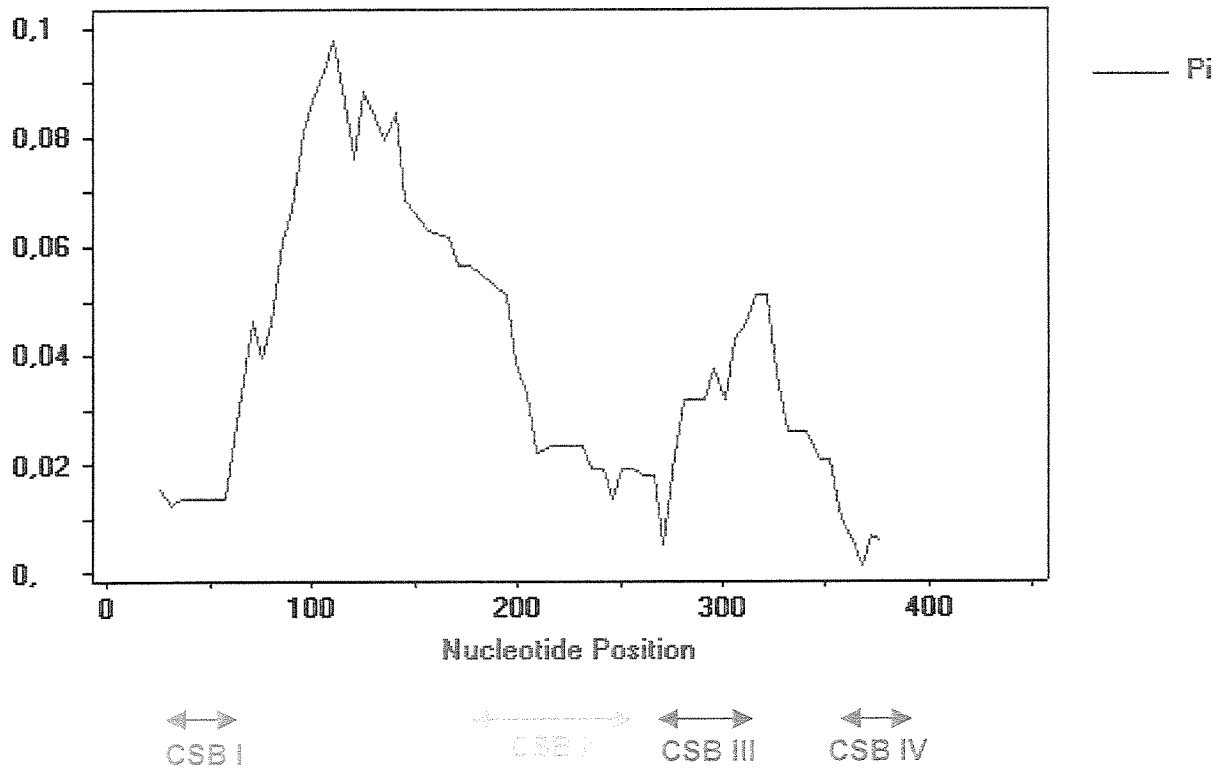


Figura 18: Gráfico produzido através do “sliding-window test”, utilizando uma janela de 50 pb e passos de 5 pb para o cálculo da diversidade nucleotíca (Pi) ao longo das 25 sequências do domínio A. As delimitações dos CSBs encontrados no domínio A estão indicados abaixo do gráfico

Dos 52 sítios polimórficos, 43 deles são parcimoniosamente informativos e estão esquematizados na Figura 19. Esta figura indica que muitos dos sítios variáveis encontram-se entre as posições nucleotídicas 80 e 180 (Figura 17). É possível verificar também o compartilhamento da maioria dos sítios parcimoniosamente informativos por quatro sequências (A173, A186, A187 e A217), que contribuíram em grande parte para a diversidade nucleotídica encontrada, principalmente no local de maior concentração dessa diversidade.

A Figura 20 mostra a árvore filogenética consenso inferida com o método da máxima parcimônia a partir das 26 sequências do domínio A de *C. putoria*. Esta árvore foi obtida a partir de um algoritmo heurístico, mas um teste com o algoritmo exato “branch-and-bound” também foi realizado para comparar as reconstruções com os dois métodos. Como as árvores foram muito semelhantes, para as outras reconstruções filogenéticas utilizou-se o algoritmo heurístico, por ser mais rápido. Deste modo, recuperou-se 36 árvores igualmente parcimoniosas (score=115), mas o teste Kishino-Hasegawa não detectou nenhuma árvore com diferença significativa. Reconstruções filogenéticas com métodos de distância também foram realizadas, mas não resultaram em agrupamentos diferentes. Foi possível verificar que as quatro amostras previamente citadas estão dispostas em um grupo diferente das demais amostras, motivando uma investigação mais detalhada sobre as possíveis causas deste agrupamento.

```

                                11111111111111111111111112222222233333333
03488899990001111223344566677924479990122339
7367801392472567141624428934840306782867391
A194Belém98      CTAGTATAATTGTTTAATTAGTATTATATTAATATACCATATA
A195Belém98..    .....
A219Belém01      .....
A54Manaus87      .....A.....
A203Vilhena86    ...A.....A.....
A193Belém98      ...A.....
A191Belém98      ...A.....
A201Viçosa84     ...A.....
A174Pirassununga01...A.....
A033SJBV01       ...A.....
A220Belém01      ...A.....
A175Pirassununga01...A.....
A204Viçosa84     ...A.....
A190Belém98      ...A.....
A182PontaGrossa93...A.....T.....
A181Vilhena86    ...A.....T...G..
A189Belém98      ...A.....T...G..
A202Vilhena86    ...A.....T.....
A188Vilhena86    ...A...A.....T.....
A222Belém01      ...A.....T.....T.....
A223Belém01      ...A.....T.....T.....
A224Belém01      ...A.....T.....T.....
A173Pirassununga01 TGGAATATATGTAAATTAATTAGAATGTAATTATATTTTA.AT
A187Cps77        TGGAATATATGTAAATTAATTAGAATGTAATTATATTTTA.AT
A186Cps77        TGGAATATATGTAAATTAATTAGAATGTAATTATATTTTA.AT
A217SCorrea98    TGGAATATATGTAAATTAATTAGAATGT.ATTATATTTTA.AT

```

Figura 19: Alinhamento dos sítios parcimoniosamente informativos encontrados na análise das 26 sequências previamente identificadas como *C. putoria*. Grande parte destes sítios são compartilhados pelas amostras A173, A186, A187 e A217, contribuindo para o aumento da diversidade nucleotídica.

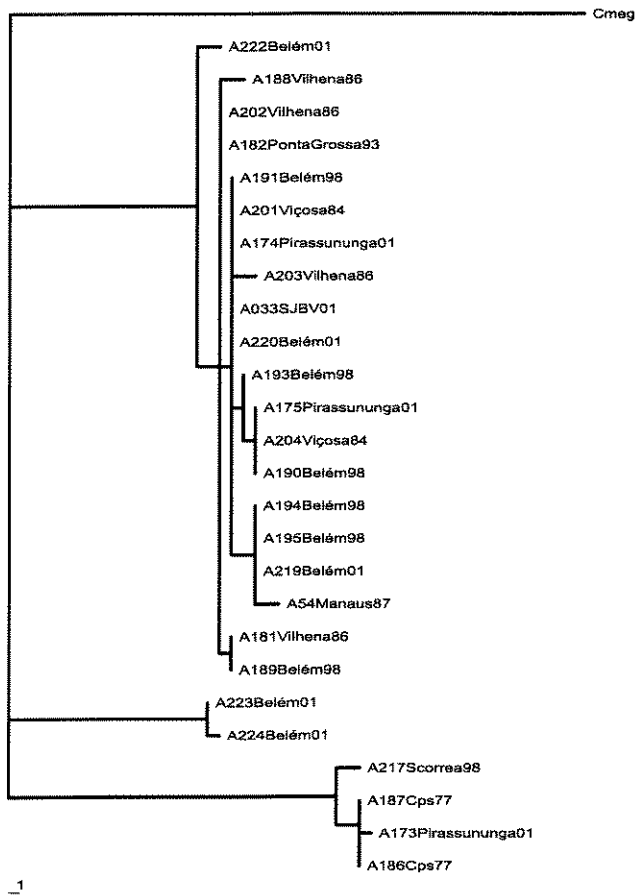


Figura 20a

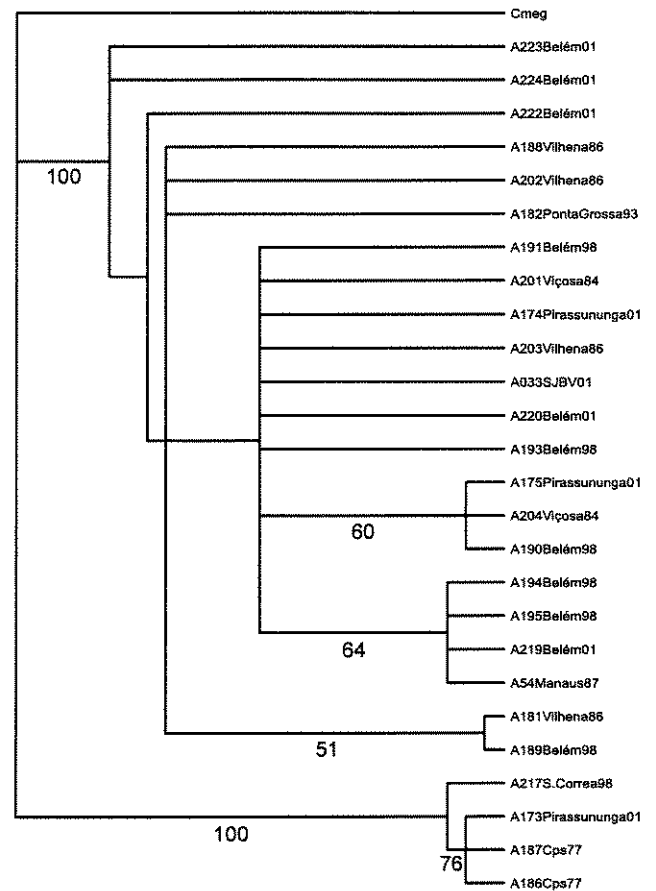


Figura 20b

Figura 20: (a) Árvore filogenética do domínio A da região controle do mtDNA, obtida a partir do método da máxima parcimônia. A espécie *C. megaloptera* foi utilizada como grupo externo. A filogenia está apresentada na forma de um filograma em que o tamanho dos ramos indica o número de substituições separando os haplótipos. (b) Árvore consenso obtida por máxima parcimônia, indicando o “bootstrap” (100 repetições). Os nós que receberam um suporte do “bootstrap” menor que 50% são mostrados como politomias.

Devido aos resultados obtidos com as análises feitas com o alinhamento das seqüências, diversidade nucleotídica através do “sliding-window test”, compartilhamento dos sítios parcimoniosamente informativos e reconstrução filogenética das 26 amostras previamente identificadas como *C. putoria*, a dúvida sobre a identificação correta das quatro amostras A173, A186, A187 e A 217 pôde ser esclarecida. Baseado na inferência filogenética de todos os dados de seqüência das amostras analisadas, juntamente com outras seqüências da região controle de califorídeos disponíveis, foi possível verificar que as amostras A173, A176, A187 e A217 são da espécie *C. albiceps*. Esta conclusão foi possível a partir da análise da árvore obtida quando incluiu-se a seqüência do domínio A de *C. albiceps*, ocasionando seu agrupamento juntamente com as quatro amostras em questão (Figura 21).

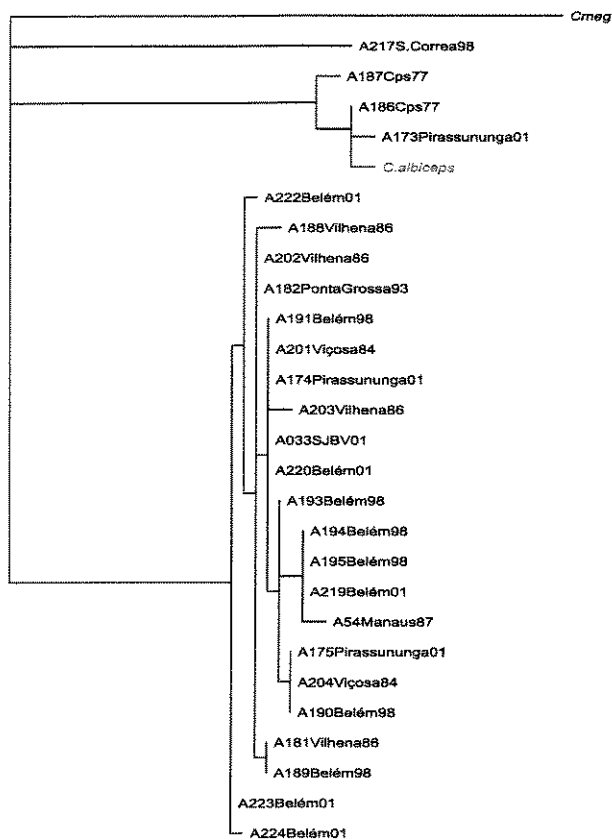


Figura 21a

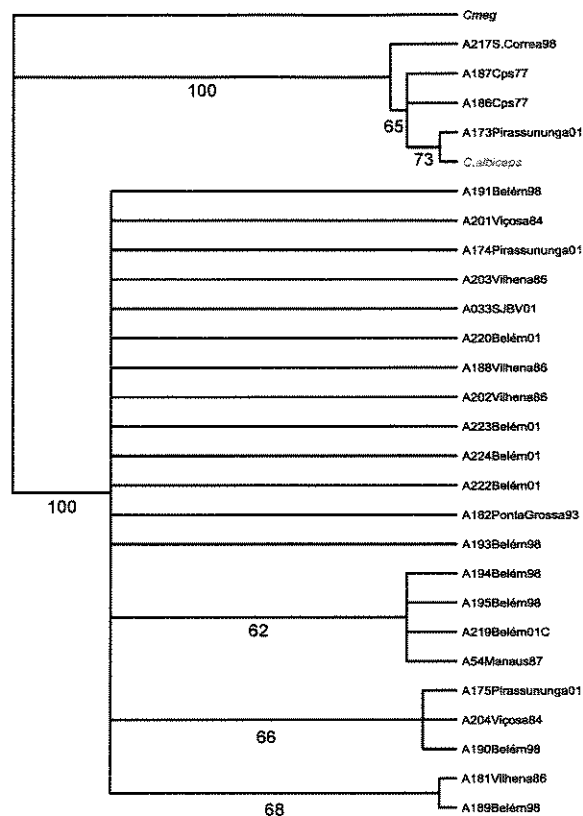


Figura 21b

Figura 21: (a) Árvore filogenética do domínio A da região controle do mtDNA, obtida a partir do método da máxima parcimônia. A espécie *C. megacephala* foi utilizada como grupo externo e a sequência do domínio A de *C. albiceps* (indicada em vermelho) foi incluída para verificação da identificação de espécimes previamente descritos como *C. putoria*. O filograma mostra o tamanho dos ramos, indicando o número de substituições separando os haplótipos. (b) Árvore consenso obtida por máxima parcimônia, indicando o “bootstrap” (100 repetições). Os nós que receberam um suporte do “bootstrap” menor que 50% são mostrados como politomias.

5. Variabilidade genética em *C. putoria*

Devido à identificação molecular das amostras A173, A186, A187 e A217 como sendo da espécie *C. albiceps*, estas quatro sequências foram desconsideradas na análise da variabilidade do domínio A.

O “sliding-window test” foi realizado para as 22 sequências de *C. putoria* e a diversidade nucleotídica diminuiu significativamente, sendo que a região de maior diversidade encontra-se entre os nucleotídeos 86 e 106 (Figura 22 e 23), que coincide com uma região em que não existem CSBs descritos.

Analisando-se a frequência das substituições encontradas nas sequências de *C. putoria*, foi possível constatar que existem 11 sítios polimórficos (4, 37, 66, 86, 101, 104, 106, 161, 232, 301, 332 - assinalados em vermelho na Figura 23), dos quais 5 são parcimoniosamente informativos (assinalados com um * na Figura 23). Foram encontrados 10 haplótipos entre as 22 sequências consideradas, excluindo-se os 10 sítios com “gaps” no alinhamento. Estes “gaps” foram verificados principalmente em regiões de repetição *in tandem* nas sequências. Uma destas regiões corresponde ao CSB I, em que há um poli-T, variando de 17 a 19 nucleotídeos para as amostras analisadas. A outra região corresponde ao CSB II, onde está localizada uma repetição dinucleotídica do tipo [TA]_n, contendo de 19 a 21 nucleotídeos.

Ao comparar as 22 amostras de *C. putoria* obteve-se uma diversidade nucleotídica média de 0.005, indicando uma baixa

variabilidade no domínio A da região controle. As sequências consideradas apresentaram uma identidade de 97%.

Quando foram consideradas apenas as seqüências do domínio A de cinco amostras de *C. albiceps*, também foi possível verificar uma diminuição na diversidade nucleotídica para cerca de 0.005, indicando que esta espécie provavelmente apresenta uma baixa variabilidade nesta região.

A análise filogenética por máxima parcimônia das 22 sequências do domínio A de *C. putoria* esquematizada na Figura 24 ressalta a baixa variabilidade genética através do tamanho dos ramos obtidos na árvore.

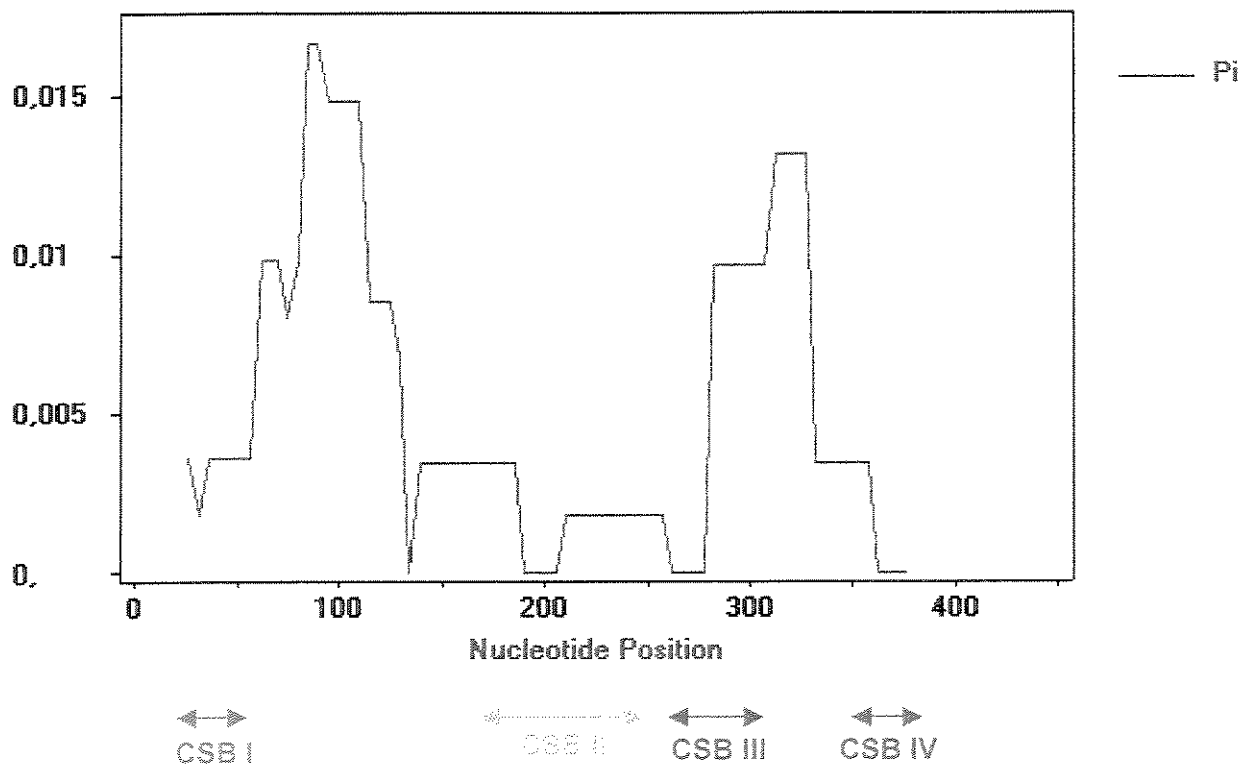


Figura 22: Gráfico produzido através do “sliding-window test”, utilizando uma janela de 50 pb e passos de 5 pb para o cálculo da diversidade nucleotídica (Pi) ao longo das 22 sequências do domínio A de *C. putoria*. As sequências reconhecidas como pertencentes à espécie *C. albiceps* não foram incluídas nesta análise. A comparação deste gráfico com o da Figura 9 mostra uma diminuição significativa na diversidade nucleotídica ao longo das sequências analisadas. A maior diversidade nucleotídica encontrada ao longo das sequências não está localizada em sequências descritas como CSBs.

```

1 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
TCCTTTTTAT CAGGCAATTC ATTAAAAGTA GGATTCCCAT CTCC-TTTT TTTTTTTTTT TTT-CITAT ACTTATTTTT
.....
A191Belém98 .....
A201Viçosa84 .....
A174Pirassununga01 .....
A033SJBV01 .....
A220Belém01 .....
A175Pirassununga01 .....
A204Viçosa84 .....
A190Belém98 .....
A181Vilhena86 .....
A189Belém98 .....
A188Vilhena86 .....
A202Vilhena86 .....
A223Belém01 .....
A224Belém01 .....
A222Belém01 .....
A182PontaGrossa93 .....
A193Belém98 .....
A203Vilhena86 .....
A194Belém98 .....
A195Belém98 .....
A219Belém01 .....
A54Manaus87 .....
.....C .....

```

Figura 23

A191Belém98	1	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
A201Viçosa84	8888888889	9999999999	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556						
A174Pirassununga01	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
A033SJBV01	TTAAAATTAT	TAAAATTTT	GAATTGAATA	TTTTATTAA	TTAATAATT	AAAAATAGTA	TTTTAAAAAT	TTATTTATAA						
A220Belém01
A175Pirassununga01
A204Viçosa84
A190Belém98
A181Vilhena86
A189Belém98
A188Vilhena86	A..C.....
A202Vilhena86
A223Belém01
A224Belém01
A222Belém01
A182PontaGrossa93
A193Belém98
A203Vilhena86
A194Belém98
A195Belém98
A219Belém01
A54Manaus87

* * *

Figura 23 – continuação

```

A191Belém98      111111111 111111111 111111111 111111111 111111112 222222222 222222222 222222222 222222222
A201Viçosa84    666666666 777777778 888888888 999999990 999999990 000000001 111111112 222222223 333333334
A174Pirassununga01 123456789 123456789 123456789 123456789 123456789 123456789 123456789 123456789 123456789
A033SJBV01      TTTATTTAAT TTAGATAATT AAAAAATTGCA TATATATATA TATATATA--- ATTTATATAT ATTTATTCAT ATATTTATAA
A220Belém01     .....
A175Pirassununga01 .....
A204Viçosa84    .....
A190Belém98     .....
A181Vilhena86  .....
A189Belém98     .....
A188Vilhena86  .....
A202Vilhena86  .....
A223Belém01     .....
A224Belém01     .....
A222Belém01     .....
A182PontaGrossa93 .....
A193Belém98     .....
A203Vilhena86  .....
A194Belém98     .....
A195Belém98     .....
A219Belém01     .....
A54Manaus87     .....
A.....*

```

Figura 23 – continuação

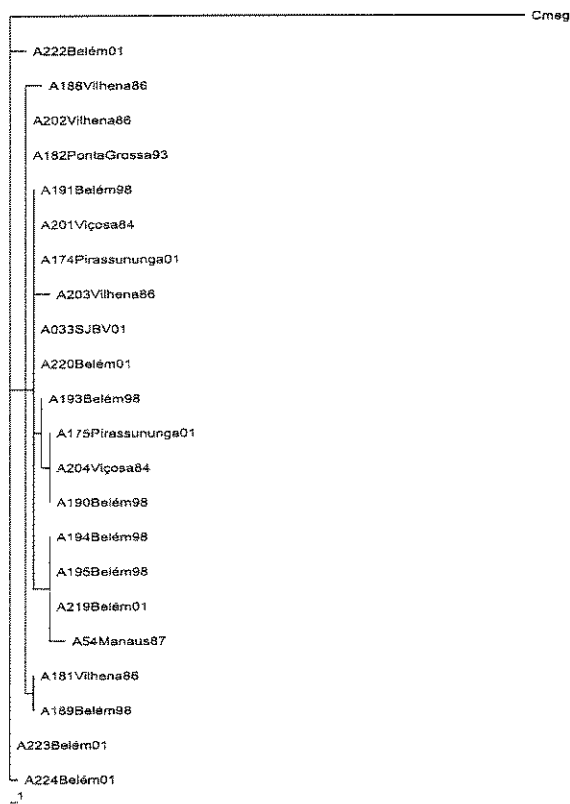


Figura 24a

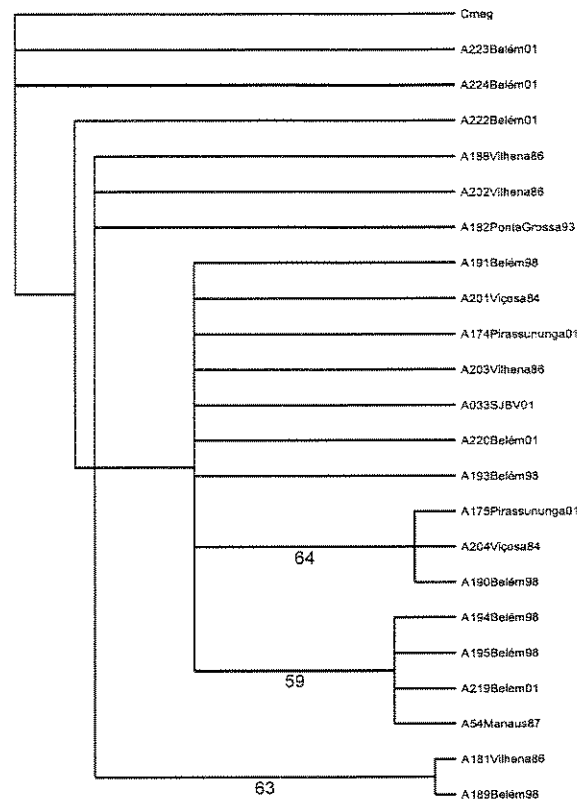


Figura 24b

Figura 24: (a) Árvore filogenética do domínio A da região controle do mtDNA, obtida a partir do método da máxima parcimônia. A espécie *C. megacephala* foi utilizada como grupo externo. O filograma mostra o tamanho dos ramos, indicando o número de substituições separando os haplótipos. (b) Árvore consenso obtida por máxima parcimônia, indicando o “bootstrap” (100 repetições). Os nós que receberam um suporte do “bootstrap” menor que 50% são mostrados como politomias.

DISCUSSÃO

1. Coletas

Estudos de dinâmica populacional e distribuição das espécies de califorídeos na região urbana de Belém (Esposito, 1997; Esposito, 1999) indicaram que de um total de 71569 moscas capturadas em armadilhas iguais às utilizadas e descritas neste estudo, cerca de 78% das amostras eram de *C. putoria*. No decorrer deste trabalho também foi possível constatar que a espécie predominante nesta região ainda é *C. putoria*, uma vez que foi a espécie mais coletada nas armadilhas utilizadas.

Por outro lado, a fauna de dípteros coletada neste mesmo período (Espósito, 1999) em diversas reservas ambientais da floresta amazônica e próximas a Belém indicou que cerca de 69% das moscas capturadas pertenciam à família Calliphoridae. Porém, as três espécies de *Chrysomya* representaram apenas 0,055% das espécies coletadas, sendo *Chloroprocta idioidea*, uma espécie nativa, a mais abundante. Nestas regiões de coleta também foi possível capturar a espécie nativa *Co. macellaria*, que sofreu grande redução populacional após a introdução das três espécies de *Chrysomya* no Brasil. Esta alteração faunística sugere que a espécie nativa tenha se refugiado em regiões de mata devido à competição e agressividade das espécies introduzidas (Esposito, comunicação pessoal).

Relatos atuais de coletas em Curitiba (PR) e diversas regiões do Rio Grande do Sul (Carvalho, comunicação pessoal) não têm registrado a presença de *C. putoria*, embora esta tenha sido a espécie mais abundante

na década de 80. Este fenômeno de redução populacional pôde ser verificado neste estudo, uma vez que nas regiões de Campinas e Goiânia não foi possível obter espécimes durante as coletas, apesar da espécie *C. putoria* ter sido a mais abundante após sua introdução na década de 70. Em Salvador, apenas um espécime de *C. putoria* foi coletado. Nestas regiões a espécie *C. albiceps* parece ser predominante atualmente.

Poucos estudos vêm sendo realizados acerca da dinâmica de populações de espécies introduzidas de insetos. Portanto os mecanismos que regulam as populações invasoras e as nativas são amplamente desconhecidos. Entretanto, com a intensificação dos transportes e comércio internacional, a taxa de estabelecimento de novas espécies aumentou significativamente (Mooney and Cleland, 2001). Neste sentido, as invasões biológicas apresentam questões evolutivas interessantes porque geralmente estão associadas a eventos estocásticos envolvendo pequenas populações que podem sobreviver a transições rápidas de habitat. O sucesso de uma invasão pode ser facilitado pela presença de características genéticas da população introduzida em que a seleção natural pode agir (Lee, 2002; Sax and Brown, 2000; Van der Putten, 2002).

Por outro lado, as espécies nativas precisam apresentar alterações evolutivas devido a fatores como a exclusão competitiva, deslocamento de nicho, hibridação, introgressão, predação e em último caso extinção (Mooney and Cleland, 2001, Sax and Brown, 2000).

As dinâmicas que regulam as populações de moscas na natureza são pouco conhecidas, mas normalmente são estabelecidas de acordo com fatores do ambiente (Linhares, 1979; Iwala and Onyeka, 1977). Sugere-se que interações competitivas e principalmente variações na disponibilidade de alimento podem ser responsáveis pelas alterações temporais do tamanho populacional das espécies (Lomônaco and Almeida, 1995).

2. Acesso à região controle do mtDNA

Dificuldades metodológicas de acesso a região controle são comuns, principalmente devido ao potencial de formação de estruturas secundárias e à presença de sequências envolvidas na origem de replicação do genoma mitocondrial. Estas características podem influenciar a eficiência da amplificação pela *Taq* DNA polimerase, assim como da ligação em plasmídeos. A constituição rica em bases A e T também pode interferir na recuperação eficiente desta região, devido às propriedades termoestáveis e à maior facilidade de incorporar erros durante a amplificação e sequenciamento. Isto ocorre principalmente em regiões de sequências repetidas *in tandem* (como o domínio de repetições dinucleotídicas [TA]) e de homopolímeros (como os domínios poli-T e poli-A) (Levinson and Gutman, 1987).

A dificuldade na construção de “primers” que amplifiquem eficientemente a região controle do mtDNA em espécies cuja sequência ainda não foi determinada deve-se principalmente à variabilidade

encontrada nesta região quando compara-se diferentes espécies, além das características já citadas. A baixa similaridade de sequências em estudos interespecíficos ocasiona uma escassez de “primers” específicos para esta região, sendo fundamental a otimização de reações de amplificação. Como uma consequência disto, pouca informação de sequência nucleotídica da região controle está disponível para insetos (Lessinger, 1998).

Os “primers” universais inicialmente utilizados para a amplificação da região A+T permitiram a caracterização de dois domínios distintos, A e B, para espécies da família Calliphoridae. O alinhamento de sequências do domínio A das espécies analisadas apresentou múltiplos CSBs, enquanto que o domínio B apresentou sequências muito variáveis que impossibilitaram alinhamentos consistentes desta região (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000). Além disso, a amplificação, sequenciamento e caracterização da região controle das espécies de Calliphoridae e Oestridae já estudadas demonstraram uma variação de tamanho entre 986 e 1569 pb, sendo que a espécie *C. megacephala* foi caracterizada com 986 pb em sua totalidade (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000).

Devido à discrepância de tamanho na amplificação da região controle de *C. putoria* (~300 pb, quando esperava-se um fragmento de ~1000 pb), o sequenciamento e a caracterização do fragmento de ~300 pb foram fundamentais para esclarecer os problemas enfrentados durante a etapa de acesso a esta região desta espécie. As análises indicaram que o oligonucleotídeo TI-N-24 estava se hibridando em dois sítios (no tRNA^{lle} e

no domínio B da região controle), ocasionando a amplificação preferencial do fragmento mais curto de ~300 pb. A amplificação preferencial deste fragmento provavelmente ocorreu devido ao seu menor tamanho, cuja amplificação é proporcionalmente mais rápida e pode ter impedido a continuidade da amplificação da região A+T inteira.

A identificação e caracterização desta duplicação gênica envolvendo a região controle, sua utilização como marcador genético e seu potencial para a filogenia molecular abrangendo outras espécies de Calliphoridae são aspectos abordados por Lessinger *et al.* (em preparação) e incluídos no ítem Anexo II desta tese.

2.1. Duplicação do tRNA^{lle}

De um modo geral, rearranjos e duplicações são características frequentes do mtDNA animal, ocorrendo independentemente da natureza codificadora ou não das regiões duplicadas e da posição relativa no genoma mitocondrial. Entretanto, eventos de duplicação associados à região controle ou adjacentes a ela são muito mais frequentes (Zhang and Hewitt, 1997; Saccone *et al.*, 1999). A ocorrência de regiões duplicadas envolvendo sequências parciais ou completas de elementos da região controle é comumente reportada em genomas mitocondriais de artrópodes. Rearranjos de tRNAs associados a sequências flangeadoras da região controle também são características comuns do mtDNA de insetos (Zhang and Hewitt, 1997; Campbell and Barker, 1999; Nardi *et al.*, 2001; Dotson and Beard, 2001; Lessinger, 2002; Lessinger *et al.*, em preparação).

Apesar disso, a partir do sequenciamento dos domínios A e B da região controle e a partir do sequenciamento total do genoma mitocondrial de *C. putoria*, foi possível caracterizar pela primeira vez em dípteros a ocorrência da duplicação do tRNA^{Leu}, ocasionando a descrição de um total de 23 genes codificadores de tRNAs, ao invés dos 22 comumente descritos para genomas mitocondriais animais em geral (Junqueira *et al.*, em preparação).

O acesso à seqüência duplicada permitirá uma análise evolutiva desta duplicação em *Chrysomya*. Apesar da duplicação não ter sido ainda analisada nas outras nove espécies do gênero, sua ocorrência entre as três espécies já analisadas e a relação filogenética entre elas sugere que a duplicação tenha ocorrido antes da radiação deste gênero. Outros gêneros relacionados também precisam ser analisados, a fim de que o evento da duplicação possa ser delimitado filogeneticamente (Lessinger *et al.*, em preparação).

As seqüências obtidas a partir da amplificação dos dois domínios da região controle das espécies de *Chrysomya* também estão sendo caracterizadas (Lessinger *et al.*, em preparação). Os CSBs foram delimitados no domínio A da região A+T das espécies analisadas de *Chrysomya* e são consistentes com os descritos para outras espécies da família Calliphoridae e Oestridae (Lessinger and Azeredo Espin, 2000). Além disso, regiões flangeadoras das repetições estão sendo analisadas termodinamicamente para verificar a presença de estruturas secundárias

do tipo “stem-and-loop”, que podem estar associadas ao processo de duplicação gênica (Saccone *et al.*, 1999). Estes resultados poderão contribuir na elucidação de alguns mecanismos relacionados a rearranjos e evolução do mtDNA. Por fim, a produção de sequências de espécies de moscas causadoras de mífases também contribuirá para a caracterização genético-molecular destas espécies, disponibilizando sequências que podem ser utilizadas para identificação espécie específica.

3. Acesso à Região Controle de *C. putoria*.

Somente com a análise das sequências da região A+T de *C. megacephala* foi possível construir oligonucleotídeos que amplificassem a região A+T de *C. putoria* eficientemente. Após a otimização das reações utilizando-se amostras frescas e congeladas, foi possível avaliar a recuperação de cada um dos domínios para amostras preservadas.

Portanto, a otimização da reação de PCR foi fundamental para a amplificação do DNA de amostras de museus e coleções entomológicas. A etapa de caracterização da região controle para as espécies *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria* foi crucial para o desenvolvimento deste trabalho, uma vez que possibilitou o acesso à informação genética destas espécies e permitiu a análise comparativa temporal de *C. putoria*.

A ausência de amplificação do domínio B das amostras preservadas em museus deve-se provavelmente à degradação que o DNA sofre ao longo do tempo através de danos hidrolíticos e oxidativos (Figura 2),

gerando cadeias de DNA fragmentadas que dificultam a amplificação de longas sequências.

Por outro lado, devido ao menor tamanho da região amplificada pelos oligonucleotídeos para o domínio A (~500 pb), era esperado que este fragmento fosse recuperado mais facilmente em amostras preservadas, devido à maior probabilidade de manutenção de sequências intactas (Lindahl, 1993; Cano, 1996; Pääbo, 1989).

Estas interpretações parecem condizentes com os resultados obtidos a partir de amostras frescas e congeladas, que apresentaram amplificações tanto para o domínio A quanto para o domínio B.

É importante também ressaltar que uma das amostras provenientes de museus (A182) teve o DNA total extraído de suas seis patas, resultando na amplificação, clonagem e sequenciamento eficientes. A obtenção de DNA de pequenas partes do inseto em boa qualidade é fundamental para a redução da destrutibilidade das técnicas de extração de DNA e para a preservação de caracteres morfológicos importantes. Entretanto, a maior dificuldade de se obter DNA amplificável de partes específicas do inseto reside na qualidade da preservação dos espécimes. No estudo realizado por Junqueira *et al.* (2002), verificou-se que a redução da recuperação da informação genética não está relacionada ao tempo de preservação dos espécimes, mas sim às condições ambientais nas quais os espécimes foram preservados. Além disso, fatores extrínsecos como o método

utilizado para a fixação das amostras têm efeitos consideráveis na extração e amplificação do DNA degradado (Thomas, 1994).

4. Caracterização do domínio A

4.1. Composição nucleotídica

O alto desvio nucleotídico na região controle é uma característica comum em insetos, sendo responsável por seu nome alternativo: região rica em A+T (Lewis *et al.*, 1994). Neste trabalho a composição média de bases A e T no domínio A foi de 91% (Tabela 3), corroborando com resultados previamente descritos. Em geral, a região controle de insetos possui mais de 85% de A+T, sendo que o conteúdo mais elevado destas bases é de 96% na região controle da abelha *Apis mellifera* e na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (Crozier and Crozier, 1993; Lewis *et al.*, 1994).

De um modo geral o genoma mitocondrial de insetos é rico em A+T. Análises detalhadas dos padrões dos nucleotídeos A e T em regiões codificadoras e não codificadoras, da função das posições dos códons e de estruturas secundárias levaram alguns autores a sugerirem a existência de uma pressão seletiva para um alto conteúdo das bases A e T (Clary and Wolstenholme, 1985; Crozier and Crozier, 1993). Esta pressão seletiva parece ser mais acentuada em posições nucleotídicas não codificadoras, sendo evidente na região controle do mtDNA.

Zhang and Hewitt (1997) sugerem que um alto conteúdo de A+T apresentado por todos os insetos cuja região controle já foi sequenciada pode ser uma característica filogenética comum e ancestral deste taxon, decorrente de mutação direcional. De fato os insetos são organismos de metabolismo acelerado, necessitando de uma grande eficiência na produção e replicação da fonte de energia celular: a mitocôndria. Como a região controle está relacionada à origem de replicação e início da transcrição do mtDNA, a rápida desnaturação da dupla cadeia nesta região é fundamental para a otimização metabólica nas células. Esta interpretação está intimamente relacionada à hipótese proposta por Kondo *et al.* (1990) e reforçada por Ballard (2000), em que o desvio de bases A e T pode ser resultado de uma seleção, já que estes genomas replicam-se mais rapidamente e requerem menos energia durante as etapas de replicação e transcrição do que genomas ricos em G+C.

Uma outra explicação para o desvio de composição nucleotídica no genoma mitocondrial foi proposta por Xia (1996), que sugeriu uma hipótese de maximização da eficiência transcricional em que a utilização dos códons depende do nucleotídeo que é mais abundante na matriz celular, uma vez que ele deve ser mais utilizado no mRNA. Na mitocôndria, códons terminados com A são utilizados mais freqüentemente em substituições sinônimas, uma vez que o ATP é muito mais abundante do que os outros três ribonucleotídeos, representando a principal forma de armazenamento de energia celular.

Martin (1995) também propõe uma hipótese para explicar as diferenças na composição nucleotídica em genomas mitocondriais de insetos. Esta tendência à alta composição em bases A e T pode ser causada pela maior suscetibilidade do dGTP e do dCTP a danos oxidativos e consequente incorporação preferencial do dATP pela polimerase em sítios sem bases. A tendência também pode ser causada devido à conversão de citosinas em uracilas através da desaminação hidrolítica (Ballard, 2000).

4.2. Blocos de Seqüência Conservada

As sequências reconhecidas nos CSBs da região A+T de *C. putoria* assinalados na Figura 17 estão presentes na região controle de vários insetos já estudados (revisão em Zhang and Hewitt, 1997), tais como em espécies de *Drosophila* e também de outros califorídeos (Monnerot *et al.*, 1990; Lessinger and Azeredo-Espin, 2000). Embora possam ter sido produzidas por convergência, suas localizações conservadas sugerem que tenham um papel importante na regulação da transcrição de genes e também na replicação do mtDNA (Clary and Wolstenholme, 1987). A localização destes blocos conservados também está relacionada à formação de estruturas secundárias nesta região (Lessinger and Azeredo-Espin, 2000).

Estes motivos são chamados de elementos estruturais, uma vez que não somente a sequêcia primária, mas também suas localizações e conformações secundárias são conservadas. Estes elementos estruturais podem ser identificados em insetos distantemente relacionados, como

gafanhotos e moscas-de-fruta, refletindo sua importância funcional (revisão em Zhang and Hewitt, 1997).

Os elementos conservados poli-timidina (poli-T) na posição 5' e a repetição do tipo $[TA]_n$ são facilmente visualizados nas seqüências alinhadas, fazendo parte respectivamente do CSB I e CSB II. Clary and Wolstenholme (1987) sugerem que o poli-T esteja envolvido no controle da transcrição e/ou replicação. O $[TA]_n$, por sua vez, é um motivo muito comum entre insetos, tendo sido descrito em ortópteros, dípteros e lepidópteros.

4.3. Análise da diversidade nucleotídica e abordagem filogenética: identificação espécie-específica.

Como era esperado, a região que apresenta a maior diversidade nucleotídica ao longo das 26 seqüências inicialmente analisadas está compreendida entre 80 e 180 pb (Figura 18), que coincide com uma região sem CSBs descritos, ressaltando a importâncias estrutural e funcional do domínio conservado da região controle.

Ao analisar o alinhamento do trecho citado acima, pode-se observar claramente que quatro indivíduos (A173, A186, A187 e A217) diferem dos outros, contribuindo significativamente para o aumento da diversidade nucleotídica desta região. Estes quatro indivíduos são de Pirassununga (A173), Campinas (A186 e A187) e Serafina Corrêa (A217), cujas coletas foram realizadas em épocas diferentes (Tabela 2), mas apresentaram um padrão similar quando considera-se a variação em suas seqüências. Estas

amostras também diferem-se das demais quando analisa-se outros sítios na sequência, ao mesmo tempo que apresentam o mesmo padrão de substituições entre si (Figura 17).

A análise da variabilidade encontrada entre estas seqüências indica que grande parte dos sítios parcimoniosamente informativos estão associados às quatro seqüências citadas anteriormente, que apresentam o mesmo padrão de substituição nucleotídica (Figura 19). Portanto, a maior parte destes sítios variáveis é compartilhada entre estas quatro seqüências.

É interessante ressaltar também que a extensão das seqüências A173, A186, A187 e A217 é menor do que a do restante das amostras (Tabela 3), apresentando seqüências que variam entre 365 e 371 pb, enquanto que as demais seqüências são maiores, contendo entre 392 e 399 pb (Tabela 3). Essa diferença na extensão das seqüências deve-se principalmente a duas regiões de indel, contendo 7 e 13 pb, entre outros eventos do tipo indel compartilhados por estas quatro amostras ao longo da seqüência.

As árvores filogenéticas obtidas com as 26 amostras através da máxima parcimônia (Figura 20) indicam que as seqüências das amostras A173, A186, A187 e A217 estão localizadas em um grupo que claramente está fora da maioria das amostras analisadas, obtendo um suporte de 100% quando realiza-se o “bootstrap” com 100 repetições. Este agrupamento característico na análise filogenética das amostras, das seqüências alinhadas, da diversidade nucleotídica e dos sítios parcimoniosamente

informativos encontrados ao longo das seqüências do domínio A, levantou algumas hipóteses a respeito da origem desta diversidade: (i) contaminação com DNA proveniente de fontes exógenas, (ii) presença de variação no mtDNA de *C. putoria*, (iii) erro de identificação de espécimes.

Com relação a possibilidades de contaminação a partir do DNA proveniente de bactérias, ácaros, fungos ou mesmo de outras amostras de dípteros (particularmente de outros califorídeos), deve-se ressaltar que todas as medidas recomendadas para prevenção de contaminações quando trabalha-se com material orgânico proveniente de museus foram adotadas nas fases de extração do DNA, amplificação por PCR e clonagem. Estas precauções são importantes, uma vez que quantidades ínfimas de DNA podem ser amplificadas através da técnica de PCR.

A segunda hipótese para explicar a variação encontrada nas amostras sequenciadas é a existência de dois grupos distintos de mtDNA entre as amostras de *C. putoria* coletadas no Brasil, que poderiam ter surgido a partir da introdução de linhagens mitocondriais distintas. A variação dentro destes grupos é pequena e será discutida mais adiante. É importante ressaltar que a probabilidade de dois grupos distintos em termos de seqüência nucleotídica primária se originarem no Brasil depois da introdução de *C. putoria* é pequena, uma vez que esta espécie foi introduzida há cerca de 35 anos e o tempo para fixação destas substituições em dois grupos caracteristicamente distintos é relativamente pequeno, mesmo considerando-se a maior taxa de substituição estimada

para o mtDNA de insetos, equivalente a $5,7 \times 10^{-9}$ substituições por sítio por geração (Tamura, 1992).

O erro de identificação de espécimes é, portanto, a hipótese mais provável para a explicação da variabilidade encontrada. Ao incluir a sequência nucleotídica do domínio A da região controle da espécie *C. albiceps* durante a análise dos dados, foi possível verificar que o alinhamento da sequência desta espécie coincidia com o padrão de substituições encontrado nas amostras A173, A186, A187 e A217. Curiosamente, a maior parte das substituições em *C. albiceps* eram as mesmas encontradas para estas amostras, nos mesmos sítios previamente caracterizados como polimórficos. Utilizando-se a sequência do domínio A de *C. megacephala* como grupo externo, a análise filogenética das sequências previamente descritas juntamente com a sequência do domínio A da espécie *C. albiceps* mostra claramente que esta espécie agrupa-se com as amostras A173, A186, A187 e A217 (Figura 21). A partir da árvore obtida e também da análise do alinhamento das seqüências deste domínio, pôde-se comprovar que alguns espécimes que haviam sido previamente identificados como *C. putoria* correspondem, na realidade, à espécie *C. albiceps*.

A caracterização e identificação molecular espécie-específica é uma abordagem de extrema importância, principalmente quando considera-se espécies crípticas ou muito próximas filogeneticamente. Entre os dípteros muscóides causadores de mífases, a identificação de espécies a partir de

evidências moleculares é uma abordagem que vem crescendo no cenário mundial, uma vez que a maioria das espécies é praga, de importância forense ou sanitária (Wells and Sperling, 1999; Litjens *et al.*, 2001; Stevens and Wall, 2001; Wallman and Donnellan, 2001; Wells and Sperling, 2001).

Litjens *et al.* (2001), através da utilização de PCR-RFLP (“Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism”), realizaram a caracterização e identificação molecular de regiões do mtDNA de duas espécies próximas de moscas causadoras de miíases, *Cochliomyia hominivorax* e *Co. macellaria*. As larvas de *Co. hominivorax*, conhecida como a mosca da bicheira, infestam feridas abertas em homens e animais, causando prejuízos substanciais na produção de couro, leite e carne. Esta espécie é morfológicamente similar à espécie *Co. macellaria*, uma espécie saprófaga causadora de miíase secundária. A sobreposição geográfica entre *Co. hominivorax* e *Co. macellaria*, a semelhança morfológica entre elas, a coexistência de ambas as espécies na mesma ferida (uma alimentando-se de tecido vivo e outra de tecido necrosado) e os prejuízos potenciais causados por *Co. hominivorax* representam a necessidade de uma rápida identificação destas duas espécies através de características confiáveis e seguras, como as que foram obtidas a partir de marcadores moleculares do mtDNA.

Além disso, a identificação de espécies é uma das principais etapas em uma análise para entomologia forense. Entretanto, o critério de diagnóstico morfológico é vago para muitas espécies e fases do

desenvolvimento. Em particular, espécies da subfamília Chrysomyinae são comumente coletadas em corpos em decomposição e podem ser identificadas através de chaves para o estágio adulto e terceiro ínstar larval (Wells and Sperling, 2001). No entanto, principalmente quando são estágios imaturos, as características anatômicas para identificação destas espécies podem ser comprometidas devido à grande semelhança morfológica e à variação intraespecífica. Portanto, o emprego de marcadores moleculares pode evitar estas dificuldades intrínsecas à identificação morfológica de espécies, quando existe disponibilidade de seqüências de DNA.

Wells and Sperling (2001) utilizaram seqüências dos genes mitocondriais para as subunidades I e II da citocromo oxidase (COI e COII) para a análise filogenética e identificação de espécies de Chrysomyiine. A abordagem proposta residia em incluir seqüências de espécimes não identificados em uma análise filogenética com as seqüências das regiões COI e COII de espécies previamente identificadas. Este método foi capaz de identificar grande parte dos espécimes de dípteros coletados em cadáveres humanos de investigações forenses nos Estados Unidos e Canadá.

Portanto, a caracterização molecular de diferentes espécies é de grande importância em análises forenses e de distribuição geográfica, uma vez que marcadores moleculares, como os do mtDNA, têm se mostrado extremamente úteis e confiáveis para a identificação espécie-específica e para estudos de variabilidade genética. Em particular, durante a condução

deste trabalho, foi possível demonstrar que a identificação de espécies a partir de dados morfológicos pode gerar conflitos, principalmente quando baseia-se em caracteres que podem ser considerados polimórficos. Logo, deve-se atentar para a utilização de vários caracteres morfológicos durante a identificação de espécies, com a finalidade de minimizar ou evitar futuras interpretações equivocadas. A disponibilidade da sequência do domínio A de *C. albiceps* sem dúvida foi fundamental para o diagnóstico das amostras A173, A186, A187 e A217, possibilitando a retratação de um engano previamente cometido. Por outro lado, a capacidade de identificar estas amostras como pertencendo à espécie *C. albiceps* demonstra a utilidade de um marcador molecular quando aplicado para a resolução de problemas específicos. Neste sentido, o domínio A da região controle do mtDNA se mostrou um marcador eficiente para a identificação das espécies do gênero *Chrysomya* existentes no Brasil.

5. Avaliação da variabilidade em *C. putoria*

As quatro amostras identificadas molecularmente como *C. albiceps* foram desconsideradas na análise da variabilidade genética do domínio A de *C. putoria*. Ao retirar estas amostras das análises, constatou-se um decréscimo significativo na diversidade nucleotídica obtida a partir destas seqüências. Enquanto que a maior diversidade nucleotídica na primeira análise da variação ao longo das seqüências (Figura 18) foi de aproximadamente 0.1, nesta segunda análise considerando-se apenas as

22 sequências de *C. putoria*, a maior diversidade nucleotídica encontrada corresponde a aproximadamente 0.017 (Figura 22). Neste sentido, a hipótese levantada de que a diversidade nucleotídica encontrada entre as sequências na primeira análise possivelmente tratava-se da diversidade interespecífica, pôde ser confirmada. Ao conduzir o “sliding-window test” considerando-se apenas as amostras identificadas como *C. albiceps*, a diversidade nucleotídica máxima encontrada também foi de aproximadamente 0.017, indicando um decréscimo significativo na variabilidade destas amostras.

A análise filogenética das sequências de *C. putoria* através do método da máxima parcimônia (Figura 24) também retrata a baixa variabilidade nesta espécie, como mostram os tamanhos reduzidos dos ramos na filogenia. As politomias presentes na árvore remetem à dificuldade de se obter uma boa resolução de grupos de indivíduos com este marcador molecular. Esta baixa variabilidade pode ser relacionada ao curto espaço de tempo para a diversificação da espécie no Brasil desde sua introdução há cerca de três décadas.

A busca por padrões específicos de substituições, sinapomorfias e/ou indels nas sequências alinhadas não teve sucesso, uma vez que não foi possível correlacionar os padrões obtidos nas sequências com localidades geográficas ou épocas de coleta, retratando novamente a baixa variabilidade genética no domínio A das populações de *C. putoria*, assim como a recente divergência dos haplótipos encontrados. Esta interpretação

é enfatizada pelo fato de que, entre os 399 sítios analisados, apenas 11 apresentaram polimorfismos, sendo que 5 deles são parcimoniosamente informativos (Figura 23). Estes resultados indicam que a variabilidade do domínio A da região controle é bastante reduzida para a espécie *C. putoria* e provavelmente também para outras espécies de *Chrysomya* introduzidas no Novo Mundo.

Estudos genéticos realizados com espécies invasoras indicam que de um modo geral a variabilidade genética das populações nos locais de introdução/invasão é extremamente reduzida. A estrutura genética de populações invasoras depende de uma série de fatores, incluindo o tamanho efetivo da população introduzida e a diversidade genética da população original. O efeito fundador, que resulta em uma redução do tamanho populacional, pode exercer um impacto severo na diminuição da variação genética.

A deriva genética, por sua vez, tem uma atuação importante em pequenas populações, podendo resultar em drásticas reduções de variabilidade genética em nível populacional (Holland, 2000; Sakai *et al.*, 2001).

Um outro fator que pode atuar na redução da diversidade genética é o endocruzamento. Em situações em que um gargalo populacional resultou numa população fundadora composta de indivíduos aparentados, a probabilidade destes indivíduos acasalarem entre si é muito maior do que

em uma população panmítica. Logo, o endocruzamento torna-se inevitável (Hartl and Clarck, 1997; Holland, 2000).

Em insetos, um exemplo representativo de redução na variabilidade genética de espécies invasoras é o da formiga Argentina *Linepithema humile*. Estudos com microsátélites demonstraram que um gargalo populacional reduziu drasticamente a diversidade genética de populações introduzidas no estado da Califórnia (EUA) (Tsutsui *et al.*, 2000). Entretanto, neste caso, o gargalo populacional foi fundamental para a dispersão desta espécie, uma vez que as formigas passaram a não apresentar o padrão de territorialidade e agressividade co-específica, comuns na região nativa. Estas características contribuíram para a origem de uma população unicolonial, possibilitando a formação de supercolônias capazes de competir com outras espécies de formigas (Tsutsui *et al.*, 2000). Trabalhos recentes com a mesma espécie de formiga na Europa demonstraram que a perda de agressividade entre indivíduos de formigueiros diferentes também foi fundamental para o estabelecimento de supercolônias que chegam a apresentar 6000 Km de extensão, desde a Itália até a costa espanhola do Oceano Atlântico (Giraud *et al.*, 2002). O gargalo populacional pelo qual esta espécie passou nos locais de introdução vem sendo indicado como a principal causa da baixa variabilidade genética encontrada, que parece ser a chave para a formação de supercolônias (Tsutsui *et al.*, 2000). Estes resultados mostram como

uma mudança relativamente simples na estrutura genética de populações pode ter consequências ecológicas e econômicas dramáticas.

Outro exemplo extremo acerca da variabilidade genética de espécies invasoras é o da mosca da fruta *Ceratitis capitata*, considerada uma praga agrícola. Estudos com isozimas detectaram a perda de 60% da variação genética ancestral após sucessivas invasões desta espécie nos Estados Unidos. Os resultados obtidos a partir do mtDNA indicam uma perda de 75% da variação original nos locais de introdução de *C. capitata* (Villablanca *et al.*, 1998). Em geral, estas populações apresentam baixa variabilidade genética devido ao gargalo populacional sofrido durante a introdução (Davies *et al.*, 1999; Bohonak, *et al.*, 2001). Entretanto, análises recentes realizadas em introns de múltiplos *loci* nucleares se mostraram eficientes na detecção da variabilidade genética, mesmo em populações recém-fundadas (Villablanca *et al.*, 1998).

Neste contexto, as invasões biológicas geralmente começam de um baixo tamanho populacional, levando à redução da variação genética no DNA nuclear e principalmente no mtDNA, uma vez que ele possui uma herança predominantemente uniparental. Conseqüentemente, abordagens genéticas para o estudo de estrutura populacional e diversidade genética são comprometidas (Villablanca, *et al.*, 1998).

Portanto, a baixa variabilidade genética detectada entre populações de *C. putoria* pode ser relacionada ao gargalo populacional que esta espécie sofreu durante o processo de introdução da espécie no Brasil.

Devido à provável introdução de poucas fêmeas provenientes de uma mesma região africana (Angola, de acordo com os registros de introdução de *C. putoria*), a baixa variabilidade no mtDNA pode estar refletindo este efeito fundador. A deriva gênica é um outro fenômeno que pode ter atuado na diminuição da variabilidade genética de *C. putoria*, principalmente se o tamanho efetivo da população introduzida foi pequeno.

Uma outra justificativa para a baixa variabilidade genética encontrada em *C. putoria* pode ter relação com o conflito taxonômico entre *C. putoria* e *C. chloropyga*. Recentemente foi analisado um fragmento de 600 pb da região CO I do mtDNA, mostrando que *C. putoria* agrupa-se em um dos haplótipos encontrados em populações de *C. chloropyga*, apresentando uma baixa variabilidade genética nas populações analisadas, que incluíram amostras do Velho e do Novo Mundo. Estes resultados indicam que é possível que *C. putoria* tenha se divergido recentemente de *C. chloropyga* (Wells, comunicação pessoal), e que esta divergência taxonômica associada ao gargalo populacional sofrido durante a introdução de *C. putoria* no Novo Mundo podem ter ocasionado a baixa variabilidade encontrada no domínio A da região controle das populações brasileiras de *C. putoria* analisadas neste trabalho. É importante lembrar que a problemática taxonômica entre estas duas espécies ainda não está esclarecida, sendo necessários maiores estudos acerca da variabilidade genética, morfológica e ecológica.

Os resultados obtidos neste trabalho também remetem a uma importante discussão a respeito da utilização do domínio A da região controle como um marcador molecular capaz de detectar a variabilidade genética entre populações de *C. putoria*.

Neste sentido, o domínio A demonstrou ter uma baixa diversidade nucleotídica quando utilizado para análises de variabilidade intraespecíficas de *C. putoria*, envolvendo um baixo número de substituições e haplótipos. Ao mesmo tempo, as regiões mais variáveis e que causaram maiores problemas no alinhamento das sequências estão relacionadas a repetições *in tandem*, como a variação na extensão do poli-T e inserções/deleções na região de repetições dinucleotídicas [TA]_n.

Uma explicação para a redução de variabilidade genética na região controle do mtDNA consiste principalmente na riqueza de nucleotídeos A e T. A pressão de mutação nesta direção limita as mutações que podem ocorrer, aumentando a frequência de convergências e homoplasias e atuando na diminuição da taxa observada de substituição nucleotídica. Além disso, os poucos nucleotídeos G e C que permaneceram na molécula podem ser de grande importância funcional, reduzindo a variabilidade nestes sítios e conseqüentemente na região controle.

É interessante ressaltar que o domínio A, por apresentar uma grande importância funcional, estando provavelmente relacionado tanto à origem de replicação quanto à ativação transcricional do genoma mitocondrial, está sujeito a uma menor variabilidade em seus CSBs, que têm uma relação

direta com a formação de estruturas secundárias responsáveis pela sinalização física de regiões importantes para a interação com a DNA polimerase, RNA polimerase e outras proteínas.

Entretanto, os resultados obtidos a partir de outros marcadores do mtDNA confirmam a baixa variabilidade encontrada em *C. putoria* através do sequenciamento do domínio A. Análises realizadas através de PCR-RFLP do domínio B da região A+T e das regiões COI/COII demonstraram uma grande dificuldade na procura por enzimas de restrição polimórficas entre os 120 indivíduos das populações analisadas até o momento, indicando uma variabilidade genética extremamente baixa nas populações de *C. putoria* no Brasil (Lima, comunicação pessoal). Por outro lado, estudos de variabilidade genética intraespecífica realizados com a sequência de ~600 pb da subunidade I do gene mitocondrial para a citocromo oxidase (COI) de *C. putoria*, *C. megacephala* e *C. rufifacies* também demonstraram uma baixa variabilidade em espécimes do Novo Mundo (Wells, comunicação pessoal), que está sendo relacionada à recente introdução das espécies no continente americano.

6. Perspectivas para análise da variabilidade genética de *Chrysomya putoria*

Uma outra estratégia para avaliar a variabilidade genética de populações de *C. putoria* é a utilização do domínio variável da região controle (domínio B). Entretanto, se faz necessária a construção de oligonucleotídeos internos ao domínio B, que sejam capazes de recupera-

lo em dois ou três fragmentos sobrepostos. A grande dificuldade desta abordagem é que todos os fragmentos sobrepostos sejam amplificados para uma mesma amostra, possibilitando o acesso à informação genética individual. Devido ao fato do domínio B apresentar uma maior taxa de substituição nucleotídica, sua amplificação para análises intraespecíficas é amplamente empregada (Höss *et al.*, 1996; Herrmann and Hummel, 1994).

A amplificação e sequenciamento de outras regiões que podem ser utilizadas como marcadores moleculares, como de íntrons do DNA nuclear, também poderia contribuir para uma melhor caracterização da variabilidade genética de *C. putoria*. Porém, a grande dificuldade a respeito da obtenção de um maior número de sequências reside principalmente em duas razões: (a) obtenção de espécimes de museus bem preservados, dos quais seja possível recuperar o DNA em boas condições para amplificação de uma região de extensão significativa, clonagem e sequenciamento da mesma, tornando possível o acesso à variabilidade genética; (b) diminuição das regiões de ocorrência e decréscimo populacional da espécie *C. putoria*, dificultando a coleta de amostras atuais de diferentes localidades e conseqüentemente de detecção dos padrões de variabilidade desta espécie.

Por outro lado, o emprego do domínio conservado da região controle demonstrou ser útil para análises interespecíficas, principalmente no que se refere à sua aplicação para estudos de relações filogenéticas entre espécies do gênero *Chrysomya* e também para identificação molecular espécie-específica. A análise do domínio A das três espécies de *Chrysomya*

existentes no Brasil através do programa Webcutter 2.0 permitiu que sítios diagnósticos fossem encontrados, ressaltando a utilização desta região para a identificação e caracterização molecular das mesmas.

A caracterização do domínio A da região controle do mtDNA e sua aplicação potencial como marcador molecular espécie-específico poderá contribuir para a identificação de espécies da fauna de moscas varejeiras, incluindo as de importância médica, sanitária e forense, especialmente aquelas que apresentam caracteres polimórficos ou de difícil identificação morfológica.

Seria fundamental para a continuidade das análises a respeito da introdução e colonização de *C. putoria* no continente americano ter acesso a espécimes provenientes da África, provável local de origem desta espécie. Análises comparativas com espécimes africanos poderiam elucidar as rotas de introdução desta espécie no Brasil e contribuir na análise da variabilidade genética de *C. putoria*. Devido a dificuldades de obtenção de amostras de regiões africanas, não foi possível neste trabalho acessar a informação genética desta região geográfica.

É importante salientar que genomas mitocondriais de invertebrados são pouco estudados em relação ao ao mtDNA de vertebrados. Neste sentido, a produção de sequências de boa qualidade da região controle do mtDNA é de extrema importância para possibilitar análises comparativas com as sequências disponíveis de outros insetos. Futuros estudos acerca da caracterização da variabilidade genética nesta região poderão contribuir

para o melhor entendimento da evolução da região controle e seus subdomínios, esclarecendo os processos que guiam a substituição nucleotídica nesta região, bem como as funções estruturais dos blocos de sequência conservada e sua correlação com processos replicativos e transcricionais do genoma mitocondrial, além de esclarecer os limites da utilização desta região como um marcador molecular em insetos.

CONCLUSÕES

- A técnica de extração de DNA com DNazol foi a mais eficiente e portanto adotada neste trabalho para a recuperação do aDNA em boa qualidade para a condução de ampliações, clonagem e sequenciamento.
- Neste trabalho, a amplificação e sequenciamento da região A+T, possibilitou a caracterização de uma duplicação do tRNA^{Ile}, inserido no domínio variável, denominado de domínio B, das espécies *C. putoria*, *C. albiceps* e *C. megacephala*.
- A utilização do domínio A de *C. putoria* demonstrou uma baixa variabilidade genética entre as amostras das populações estudadas. Esta perda da variabilidade genética pode estar relacionada ao gargalo populacional sofrido por esta espécie há cerca de 35 anos, durante sua introdução no Novo Mundo, e também à recente divergência desta espécie em relação à espécie próxima *C. chloropyga*.
- O domínio A demonstrou-se um marcador molecular efetivo para a identificação espécie-específica de espécies do gênero *Chrysomya* existentes no Brasil. Foi possível identificar molecularmente quatro amostras de *C. albiceps* previamente identificadas como *C. putoria*, ressaltando a aplicação deste marcador para diagnóstico espécie-específico.

ANEXO I

A seguir será apresentado o artigo científico decorrente desta tese, que aborda as padronizações e otimizações realizadas para recuperação de fragmentos do mtDNA de amostras preservadas em museus e coleções entomológicas. O artigo enfoca as dificuldades na extração e amplificação do DNA degradado de moscas causadoras de miíases.

Junqueira, A. C. M.; Lessinger, A. C. and Azeredo-Espin, A. M. L. (2002). Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 39–45.

Resumo

Regiões do DNA mitocondrial (mtDNA) de oito espécies de moscas causadoras de miíases, preservadas por um período de 2 a mais de 50 anos, foram eficientemente amplificadas com pares de oligonucleotídeos universais que amplificaram seis fragmentos de cinco regiões do mtDNA, a partir da extração de DNA total. A comparação das técnicas de extração do DNA com Fenol/Clorofórmio, Chelex e DNAzol indicou que este último reagente foi o mais eficiente na recuperação do DNA de amostras preservadas em museus, embora a metodologia com a resina Chelex seja a mais amplamente empregada na extração do DNA de amostras degradadas. A comparação entre as sequências dos oligonucleotídeos universais empregados e as respectivas sequências homólogas de

Cochliomyia hominivorax Coquerel e de *Chrysomya putoria* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae) revelou substituições de bases, que podem ser responsáveis pela baixa recuperação da sequência da subunidade II da citocromo oxidase (COII). A caracterização de marcadores moleculares do mtDNA de espécimes de museus pode ser útil em estudos comparativos de amostras atuais, assim como na elucidação de padrões de introdução, colonização e dispersão de espécies.

Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies

A. C. M. JUNQUEIRA, A. C. LESSINGER and A. M. L. AZEREDO-ESPIN
Laboratório de Genética Animal, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil

Abstract. Mitochondrial DNA (mtDNA) sequences from eight species of myiasis-causing flies, stored for up to 50 years, were amplified successfully. Universal primers were used to amplify six specific regions from total genomic DNA, including five mtDNA genes. The comparison of phenol/chloroform, DNAzol® and Chelex techniques for DNA extraction showed that the DNAzol® reagent was the most efficient in retrieving DNA from museum specimens, although the Chelex extraction procedure is currently the most frequently reported method. Comparison of the universal primer sequences with the homologous sequences of *Cochliomyia hominivorax* Coquerel and *Chrysomya putoria* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae) revealed mismatches that could contribute to the low recovery of a short sequence from subunit II of cytochrome oxidase. The ability to characterize mtDNA markers from museum specimens should be useful in comparative studies of contemporary samples and should help in elucidating species introduction, colonization and dispersal.

Key words. Calliphoridae, Oestridae, DNA extraction, DNAzol, mtDNA, museum specimens, myiasis, PCR, Brazil.

Introduction

Until recently, morphological analysis was the only tool available for scientists to determine the relationships of museum specimens. However, the improvement in techniques of molecular biology over the past two decades has allowed the retrieval of DNA from well-preserved specimens. Studies with damaged DNA have shown that genetic information can be recovered from preserved specimens, but such samples are reduced to a few hundred base pairs because of oxidative and hydrolytic damage. Hydrolysis results in the deamination of nucleotide bases and cleavage of base-sugar bonds, creating baseless sites (Lindahl, 1993). When the base is lost, the chain is weakened and eventually cleaved (Cano, 1996). Oxidation leads to the chemical modification of nucleotide bases and eventual destruction

of the ring structure of base and sugar residues in the DNA molecule (Pääbo, 1989; Lindahl, 1993).

The molecular approaches applied to museum material are based mainly on the enzymatic amplification of short, high copy number DNA sequences, such as those of mitochondrial DNA (mtDNA), using the polymerase chain reaction (PCR). The use of molecular markers for comparing the genetic information of live and preserved organisms could provide some idea of the population genetic changes that have occurred and of the mechanisms behind these processes (Cano, 1996; Roy *et al.*, 1994).

In this work, we compared the efficiency of three techniques for DNA extraction based on the recovery of specific PCR products from preserved specimens of Calliphoridae and Oestridae (Diptera). These are the main families of myiasis-causing flies, which contain species of economic, medical, veterinary and forensic importance, including obligate or facultative livestock parasites. We also undertook an analysis of the universal primers used for amplifying mtDNA fragments and describe the difficulties of recovering and storing DNA under appropriate conditions.

Correspondence: Ana Carolina Martins Junqueira, Laboratório de Genética Animal, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), DGE/CBMEG, C.P. 6010, Campinas, São Paulo 13087-970, Brazil. E-mail: anacmj@obelix.unicamp.br

Materials and methods

Specimens

Dried pinned specimens of *Cochliomyia hominivorax* Coquerel, *C. macellaria* Fabricius, *Chrysomya albiceps* Wiedemann, *C. megacephala* Fabricius, *C. putoria* Wiedemann, *Lucilia eximia* Wiedemann, *Hemilucilia segmentaria* Fabricius and *Dermatobia hominis* Linnaeus Jr., were provided by six entomological collections. Alcohol-preserved specimens (adults and larvae) of *C. hominivorax*, *C. putoria* and *D. hominis* were also obtained from three entomological collections. Fresh specimens were collected and maintained in the laboratory (Leal *et al.*, 1982; Infante & Azeredo-Espin, 1995) or frozen at -70°C and used as extraction and PCR controls.

DNA extraction

The three techniques used in this work were based in different principles for DNA extraction. The DNAzol[®] reagent (Gibco BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, U.S.A.) contains the chaotropic agent guanidine thiocyanate and a detergent mixture in a lysing solution which permits selective precipitation of DNA from a cell lysate (Chomczynski *et al.*, 1997). The Chelex[®] 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) is a chelating resin that protects the DNA during the boiling step and sequesters divalent heavy metals that could introduce DNA damages (Walsh *et al.*, 1991). The phenol/chloroform procedure is based in two different organic solvents for deproteinization, including several separation and purification steps (Sambrook *et al.*, 1989).

Fresh, pinned and alcohol-preserved adult specimens were washed in sterile distilled water and the wings were removed with sterile pincers. The specimens were transferred to sterile, screw-capped 1.5 mL microcentrifuge tubes.

For extractions using the DNAzol[®] procedure, each sample was ground in 500 μL of DNAzol[®] with a sterile pestle. A further 500 μL of DNAzol[®] was added and the contents were mixed twice by inversion. After centrifugation at 16 000 g for 10 min, 500 μL of ice-cold absolute ethanol were added to the supernatants for DNA precipitation. After 5 min at room temperature, the samples were again centrifuged at 16 000 g for 5 min. The DNA pellets were washed once in 95% ethanol. After air drying for 10 min, the DNA was resuspended in 50 μL of sterile 1 \times TE (1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.0). For DNA extractions of thorax, abdomen and legs, the initial volume of DNAzol[®] was reduced to 250 μL , and the volumes of absolute and 95% ethanol were also reduced proportionally.

DNA extraction with Chelex 100 consisted of grinding the samples in 100 μL of 10% Chelex 100 and incubating at 56°C overnight. Then the samples were mixed with vortex at high speed for 10 s, incubated in boiling water for 5 min and mixed again in vortex for 10 s. The tubes were centrifuged at 15 000 g and the supernatants were transferred to new screw-capped tubes (Walsh *et al.*, 1991; Cano *et al.*, 1992).

The phenol/chloroform DNA extraction was done as reported in Infante & Azeredo-Espin (1995). The specimens were homogenized in 100 μL of grinding buffer (2 M Tris, 5 M NaCl, 50% sucrose, 0.5% EDTA) pH 7.5 using a sterile pestle. A further 100 μL of lysis buffer (2 M Tris, 10% SDS, 0.5% EDTA, 2% DEPC) pH 9.0 were added. The lysate was incubated in ice for 15 min, after which an equal volume of phenol pH 7.6 was added, mixed with vortex and incubated in ice for 2 min. The tubes were centrifuged at 2600 g for 5 min and the supernatant was transferred to a new tube. An equal volume of phenol/chloroform: isoamyl alcohol 24:1 were added, mixed with vortex, incubated for 2 min in ice and centrifuged at 2600 g for 5 min. The supernatant was transferred to a new tube and an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol 24:1 was added, mixed in vortex, incubated in ice for 2 min and centrifuged at 2600 g for 5 min. After the last centrifugation, 100 μL of 1 \times TE, 0.05 volumes of 3M sodium acetate (20 μL) and 2.5 volumes (900 μL) of ice-cold absolute ethanol were added to the supernatant, mixed by inversion and incubated at -20°C for 2 h to precipitate the DNA. After a centrifugation at 15 000 g for 30 min, the supernatant was discarded and the pellet resuspended in 50 μL of 1 \times TE. All the DNA extractions were stored at -20°C .

Amplification

Extracted DNA was diluted 1:5, 1:10 and 1:20 in sterile 1 \times TE and 5 μL were used as a template in PCR reactions. The PCR amplifications were done with 1 \times PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1.25 mM MgCl_2 , 200 μM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.5 μM of each primer, and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL/Life Technologies), in a final volume of 25 μL . These PCR conditions have been optimized for fresh and frozen samples and then used for dried and alcohol 80% preserved specimens, guaranteeing that the reactions were not suboptimal for different techniques used during the DNA extraction. The amplification reactions from thorax and legs DNA were conducted with 5 μL of the extract, without dilutions.

The primers used were mainly from the UBC Insect mtDNA oligonucleotide set (Simon *et al.*, 1994). Five regions of the mtDNA were analysed: subunit I of cytochrome oxidase (COI) with the primers C1-J-2195 and C1-N-2329, subunit II of cytochrome oxidase (COII) with the primers C2-J-3400, C2-N-3494 and C2-N-3661, cytochrome b (Cyt. b) with the primers CB-J-10612 and CB-N-10920, a region including the partial sequence of ribosomal RNA 16S and subunit I of NADH genes (16S/ND1) amplified with the primers N1-J-12585 and LR-N-12866, and the control region using the primers TI-N-24 and CR-J-433. This last primer was designed based on the *C. megacephala* sequence (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000). These regions were selected based on the total length of the sequences to be amplified and were limited to a few hundred base pairs to provide more reliable PCR products

as the DNA of these samples was highly degraded and fragmented.

The PCR reactions were run on a model 9600 Thermocycler (Perkin Elmer, Foster City, CA, U.S.A.). During the first cycle, the DNA templates were denatured at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles consisting of a 1-min denaturation at 94°C, annealing for 1 min 15 s at 42–50°C, depending on the primer pair used, and an elongation step at 72°C for 2 min. The final cycle involved an extended elongation at 72°C for 7 min. The amplification of the control region fragment required a modification of the elongation temperature to 60°C. In all amplifications, a control reaction with no template was included to ensure that contaminating DNA would not be amplified instead of the museum specimen target molecules. The products of the PCR reactions were evaluated by electrophoresis in 2.0% agarose gels in 1 × TAE (40 mM Tris – Acetate, 1 mM EDTA) buffer.

Cloning and sequencing

An aliquot of each amplification product was purified by dialysis in 1 × TE buffer, pH 7.4 on a VM 0.05 µm filter (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) for 20 min. The products were then cloned into the vector pUC 18 *Sma*I/BAP using a SureClone ligation kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, U.S.A.), according to the manufacturer's instructions. After preparation of plasmid DNA by alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989), the recombinant clones were confirmed and used as templates for automatic sequencing with the Big Dye™ terminator kit (Perkin Elmer) according to the manufacturer's instructions. A total of 45 cycles were performed during the PCR reaction for sequencing. The sequences obtained were analysed in BLASTN using the GenBank (Altschul *et al.*, 1997) database and aligned with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

Results

DNA extraction

Of the three methods for DNA extraction evaluated, the DNAzol and Chelex techniques provided consistent and

well-resolved PCR products from museum specimens. Dried and alcohol-preserved samples yielded no PCR products when extracted with phenol/chloroform. For this reason, this technique was not used for subsequent DNA extractions from museum specimens. Fresh and frozen specimens yielded PCR products with all three methods.

To establish which technique was the most efficient in recovering DNA from museum specimens, three alcohol-preserved larvae of *D. hominis* were sectioned longitudinally into two identical parts. One half was extracted with DNAzol and the another with Chelex. The results showed that DNAzol provided the best recovery of DNA from preserved specimens (Table 1).

Amplification

Low (1:5) dilutions of DNA extracts from museum specimens provided well-resolved PCR products when compared to dilutions of 1:10 and 1:20. The size of the amplified products varied from 137 to 404 bp, depending on the primers and regions used (Fig. 1, Table 2). DNAzol extraction recovered specific PCR products from specimens stored for up to 50 years (Table 2), indicating that the genetic information of well-preserved organisms can be accessed and used for comparative studies.

Although most of the amplifiable DNA was derived from the entire specimen, DNA extractions from specific parts of the dried samples were also tried in order to reduce the destruction of specimens and preserve important morphological traits. Thoracic DNA extractions with DNAzol and Chelex yielded PCR products, but from legs DNA resulting in a detectable PCR product was obtained only with the DNAzol technique. Extracts from the abdominal region yielded no amplification products.

The comparative analysis between sequences of the universal primers used in this work and its homologous regions of *C. hominivorax* and *C. putoria* (Fig. 2) allowed the evaluation of these primers for recovering the genetic information of museum specimens, considering the mutational events on the annealing sites and the total length to be amplified. As discussed below, this analysis could provide the most adequate primers pair to be used in initial attempts on amplifying DNA from preserved samples.

Table 1. Comparison of DNA recovery with DNAzol and Chelex.

Samples	Extraction method	Size of amplified mtDNA regions						
		COII 137 bp	COII 155 bp	COI 180 bp	COII 305 bp	16S/ND1 315 bp	Cyt b 357 bp	
<i>D. hominis</i>	(A 155)	Chelex	–	–	–	–	–	–
	(A 156)	DNAzol	+	+	–	+	+	–
<i>D. hominis</i>	(A 157)	Chelex	–	–	–	–	–	–
	(A 158)	DNAzol	+	+	–	+	–	–
<i>D. hominis</i>	(A 159)	Chelex	–	–	–	–	–	–
	(A 160)	DNAzol	–	–	–	–	–	–

+ = successful amplification; – = unsuccessful amplification.

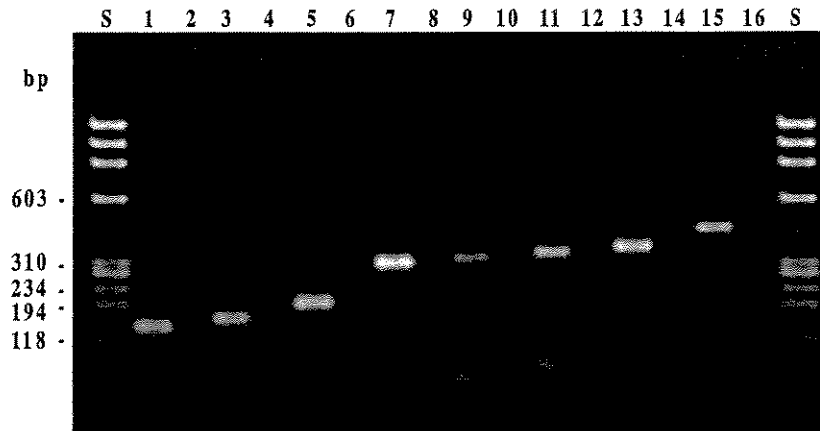


Fig. 1. Agarose gel (2.0%) with mtDNA PCR products. Lane 1 = 137 bp fragment of the COII gene from a *C. putoria* leg extracted with DNAzol; lane 3 = 155 bp fragment of the COII gene from an alcohol-preserved larva of *D. hominis* extracted with DNAzol; lane 5 = 180 bp fragment of the COI gene from a pinned adult of *C. hominivorax* extracted with DNAzol; lane 7 = 305 bp fragment of the COII gene from a pinned adult *D. hominis* extracted with DNAzol; lane 9 = 320 bp of the A + T region of a pinned adult of *C. putoria* extracted with DNAzol; lane 11 = 315 bp fragment including sequences of the 16S and ND1 genes from a *C. macellaria* thorax extracted with Chelex; lane 13 = 357 bp fragment of the cytochrome b gene from a pinned adult of *C. putoria* extracted with DNAzol; lane 15 = 404 bp fragment of the A + T region from a pinned adult of *C. putoria* extracted with DNAzol. Lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 are PCR controls and Lane S contains the molecular size markers. Small bands (below 118 bp) correspond to primer dimers.

Discussion

Extractions from museum specimens usually contain sheared and interstrand cross-linked DNA, compromising the continuity and the denaturation of DNA strands during the PCR amplification (Dean & Ballard, 2001). Hydrolytic and oxidative damages also have major effects on DNA recovery by PCR, reducing the number of intact DNA molecules. For these reasons, short PCR products from museum specimens were expected to be recovered more efficiently than larger fragments. Generally, the smaller the region, the better the retrieval of DNA from damaged specimens (Pääbo *et al.*, 1989; Lindahl, 1993; Cano, 1996). However, amplification of the 305 bp fragment of the COII region was much more reliable than that of the 155 bp fragment of the same gene (Table 2). The low recovery of this shorter product may reflect the occurrence of mismatches between the primers and the target sequence, which would in turn compromise the annealing step of the PCR reaction.

Comparison of the COII sequence of *C. hominivorax* (Lesinger *et al.*, 2000; GenBank accession number AF260826), *C. putoria* (Junqueira *et al.* unpublished; GenBank accession number AF352790) and the homologous sequences of the universal primers (Simon *et al.*, 1994) used for amplification of the 155 bp fragment revealed five mutational events involving three transversions and two transitions in the C2-J-3279 primer (Fig. 2), originally derived from the *Drosophila yakuba* mtDNA sequence (Clary & Wolstenholme, 1985). The low recovery of the Cyt b 357 bp fragment may also have been caused by mismatches between the primers and the homologous sequences of the species analysed, as the primer CB-J-10612 was the most variable (Fig. 2).

Based on sequence analysis of the primer pairs, the pairs C2-J-3400/C2-N-3494 (137 bp) and C2-J-3400/C2-N-3661 (305 bp) showed few nucleotide substitutions (Fig. 2) and yielded reliable PCR products from different species and samples preserved over a wide period of time (Table 2). These results suggest that the 137 bp region of CO II should be used in initial attempts at recovering DNA from insect museum specimens, as the universal primers for this region are conserved and amplify a short sequence. In addition, the CO II gene may be very useful for comparative analysis because it has been sequenced for a wide variety of insects, thus providing direct comparisons among them (Caterino *et al.*, 2000).

As reported previously (Pääbo, 1989; Post *et al.*, 1993; Handt *et al.*, 1994; Hauswirth, 1994; Phillips & Simon, 1995; Cano, 1996; Höss *et al.*, 1996; Kelman & Moran, 1996), and based on the data in Table 2, the extent of the reduction in the size and genetic information of the retrieved fragments did not correlate with the age of the specimen, but was related to the environmental conditions under which the specimen was preserved. Other extrinsic factors, such as the type of fixation and its method of application, also have considerable effects, but vary according to the curator's collecting habits (Thomas, 1994).

Rapid desiccation after death, the chelation of copper and other metal ions, protection against exposure to UV light and storage at low temperatures in an alkaline environment favour the preservation of DNA (Eglinton & Logan, 1991). The method by which specimens are killed can also affect the yield and quality of DNA. Dillon *et al.* (1996) showed that specimens killed in ethyl acetate vapour gave very low yields of DNA, which could not be amplified by PCR.

Table 2. Museum specimens and size of mitochondrial DNA regions used in this study.

Museum	Species	Sex	Date	Locality	Extraction method	Size of amplified mtDNA regions					
						COII 137 bp	COII 155 bp	COI 180 bp	COII 305 bp	16S/ND1 315 bp	Cyt b 357 bp
MZ-USP ¹	<i>C. macellaria</i> (A85)†	♀	1978	São Paulo-SP	DNAzol	+	-	-	+	+	-
	<i>C. macellaria</i> (A88)‡	♀	1978	São Paulo-SP	DNAzol	+	-	-	-	+	-
	<i>L. eximia</i> (A65)‡	♀	1965	Boca do Tucano-AM	DNAzol	+	-	-	+	-	-
	<i>D. hominis</i> (A58)‡	*	1945	Itatiaia-RJ	DNAzol	+	-	-	+	+	-
	<i>D. hominis</i> (A69)‡	*	1950	Boracéia-SP	DNAzol	+	-	-	+	-	-
MNRJ ²	<i>C. macellaria</i> (A76)†	♂	1993	Rio de Janeiro-RJ	Chelex	+	-	+	-	-	-
	<i>C. macellaria</i> (A87)‡	♂	1976	Rio de Janeiro-RJ	DNAzol	+	+	-	+	+	-
MPEG ³	<i>C. macellaria</i> (A106)†	*	1976	Rio de Janeiro-RJ	Chelex	+	-	-	-	-	-
	<i>C. macellaria</i> (A128)‡	♂	1995	Breves-PA	DNAzol	+	-	-	-	-	+
	<i>C. macellaria</i> (A130)‡	♀	1983	Serra Norte-PA	DNAzol	+	+	-	+	-	-
	<i>C. putoria</i> (A132)‡	♀	1982	Belém-PA	DNAzol	+	-	-	+	-	-
	<i>C. megacephala</i> (A134)‡	♀	1987	Belém-PA	DNAzol	+	-	-	-	-	-
	<i>C. putoria</i> (A203)††	♀	2001	Belém-PA	DNAzol	+	+	+	+	+	+
	<i>C. putoria</i> (A207)††	♀	2001	Belém-PA	Phenol	+	+	+	+	+	+
	<i>C. macellaria</i> (A45)‡	♀	1987	Manaus-AM	DNAzol	+	-	-	-	-	-
	<i>C. albiceps</i> (A55)‡	♀	1988	Manaus-AM	DNAzol	+	-	-	+	-	-
	UFA ⁴	<i>C. megacephala</i> (A52)‡	♀	1987	Manaus-AM	DNAzol	+	+	-	+	+
<i>C. putoria</i> (A53)‡		♀	1987	Manaus-AM	DNAzol	+	-	+	+	+	+
<i>L. eximia</i> (A50)‡		♂	1988	Manaus-AM	DNAzol	+	-	+	+	-	-
<i>C. hominivorax</i> (A03)¶		♀	1992	Morro do Chapéu-BA	DNAzol	+	+	+	+	+	+
<i>C. hominivorax</i> (A07)‡		♀	1992	Morro do Chapéu-BA	DNAzol	+	-	-	+	+	-
<i>C. hominivorax</i> (A17)¶		♀	1992	Alfenas-MG	Phenol	+	+	+	+	+	+
<i>C. hominivorax</i> (A35)‡		♀	1987	Porto Alegre-RS	DNAzol	+	-	-	+	+	+
<i>C. hominivorax</i> (A36)‡		♀	1987	Alfenas-MG	DNAzol	+	-	-	+	+	+
<i>C. hominivorax</i> (A39)‡		♂	1987	Porto Alegre-RS	DNAzol	+	+	+	+	+	+
UNICAMP ⁵		<i>C. hominivorax</i> (A43)‡	♂	1987	Porto Alegre-RS	DNAzol	+	-	-	+	+
	<i>C. hominivorax</i> (A44)‡	♂	1987	Porto Alegre-RS	DNAzol	+	-	-	+	+	-
	<i>C. hominivorax</i> (A49)‡	♀	1987	Caraguatatuba-SP	DNAzol	+	-	+	+	-	-
	<i>C. macellaria</i> (A78)¶	♂	1993	Rio de Janeiro-RJ	Chelex	+	+	+	+	+	+
	<i>C. hominivorax</i> (A79)¶	♀	1992	Morro do Chapéu-BA	Chelex	+	+	+	+	+	+
	<i>C. hominivorax</i> (A99)‡	*	1987	Caraguatatuba-SP	DNAzol	+	+	-	+	+	+
INM ⁶	<i>C. hominivorax</i> (A33)‡	♀	1987	Buenos Aires-AR	DNAzol	+	+	+	+	+	+
	<i>D. hominis</i> (A156)§	*	1994	Petit Saut-FG	DNAzol	+	+	-	+	+	-
NHM ⁷	<i>D. hominis</i> (A158)§	*	1994	Petit Saut-FG	DNAzol	+	+	-	+	+	-
	<i>D. hominis</i> (A163)§	*	1994	Petit Saut-FG	DNAzol	+	+	-	+	+	-

†Dried thorax; ‡dried adult; §alcohol 80%; ¶frozen; ††fresh.

+ = successful amplification, - = unsuccessful amplification, * = sex not identified.

¹Zoology Museum, University of São Paulo, ²National Museum, Rio de Janeiro, ³Emílio Goeldi Paraense Museum, ⁴Entomological Collection, Federal University of Amazonas, ⁵Entomological Collection, State University of Campinas, ⁶Dr Carlos G. Malbrán National Institute of Microbiology – Buenos Aires, Argentina, ⁷The Natural History Museum of London. AM – Amazonas, Brazil, BA – Bahia, Brazil, RJ – Rio de Janeiro, Brazil, SP – São Paulo, Brazil, RS – Rio Grande do Sul, Brazil, MG – Minas Gerais, Brazil, AR – Argentina, FG – French Guiana.

Although speculative, the climate could be a major problem accelerating the DNA degradation and fragmentation when collections and specimens are not stored appropriately in dried environments with a stable temperature. Of the 55 dried specimens from Rio de Janeiro, Manaus and Belém used for DNA extraction, only 12 have been successfully amplified. These cities are located in coastal and/or rain forest areas, where the high humidity and temperatures could accelerate the degradation of DNA.

The sequenced fragments showed high nucleotide sequence identity with homologous regions of mtDNA

from other Calliphoridae species in GenBank, thus indicating that contamination had been effectively avoided. Contamination is a particular problem in the analysis of DNA from museum specimens, as DNA from other organisms may be preferentially amplified.

In preliminary studies with fresh samples, the DNAzol technique also yielded suitable DNA for restriction fragment length polymorphism, random amplified polymorphism DNA and microsatellite analysis. DNA obtained by DNAzol can be stored for long periods of time and amplified after more than 3 years when stored at -20°C. This finding is

CO II 137 bp	C2-J-3400	C2-N-3494
<i>D. yakuba</i>	ATTGGACATCAATGATATTGA	GGTAAACTACTCGATTATCAAC
<i>C. hominivorax</i>T.....
<i>C. putoria</i>T..C.....
CO II 155 bp	C2-J-3279	C2-N-3389
<i>D. yakuba</i>	GGTCAAACAATTGAGTCTATTGAAC	TCATAAGTTCARTATCATTG
<i>C. hominivorax</i>	..A.....T.....AAT.....GC.....
<i>C. putoria</i>	..A.....T.....AAT.....C.....
CO I 180 bp	C2-J-2195	C2-N-2329
<i>D. yakuba</i>	TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT	ACTGTAAATATATGATGAGCTCA
<i>C. hominivorax</i>A.....T.....G..G.....
<i>C. putoria</i>C.....A.....	..A.....C..G.....
CO II 305 bp	C2-J-3400	C2-N-3661
<i>D. yakuba</i>	ATTGGACATCAATGATATTGA	CCACAAATTTCTGAACATTGACCA
<i>C. hominivorax</i>T..G
<i>C. putoria</i>T..C.....T..
rRNA16S/tRNA ^{Leu} / ND1 315 bp	N1-J-12585	LR-N-12866
<i>D. yakuba</i>	GGTCCCTTACGAATTTGAATATATCT	ACATGATCTGAGTTCAAACCGG
<i>C. hominivorax</i>	..C....C....C.....A...
<i>C. putoria</i>	..A.....T.....
Cyt b 357 bp	CB-J-10612	CB-N-10920
<i>D. yakuba</i>	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	CCCTCAGAATGATATTTGTCCCTCA
<i>C. hominivorax</i>	..TAGA..T..T..C..T.....	A.....A..A.....
<i>C. putoria</i>	..TAGT..T..T.....	T.....

Fig. 2. Sequences of the universal primers from *Drosophila yakuba*, compared with the homologous regions of *Cochliomyia hominivorax* and *Chrysomya putoria*.

particularly important because DNA extracted by Chelex shows a rapid degradation (Cano & Poinar, 1993).

The isolation and analysis of DNA from dried and alcohol-preserved specimens adds a direct temporal dimension to genetic and evolutionary studies (Wayne *et al.*, 1999), as the genetic variability over time and the geographical distribution of inaccessible populations can be studied. Access to temporal changes in living organisms allows the reconstruction of their genetic past and provides important insights into a species' pattern of introduction, distribution and colonization.

Acknowledgements

The authors thank Drs M.C.F. do Val, D. Pamplona, C.J.B. Carvalho, N.D. Parallupi, M.C. Esposito, A. Harada and M.J.R. Hall for kindly providing specimens from entomological collections. M.C. Arias provided helpful comments on the Chelex procedure, and R.A. Rodrigues, M.S. Couto and M. Constantino Filho gave valuable technical assistance. We are grateful to Dr F.A.H. Sperling for constructive comments on the manuscript and to two anonymous referees for their critical review. This research

was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant 99/07355-0) and by a PADCT/CNPq grant 620097/95-7 to A.M.L.A.E. A.C.L. was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). A.C.M.J. was supported by a fellowship from FAPESP.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389–3402.
- Cano, R.J. (1996) Analysing ancient DNA. *Endeavour*, **20**, 162–167.
- Cano, R.J. & Poinar, H.N. (1993) Rapid isolation of DNA from fossil and museum specimens suitable for PCR. *Biotechniques*, **15**, 432–435.
- Cano, R.J., Poinar, H.N., Roubik, D.W. & Poinar, G.O. Jr (1992) Enzymatic amplification and nucleotide sequencing of portions of the 18S rRNA gene of the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) isolated from 25 to 40 million year old Dominican Amber. *Medical Science Research*, **20**, 619–622.
- Caterino, M.S., Cho, S. & Sperling, F.A.H. (2000) The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. *Annual Review of Entomology*, **45**, 1–54.
- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R. & Wilfinger, W. (1997) DNAzol[®]: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*, **22**, 550–553.
- Clary, D.O. & Wolstenholme, D.R. (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 252–271.
- Dean, M.D. & Ballard, W.O. (2001) Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **98**, 279–283.
- Dillon, N., Austin, A.D. & Bartowsky, E. (1996) Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*, **5**, 21–24.
- Eglinton, G. & Logan, G.A. (1991) Molecular preservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, **333**, 315–328.
- Handt, O., Höss, M., Krings, M. & Pääbo, S. (1994) Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia*, **50**, 524–529.
- Hauswirth, W.W. (1994) Ancient DNA: an introduction. *Experientia*, **50**, 521–523.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T.H., Dizdaroğlu, M. & Pääbo, S. (1996) DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, **24**, 1304–1307.
- Infante, M.E.V. & Azeredo-Espin, A.M.L. (1995) Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochemical Genetics*, **33**, 737–756.
- Kelman, Z. & Moran, L. (1996) Degradation of ancient DNA. *Current Biology*, **6**, 223.
- Leal, T.T.S., Prado, A.P. & Antunes, A.J. (1982) Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedmann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. *Revista Brasileira de Zoologia*, **1**, 41–44.
- Lessinger, A.L. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2000) Evolution and structural organisation 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.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709–715.
- Pääbo, S. (1989) Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **86**, 1939–43.
- Pääbo, S., Higgschi, R.G. & Wilson, A.C. (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 9709–9712.
- Phillips, A.J. & Simon, C. (1995) Simple, efficient and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods. *Annals of the Entomological Society of America*, **88**, 281–283.
- Post, R.J., Flook, P.K. & Millest, A.L. (1993) Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, **21**, 85–92.
- Roy, M.S., Girman, D.J., Taylor, A.C. & Wayne, R.K. (1994) The use of museum specimens to reconstruct the genetic variability and relationships of extinct populations. *Experientia*, **50**, 551–557.
- Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E.F. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Lin, H. & Flook, P. (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of DNA sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651–701.
- Thomas, R.H. (1994) Analysis of DNA from natural history museum collections. *EYS*, **69**, 311–321.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673–4680.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, **10**, 506–513.
- Wayne, R.K., Leonard, J.A. & Cooper, A. (1999) Full of sound and fury: the recent history of ancient DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **30**, 457–477.

Accepted 17 September 2001

ANEXO II

O próximo manuscrito refere-se a um trabalho realizado em colaboração com outros membros do Laboratório de Genética Animal e que foi desenvolvido durante esta da tese de mestrado. Minha participação envolveu a detecção e a caracterização molecular da duplicação do tRNA^{Ile} no genoma mitocondrial da espécie *C. putoria*.

A. C. Lessinger, A. C. M. Junqueira, F. F. Conte, A. M. L. Azeredo-Espin. The occurrence of a duplication in the mtDNA control region of *Chrysomya* species (Diptera: Calliphoridae) involving two tRNAs, submetido.

Resumo:

A região controle (RC) do DNAm^t das moscas varejeiras *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria* (Calliphoridae) foi caracterizada. O aspecto mais incomum encontrado na RC de *Chrysomya* foi a presença de duas seqüências adicionais de tRNAs, correspondendo aos genes tRNA^{Ile} e tRNA^{Gln}, além de uma repetição de 19 pb pertencentes à RC. O tRNA^{Gln} parcialmente duplicado deve representar um pseudogene, uma vez que a maior parte da seqüência de um tRNA^{Gln} típico de inseto está ausente e estas seqüências apresentam um elevado grau de divergência nucleotídica nas comparações entre as espécies de *Chrysomya*. É interessante notar a elevada divergência especificamente associada ao tRNA^{Gln} duplicado em *C. putoria*, resultando na formação de um elemento de seqüência contendo um padrão de simetria interno.

Por outro lado, a cópia adicional do gene de tRNA^{Ile} parece ter preservado sua identidade nucleotídica desde o evento de duplicação e deve representar uma cópia funcional deste gene. A ocorrência de seleção diferencial nos genes duplicados nestas espécies pode estar refletindo a conservação do tRNA^{Ile} extra e a degeneração das seqüências do tRNA^{Gln}. A caracterização de elementos de seqüência associados às extremidades da repetição pode auxiliar na compreensão dos mecanismos responsáveis pela duplicação. O potencial de formação de estruturas secundárias foi investigado nas extremidades da duplicação, uma vez que existe uma associação frequente destas estruturas com eventos de duplicação gênica e rearranjos no DNA mitocondrial animal. Padrões de evolução específicos estão associados aos diferentes elementos identificados. Estes resultados demonstram e confirmam a plasticidade da molécula de mtDNA em *Chrysomya*, especialmente em relação aos genes de tRNA e seqüências adjacentes à RC, contribuindo para a investigação da evolução do genoma mitocondrial de insetos. Além disso, a caracterização da RC de *Chrysomya* favorece o acesso às seqüências variáveis do genoma mitocondrial, que podem auxiliar na identificação espécie-específica de moscas de importância forense, assim como fornecer dados informativos para análises filogenéticas de espécies próximas e potenciais marcadores para genética de populações.

The occurrence of a duplication in the mtDNA control region of *Chrysomya* species (Diptera: Calliphoridae) involving two tRNAs

A. C. Lessinger, A. C. M. Junqueira, F. F. Conte, A. M. L. Azeredo-Espin
Lab. Genética Animal, CBMEG/UNICAMP

Affiliations: DGE/CBMEG, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
C. P. 6010, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author:

Ana Cláudia Lessinger

Laboratório de Genética Animal, CBMEG, Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP),

C.P. 6010, CEP 13083-970, Campinas, S.P., Brazil

Phone: 55 - 19 - 3788-1141

Fax: 55 - 19 - 3788-1089

E-mail: lessinge@unicamp.br

Keywords: *Chrysomya*, mtDNA, control region, duplication, tRNA,
rearrangement, molecular evolution

Running head: tRNA duplication in *Chrysomya* control region

ABSTRACT

The mtDNA control regions (CR) of the blowflies *C. albiceps*, *C. megacephala* and *C. putoria* (Calliphoridae) were characterized. The most unusual feature found was the presence of two extra tRNA sequences corresponding to the tRNA^{Ile} and tRNA^{Gln} genes and a 19 bp repeat of adjacent CR sequences. The partially duplicated tRNA^{Gln} may correspond to a pseudogene since most of the sequence of the typical insect tRNA^{Gln} is missing and interspecific comparisons showed a significant degree of sequence divergence among *Chrysomya* species. The tRNA^{Gln} gene showed marked divergence in *C. putoria* and resulted in a specific sequence element with an internal symmetric pattern. In contrast, the additional tRNA^{Ile} gene had a conserved primary sequence following the duplication event and may have represented a functional copy of the gene. Differential selection against duplicated genes appears to have been operating in these species as reflected in the conserved extra tRNA^{Ile} copy and the degeneration of the tRNA^{Gln} sequences. The characterization of CR sequence elements close to the duplication endpoints could provide a better understanding of the mechanism responsible for the duplication event. The potential to form stable stem-and-loop structures was investigated in duplication endpoints because of the common association of secondary structures with duplication events and rearrangements in animal mtDNA. Duplication of the tRNA-coding sequences adjacent to the mtDNA control region was observed, including that of a noncoding sequence repeat. Specific patterns of evolution were assigned to the different sequences identified. These results demonstrated and confirmed the

plasticity of the mtDNA molecule in *Chrysomya*, especially for the tRNA genes and adjacent control region sequences. The characterization of the *Chrysomya* CR provides access to variable sequences in the mitochondrial genome which should be useful in the identification of forensically important flies, and could provide data for phylogenetic analyses of closely related species, as well as potential markers for population genetics.

INTRODUCTION

Rearrangements in gene order are well documented in a number of organisms and assumptions on the conservation of animal mitochondrial genomes have to deal with the increasing evidence for a more “flexible” and dynamic molecule (Black IV & Roehrdanz, 1998; Downton & Austin, 1999; Campbell *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2001a,b). Studies of tRNA positions in animal mitochondrial genomes suggest their accelerated mobility relative to other mitochondrial genes (Saccone *et al.*, 1999). The control region (CR) and adjacent sequences are frequently associated with structural divergence in animal mtDNA, indicating that the driving mechanisms of structural organization may be closely related to errors in the replication process (Zevering, *et al.*, 1991; Macey *et al.*, 1998).

The structural organization of the insect mtDNA control region (or A+T-rich region) consists of a variety of sequence elements with specific patterns of evolution in different species (Zhang & Hewitt, 1997). In *Drosophila*, the occurrence of repetitive or duplicated motifs is usually associated with the control region, considering both variable and conserved domains (Monforte, *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1994). Rearrangements of tRNAs associated with sequences flanking the control region are a common feature of insect mtDNA (Wolstenholme, 1992). The analysis of control region evolution is strongly compromised by the species-specific patterns of structural organization. This lack of structural conservation, even among closely related species, limits the use of universal insect mtDNA primers in amplification reactions and requires

special care in the interpretation of homologous elements in comparative analyses.

The blowfly mtDNA control region contains conserved and variable sequences arranged in specific domains (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000). The A domain shows multiple conserved sequence blocks when Calliphoridae sequences are aligned. In contrast, the B domain sequences are too variable to allow consistent alignment and validation of homologous sites in myiasis-causing flies. Although the control region sequences of *C. megacephala* have been described (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000) there has been no detailed characterization of the repeated region in this species. To address this question, we reviewed the *C. megacephala* sequence (AF151386) and included an analysis of the mtDNA control region of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria*.

A revised analysis of the *Chrysomya* control region identified the tRNA^{Ile} and tRNA^{Gln} gene sequences near to the rRNA 12S end of the control region. The control region sequences of *C. megacephala*, *C. albiceps* and *C. putoria* mtDNA were established in order to confirm the occurrence of duplicated tRNA sequences in these species, and to determine which patterns of molecular evolution were operating in the repeated region, as well as the molecular mechanism that could give rise to this duplication in *Chrysomya*.

RESULTS AND DISCUSSION

Amplification of the Chrysomya control region

Figure 1 schematically shows the structural organization of the *Chrysomya* control region based on the presence of a tRNA repeat adjacent to the 3' end of the control region as predicted by a review of the *C. megacephala* AF151386 sequence. Annealing sites for the universal and *Chrysomya*-specific primers are shown in order to provide a general overview of the possible amplification products generated by alternative PCR reactions. Amplification of the control region sequences with the primers *CmegA* and *CmegAR* (Table 1) combined with the primers TI-N-24 (Simon *et al.*, 1994) and SR-J-14776 (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000), in two independent reactions, allowed recovery of the complete control region sequences in each species (*amplicons* 1 and 2, figure 2). Size variations in the homologous amplified regions were evident for *C. albiceps* relative to the other two species and were partially related to numerous short tandem repeats distributed along the entire region (as poly-Ts, poly-As, [TA]_n and T[A]_n stretches). The amplification of a 300 bp fragment (Table 1 and Figure 2 lane 8) is indirect evidence of the presence of the a tRNA copy and could be used as a control parameter to search for this duplication in other *Chrysomya* and related species. The analysis of amplified control region-specific fragments provided an estimate of the total size for *C. albiceps* (~ 1300 bp), *C. megacephala* and *C. putoria* (~ 1150 bp each), indicating the potential application of control region markers for species-specific identification, especially considering their combination with PCR-RFLP analysis (Litjens *et al.* 2001). The amplification of the

300 bp product for *Chrysomya* was initially misinterpreted as a non-specific PCR product and has now been recognized as a legitimate amplification product.

The usefulness of newly described primers for the efficient amplification of *Chrysomya* control region sequences was confirmed. These primers were also effective in recovering control region sequences from other forensically important blowflies (unpublished observations) and from preserved museum specimens of myiasis-causing flies (Junqueira *et al.*, *in press*).

Structural organization of the Chrysomya control region

Analysis of the mtDNA control region of *Chrysomya* revealed duplicated tRNA sequences in *C. albiceps*, *C. megacephala* and *C. putoria*. This duplication was conserved among these species, as indicated by amplification analysis of numerous individuals of each species (data not shown). The *amplicon 1* sequences confirmed the identity of both tRNAs genes (tRNA^{Ile} and partial tRNA^{Gln}), as well as the initial 19 bp from the 5' end of the control region (adjacent to the original tRNA^{Ile} gene). However, interspecific sequence analyses have suggested that specific sequence elements associated with the duplicated region may be under differential mutation pressure and may have evolved independently since duplication.

The alignment of control region sequences (Figure 3A, B) of *C. albiceps*, *C. megacephala* and *C. putoria* provided an improved interpretation of the *Chrysomya* 'variable' domain B and confirmed the conserved features associated with the control region of the Calliphoridae A domain. Several sequence

elements were identified and compared among these species, including the conserved sequence blocks (CSBs) previously described for myiasis-causing flies (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000), the predicted secondary structures potentially associated with the origin of mtDNA replication (OR), duplicated sequences, adjacent regions and stem-and-loop-forming sequences at the duplication endpoints. A general overview of the structural organization of the *Chrysomya* control region is shown schematically in Figure 4.

Calliphoridae conserved sequences

All previously described CSBs for the mtDNA control region of myiasis-causing flies were assigned for the *Chrysomya* species analyzed, except for CSB V which corresponds to the annealing site of the *CMeg* primers and, as expected, should be highly conserved in these species. The evolution of the *Chrysomya* CR A domain and specific elements is consistent with the analysis reported for other Calliphoridae and Oestridae, as described in Lessinger & Azeredo-Espin (2000).

The predicted secondary structure for the *Chrysomya* mtDNA replication origin (Figure 5) is conserved as in other Calliphoridae species (data not shown) and its primary sequence included CSB VI, the largest conserved element identified in the control region sequences of myiasis-causing flies. Some, but not all, of the conserved elements described for the insect control region (Zhang & Hewitt, 1997) could be addressed in the suggested *Chrysomya* OR sequences, including a TATA motif (from 712 to 715 in figure 5), a proximal CG-rich

element – GAAGCGTGC (from 682 to 690 in figure 3A) and a prior [TA]_n stretch (from 168 to 210 in figure 3B). Compensatory mutations were identified in *C. albiceps* and *C. putoria* sequences indicating possible functional constraints associated with the maintenance of the secondary structure. These nucleotide substitutions resulted in the replacement of consecutive CG and TA stem-forming pairs in *C. putoria* with two TA pairs in the corresponding *C. albiceps* sequence. The disruption of basal stem pairing in *C. albiceps* because of two adjacent A→G transitions did not prevent the formation of an energetically stable stem-and-loop structure. The same was true for the *C. megacephala* structure, based on the nucleotide divergences shown in figure 5.

Duplicated region and adjacent sequences

The entire duplicated region comprised approximately 120 bp, including 19 bp derived from control region sequences, 68 bp duplicated from the tRNA^{Ile} gene and a 32 bp sequence from a tRNA^{Gln} origin. A BLAST search for sequence similarity for the 71 bp sequence immediately adjacent to the rRNA 12S gene provided no information about the identity or origin of this region. Because of the lack of primary sequence conservation among *Chrysomya* species, and the lack of correspondence with any known sequence described in GenBank, the 71 pb region was assigned as an intergenic region than as a remnant control region sequence. Nevertheless, there are insufficient evidence to validate any candidate origin for these sequences in the analyzed species. In this work, the

90 bp region between the extra tRNA^{Ile} and the rRNA 12S genes is referred to as the *Chrysomya* intergenic region (CIR).

The secondary structure of the duplicated tRNA^{Ile} gene of *Chrysomya* is shown in figure 6A. Two A→G transitions in the *C. megacephala* copy are indicated and represent the only divergent sites among these species. Comparative analysis of the orthologous and paralogous tRNA^{Ile} sequences provided a highly significant nucleotide identity among *Chrysomya* species and the homologous single-copy *C. hominivorax* gene (Figure 4A). The high degree of sequence conservation observed in the tRNA^{Ile} copies contrasted with the variation found in adjacent duplicated sequences. This differential mutation pattern could be indicative of functional constraints responsible for preserving the original tRNA activity, or could result from the homogenization of gene copies. The duplicated state of the tRNA^{Ile} gene seems to be a stable feature in the *Chrysomya* mitochondrial genome. As suggested by Campbell & Barker (1999), stabilizing selection, in which duplicated genes persist without any adjacent loss of functionality could be invoked to explaining the evolution of tRNA^{Ile} sequences in these species.

The duplicated tRNA^{Gln} sequence in *Chrysomya* is an incomplete or degenerated copy of this gene (pseudogene) as shown in figure 6B, based in the original tRNA cloverleaf structure retrieved from the *C. putoria* mitochondrial genome (AF352790). The repeated sequence corresponded to the tRNA 3' end, and consisted of the acceptor stem, the TYC and variable loops and two initial nucleotides of the anticodon stem. Numerous nucleotide substitutions were

observed among *Chrysomya* tRNA^{Gln} repeated sequences, however accelerated evolution from the original duplicated sequence was only evident in the *C. putoria* repeat, which was significantly divergent, and included a 4 bp insertion and several substitutions. The *C. albiceps* and *C. megacephala* copies agreed with the original paralogous region of the tRNA^{Gln} gene.

The *Chrysomya* duplication endpoints (Figure 7A, B) were examined for the presence of common sequence features that could play a role in duplication. The occurrence of sequences able to produce stable stem-and-loop structures has been described as a feature associated with gene rearrangements and duplications in animal mtDNA (Stanton *et al.*, 1994). Furthermore, the nature of the intergenic sequences surrounding the repeat could reveal aspects of the mechanism of rearrangement (Dowton & Austin, 1999). In particular, the occurrence of tandem or inverted repeats might provide sufficient plasticity to allow a reorganization of the mitochondrial genome. Low complexity sequence elements and simple repeats (such as [TA]_n, [TAA]_n, [A]_n) are abundant motifs in the surrounding repeat area and may be involved in duplication. The initial characterization of endpoint sequences and the possible patterns of evolution for related structures are provided below. However, little is known about the specific role of these elements in the duplication process.

As indicated in figure 7A, partial sequences of the tRNA^{Ile} copy and the 19 bp element could be arranged in an energetically stable stem-and-loop structure that was highly conserved between *C. albiceps* and *C. putoria*, while in *C. megacephala* there was a more divergent pattern, including four transitions

in paired sites of the stem formation. The occurrence of four GC pairings in the *Chrysomya* structures (one of which was lost in the *C. megacephala* sequence) contributed to the stabilization of the stem-and-loop configuration. The inclusion of additional sequence data from different *Chrysomya* species would provide a better identification of possibly regulatory motifs in the mtDNA control region.

As described above, there was a significant divergence between the *C. putoria* sequences for the tRNA^{Gln} pseudogene and adjacent sequences and those of the other *Chrysomya* species. This variation was related to the occurrence of a motif containing a symmetric internal repeat (33 bp element) in the *C. putoria* duplication endpoint (from 335 to 367 in Figure 3A). This element consisted of sequences of the tRNA^{Gln} repeat and of an 18 bp conserved sequence of the *Chrysomya* control region (Figure 4C). Although there was no significant evidence supporting any regulatory importance for this region in the mtDNA, especially considering the rate of accelerated evolution (13 divergent sites, including five transversions and numerous gaps), a stem-and-loop structure could be formed by this *C. putoria* 33 bp element (Figure 7B). The discrepancy between the *C. putoria* copy and the other species, may have resulted from accelerated evolution after duplication and *Chrysomya* divergence.

Evolution of duplication in animal mtDNA

Rearrangements and duplications are a frequent feature of animal mtDNA, occurring independently of the coding or noncoding nature of the duplicated sequences and of the relative position in the mitochondrial genome, although duplication events associated with or adjacent to control region sequences are more frequent (Zhang & Hewitt, 1997; Black IV & Roehrdanz, 1998; Saccone *et al.*, 1999; Dotson & Beard, 2001).

The resulting copies of duplication events have been characterized as complete genes, pseudogenes and repeated elements in the control region (or even the entire CR). Most definitions concerning functional/non-functional assumptions for gene copies are based on predicted transcribed sequences or inferred secondary structures of the duplicated regions. Recently, direct experimental evidence of the expressed gene product lead to determination of the non-functional nature of a previously misinterpreted duplicated gene in *Mytilus* (Beagley *et al.*, 1999). The occurrence of duplicated regions involving complete, partial or specific elements of control region sequences has frequently been reported for the arthropod mitochondrial genome (Rand & Harrison, 1989; Zhang & Hewitt, 1997; Black IV & Roehrdanz, 1998; Dotson & Beard, 2001; Nardi *et al.*, 2001).

The presence of pseudogenes, mainly tRNAs, in the animal mitochondrial genome may represent a possible transient or intermediate state from the degeneration of duplicated regions because of the lack of functional constraints on redundant copies (Moritz, 1987; Macey, 1998; Kumazawa *et al.*, 1998;

Campbell & Barker, 1999; Beagley *et al.*, 1999; Eberhard *et al.*, 2001; Dorner *et al.*, 2001). The degeneration of original or recently duplicated sequences occurs randomly and contributes to the rearrangement process (Macey, 1997).

Duplication of mitochondrial coding regions other than those for tRNAs, has been reported only for the protein-coding ND6 gene in parrots (Eberhard *et al.*, 2001) and the ND1 gene in *Boophilus* ticks (Campbell & Braker, 1999), both of which represent non-functional copies. The prediction of functional duplicated coding regions in animal mtDNA, as suggested for *Chrysomya* tRNA^{Ile}, is restricted to the tRNA genes in *Mytilus* (Hoffman, 1992; Beagley *et al.*, 1999), in an anphisbaenian (Macey, 1998) and in snakes (Kumazawa, 1998), and correspond to the tRNA^{Met}, tRNA^{Pro} and tRNA^{Phe} genes, respectively. Recently, Hwang *et al.* (2001) re-examined non-annotated regions in published mitochondrial genome sequences and identified a “coding probability” for a second tRNA^{Tyr} in *Lumbricus terrestris*.

The duplicated copies of coding sequences which are free from functional constraints are prone to high levels of sequence divergence, even among closely related species. The maintenance of conserved copies of coding or non-coding regions in the animal mitochondrial genome is a challenging subject that is raising new questions about the strength and nature of stabilizing selection in mitochondrial genomes (Kumazawa *et al.*, 1998; Black IV & Roehrdanz, 1998; Campbell & Barker, 1999; Eberhard *et al.*, 2001).

Dowton & Austin (1999) proposed a correlation between mtDNA rearrangements and the evolution of a parasitic lifestyle in hymenopterans. An

extension of this association, including the mitochondrial dynamics of rearrangements in obligate ectoparasites such as ticks, wallaby lice, mosquitoes and others, suggests that parasitic lineages could be prone to mtDNA rearrangements as a result of selective pressure from the host–parasite interaction (Shao *et al.*, 2001a; Downton & Campbell, 2001). The Calliphoridae contains many species of myiasis–causing flies that are obligate ectoparasites of great medical and veterinary importance, including species of the genera *Cochliomyia* (the New World screwworm), *Chrysomya* (the Old World screwworm) and *Lucilia* (the sheep blowfly). The structural organization of the mtDNA of *C. hominivorax*, a primary agent of myiasis, resembles that proposed for *Drosophila* species. Moreover, no correlation was found with the initial levels of structural divergence in the mitochondrial genome of *Chrysomya* since the species analyzed were all primarily free–living organisms. The possibility of multiple evolution as pathways for the parasitic habit from more generalist species in this group (Wall & Hall, 1995) apparently did not directly affect the Calliphoridae mitochondrial gene order.

Mechanisms of structural organization in animal mtDNA

Duplications of mitochondrial sequences may represent an intermediate state for mtDNA with further structural organization produced by random the loss of duplicated sequences and relaxed selection on redundant copies (Macey, 1997). This duplication/random loss model has been used to explain numerous rearrangements among mitochondrial genomes of related groups (Moritz *et al.*,

1987; Macey, 1997, 1998). On the other hand, various examples of conserved duplicated functional or nonfunctional regions have been interpreted as evidence for gene conversion or concerted evolution (Zhang *et al.*, 1995; Zhang & Hewitt, 1997; Black IV & Roehrdanz, 1998; Eberhard *et al.*, 2001). Intramitochondrial recombination has also been suggested as a legitimate mechanism for mediating some specific rearrangements in animal mtDNA (Dowton & Campbell, 2001), in addition to other frequently described mechanisms such as slippage-strand-mismatch, tRNA mediated integration, replication errors, stem-and-loop regulatory structures and direct/inverted repeats interactions (Levinson & Gutman, 1987; Stanton, 1994; Moritz, 1987; Cantatore *et al.*, 1987).

The most reasonable explanation for the present data is that the duplication process in *Chrysomya* mtDNA was mediated by stem-and-loop structures (Saccone *et al.*, 1999), since one duplication endpoint was within the tRNA^{Gln} sequence while the other lay near a stable secondary structure formed by tRNA^{Ile} and 19 bp-element sequences (Figure 7A). The mechanism whereby site-specific integration occurs remains unknown (Stanton, 1994). An alternative hypothesis would involve a tandem repeat duplication process via a slippage-strand mismatch or mispairing (SSM) mechanism in which the secondary structures may have played a role in stabilizing a single-strand region implicated in the slippage during replication. If an SSM event did occur, a drastic reorganization of the duplicated control region sequences must have taken place in order to produce the arrangement observed in the *Chrysomya*

control region sequences, including extensive deletions and degeneration of CR-like duplicated sequences, despite the preservation of the tRNA^{Ile} copy.

These results demonstrate and confirm the plasticity of the mtDNA molecule in *Chrysomya*, especially the tRNA genes and adjacent control region sequences, and should contribute to our understanding of insect mitochondrial genome evolution.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chrysomya samples

Adults of *C. albiceps* (Wiedemann, 1819) were collected in Rio de Janeiro, Rio de Janeiro State, Brazil, and stored at -70°C. Samples of *C. putoria* (Wiedemann, 1830) or *C. chloropyga* (synonym), from Belém, Pará State, Brazil, were reared as a laboratory strain, and the pupae were stored at -70°C prior to analysis. The *C. megacephala* (Fabricius, 1794) used for comparative analysis (AF151386) was from Adamantina, São Paulo State, Brazil.

Genomic extraction

Total individual DNA was extracted from pupae or adults as described in Infante & Azeredo-Espin (1995), using a phenol-chloroform procedure.

Amplification reactions

The PCR reactions were done as described by Lessinger & Azeredo-Espin (2000). The primers used in the amplification reactions of control region sequences for *C. albiceps*, *C. megacephala* and *C. putoria* are described in table 1. The primers *CMeg A* and *CMeg AR* were based on the *C. megacephala* control region sequence (AF151386) and recognized complementary annealing sites with opposite orientations in the mtDNA molecule (Figure 1). The complete sequences of the *Chrysomya* control region were amplified in two independent reactions (products are referred to as *amplicons* 1 and 2) to avoid competition between alternative annealing sites for the primer TI-N-24 in the duplicated tRNA^{Ile} sequence. This PCR reaction preferentially amplified a short 300 bp product instead of the expected 1200 bp (approximately) control region product (Figure 1).

Cloning and sequencing

The amplified PCR products were purified using 0.05 µm filters as described in Lessinger & Azeredo-Espin (2000). An aliquot of the purified PCR product was cloned into the pUC18 – Sure Clone system (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's specification. Two to four clones from independent PCR reactions were sequenced for each species in both strands.

Comparative and structural analysis

The CR nucleotide sequences of *C. albiceps*, *C. putoria* and *C. megacephala* (AF151386) species were aligned using Clustal W (Thompson *et*

et al., 1994) set to default parameters with manual adjustments where required. The identification of conserved sequence blocks was based on the description by Lessinger & Azeredo-Espin (2000) for blowflies. The tRNA secondary structure was determined using tRNAscan-SE software (Lowe & Eddy, 1997). Other secondary structures and their thermodynamic properties were determined using Mulfold software (SantaLucia, 1998). The *C. hominivorax* (AF260826) and *C. putoria* (AF352790) mitochondrial sequences were used as additional parameters for comparison to provide information on the primary sequences and predicted secondary structures of tRNA.

General definitions

Homology was defined based on sequence similarity, relative position and structural organization of the mtDNA control region elements in *Chrysomya* species. The definition of homology in non-coding and/or regulatory sequences is complex and should be addressed carefully as indicated by Fitch (2000) and Mindell & Meyer (2001). The observation that shared variation in mitochondrial gene organization represents highly reliable evidence of a common ancestry (Boore *et al.*, 1998) supports the assumptions of orthology and paralogy defined for the *Chrysomya* mtDNA duplicated sequences in this work. Note that the term 'original' in the text refers to homologous genes and mtDNA sequences in the corresponding *C. hominivorax* and *C. putoria* mtDNA structural organization (Lessinger *et al.*, 2000; Junqueira *et al.*, in preparation).

Duplicated sequences are described as a “copy”, “repeat”, “duplication” or related term. An approximately 90 bp sequence, immediately adjacent to the rRNA 12S gene, is suggested to be recognized as a “*Chrysomya* intergenic region” (CIR) based on its relative position between the extra tRNA^{Leu} and rRNA 12S genes and on the fact that it shares no significant primary sequence identity with any known control region element. The further characterization of *Chrysomya* CR sequences could provide additional evidence for a better understanding of the origin and evolution of this noncoding intergenic region.

Duplication endpoints were identified by aligning the sequences flanking the internal duplication junction with the corresponding original sequences. However, their exact boundaries could not be assigned precisely because of the high sequence variability at the terminations of the duplicated region.

Functional and non-functional interpretations were based in the analysis of primary sequence elements and predicted secondary structures, and need to be confirmed by further experiments. The discussion of mitochondrial duplicated sequences and pseudogenes was limited to the structural organization of the organellar genome. The occurrence of complete mitochondrial genomes, as well as partial sequences and pseudogenes that have been found transferred to the nuclear genome in numerous organisms (Bensasson *et al.*, 2000 and Willians & Knoulton, 2001) was not addressed here.

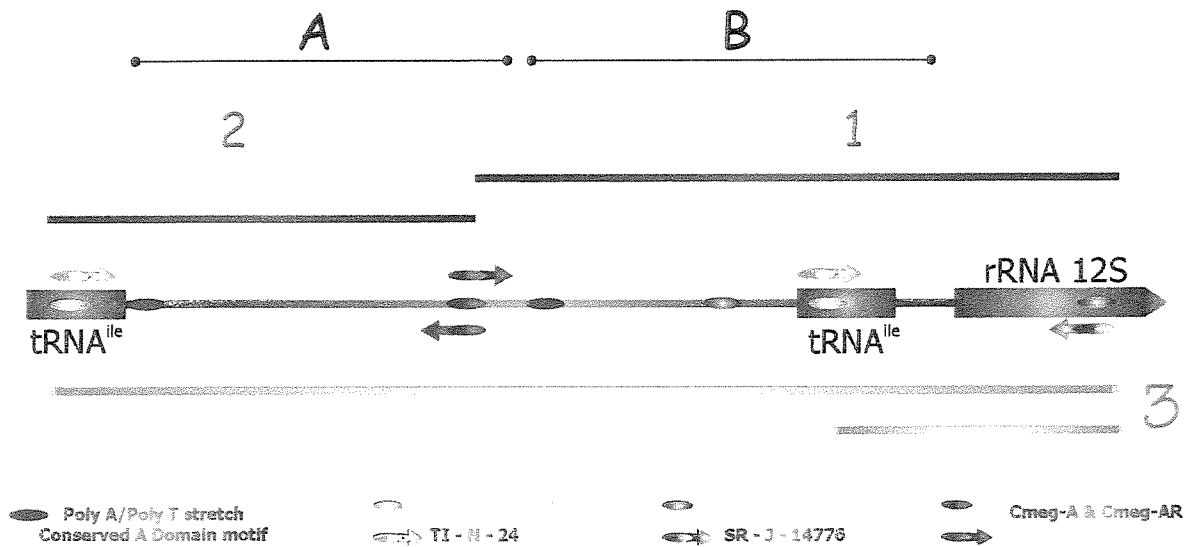


Figure 1 – Schematic organization of the *Chrysomya* mtDNA control region and adjacent genes (tRNA^{Ile} and rRNA 12S) indicating the primer sites and related PCR amplification products. Amplification results are indicated for reactions 1 to 3. Numbers 1 and 2 indicate *Amplicons* 1 and 2. Two PCR products (approximately 300 bp and 1200 bp) are potentially amplified using a universal primer set (3). A and B indicate control region-specific domains (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000). Experimental results are shown in Figure 2.

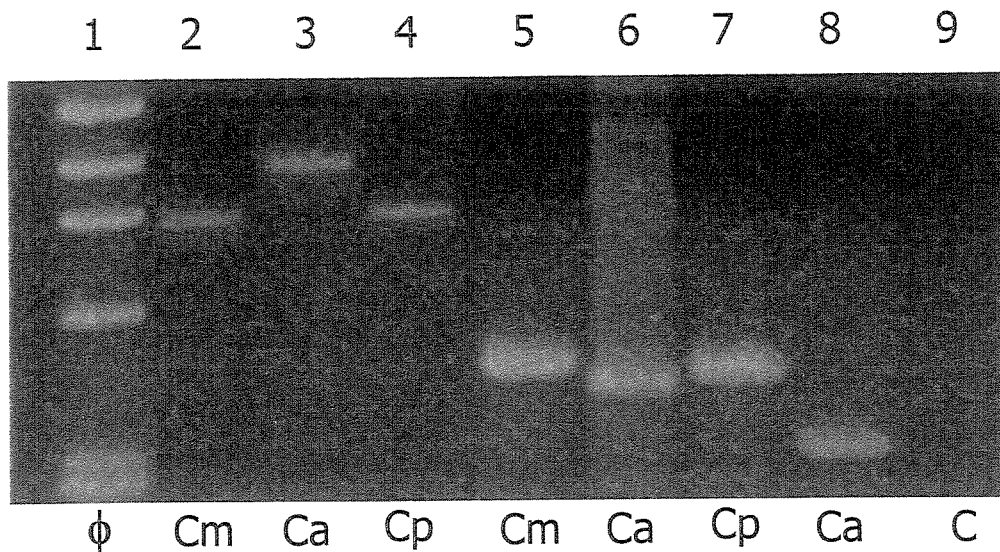


Figure 2 - Control region amplification of *Chrysomya* species using universal (Simon *et al.*, 1994) and *Chrysomya*-specific primers. Cm = *C. megacephala*, Ca = *C. albiceps* and Cp = *C. putoria*. C = PCR control reaction (no DNA). Lanes 2 to 4 and 5 to 7 are related to PCR reactions 1 and 2 (see Figure 1). These PCR products are referred to as *amplicons* 1 and 2 in the text. Lane 8 is a 300 bp product produced by the primer TI-N-24 annealing at the tRNA copy (3 in Figure 1). This product predominates in the PCR reaction, overcoming a potentially amplifiable 1200 bp product. The molecular marker ϕ X 174 is indicated in lane 1

FIGURE 3

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
1 <i>C. putoria</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	600	601	615	616	630
2 <i>C. megacephala</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	582				582
3 <i>C. albiceps</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	605				605
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
1 <i>C. putoria</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	520				520
2 <i>C. megacephala</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	513				513
3 <i>C. albiceps</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	521				521
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
1 <i>C. putoria</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	440				440
2 <i>C. megacephala</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	432				432
3 <i>C. albiceps</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	432				432
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360
1 <i>C. putoria</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	353				353
2 <i>C. megacephala</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	350				350
3 <i>C. albiceps</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	348				348
	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450
1 <i>C. putoria</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	440				440
2 <i>C. megacephala</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	432				432
3 <i>C. albiceps</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	432				432
	451	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540
1 <i>C. putoria</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	520				520
2 <i>C. megacephala</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	513				513
3 <i>C. albiceps</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	521				521
	541	555	556	570	571	585	586	600	601	615	616	630
1 <i>C. putoria</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	600				600
2 <i>C. megacephala</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	582				582
3 <i>C. albiceps</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	605				605
	631	645	646	660	661	675	676	690	691	705	706	720
1 <i>C. putoria</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	688				688
2 <i>C. megacephala</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	668				668
3 <i>C. albiceps</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	691				691
	721	735	736	750	751	765	766	780	781	795	796	810
1 <i>C. putoria</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	771				771
2 <i>C. megacephala</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	751				751
3 <i>C. albiceps</i>	AAATGCTGCTGCTGCT	AGGATTAACCTGATA	GGGTAAGATCAATGTA	GAATATTACATCTCCTA	AT-----TTT	TTTTTTTTTTTTTTTT	ATAATATAAATTTA	774				774

CSB VII

CSB VI

FIGURE 3

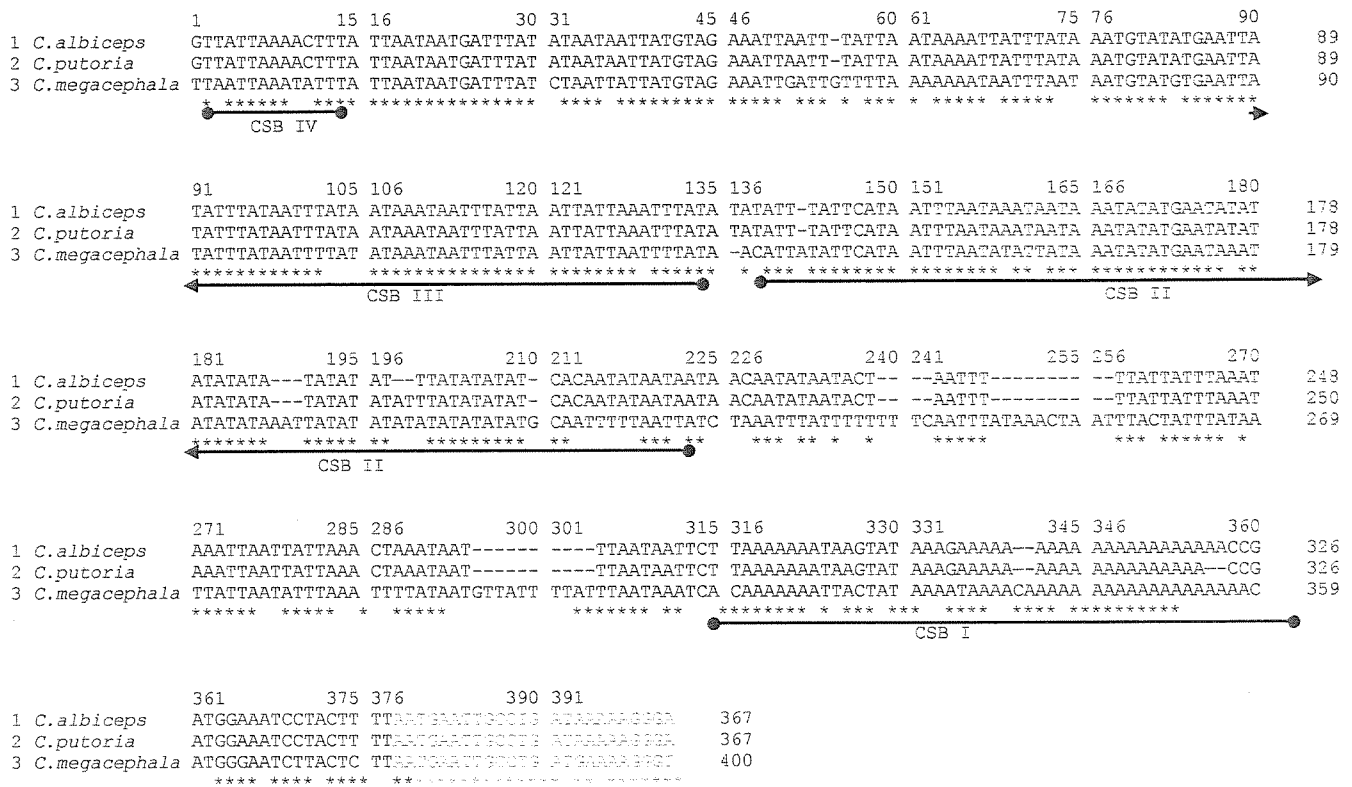


Figure 3 – Alignment of the mtDNA control region of *Chrysomya* species. A – Alignment of control region *amplicon* 1 that comprises partial sequences from rRNA 12S (1 – 160), t-duplicated region (233 – 357), and partial sequences from the Calliphoridae conserved domain (598 – 803). A red arrow identifies the alternative annealing site of the primer TN-I-24 (taken from Lessinger & Azeredo-Espin, 2000). Boxes identify sequences capable of forming stable stem-and-loop structures. Primary sequence elements identified in the alignment were the 19 bp repeat (233 – 251), the tRNA^{Val} copy (252 – 317), the tRNA^{Gln} pseudogene (322 – 357) and the 18 bp-conserved sequence (358 – 379). The *C. putoria* 33 bp-symmetric element ranges from 335 to 367. The alignment indicates variable size for *C. albiceps* due to [AT]_n extension. B – Alignment of control region *amplicon* 2 with the identification of blowflies’ “conserved sequence blocks” (CSBs) previously described in Lessinger & Azeredo-Espin (2000). The original tRNA^{Leu} sequences adjacent to tRNA^{Val} range from 378 to 401. See figure 4.

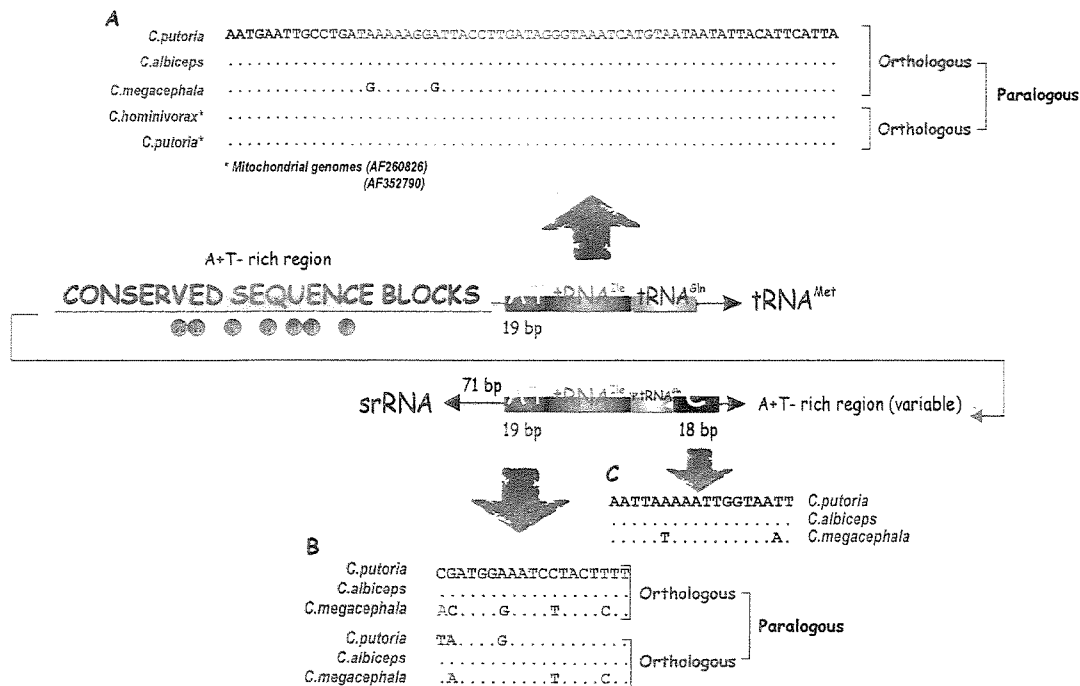


Figure 4 – Structural organization of duplicated elements in the *Chrysomya* control region. Comparative analyses of homologous regions indicate different levels of conservation among these elements (A, B and C). A – Alignment of *Chrysomya* orthologous and paralogous tRNA^{Leu} genes, including the *Cochliomyia* homologous sequence as an additional parameter. B – Alignment of the 19 bp element (repeated CR sequence) presenting initial levels of nucleotide divergence between copies. C – Alignment of the conserved 18 bp element. A tRNA^{Gln} pseudogene was identified in the duplicated region followed by the conserved 18 bp sequence. An approximately 90 bp region, including 71 bp immediately adjacent to the rRNA 12S gene plus the 19 bp repeated element, is referred to as the *Chrysomya* intergenic region (CIR) in the text.

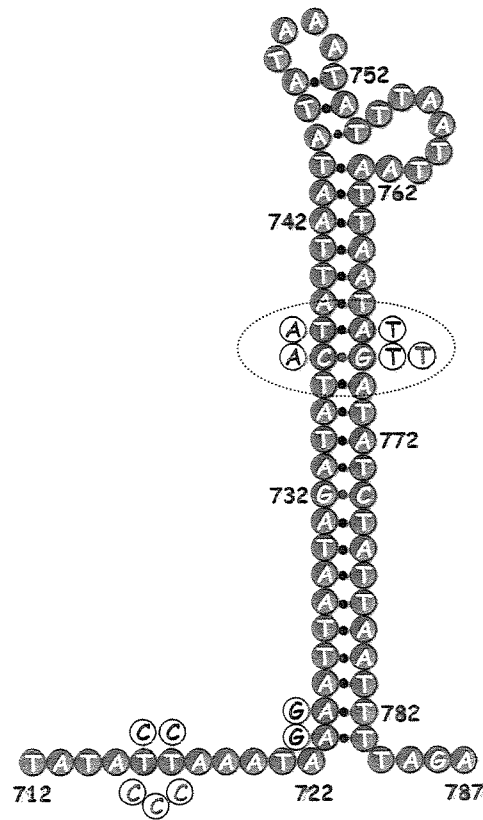


Figure 5 - The predicted secondary structure formed by the A domain control region sequences in *Chrysomya*. This conserved structure is energetically stable (free energy values vary from -12.2 to -15.2 in these species) and represents the potential origin of replication (OR) of the *Chrysomya* mtDNA (blowfly CSB VI). Nucleotide positions from 712 to 787 correspond to the relative positions of alignment in Figure 3A. Conserved nucleotides among *Chrysomya* species are shown in blue circles; red circles indicate nucleotide divergence in the corresponding *C. putoria* sequence; white circles with red or black characters indicate substitutions in the *C. megacephala* and *C. albiceps* sequences, respectively. Compensatory nucleotide substitutions resulting in the replacement of consecutive CG and TA pairs in *C. putoria* for two AT pairs in *C. albiceps* indicated by the dotted oval.

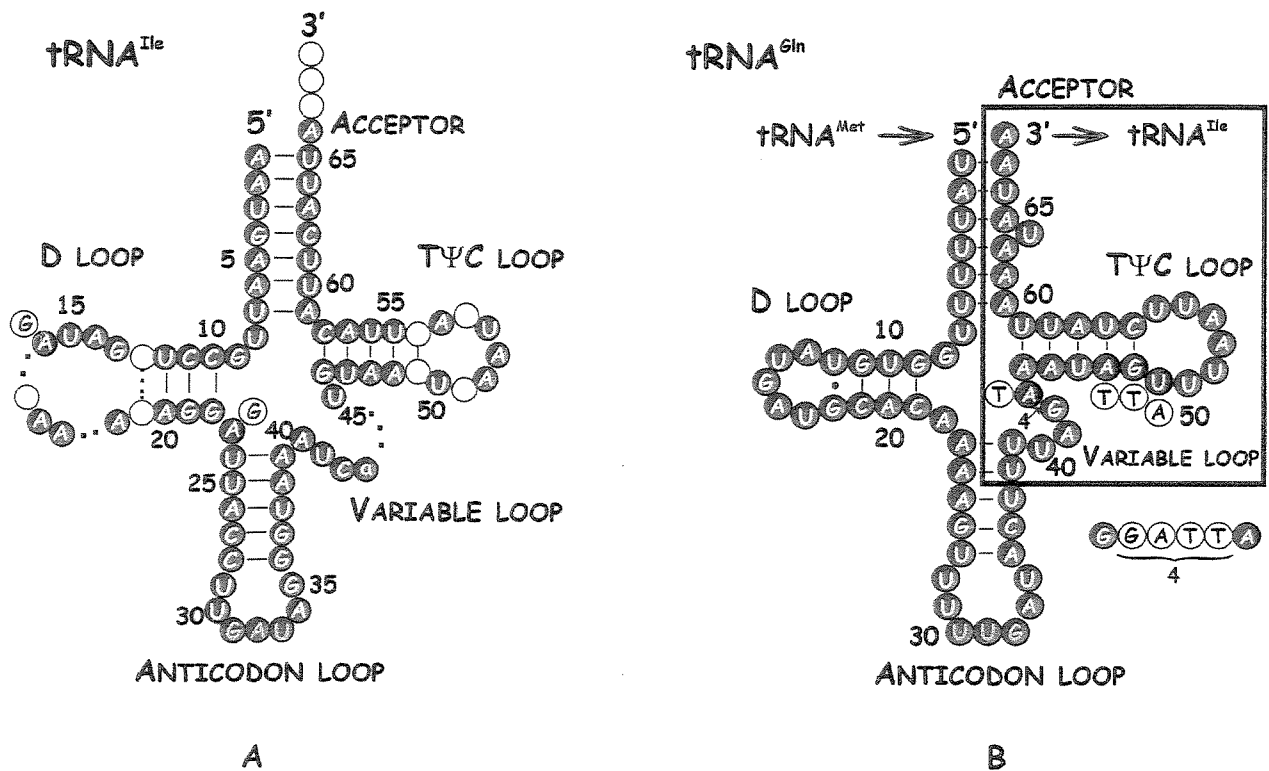


Figure 6 – Secondary structure of duplicated tRNA sequences. Conserved nucleotides among *Chrysomya* species are shown in blue circles; red circles indicate nucleotide divergence in the *C. putoria* sequence. A – “Clover-leaf” configuration predicted for the duplicated *Chrysomya* tRNA^{Ile}. Blank circles indicate overlap with a typical tRNA structure; white circles with red characters indicate substitutions in the *C. megacephala* sequences. B – The predicted secondary structure of *C. putoria* tRNA^{Gln} (AF352790) used for comparison of duplicated sequences. The box indicates the tRNA^{Gln}-duplicated region in *Chrysomya*. The main sequence in the box is conserved for both *C. albiceps* and *C. megacephala* repeats. White circles with black characters indicate nucleotide substitutions and a 4 bp insertion (GATT) between position 42 (G) and 43 (A) in the repeated element of *C. putoria*.

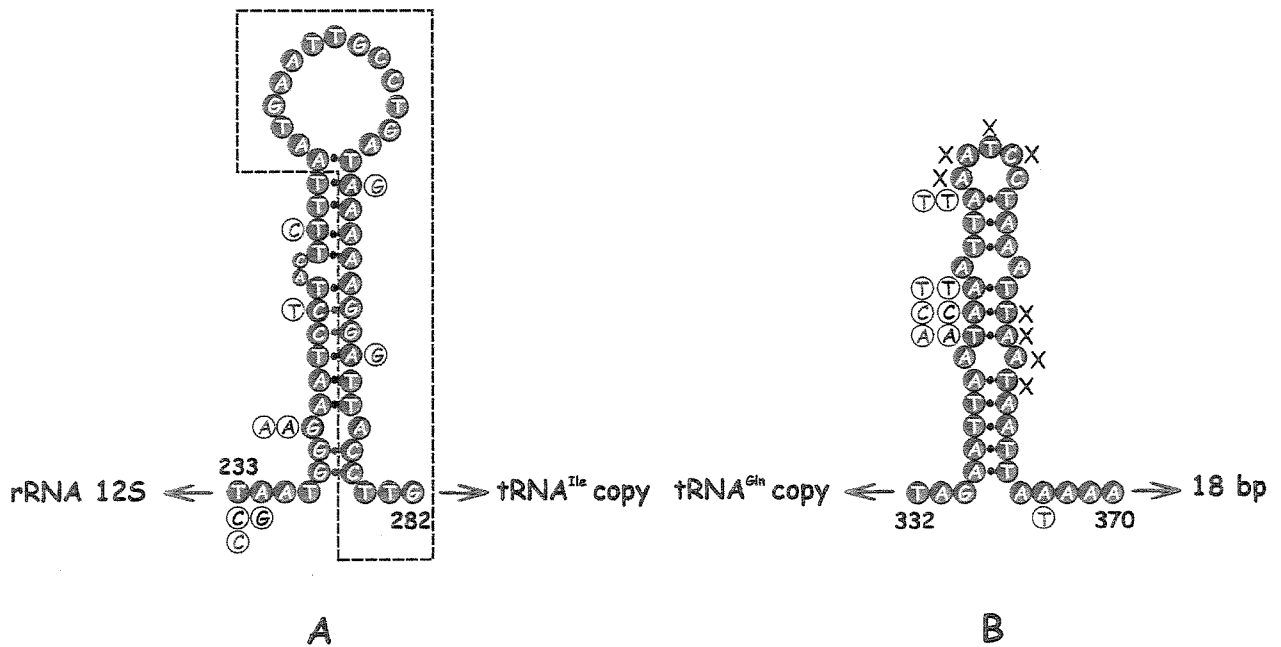


Figure 7 - Secondary structures at the duplication endpoints. Nucleotide positions 233 to 370 correspond to relative positions in the alignment in Figure 3A. Conserved nucleotides among *Chrysomya* species are shown in blue circles; red circles indicate nucleotide divergence in the corresponding *C. putoria* sequence (note the occurrence of a 33 bp symmetric sequence element in B); white circles with red or black characters indicate substitutions in *C. megacephala* and *C. albiceps* sequences, respectively. A - Predicted secondary structure formed by partial tRNA^{Ile} and 19 bp element sequences in the duplication endpoint near the rRNA12S gene (free energy -6.1). tRNA^{Ile} sequence is boxed. B - Predicted secondary structure formed by partial sequences of the pseudo-tRNA^{Gln} and the 18 bp conserved element (free energy -3.2). X indicates gaps in both species.

Table 1 - Primers used for the amplification of *Chrysomya* mtDNA control region sequences. The primers are oriented in the 5' → 3' direction. The terms *Direct* and *Reverse* are used arbitrarily to indicate orientation. See figure 1.

REACTION	DIRECT	REVERSE	PRODUCT/DOMAIN
1	CMEG A ATGATATTCTTAACTGGATT	SR-J-14776 GCTGGCACGAATTTTGTC	DUPLICATED REGION AMPLICON 1
2	TI-N-24 ATTTACCCTATCAAGGTAA	CMEG AR AATCCAGTTAAGAATATCAT	PARCIAL DOMAIN AMPLICON 2
3	* TI-N-24 ATTTACCCTATCAAGGTAA	SR-J-14776 GCTGGCACGAATTTTGTC	300 BP REGION

* annealing site in the duplicated gene

REFERENCES

- Beagley, C. T.; Okimoto, R. & Wolstenholme, D. R. (1999). *Mytilus* mitochondrial DNA contains a functional gene for a tRNA^{Ser} (UCN) with a dihydrouridine arm-replacement loop and a pseudo-tRNA^{Ser} (UCN) gene. *Genetics*, 152: 641 – 652.
- Bensasson, D.; Zhang, D. X. & Hewitt, G. M. (2000). Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 406 – 415.
- Black, IV, W. C. & Roehrdanz, R. L. (1998). Mitochondrial gene order is not conserved in arthropods: prostriate and metastriate tick mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1772 – 1785.
- Boore, J. L.; Lavrov, D. V. & Brown, W. M. (1998). Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature*, 392: 667 – 668.
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27: 1767 – 1780.
- Campbell, N. J. & Barker, S. C. (1998). An unprecedented major rearrangement in an arthropod mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1786 – 1787.
- Campbell, N. J. H. & Barker, S. C. (1999). The novel mitochondrial gene arrangement of the cattle tick, *Boophilus microplus*: fivefold tandem repetition of a coding region. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 732 – 740.

- Cantatore, P.; Gadaleta, M. N.; Roberti, M.; Saccone, C. & Wilson, A. C. (1987). Duplication and remoulding of tRNA genes during the evolutionary rearrangement of mitochondrial genomes. *Nature*, 329: 853 – 855.
- Dorner, M.; Altmann, M.; Pääbo, S. & Morl, M. (2001). Evidence for import of a Lysyl-tRNA into marsupial mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 12: 2688 – 2698.
- Dotson E. M. & Beard C. B. (2001). Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Molecular Biology*, 10: 205 – 215.
- Dowton, M. & Austin, A. D. (1999). Evolutionary dynamics of a mitochondrial rearrangement “hot spot” in Hymenoptera. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 298 – 309.
- Dowton M. & Campbell N. J. (2001). Intramitochondrial recombination – is it why some mitochondrial genes sleep around? *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 269 – 271.
- Eberhard, J. R.; Wrigth, T. F. & Bermingham, E. (2001). Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1330 – 1342.
- Fitch, W. M. (2000). Homology a personal view on some of the problems. *Trends in Genetics*, 16: 227 – 231.
- Hall, M. & Wall, R. (1995). Myiasis of humans and domestic animals. *Advances in Parasitology*, 35: 257 – 334.

- Hoffmann, R. J.; Boore, J. L. & Brown, W. M. (1992). A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics*, 131: 397 - 412.
- Hwang, U. H.; Friedrich, M.; Tautz, D.; Park, C. J. & Kim, W. (2001). Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature*, 413: 154 - 157.
- Infante, 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.
- Junqueira, A. C. M.; Lessinger, A. C. & Azeredo-Espin, A. M. L. Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, in press.
- Kumazawa, Y.; Ota, H.; Nishida, M. & Ozawa, T. (1998). The complete nucleotide sequence of a snake *Dinodon semicarinatus* mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics*, 150: 313 - 329.
- 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.

- Levinson, G. & Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 203 - 221.
- Litjens, P; Lessinger, A. C. & Azeredo-Espin, A. M. L. (2001). Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Medical and Veterinary Entomology*, 15: 183 - 188.
- Lowe, T. M. & Eddy, S. R. (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequences. *Nucleic Acids Research*, 25: 955 - 964.
- Macey, J. R.; Larson, A.; Ananjeva, N. B.; Fang, Z. & Papenfuss, T. J. (1997). Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 91 - 104.
- Macey, J. R; Schulte, J. A. 2nd; Larson, A. & Papenfuss, T. J. (1998). Tandem duplication via light-strand synthesis may provide a precursor for mitochondrial genomic rearrangement. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 71 - 75.
- Mindell, D. P. & Meyer, A. (2001). Homology evolving. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 434 - 440.
- Moritz, C. & Brown, W. M. (1987). Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs: variation in incidence and gene content among lizards.

- Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 84: 7183 – 7187.
- Nardi, F.; Carapelli, A.; Fanciulli, P. P.; Dallai, R. & Frati, F. (2001). The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetradontophora bielensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1293 – 1304.
- Rand, D. M. & Harrison, R. G. (1989). Molecular population genetics of mtDNA size variation in crickets. *Genetics*, 121: 551 – 569.
- Saccone, C.; De Giorgi, C.; Gissi, C.; Pesole, G. & Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238: 195 – 209.
- SantaLucia, J. Jr (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 95: 1460 – 1465.
- Shao, R.; Campbell, N. J. & Barker, S. C. (2001a). Numerous gene rearrangements in the mitochondrial genome of the wallaby louse, *Heterodoxus macropus* (Phthiraptera). *Molecular Biology and Evolution*, 18: 858 – 865.
- Shao, R; Campbell, N. J; Schmidt, E. R. & Barker, S. C. (2001b). Increased rate of gene rearrangement in the mitochondrial genomes of three orders of hemipteroid insects. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1828 – 1832.
- Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H. & Flook, P. (1994). *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651 – 701.

- Stanton, D. J.; Daehler, L. L.; Moritz, C. C. & Brown, W. M. (1994). Sequences with the potential to form stem-and-loop structures are associated with coding-region duplications in animal mitochondrial DNA. *Genetics*, 137: 233 - 241.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673 - 4680.
- Williams, S. T. & Knowlton, N. (2001). Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1484 - 1493.
- Zevering, C. E.; Moritz, C.; Heideman, A. & Sturm, R. A. (1991). Parallel origins of duplications and the formation of pseudogenes in mitochondrial DNA from parthenogenetic lizards (*Heteronotia binoei*; Gekkonidae). *Journal of Molecular Evolution*, 33: 431 - 441.
- Zhang, D. X. & Hewitt, G. M. (1997). Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical and Systematic Ecology*, 25: 99 - 120.
- 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.

REFERÊNCIAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389–3402.
- Anderson, G. S. (2000). Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences*, 45(4): 824–832.
- Austin, J. J.; Smith, A. B.; Thomas, R. H. (1997). Palaeontology in a Molecular World: the search for authentic ancient DNA. *Trends in Ecology and Evolution*, 12(8): 303–306.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, NY.
- Azeredo-Espin, A.M.L. & Pavan, C. (1983). Karyotypes and possible regions of origin of three species of Calliphoridae (Diptera) recently introduced in Brazil. *Revista Brasileira de Genética*, VI (4): 619–638.
- Bailey, T. L. and Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the*

Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp. 28–36, AAAI Press, Menlo Park, California.

Bailey, T. L. and Gribskov, M. (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics* 14:48–54.

Ballard, J. W. O. and Kreitman, M. (1995). Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends in Ecology and Evolution*, 10(12): 485–488.

Ballard, J. W. O. (2000). Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Journal of Molecular Evolution*, 51: 48–63.

Baumgartner, D. L. and Greenberg, B. (1984). The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *Journal of Medical Entomology*, 21 (1): 105–113.

Baumgartner, D. L. (1993). Review of *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 30: 338–352.

Bohonak, A. J.; Davies, N.; Villablanca, F. X. and Roderick, G. K. (2001). Invasion genetics of New World medflies: testing alternative colonization scenarios. *Biological Invasions*, 3: 103–111.

- Campbell, N. J. H. and Barker, S. C. (1999). The novel mitochondrial gene arrangement of cattle tick *Boophilus microplus*: five fold tandem repetition of a coding region. *Molecular Biology and Evolution*, 16 (6): 732-740.
- Cano, R. J. (1996). Analysing Ancient DNA. *Endeavour*, 20(4): 162-167.
- Carrodeguas, J. A. and Vallejo, C. G. (1997). Mitochondrial transcription initiation in the crustacean *Artemia franciscana*. *European Journal of Biochemistry*, 250(2): 514-23.
- Carvalho, L. M. L.; Thyssen, P. J.; Linhares, A. X. and Palhares, F. A. B. (2000). A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(1): 135-138.
- Chang, D. D. and Clayton, D. A. (1984). Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell*, 36: 635-643.
- Clary, D. O. & Wolstenholme, D. R., (1987). *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequences in the A+T- rich region and supporting evidence

for a secondary model of the small ribosomal RNA. *Journal of Molecular Evolution*, 25: 116–125.

Cooper, A.; Lalueza-Fox, C.; Anderson, S.; Rambaut, A.; Austin, J. and Ward, R. (2001). Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution, *Nature*, 409: 704–707.

Crozier, R. H. and Crozier, Y. C. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133: 97–117.

Davies, N.; Villablanca, F. X. And Roderick, G. (1999). Bioinvasions of the Medfly *Ceratitis capitata*: source estimation using DNA sequences at multiple intron loci. *Genetics*, 153: 351–360.

Dean, M. D. and Ballard, W. O. (2001). Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98: 279–283.

Dear, J. P. (1985). A revision of the New World Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 3(3): 109–169.

- Dillon, N.; Austin, A. D. and Bartowsky, E. (1996). Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*, 5: 21–24.
- Dotson, E. M. and Beard, C. B. (2001). Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Molecular Biology*, 10: 205–215.
- Eglinton, G. and Logan, G. A. (1991). Molecular preservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 333, 315–328.
- Esposito, M. C. (1997). As espécies exóticas de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) na Amazônia: Porque elas ainda não ocorrem na Estação Científica Ferreira Penna? *in Caxiuanã* Pedro L. B. Lisboa (Ed.) Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém–Pará.
- Esposito, M. C. (1999). *A fauna de moscas varejeiras (Diptera: Calliphoridae) da Amazônia e sua ecologia na região de Caxiuanã e cidade de Portel/PA*. Tese de Doutorado, Manaus, AM.
- Giraud, T.; Pedersen, J. S.; Keller, L. (2002). Evolution of supercolonies: The Argentine ants of southern Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 99 (9): 6075–6079.

- Goddard, J. M. and Wolstenholme, D. R. (1980). Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from the genus *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, 25: 741–757.
- Golenberg, E. M.; Giannasi, D. E.; Clegg, M. T.; Smiley, C. J.; Durbin, M.; Henderson, D. and Zurawski, G. (1990). Chloroplast DNA sequence from a miocene Magnolia species. *Nature*, 344: 656.
- Greenberg, B. (1971). Ecology, classifications and biotic associations. In: Flies and Disease. Vol 1, Princeton University Press, Princeton.
- Guimarães, J. H. ; Prado, A.; Linhares, A. X. (1978). Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 22: 53–60.
- Guimarães, J. H. , Prado, A. P. & Buralli, G.M. (1979). Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera: Calliphoridae *Revista Brasileira de Entomologia*, 23 (4): 245–255.
- Guimarães, J. H. & Papavero, N. (1999). Myiasis in Man and Animals in the Neotropical Region. Plêiade/FAPESP, São Paulo, SP.

- Haddrath, O. and Baker, A. J. (2001). Complete mitochondrial genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 268: 939–945.
- Hall, B. G. (2001). *Phylogenetic trees made easy*. Sinauer, Sunderland, Massachussets, 179 p.
- Handt, O., Höss, M., Krings, M. and Pääbo, S. (1994). Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia*, 50: 524–529.
- Heiman, M. (1997). Programa Webcutter 2.0, utilizado pela internet no endereço www.firstmarket.com/cutter/cut2.html.
- Hendy, M. D. and Penny, D. (1982). Branch-and-bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Mathematical Biosciences*, 59: 277–290.
- Herrmann, B.; Hummel, S. (1994). *Ancient DNA*. Springer-Verlag, New York, NY, pp 263.
- Holland, B. S. (2000). Genetics of marine bioinvasions. *Hydrobiologia* 420: 63–71.

- Höss, M.; Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M. and S. Pääbo. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, 24, 1304–1307.
- Imbiriba, A. S., Izutami, D. T., Millhoretto, I. T. and Luz, E. (1977). Introdução de *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 20: 35–39.
- Iwala, M. O. E. and Onyeka, J. O. A. (1977). The type and distribution patterns of domestic flies in Nsukka, East Central State, Nigeria. *Environmental Entomology*, 6: 43–49.
- Jirón, L. F. (1979). Sobre moscas califóridas de Costa Rica (Diptera: Cyclorrhapha). *Brenesia*, 16: 221–222.
- Junqueira, A. C. M., Lessinger, A. C. and Azeredo-Espin, A. M. L. (2002). Methods for recovery of mtDNA sequence from museum specimens of myiasis-causing-flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 39–45.
- Junqueira, A. C. M.; Lessinger, A. C.; Torres, T. T.; Vettore, A. L.; da Silva, F. R.; Arruda, P. and Azeredo-Espin, A. M. L. The complete mitochondrial genome of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae), em preparação.

Kelman, Z. and Moran, L. (1996). Degradation of ancient DNA. *Current Biology*, 6: 223.

Kondo, R.; Satta, Y.; Matsuura, E. T., Ishiwa, H.; Takahato, N. and Chigusa, S. I. (1990). Incomplete maternal transmission of mtDNA in *Drosophila*. *Genetics*, 126: 657-663.

Laurence, B. R. (1986). Old World blowflies in the New World. *Parasitology Today*, 2(3): 77-79.

Laurence, B. R. (1988). The tropical African latrine blowfly, *Chrysomya putoria* (Wiedemann). *Medical and Veterinary Entomology*, 2: 285-291.

Lee, C. E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution*, 17 (8): 386-391.

Lessinger, A. C. (1998). Análise do genoma mitocondrial de dípteros causadores de miíases: estrutura, função e perspectivas filogenéticas utilizando a região controle. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 101 p.

- Lessinger, A. C. and Azeredo-Espin, A.M.L. (2000). Evolution and structural organisation of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 14: 1-10.
- Lessinger, A. C. (2002). O genoma mitocondrial de moscas causadoras de miíases: sequência, organização e evolução. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 85 p.
- Lessinger, A. C.; Junqueira, A. C. M.; Conte, F. F. and Azeredo-Espin. The occurrence of a duplication in the mtDNA control region of *Chrysomya* species (Diptera: Calliphoridae) involving two tRNAs. Em preparação.
- Levinson, G. and Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (3): 203-221.
- Lewis, D. L.; Farr, C. L.; Farquhar, A. L. and Kaguni, L. S. (1994). Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 11(3): 523-538.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362: 709-715.

- Linhares, A. X. (1979). Sinantropia de dípteros muscóides de Campinas, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 25: 189–215.
- Linhares, A. X. (1981). Sinanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 35: 189–215.
- Litjens, P.; Lessinger, A. C. and Azeredo-Espin, A. M. L. (2001). Characterization of the screem flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Medical and Veterinary Entomology*, 15: 183–188.
- Lomônaco, C. and Almeida, J. R. (1995) Sazonalidade e uso de recursos para alimentação e oviposição de dípteros muscóides na restinga de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 39 (4): 883–890.
- Lowe, T. (1997). tRNAscan-SE: a program for improved transfer RNA detection in genomic sequence (release: 1.1). User manual.
- Martin, A. P. (1995). Metabolic rate and directional nucleotide substitution in animal mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 1124–1131.

- Miyaki, C. Y.; Russo, C. A. M. and Pereira, S. L. (2001). Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia, in Matioli, S. R. (ed). *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, SP, pp: 97–107.
- Monnerot, M.; Solignac, M. and Wolstenholme, D. R. (1990). Discrepancy in divergence of the mitochondrial and nuclear genomes of *Drosophila teissieri* and *Drosophila yakuba*. *Journal of Molecular Evolution*, 30: 500–508.
- Mooney, H. A. and Cleland, E. E. (2001). The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98 (10): 5446–5451.
- Nardi, F.; Carapelli, A.; Fanciulli, P. P.; Dallai, R.; Frati, F. (2001). The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetradontophora bielensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1293–1304.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, New York, 333 p.

- Pääbo, S. (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86: 1939–1943.
- Pääbo, S.; Higgs, R. G.; Wilson, A. C. (1989). Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 264(17): 9709–9712.
- Page, R. D. M. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357–358.
- Phillips, A. J. and Simon, C. (1995). Simple, efficient and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods. *Annals of Entomological Society of America*, 88, 281–283.
- Poinar, G.; Poinar, R. (1994). The quest for life in amber. Addison–Wesley Publishing Company, Menlo Park, California.
- Pont, A. C. (1980). Family Calliphoridae, in *Catalogue of the Diptera of the Afrotropical region*. London, Flectcher and Ltd. Norwich. 1437 pp.

- Post, K.; Riesner, D; Walldorf, V.; Mehlhorn, H. (1999). Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. *Lancet*, 354 (9194): 1969–1970.
- Pusch, C. M.; Giddings, I.; Scholz, M. (1998). Repair of duplex DNA from prehistoric samples using *Escherichia coli* DNA polymerase I and T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Research*, 26(3): 857–859.
- Roy, M. S.; Girman, D. J.; Taylor, A. C.; Wayne, R. K. (1994). The use of museum specimens to reconstruct the genetic variability and relationships of extinct populations. *Experientia*, 50: 551–557.
- Rozas, J. and Rozas, R. (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15: 174–175.
- Saccone, C.; de Giorgi, C.; Gissi, C.; Pesole, G. and Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238: 195–209.
- Sakai, A. K.; Allendorf, F. W.; Holt, J. S.; Lodge, D. M.; Molofsky, J.; With, K. A.; Baughman, S.; Cabin, R. J.; Cohen, J. E.; Ellstrand, N. C.; McCauley, D. E.; O’Neil, P.; Parker, M.; Thompson, J. N. and Weller, S. G. (2001).

The population biology of invasive species. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 32: 305–332.

Salviano, R. J. ; Mello, R.P. ; Santos, R. F. S. ; Beck L. C. N. H. ; Ferreira A. (1996). Calliphoridae (Diptera) associated with human corpses in Rio de Janeiro, Brazil. *Entomologia y Vectores*, 3 (5): 145–146.

Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sax, D. F. and Brown, J. H. (2000). The paradox of invasion. *Global Ecology and Biogeography*, 9: 363–371.

Shadel, G. S. and Clayton, D. A. (1993). Mitochondrial Transcription Initiation: Variation and Conservation. *Journal of Biological Chemistry*, 268(22): 16083–16086.

Shewell, G. E. (1987). Calliphoridae, in *Manual of Nearctic Diptera. Research Branch Agriculture Canada*, 2: 1133–1145.

Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Lin, H.; Flook, P. (1994). Evolution, Weighting and Phylogenetic utility of DNA sequences and

compilation of conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of Entomological Society of America*, 87(6): 651–701.

Souza, A. M. de & Linhares, A. X. (1997). Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Medical and Veterinary Entomology*, 11: 8–12.

Stevens, J. and Wall, R. (2001). Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Science International*, 120: 116–123.

Swofford, D. L.; Olsen, G. J.; Wadell, P. J. and Hillis, D. M. (1996). Phylogenetic inference, in Hillis, D. M.; Moritz, C. and Mable, B. K. (ed). *Molecular Systematics*, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 407–504.

Swofford, D. L. (2000). *Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods* (software). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Tamura, K. (1992). The rate and pattern of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 814–825.

- Taylor, M. F. J.; McKechnie, S. W.; Pierce, N. and Kreitman, M. (1993). The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 10(6): 1259–1272.
- Thomas, R. H. (1994). Analysis of DNA from natural history museum collections. *EXS*, 69: 311–321.
- Thomas, W. K. and Pääbo, S. (1993). DNA sequences from old tissue remains. *Methods in Enzymology*, 224: 406–419.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. and 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.
- Tsutsui, N. D.; Suarez, A. V.; Holway, D. A. and Case, T. J. (2000). Reduced genetic variation and success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97 (11): 5948–5953.
- Van der Putten, W. H. (2002). How to be invasive. *Nature*, 417: 32–33.

- Villablanca, F. X.; Roderick, G. K. and Palumbi, S. R. (1998). Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Molecular Ecology*, 7 (5): 547–560.
- Wallman, J. F. and Donnellan, S. C. (2001). The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Science International*, 120: 60–67.
- Wells, J. D. and Sperling, F. A. H. (1999). Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 36 (3): 222–226.
- Wells, J. D. and Sperling, F. A. H. (2001). DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120: 110–115.
- Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology*, 141: 173–216.
- Xia, X. (1996). Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. *Genetics*, 144: 1309–1320.

Zhang, D.-X and Hewitt, G. M. (1997). Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25 (2): 99–120.

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