

LILIAN CASTIGLIONI RUIZ

Caracterização Molecular de Populações de  
*Haematobia irritans* (Mosca - do - Chifre), pela  
Técnica de RAPD - PCR

1910001011



UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

*Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas*

Programa de Pós-graduação em Genética

---

LILIAN CASTIGLIONI RUIZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE  
*Haematobia irritans* (MOSCA-DO-CHIFRE), PELA  
TÉCNICA DE RAPD-PCR



T 1011/01

Tese apresentada para obtenção  
do Grau de Doutor em Genética.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

---

São José do Rio Preto – SP  
2001

UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

*Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas*

Programa de Pós-graduação em Genética

---

LILIAN CASTIGLIONI RUIZ

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE  
*Haematobia irritans* (MOSCA-DO-CHIFRE), PELA  
TÉCNICA DE RAPD-PCR**



T 1011/01

Tese apresentada para obtenção  
do Grau de Doutor em Genética.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

---

São José do Rio Preto – SP  
2001

X 575:577.23  
R934c

Assunto CAPES:  
2.02.02.00 - 8 - Genética molecular  
e de microrganismos

Genética molecular

O Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,  
Área de Concentração em Genética, passou a denominar-se  
Programa de Pós-Graduação em Genética pela Resolução  
UNESP nº RU. 10/01 de 08/03/2001, DOE de 09/03/2001.

Ruiz, Lilian Castiglioni.

Caracterização molecular de populações de *Haematobia irritans*  
(mosca-do-chifre), pela técnica de RAPD-PCR / Lilian Castiglioni Ruiz.  
- São José do Rio Preto : [s.n.], 2001.

111 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Hermione Elly Melara de Campos Bicudo.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Instituto de  
Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Genética molecular 2. *Haematobia irritans*. 3. RAPD-PCR. 4.  
Polimorfismo. I. Bicudo, Hermione Elly Melara de Campos. II.  
Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e  
Ciências Exatas. III. Título

CDU - 575:577.23



LILIAN CASTIGLIONI RUIZ

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE  
*Haematobia irritans* (MOSCA-DO-CHIFRE), PELA TÉCNICA DE  
RAPD-PCR**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: .....

2º Examinador .....

3º Examinador .....

4º Examinador .....

5º Examinador .....

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, SP, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, com o auxílio-bolsa do CNPq e auxílio financeiro da FAPESP e CAPES.



Dedico este trabalho...

À minha pequena **Gabriela**, sublime manifestação Divina  
em minha vida, que, com seu sorriso sincero, me impulsiona a viver....

## AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, expresso minha sincera gratidão às pessoas que, durante o desenvolvimento do mesmo, estiveram presentes e contribuíram de diferentes formas para sua realização.

Minha eterna gratidão à querida orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Hermione Elly Melara de Campos Bicudo**, pelo seu entusiasmo, dedicação e amor à ciência, pelo exemplo de seriedade, por sua brilhante orientação, pela confiança em meu trabalho e, principalmente, pela gostosa convivência e preciosa amizade, com a qual muito aprendi.

Aos Professores Doutores **Alberto José Prioli e Gilson Pereira de Oliveira**, pelas valiosas sugestões e criteriosa análise da Pró-forma desta Tese e, também, pela solicitude em atender ao nosso convite.

Ao Prof. Dr. **Francisco Langeani Neto**, pelas valiosas sugestões, criteriosa avaliação da Pró-forma desta Tese, e pela sua prontidão em auxiliar na análise filogenética.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Lilian Madi-Ravazzi**, pela criteriosa análise da Pró-forma, pelo aprendizado da técnica de RAPD e, acima de tudo, pelo seu carinho, amizade e incentivo constante, durante os Cursos de Graduação e Pós-Graduação.

Ao Dr. **Felix Guerrero**, pesquisador do U.S. Livestock Insects Research Laboratory (Kerrville, Tx / E. U. A.), por gentilmente nos fornecer as amostras de DNA de *H. irritans* de Kerrville.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Ana Maria A. de Oliveira**, pelo precioso auxílio na coleta das moscas-do-chifre de Rio Branco, Acre.

Às Prof.<sup>as</sup> Dr.<sup>as</sup> **Maria Tercília V. de A. Oliveira, Marlene K. H. Kobayashi e Mary Itoyama**, exemplos de dedicação e entusiasmo à pesquisa, afetuosas amigas, presentes em todos os momentos desta investigação.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Maria Astride S. Corradi**, pela preciosa amizade e incentivo constante, pelo seu sorriso sincero e pelas vibrações positivas que muito me auxiliaram no término deste trabalho.



Ao Prof. Dr. **Carlos Roberto Ceron**, mestre e amigo, pelo seu amor à ciência, exemplo de seriedade e dedicação.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Cláudia Márcia A. Carareto**, pela colaboração inestimável no decorrer deste trabalho e, principalmente, na finalização do mesmo.

Aos **Professores do Departamento de Biologia**, pelos valiosos ensinamentos, pela convivência amigável e estímulos ao meu ingresso na vida acadêmica.

À **Direção** do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, pelo fornecimento dos recursos materiais.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial à secretária **Simone C. Fernandes**, pela presteza na realização de suas tarefas.

Aos funcionários **Nanci Q. A. Pereira**, **Oscar J. Marques** e **Rosana M. G. Ferro** (Seção de Pós-Graduação), **Márcio Santana da Silva** (Laboratório de Recursos Audiovisuais), **Maria do Carmo Junqueira** e **Elza M. Sato** (Biblioteca), pela eficiência na realização de suas funções e pelo carinho no atendimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Doutorado.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a finalização da parte experimental deste trabalho.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação, pela convivência amigável, solicitude e incentivo constante.

Agradeço, em especial, às minhas amigas e colegas de trabalho no laboratório, pela gostosa convivência: **Rita de Cássia S. Polezzi**, **Adriana P. Nascimento**, **Alessandra Laranja**, **Cássia C. de Oliveira** e **Ana Paula Fresche**.

Ao querido **Marcus A. Mendes Luz**, pelo seu carinho, preciosa amizade e presença inestimável na fase final desta investigação, com quem pude muito aprender, principalmente a enfrentar os desafios da vida com coragem e determinação.

Aos meus queridos **Priscila Belentani**, **Felipe Rafael Torres**, **Juliana Polachini de Castro** pela amizade e incentivo constante, sempre me



apoiando nas dificuldades surgidas durante a realização deste trabalho, com valiosas sugestões e me oferecendo seus ombros amigos.

Ao querido amigo **José Henrique dos Santos**, por sua amizade e sinceridade, sempre disposto a ajudar.

À minha eterna e preciosa amiga **Andréa Regina Baptista Rossit**, pelo seu amor, carinho e companheirismo, exemplo de amizade verdadeira, com a qual eu posso dividir todos os momentos da minha vida e muito aprender.

Aos meus queridos pais, **Edna Daniel Castiglioni** e **Duilio Castiglioni**, por todo seu amor, dedicação e sacrifício, sem os quais eu não poderia ter chegado até aqui. Principalmente à você, querida “**Vovó Nê**”, pelos preciosos cuidados com a nossa **Gabi**, minha eterna gratidão!

À nossa querida “**Tia Cassinha**”, pela sua pureza de coração, sempre disposta a ajudar!

À minha querida irmã **Luciane Castiglioni (Tatinha)**, a quem tanto amo, exemplo de coragem e perseverança, companheira de todas as horas!

Ao querido **Antonio Carlos Nobre Ruiz**, pelo seu carinho, compreensão e incentivo imprescindíveis, por ter me dado o maior tesouro que alguém pode ter na vida (a nossa **Gabi**), minha eterna gratidão!

À minha pequena filhinha **Gabriela Castiglioni Ruiz**, a florzinha mais preciosa do meu jardim!

Enfim, à todos vocês, meu muito obrigado, e...

...a **Deus**, pelo dom da vida.

“Que seria de nós, as criaturas humanas, se o Criador nos exigisse chegar à meta de um dia para o outro? Em todo empreendimento digno, tanto quanto em qualquer construção, entre o início e o acabamento da tarefa jazem, de permeio, o ideal e o serviço, a persistência e a esperança”

**Emmanuel**

“A vida, em todas as manifestações, é uma sucessão de testes e exames a que são submetidos os aprendizes da evolução”

*Joanna de Ângelis*

## SUMÁRIO

|             |                                                               |           |
|-------------|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I.</b>   | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                        | <b>1</b>  |
| I.1.        | <i>Haematobia irritans</i> .....                              | 1         |
| I.2.        | A Técnica de RAPD.....                                        | 3         |
|             | a. Histórico e princípio.....                                 | 3         |
|             | b. Vantagens e limitações da técnica.....                     | 8         |
|             | c. Aplicações da técnica de RAPD para estudos em insetos..... | 15        |
| I.3.        | Objetivos.....                                                | 21        |
| <b>II.</b>  | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                | <b>22</b> |
| II.1.       | Obtenção das amostras.....                                    | 22        |
| II.2.       | Extração do DNA genômico.....                                 | 25        |
| II.3.       | Deteção e quantificação do DNA nas amostras.....              | 26        |
| II.4.       | Oligonucleotídeos.....                                        | 26        |
| II.5.       | Condições para amplificação.....                              | 27        |
| II.6.       | Análise dos dados.....                                        | 29        |
|             | a. Cálculos dos Índices de Similaridades.....                 | 30        |
|             | b. Análise filogenética.....                                  | 31        |
| <b>III.</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                        | <b>33</b> |
| III.1.      | Padrão de bandas geradas por RAPD.....                        | 33        |
|             | a. <i>primer 51</i> .....                                     | 35        |
|             | b. <i>primer 54</i> .....                                     | 38        |
|             | c. <i>primer 60</i> .....                                     | 41        |
|             | d. <i>primer 78</i> .....                                     | 44        |
|             | e. <i>primer 81</i> .....                                     | 47        |
|             | f. <i>primer 83</i> .....                                     | 50        |
|             | g. <i>primer 88</i> .....                                     | 53        |
|             | h. <i>primer 91</i> .....                                     | 56        |



|                                            |            |
|--------------------------------------------|------------|
| i. <i>primer</i> 50-10.....                | 59         |
| j. <i>primer</i> 60-36.....                | 62         |
| III.2. Similaridade genética.....          | 70         |
| III.3. Análise filogenética.....           | 73         |
| IV. <b>DISCUSSÃO</b> .....                 | <b>82</b>  |
| V. <b>CONCLUSÕES</b> .....                 | <b>92</b>  |
| VI. <b>REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS</b> ..... | <b>94</b>  |
| VII. <b>RESUMO</b> .....                   | <b>108</b> |
| VIII. <b>ABSTRACT</b> .....                | <b>109</b> |
| ANEXO I.....                               | 110        |

## I. INTRODUÇÃO

### I.1. *Haematobia irritans*

*Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) é popularmente conhecida como a mosca-do-chifre. Díptero, da Família Muscidae, fêmeas e machos são hematófagos obrigatórios na fase adulta, parasitas do gado e como tal, causadores de sérios prejuízos econômicos (Campbell, 1976; Harvey & Launchbaugh, 1982; Kunz *et al.*, 1984; Byford *et al.*, 1999; Kaufman *et al.*, 1999).

Originária da Europa, a mosca-do-chifre foi introduzida nos Estados Unidos no século XVIII, de onde se difundiu para toda América do Norte e algumas áreas da América Central e do Sul, chegando ao Brasil por Roraima, em 1978, provavelmente vinda da Venezuela (Valério & Guimarães, 1983). Invadiu o Estado de São Paulo alastrando-se rapidamente. Aproximadamente 6 meses após a denúncia do primeiro foco, mais de uma centena de outros já haviam aparecido, só na região de São José do Rio Preto.

A mosca-do-chifre apresenta de 2 a 3 mm de comprimento, localizando-se preferencialmente nas regiões dos chifres (daí seu nome), cervical e dorso-lombar, deslocando-se para a região ventral do animal nos horários de sol forte. Uma de suas características é ficar pousada sempre de cabeça para baixo. Após o acasalamento, a fêmea deposita os ovos maduros em fezes bovinas frescas quando estas ainda estão quentes (menos de 15 minutos após a evacuação). Os ovos são depositados em pequenas fissuras nessas fezes, sendo que o número médio de ovos por postura varia entre 10 e 15. Cada fêmea tem a capacidade de depositar de 300 a 400 ovos durante o seu ciclo de vida. O período de



### Introdução

desenvolvimento de ovo a adulto leva de 10 a 14 dias, dependendo da temperatura do ambiente. A eclosão dos ovos leva entre 14 e 24 horas, o estágio larval entre 5 e 7 dias e o pupal, cerca de 5 dias, em média. Nas fezes, os insetos em desenvolvimento passam pelas fases de larva, pupa e emergem como adultos, cuja longevidade pode variar em torno de 28 dias (Guimarães, 1983; Campbell & Thomas, 1992).

Os prejuízos causados à pecuária pela mosca-do-chifre tornaram-na objeto de muitos estudos, principalmente relacionados com os problemas das altas taxas de infestações no gado e com o uso de inseticidas visando ao seu controle (Drummond *et al.*, 1988; Guglielmone *et al.*, 1999; Jonsson & Mayer, 1999; Kaufman *et al.*, 1999; Guglielmone *et al.*, 2000; Pruett *et al.*, 2000; Barros, 2001; Barros *et al.*, 2001).

Com o objetivo de analisar a variabilidade genética das populações de *H. irritans*, Castiglioni-Ruiz *et al.*, (1997) estudaram o padrão de bandas esterásicas em quatro populações brasileiras dessa mosca, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram observadas oito bandas esterásicas, denominadas EST 1 a EST 8, a partir da extremidade anódica do gel. Quando comparado com o observado em moscas de outros gêneros, esse número é considerado pequeno, o que pode ser compatível com o modo de vida da mosca, parasítico e dependente inteiramente de sangue para alimentação. Também, diferentemente de outras espécies, nas quais as bandas esterásicas exibem afinidade aos substratos  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetatos (sendo classificadas como  $\alpha$  e  $\beta$  esterases), as esterases de *H. irritans* hidrolisam preferencialmente o  $\alpha$  naftil-



### Introdução

acetato, sendo denominadas bandas  $\alpha$ . As esterases (hidrolases de ésteres carboxílicos, E.C.3.1.1) pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente os ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar, também, sobre outros substratos que contenham ligações amidas. Nos insetos essas enzimas estão envolvidas não só em processos digestivos (Argentine & James, 1995), mas também em outras atividades fisiológicas, como a regulação dos níveis de hormônio juvenil (Kort & Cranger *et al.*, 1981) e a resistência a inseticidas (Fournier *et al.*, 1992; 1993).

Castiglioni-Ruiz *et al.* (1997) verificaram ainda que, as quatro populações de *H. irritans* eram muito semelhantes com relação às suas bandas esterásicas, diferindo somente pelas bandas EST 2 e EST 7, ambas encontradas exclusivamente em uma população.

Dando continuidade à análise da variabilidade genética das populações de *H. irritans*, no presente trabalho foi empregada a técnica de RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA-PCR*) para caracterizar a diversidade genética de amostras de *H. irritans* que foram coletadas em diferentes localidades. Por esta técnica poder-se-ia analisar diretamente o DNA das mesmas.

## I.2. A Técnica de RAPD

### a. Histórico e princípio

Com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismos genéticos diretamente ao nível de DNA, os quais permitem a obtenção de um grande número de marcadores



cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores são tecnicamente denominados “marcadores moleculares” e podem ser utilizados para diversas aplicações, como estudos evolutivos, ecológicos, filogenéticos e taxonômicos (Lynch & Milligan, 1994; Reineke & Zebitz, 1999).

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos genéticos e evolutivos, apresentando vantagens significativas quando comparados com técnicas de análise de proteínas, tais como o fato da análise do genótipo ser mais informativa do que a do fenótipo, uma ou mais seqüências apropriadas podem ser selecionadas com base na taxa evolutiva ou modo de herança, os métodos podem, na maioria das vezes, ser utilizados para qualquer tipo de DNA, este pode ser obtido de pequenas quantidades de tecido e é relativamente estável (Williams *et al.*, 1993).

O desenvolvimento na área de marcadores moleculares tem sido rápido. A tecnologia de DNA recombinante e a possibilidade de amplificação de segmentos de DNA via PCR (Mullis & Faloona, 1987) abriram caminho para uma mudança no paradigma genético básico da inferência do genótipo através do fenótipo, do qual Mendel foi pioneiro, para a análise genética direta da variação na seqüência de DNA (Beckmann, 1988).

Um avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada. Esta técnica foi desenvolvida, independentemente, por dois grupos de pesquisadores nos Estados



### Introdução

Unidos. Williams *et al.* (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais utilizado, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*, isto é, DNA polimórfico amplificado ao acaso). Welsh & McClelland (1990), por sua vez, propuseram outra denominação para a técnica, chamando-a de AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*), uma vez que os *primers* possuem sequência arbitrária mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos no genoma. Esta técnica também foi denominada DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), por Caetano-Anollés *et al.* (1991a; 1991b), para detectar diferenças genéticas entre organismos.

A técnica de RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com algumas características distintas: utiliza como *primer* um único oligonucleotídeo, contendo de 9 a 10 bases, ao invés de um par de *primers*, e sua sequência é construída aleatoriamente, o que resulta na amplificação de uma sequência alvo desconhecida, daí serem chamados de *primers* aleatórios ou arbitrários. Entretanto, podemos encontrar trabalhos mais recentes na literatura, que utilizam *primers* maiores (20 bases) para obtenção de dados sobre sequências específicas, pela técnica de RAPD (Guerrero *et al.*, 1997).

Para que haja amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado, duas sequências de DNA complementares ao *primer* arbitrário devem estar suficientemente adjacentes e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser diretamente visualizado na forma de uma banda no gel de eletroforese. A

### Introdução

eletroforese é geralmente conduzida em gel de agarose e a visualização é feita com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. Alternativamente, géis de poliacrilamida podem ser utilizados e as bandas visualizadas por autoradiografia (AP-PCR) ou coloração com nitrato-de-prata. Cada *primer* arbitrário utilizado dirige a síntese de vários segmentos de DNA, simultaneamente, em diversos pontos do genoma, resultando em várias bandas no gel (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

O polimorfismo produzido pela técnica de RAPD aparece sob a forma de presença ou ausência de fragmentos ou bandas no gel e sua natureza molecular não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações em ponto) são suficientes para causar a não complementariedade do *primer* com o sítio de iniciação (*priming site*) e assim impedir a amplificação de um segmento (Williams *et al.*, 1990; Caetano-Anollés, 1996).

Teoricamente, o número de marcadores RAPD amplificados e visualizados na eletroforese depende exclusivamente do comprimento do *primer* utilizado e do tamanho e complexidade do genoma analisado. A frequência de amplificação de um segmento depende da probabilidade do *primer* utilizado encontrar duas seqüências complementares (sítios de iniciação) em orientação oposta ao longo do DNA e a uma distância amplificável. A frequência esperada de sítios de amplificação arbitrária num genoma de uma certa complexidade pode assim ser teoricamente calculada, de maneira que uma relação linear entre a complexidade do genoma e o número de bandas é esperada. Dados experimentais



### Introdução

têm mostrado, entretanto, que o número de bandas obtido é independente da complexidade do genoma. Ou seja, o número de bandas amplificadas a partir de genomas mais simples é semelhante àquele amplificado a partir de genomas mais complexos (Williams *et al.*, 1990). Um certo grau de não complementariedade (*mismatch*), entre o *primer* e o sítio de iniciação no DNA molde, deve ocorrer para que o mesmo número de segmentos seja amplificado em dois genomas. No ensaio RAPD, portanto, a competição que ocorre entre seqüências amplificadas, simultaneamente, é um aspecto fundamental da técnica. A reação RAPD favorece a amplificação de segmentos onde a complementariedade entre o *primer* e o sítio de iniciação no DNA molde é mais alta.

Uma outra característica dos marcadores RAPD é a de serem herdados como marcadores dominantes. Este modelo de herança não permite diferenciar indivíduos heterozigotos e homozigotos dominantes sem cruzamentos subsequentes. Ao se observar uma banda no gel não é possível distinguir se aquele segmento originou-se a partir de uma ou de duas cópias da seqüência amplificada. Assim sendo, um indivíduo diplóide homozigoto para aquele loco RAPD é considerado como portador de dois alelos RAPD idênticos (AA), a partir dos quais a amplificação ocorre. Por outro lado, um indivíduo heterozigoto (Aa) para o mesmo loco RAPD possui um alelo (A) que é amplificado e outro (a) que não o é, devido a qualquer uma das causas de polimorfismo já mencionadas. A detecção dos segmentos RAPD não tem sensibilidade quantitativa suficiente para discriminar os dois casos. Por isso, enquanto o genótipo denominado como homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda no gel (fenótipo

### Introdução

nulo), os genótipos denominados de homozigotos dominantes (AA) e heterozigotos (Aa) são colocados juntos na mesma classe fenotípica, isto é, a presença da banda no gel (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Reineke *et al.*, 1999).

As aplicações da técnica de RAPD incluem: (1) a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, variedades e populações; (2) a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; (3) o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies; (4) a construção de mapas genéticos de alta resolução e a localização de genes de interesse econômico (Williams *et al.*, 1993; Hoey *et al.*, 1996).

#### b. Vantagens e limitações da técnica

Quando comparada com outras metodologias, a técnica de RAPD apresenta vantagens, que serão discutidas a seguir.

Diferentemente de outros métodos, a técnica de RAPD não necessita de trabalhos preliminares, como a construção de bancos genômicos, pois não requer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse, eliminando a necessidade de transferência de DNA para membranas (*Southern blot*) e a utilização de isótopos radioativos ou marcação não-radioativa. Um conjunto único de *primers* arbitrários pode ser utilizado para qualquer organismo. Os segmentos RAPD uma vez amplificados e separados por eletroforese podem ser isolados do gel, mantidos na forma de uma biblioteca genômica *in vitro* sem necessidade do uso de vetores, e amplificados via PCR,

sempre que necessário. Apresenta um custo mais baixo e uma relativa facilidade metodológica, quando comparada com outras técnicas (Reiter *et al.*, 1992; Haymer & McInnis, 1994). A técnica de RAPD necessita de apenas uma pequena quantidade de DNA para a análise genotípica de um indivíduo (Williams *et al.*, 1990). Consequentemente, numerosas reações podem ser feitas a partir do DNA de um único indivíduo. Isto permite, ainda, que sejam efetuados, paralelamente, outros estudos, como a análise cromossômica ou isoenzimática (Wilkerson *et al.*, 1995). Esta técnica tem sido aplicada quando a quantidade de DNA disponível é limitada, como por exemplo, em pequenos insetos (Hadrys *et al.*, 1992; Landry *et al.*, 1993). A extração de DNA pode, até mesmo, ser realizada a partir de uma única pata de um inseto, como aquela efetuada em *Aedes albopictus* por Kambhampati *et al.* (1992).

Uma outra vantagem desta técnica é que ela permite gerar uma grande quantidade de polimorfismos de segmentos de DNA, distribuídos pelo genoma, e, inclusive amostrar regiões de DNA repetitivo, uma vez que os *primers* utilizados para a detecção de variação são arbitrários, não havendo discriminação entre as regiões codificadoras e não-codificadoras do genoma. Segundo Haymer (1994), o uso de *primers* arbitrários para análises genéticas permite a obtenção de resultados relacionados a todas as partes do genoma, inclusive as que tradicionalmente têm sido difíceis de serem analisadas, como é o caso do DNA repetitivo. O termo DNA repetitivo descreve uma classe de seqüências de DNA encontradas em múltiplas cópias no genoma, variando de 10 a milhares e que pode ser encontrada em todos eucariontes, havendo espécies nas quais mais de

*Introdução*

50% do genoma consiste de seqüências de DNA repetitivo (Lohe & Roberts, 1988). Seqüências de DNA repetitivo predominam nas regiões heterocromáticas do genoma, as quais podem incluir cromossomos inteiros (como é o caso do cromossomo Y em algumas espécies) ou as regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos autossômicos e sexuais. Muitas vezes esta porção do genoma é negligenciada, em parte devido aos poucos genes “verdadeiros” que nela existem. Ainda segundo Haymer (1994), essas porções do genoma são mais apropriadas para certos tipos de análises do que os genes tradicionais. As forças evolutivas que atuam neste tipo de DNA parecem ser diferentes daquelas que atuam sobre as cópias de seqüências simples (genes). Em geral, com regiões de DNA não-codificadoras, os fenômenos de mutação e deriva genética assumem um papel maior na dinâmica populacional do que a seleção natural. A taxa de mutação neste tipo de DNA pode ser elevada; teoricamente qualquer modificação nucleotídica que ocorrer nos segmentos de DNA repetitivo não codificadores tem a chance de ser mantida. Assim, estas seqüências de DNA constituem um imenso reservatório de variabilidade genética. Os polimorfismos de DNA produzidos pela técnica de RAPD podem se originar a partir de seqüências repetidas, como podem também ser derivados de seqüências de cópias únicas. Em muitos casos onde os produtos RAPD foram clonados e melhor estudados, embora seqüências de cópias únicas tenham sido encontradas, verificou-se que muitas das mais importantes seqüências polimórficas eram derivadas de seqüências de DNA repetitivo (Williams *et al.*, 1990; Kazan *et al.*, 1992; Haymer & McInnis, 1994).



### *Introdução*

Nesta metodologia, o sucesso de uma reação e a sua repetibilidade podem ser dificultadas devido ao número de variáveis envolvidas: a temperatura de anelamento dos *primers* (Ellsworth *et al.*, 1993; Levi *et al.*, 1993); a duração entre os intervalos de transição de desnaturação, anelamento e extensão das cadeias de DNA (Yu & Pauls, 1992; Schweder *et al.*, 1995); a concentração e a qualidade do DNA molde a ser amplificado (Muralidharan & Wakeland, 1993; Davin-Regli *et al.*, 1995); a concentração de  $Mg^{2+}$  (Williams *et al.*, 1993); a sequência e a concentração do *primer* utilizado (Pan *et al.*, 1997); a concentração do dNTP (Stevens & Wall, 1997); a marca comercial da Taq polimerase utilizada, bem como a presença de possíveis contaminantes na mesma (Meunier & Grimont, 1993) e, ainda, o termociclador e o número de ciclos térmicos que será utilizado na reação da PCR (Penner *et al.*, 1993).

Diferentes estudos, como os citados acima, foram realizados afim de verificar a reprodutibilidade da técnica de RAPD e os autores concluíram que um alto nível de padronização e controle interno no laboratório é necessário para que os dados obtidos por esta metodologia possam ser analisados com confiabilidade e sejam reproduzíveis por outros laboratórios. Resultados errôneos podem ser produzidos se as condições ótimas de reação não forem previamente estabelecidas (Black IV, 1993).

Um outro problema que pode ser observado com esta técnica é a existência de produtos de amplificação inespecíficos, *primer*-derivados, em reações de controle negativo. Estas reações possuem todos os componentes necessários para a PCR, exceto o DNA molde (Pan *et al.*, 1997). Tais artefatos



*Introdução*

*primer*-derivados foram observados por alguns autores (Williams *et al.*, 1990; Lanham *et al.*, 1992; Tingey & del Tufo, 1993 e Castro & Madi-Ravazzi, 2000). Pan e colaboradores (1997) realizaram experimentos omitindo alguns componentes da reação e observaram que apenas quando o DNA molde e o *primer* foram omitidos, ou quando somente o segundo foi omitido, nenhum produto de amplificação foi observado. Segundo esses autores, a presença de tais produtos inespecíficos seriam amplificadas a partir de DNAs contaminantes dos conjuntos de *primers* ou da própria DNA polimerase. As causas da amplificação de produtos *primer*-derivados ainda são desconhecidas. Sabe-se apenas que a sua presença não é devida ao anelamento aleatório, uma vez que são relativamente grandes, variando de 200 a 2000 pb. Muitos são resistentes ao calor e recompõem sua estrutura de cadeia-dupla quando resfriados gradualmente, à temperatura ambiente e não são hibridizados por *Southern blotting* com nenhum produto de amplificação proveniente das amostras com DNA molde. Além disso, quando o DNA molde foi acrescentado na reação, nenhum desses produtos foi identificado, o que sugere que sua presença inibe a amplificação de produtos inespecíficos.

Meunier & Grimont (1993) também observaram a presença de produtos de amplificação, com seus controles negativos, em reações contendo um *primer* (Ap12h) com três marcas diferentes de DNA polimerases testadas. As três enzimas produziram bandas contaminantes em reações onde o DNA molde foi excluído. Os autores concluíram que estas enzimas estavam contaminadas com algum DNA externo. Outro aspecto discutido por eles é que este tipo de contaminação da Taq DNA polimerase pode produzir produtos de amplificação



influenciados também pela natureza dos *primers* utilizados, uma vez que a amplificação inespecífica pode ser mais freqüente em *primers* universais, como o Ap12h utilizado naquele estudo. Contudo, segundo esses autores, esta contaminação não afeta o padrão de bandas polimórficas obtido, pois nenhuma das bandas contaminantes foi equivalente (em pares de bases) às bandas RAPDs.

Como ocorre em todos os tipos de marcadores, no caso dos marcadores RAPDs, algumas bandas são fáceis e claramente interpretadas, enquanto outras são ambíguas. Essa ambiguidade pode resultar: (a) do baixo poder de um *primer* específico de discriminar entre sítios de amplificação distintos; (b) da competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima, de maneira que a presença de certos segmentos pode interferir na amplificação de outros (Williams *et al.*, 1990; Black IV *et al.*, 1992); (c) da amplificação inespecífica ou de formações de heteroduplex, ou seja, o emparelhamento entre alelos de natureza diferente (Ayliffe *et al.*, 1994); (d) ou ainda, de problemas relacionados com a padronização das condições de amplificação, já discutidos anteriormente.

Entretanto, muitos autores mostraram que, se as amplificações RAPD são repetidas várias vezes, a maioria dos marcadores são reproduzíveis e identificáveis (Haymer, 1994). E ainda, melhoramentos nos procedimentos de eletroforese, como a utilização de géis de agarose contendo baixo ponto de fusão (*Low Melting Point*), mais resolutiva, ou então um tempo de migração maior, podem eliminar algumas ambigüidades. O emprego do gel de poliacrilamida seguido de coloração com nitrato de prata e a utilização da marcação radioativa



### Introdução

dos fragmentos via PCR, utilizando-se  $P^{32}$ , pode, ainda, auxiliar na detecção de um número maior de bandas e esclarecer problemas relacionados às bandas ambíguas.

Outra limitação da técnica, a ser mencionada, é o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado (o segmento que é amplificado), enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo, exceção feita para alelos co-dominantes, resultantes de pequenas inserções ou deleções no loco RAPD. Genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos por esta técnica. Esta limitação é descrita como dominância dos marcadores RAPD, já mencionada anteriormente.

Por fim, existe ainda o problema das bandas que co-migram, ou seja, bandas que apresentam o mesmo tamanho em pares de bases, migram juntas no gel, mas que não são homólogas (Pillary & Kenny, 1995; Riesberg, 1996). Segundo dados da literatura, a utilização de bandas que apresentam este tipo de comportamento pode comprometer estudos taxonômicos e filogenéticos, mas estes problemas podem ser solucionados de várias formas: (a) utilizando-se géis de agarose de alta resolução; (b) isolando-se a banda em questão, do gel, e sequenciando-a em seguida; (c) digerindo-se as bandas, supostamente homólogas, com enzimas de restrição e comparando-se os perfis obtidos; (d) ou, ainda, através da autorradiografia e hibridização por *Southern blotting*. Um trabalho realizado por Pillary & Kenny (1995) em uma espécie de minhoca (*Humulus lupulus*) demonstrou que uma sonda marcada com  $P^{32}$ , obtida a partir de um único produto



### Introdução

de amplificação por RAPD e utilizado em experimentos de hibridização por *Southern blotting*, apresentou homologia com fragmentos que co-migravam no gel e com outros fragmentos que diferiam em tamanho quando comparados com a sonda utilizada. Em suas conclusões, esses autores comentam que a técnica de RAPD, combinada com experimentos de hibridização por *Southern blotting*, seria uma forma alternativa para elucidar os problemas de bandas que co-migram.

### c. Aplicações da técnica de RAPD para estudos em insetos

O fato desta técnica não necessitar de clonagem, sequenciamento de nucleotídeos ou hibridização, tem permitido a detecção de polimorfismos e marcadores genéticos em uma grande quantidade de organismos, incluindo bactérias, protozoários, plantas e animais, inclusive insetos (Wang & Paterson, 1994; Hunte & Page, 1995a; Apostol *et al.*, 1996; Cushing, 1998; Margaritopoulos *et al.*, 1998; Curtsinger *et al.*, 1998; Banuls *et al.*, 1999; Beeman & Brown, 1999; Abe *et al.*, 2000; Borges *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000; Scataglini *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2001).

Muitas ordens pertencentes à classe dos insetos já foram estudadas através da técnica de RAPD, com diferentes enfoques, entre os quais incluem-se estudos filogenéticos, taxonômicos, epidemiológicos, para a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, para a análise da estrutura e diversidade genética de populações, para a construção de mapas genéticos de alta resolução e em estudos relacionados à aquisição de resistência aos inseticidas. Muitas espécies têm sido estudadas e podemos destacar alguns organismos de importância médica,

---

*Introdução*

---

insetos vetores de doenças humanas, tais como o mosquito vetor da malária, *Anopheles* (Diptera: Culicidae; Gookol *et al.*, 1993; Favia *et al.*, 1994; Wilkerson *et al.* 1995; Manguin *et al.*, 1999), o mosquito vetor da dengue e da febre amarela, *Aedes* (Diptera: Culicidae; Ballinger-Crabtree *et al.* 1992; Sousa *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2000) e, o triatomíneo transmissor da Doença de Chagas, *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae; Garcia *et al.* 1998; Tavares, 1999; Borges *et al.*, 2000). Também insetos de interesse econômico utilizados para controle biológico, tais como as espécies pertencentes ao gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae; Landry *et al.*, 1993; Vanlerberghe-Masutti, 1994), insetos fitófagos, como *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae; Barro & Driver 1997) e *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae; Bournoville *et al.*, 2000), insetos hematófagos, como *H. irritans* (Diptera: Muscidae; Guerrero *et al.*, 1997), entre outros; e de importância genética, como as espécies pertencentes ao gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae).

Esta técnica mostrou-se bastante eficiente para a correta identificação dos mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles*, pré-requisito importante para estudos epidemiológicos, envolvendo o planejamento e a monitoração de programas de controle e erradicação, pois a capacidade vetorial destes mosquitos pode variar no mesmo complexo de espécies (Gookol *et al.*, 1993; Favia *et al.*, 1994; Manguin *et al.*, 1999). Wilkerson *et al.* (1995) utilizaram a técnica de RAPD, com sucesso, para distinguir quatro espécies crípticas do complexo *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*, distribuídos no Brasil, Paraguai e Argentina.

---

*Introdução*

---

Ballinger-Crabtree *et al.* (1992) conseguiram, pela técnica de RAPD, diferenciar duas subespécies do gênero *Aedes* (*Aedes aegypti aegypti* e *Aedes aegypti formosus*). Em suas conclusões, esses autores também enfatizam a utilização da técnica de RAPD para a identificação individual de mosquitos, de populações e de subespécies, para elucidar problemas que envolvem taxonomia molecular e para a obtenção de dados relacionados com estudos epidemiológicos.

Outros insetos que foram estudados por RAPD são espécies de triatomíneos, tradicionalmente identificadas utilizando-se critérios morfológicos. Entretanto, existem problemas taxonômicos, que ainda permanecem. Garcia *et al.* (1998) utilizaram a técnica de RAPD para diferenciar dez espécies desses organismos, atestando, novamente, a capacidade dos marcadores obtidos via RAPD-PCR para a resolução de problemas de identificação de espécies intimamente relacionadas.

O hemíptero *Bemisia tabaci*, também conhecido como mosca branca, é uma praga que tem causado muitos danos em culturas de algodão, alface e hortaliças, pois, além de ser um parasita fitófago, também é capaz de transmitir algumas viroses para as plantas. Sua identificação taxonômica é muito problemática, pois esta espécie é altamente polimórfica, com extrema plasticidade dos caracteres morfológicos-chaves, que variam conforme o hospedeiro, apresentando vários biótipos. Na Austrália, foram encontrados o biótipo B (que também é encontrado em outros países) e um segundo biótipo, o nativo. Ambos apresentam distribuição geográfica semelhante, na Austrália, e partilham vários hospedeiros, mas o tipo B é muito mais difícil de ser controlado e é mais

---

*Introdução*

---

resistente aos inseticidas utilizados para esse fim. As moscas brancas são identificáveis utilizando-se características do casulo pupal de quarto estágio. Entretanto, não existem características que possam distinguir esses dois biótipos na fase adulta. Além disso, uma outra espécie de mosca branca, *T. vaporariorum*, em sua fase adulta, pode ser confundida com *B. tabaci*. Barro & Driver (1997) utilizaram a técnica de RAPD para distinguir esses organismos, em espécimes recém coletadas e em espécimes preservadas em álcool 70% e 100%. Os resultados obtidos com um dos *primers* utilizados permitiram a clara separação do biótipo B dos demais e, também, da outra espécie de mosca branca analisada. Foram gerados padrões de RAPD distintos, tanto para os espécimes recém coletados quanto para os fixados em álcool, comprovando a eficácia desta técnica para este tipo de estudo e, inclusive, permitindo a análise de espécimes mantidos em coleções.

*Drosophila azteca* e *D. athabasca* são espécies muito próximas, pertencentes ao grupo *obscura*. *D. athabasca* é uma espécie nativa largamente distribuída na América do Norte. Na tentativa de efetuar a identificação, estimar o tempo de divergência entre estas espécies e compreender melhor alguns aspectos relacionados com a colonização daquele continente, por estas espécies, Pascual *et al.* (1997) utilizaram conjuntamente isoenzimas, o DNA mitocondrial e a técnica de RAPD. Comparando os resultados obtidos, estes autores puderam estimar o tempo de divergência entre as duas espécies, que deve ter ocorrido entre 2,5 e 5,8 milhões de anos, se o tempo de separação do grupo *obscura* e do grupo *melanogaster* ocorreu há 20,6 ou há 46 milhões de anos. Estas duas espécies

### Introdução

podem se cruzar no laboratório, mas produzem descendentes estéreis. A técnica de RAPD revelou altos índices de similaridade entre as mesmas, mas, segundo os autores, um número maior de indivíduos deve ser analisado, a fim de se obter mais dados que possam elucidar as questões relacionadas com a filogenia destas duas espécies irmãs.

Castro & Madi-Ravazzi, (2000) realizaram um estudo para avaliar o potencial taxonômico da técnica de RAPD para espécies de *Drosophila* pertencentes ao grupo *buzzatii*, uma vez que existem aspectos intrigantes relacionados com seu processo de especiação. Para isto, foi realizada a amplificação do DNA genômico individual de três linhagens de *D. buzzatii* (3B, D69R5 e D69R2, nativas na América do Sul), duas de *D. seriema* (A95F3 e D72M, restrita à cadeia do Espinhaço, no nordeste brasileiro), duas de *D. koepferae* (B20D2 e B25D7, da Argentina e Bolívia), e duas linhagens de *D. serido* (tipo B: A55F11; e tipo D: B31D1, que são assim classificadas de acordo com a morfologia do edeago, sendo encontradas no nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil). As autoras utilizaram três *primers* para gerar os fragmentos RAPDs. No total, foram produzidas 99 bandas que variaram de 290 a 5090 pb de comprimento. Também foram observados fragmentos de DNA linhagem-específicos e espécie-específicos, produzindo um padrão característico de bandas que permitiu reconhecer as diferentes linhagens e espécies. Quando foram realizadas as análises do Índice de Similaridade e de *cluster*, confirmaram-se as relações de proximidade obtidas por outros marcadores para essas linhagens, reforçando a diferenciação das linhagens de *D. serido* tipo B e tipo D em relação



### *Introdução*

às demais espécies do grupo. Esses resultados reforçam a idéia de eficiência da técnica de RAPD, para estudos taxonômicos. Os resultados também aproximaram a linhagem A55 (*D. serido* tipo B), do cerrado brasileiro, com linhagens de *D. koepferae*, do Chaco Argentino. Esse fato, porém, não havia sido observado com nenhum outro marcador.

A técnica de RAPD tem sido utilizada, também, para produzir marcadores moleculares que possam identificar indivíduos e, conseqüentemente, populações resistentes aos inseticidas. Particularmente nos insetos vetores de doenças, pragas agrícolas e de animais, o fenômeno de aquisição de resistência a certos inseticidas constitui um sério problema, enfrentado com dificuldades pelos programas de erradicação destes organismos. Há ainda, que considerar os problemas relacionados ao uso excessivo de inseticidas, contaminando o ambiente, pois o desenvolvimento de resistência exige a aplicação de inseticidas cada vez mais potentes em sua ação.

A técnica foi utilizada por Guerrero *et al.* (1997) e permitiu produzir marcadores capazes de diferenciar populações susceptíveis, resistentes e super resistentes a inseticidas piretróides

Assim, a abrangência das aplicações da técnica RAPD e a contribuição ao avanço do conhecimento científico, que dela tem advindo, justificam, ao nosso ver, a continuidade de seu uso e a busca de seu aprimoramento.



---

### I.3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da variabilidade genética existente em populações de *Haematobia irritans*, que foram coletadas em quatro localidades brasileiras, e da diferenciação genética das mesmas, utilizando a técnica de RAPD. Foi também analisado o DNA de uma população americana considerada resistente a inseticidas, mantida em laboratório sob pressão de seleção. A análise desse DNA faz parte de uma tentativa de obter dados que possam, futuramente, com a amplificação do número de linhagens analisadas, auxiliar na elucidação da origem geográfica das populações que colonizaram o Brasil, uma vez que existem dúvidas a respeito da mesma.



## II. MATERIAL E MÉTODOS

### II.1. Obtenção das amostras

O DNA analisado foi obtido de amostras de *H. irritans* adultas, procedentes de quatro localidades brasileiras e de uma localidade norte-americana, conforme consta da **Tabela 1**. A localização geográfica das amostras brasileiras pode ser visualizada na **Figura 1**.

Para obtenção das moscas, utilizou-se um puçá feito com tecido de *nylon*, em forma de funil, tendo na base um reforço em forma tubular, fechado no fundo. As moscas foram coletadas movendo-se o puçá, rapidamente para a direita e para a esquerda, sobre o gado imobilizado em um brete de contenção e, em seguida, fechava-se o puçá com uma das mãos na região imediatamente acima da parte tubular reforçada. Após a coleta, as moscas eram cuidadosamente transferidas para vidros de 1/4 de litro ou pequenos tubos de vidro e levadas ao laboratório, onde foram separadas por sexo e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise.

No presente estudo, foi utilizado o DNA genômico individual de 30 machos, de cada localidade. Optou-se por analisar apenas os machos, uma vez que as moscas foram coletadas na natureza e as fêmeas poderiam conter espermatozóides em suas spermatecas ou, ainda, conter muitos ovos, cujo DNA poderia comprometer nossas análises individuais.

Com o objetivo de auxiliar a análise dos dados obtidos com a técnica de RAPD, foi incluída uma amostra de *Drosophila prosaltans* (Dp), utilizada como grupo externo. Para isto, foi extraído o DNA genômico

**Tabela 1.** Origem geográfica das amostras de *H. irritans* analisadas no presente estudo.

| Origem                       | Notação |
|------------------------------|---------|
| São José do Rio Preto, SP/Br | SJRP    |
| Turiúba, SP/Br               | Tu      |
| Cassilândia, MS/Br           | Ca      |
| Rio Branco, Ac/Br            | RB      |
| Kerrville*, Tx/E.U.A.        | Ker     |

\*Amostra de DNA genômico de *H. irritans*, obtida através do Dr. Felix Guerrero, pesquisador do U.S. Livestock Insects Research Laboratory (Kerrville, Tx / E. U. A.).



**Figura 1.** Mapa da localização das populações de *H. irritans* analisadas no presente estudo. Legenda: 1. Rio Branco ( $9^{\circ}97'47''\text{S}/67^{\circ}81'00''\text{W}$ ); 2. Cassilândia ( $19^{\circ}11'33''\text{S}/51^{\circ}73'41''\text{W}$ ); 3. Turiúba ( $20^{\circ}93'33''\text{S}/50^{\circ}10'75''\text{W}$ ); 4. São José do Rio Preto ( $20^{\circ}81'97''\text{S}/49^{\circ}37'94''\text{W}$ ).

### *Material e Métodos*

de 30 machos adultos, mantidos no estoque do Departamento de Biologia deste Instituto, o qual foi amplificado para os mesmos *primers* utilizados na análise das moscas-do-chifre.

## **II.2. Extração do DNA genômico**

O protocolo de extração de DNA genômico, a partir de um único indivíduo, seguiu a técnica descrita por Dellaporta *et al.* (1983), com algumas modificações.

Em cada *eppendorf* foi colocado um macho de *H. irritans*, previamente congelado. Em seguida, foram adicionados 160µl da Solução I fria (Tris 10mM, NaCl 60mM, Sacarose 5%, EDTA 10mM, pH 7,8), onde o mesmo foi macerado, com o auxílio de um bastão de vidro. Após este procedimento, foram adicionados 200µl da Solução II (Tris 300 mM, SDS 1,25%, Sacarose 5%, EDTA 10 mM, pH 8,0), por *eppendorf*. Os *eppendorfs* foram agitados por inversão várias vezes e incubados a 65°C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 60µl de acetato de potássio (3M, pH 5,0) e as amostras foram novamente agitadas por inversão. Em seguida, estas foram colocadas durante 20 minutos a -20°C, centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novos *eppendorfs*. Uma segunda centrifugação foi realizada, por 10 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para outro *eppendorf* e foi adicionado o mesmo volume de isopropanol. Os *eppendorfs* foram então agitados por inversão e mantidos 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm e o



### *Material e Métodos*

sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 500µl de etanol 70%, em cada *ependorff*, centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Após a extração, os *ependorfs* foram colocados em estufa a 37°C, por 15 minutos, para a secagem do DNA, o qual foi ressuspenso posteriormente em 100µl de Tampão TE (Tris HCl 10 Mm, EDTA 1 mM, pH 8,0) e armazenado a -20°C. Durante os procedimentos descritos acima, sempre que possível, os *ependorfs* permaneceram acondicionados no gelo.

### **II.3. Detecção e quantificação do DNA nas amostras**

Com o objetivo de verificar a qualidade do DNA extraído e padronizar sua quantidade para uso na amplificação via PCR, após a extração foi realizada uma análise quantitativa e qualitativa do mesmo através da leitura em espectrofotômetro, utilizando-se  $\lambda=260$  nm para a leitura da absorbância do DNA e  $\lambda=280$  nm para proteínas. Para a leitura, foram retirados 10µl de cada amostra de DNA e diluídos em 490µl de água MilliQ (autoclavada) e, com base na absorbância obtida, foi calculada sua concentração (ng/µl) e a razão DNA/proteína. A partir destes dados, as amostras foram diluídas de tal forma que, cada reação de amplificação por PCR continha 25 ng de DNA por µl.

### **II.4. Oligonucleotídeos**

Os oligonucleotídeos decâmicos que foram utilizados no presente estudo foram produzidos, inicialmente, pelo laboratório Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Vancouver, B.C., Canadá, e depois



### *Material e Métodos*

sintetizados no Brasil e adquiridos da UltraChem. Foram preparadas soluções de trabalho de 15µM de cada *primer*, em tampão Tris/EDTA, as quais foram mantidas a -20°C. Na **Tabela 2** estão relacionadas as seqüências de nucleotídeos dos *primers* testados no presente estudo. Foi realizado um *screening* com 23 *primers* e, destes, selecionados 10, por apresentarem boa repetibilidade e polimorfismos entre as populações.

#### **II.5. Condições para amplificação**

O DNA genômico foi amplificado seletivamente por PCR, segundo protocolo descrito por Williams *et al.* (1990), com algumas modificações.

Para o preparo das amostras a serem amplificadas, foi feita, inicialmente, uma mistura de reagentes contendo: 20 mM de Tampão (Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de *primer*, 2,5 U de Taq polimerase (Gibco BRL) e água MilliQ autoclavada. Em seguida, esta mistura foi distribuída em *ependorfs* e foram acrescentados 25 ng de DNA genômico, em uma reação final que continha 25 µl, onde foram adicionados 40 µl de óleo mineral. Para cada reação foi realizado um controle negativo, isto é, sem a presença de DNA. A reação de PCR foi efetuada em um termociclador *MJ Research Minicycler*. O primeiro ciclo foi de 3 minutos a 94°C, o qual é responsável pela inativação de possíveis proteases que possam interferir na reação enzimática. Em seguida, foram utilizados 45 ciclos de amplificação, com os



Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos *primers* testados no presente trabalho.

| <i>Primer</i> | Seqüência     |
|---------------|---------------|
| 51*           | CTA CCC GTC C |
| 53            | CTC CCT GAG C |
| 54*           | GTC CCA GAG C |
| 55            | TCC CTC GTG C |
| 58            | TTC CCG GAG C |
| 60*           | TTG GCC GAG C |
| 64            | GAG GGC GGG A |
| 66            | GAG GGC GTG A |
| 73            | GGG CAC GCG A |
| 76            | GAG CAC CAG T |
| 78*           | GAG CAC TAG C |
| 81*           | GAG CAC GGG G |
| 82            | GGG CCC GAG G |
| 83*           | GGG CTC GTG G |
| 87            | GGG GGG AAG C |
| 88*           | GGG GGG ATG G |
| 91*           | GGG TGG TTG C |
| 92            | CCT GGG CTT T |
| 96            | GGC GGC ATG G |
| 99            | ATC CCC TGG G |
| 100           | ATC GGG TCC G |
| 50-10*        | CCA TTT ACG C |
| 60-36*        | GTA GCC ATG G |

\* *primers* que foram selecionados e empregados no presente estudo



### *Material e Métodos*

seguintes passos: 30 segundos a 94°C, para a desnaturação do DNA, 1 minuto a 35°C para o anelamento dos *primers* e 2 minutos a 72°C o que permitiu a extensão das cadeias. Um último ciclo de 5 minutos a 72°C foi necessário para a extensão final das cadeias com fita simples, em suas extremidades.

Após a amplificação, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a uma voltagem de 70V, por aproximadamente 2:30 horas. O gel foi preparado com tampão TAE 1X (Tris-acetato 4mM, EDTA 1mM, pH 8,5), corado com brometo de etídio, visualizado em um transluminador UV e fotografado em filme *Polaroide* 667. O marcador de peso molecular utilizado foi o *DNA Ladder* 1Kb (GIBCO BRL), do qual foi aplicado 1 µl, sempre na primeira canaleta, da esquerda para a direita. Nas demais canaletas, foram aplicados 15 µl do produto amplificado, incluindo os controles negativos. Em todas as amostras foi previamente adicionado o tampão de aplicação (40% sacarose, 0,05% azul de bromofenol).

#### **II.6. Análise dos dados**

Cada indivíduo estudado das amostras brasileiras, teve seu DNA extraído e examinado da mesma forma que o recebido dos Estados Unidos, para cada um dos *primers* utilizados. Os fragmentos obtidos através da amplificação do DNA pela técnica de RAPD, foram analisados quanto à presença e ausência no gel, e, também, quanto à sua frequência, separadamente, para cada um dos 10 *primers* utilizados no presente estudo. Bandas com 100% de frequência foram consideradas monomórficas.



### ***Material e Métodos***

As fotografias dos géis foram reproduzidas em papel milimetrado, para todos os indivíduos analisados. Os fragmentos foram selecionados e numerados da extremidade mais negativa para a menos negativa do gel. Foram consideradas, para fins de análise, todas as bandas nítidas, desde que presentes em frequência maior ou igual a 10%.

O tamanho de cada fragmento foi estimado em pares de bases, obtidos através do cálculo da distância entre o fragmento e a banda do DNA marcador (*DNA ladder*) mais próxima.

#### **a. Cálculo dos Índices de Similaridades**

Para o cálculo dos Índices de Similaridade entre as populações, foi utilizado o método descrito por Nei & Li (1979), utilizando-se a fórmula  $S_{xy} = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ , onde:

- $N_{xy}$  = número de bandas comuns entre x e y (populações comparadas);
- $N_x$  = número de bandas presentes em x;
- $N_y$  = número de bandas presentes em y.

Os valores deste índice podem variar de 0 (nenhuma banda compartilhada entre as populações) a 1 (completa identidade entre as populações). Os mesmos foram calculados separadamente, para cada *primer*, e, também, considerando-os em conjunto. Este último foi obtido através do cálculo das médias dos Índices de Similaridade obtidos separadamente, para cada *primer*, em cada população analisada.



### b. Análise filogenética

Para a análise filogenética, com base nos resultados dos *primers* avaliados discretamente, foi construída uma matriz, de forma que o valor “1” representasse a presença da banda no gel, e “0”, a ausência da mesma, em cada população (ANEXO I). Foi utilizado o algoritmo *neighbor-joining* do programa PAUP 4.0 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, versão beta; Swofford, 2001) e aplicado o método de *bootstrap*, com 100 réplicas.

A parcimônia é hoje, provavelmente, o algoritmo de construção de árvore filogenética mais utilizado. Ele trabalha procurando a árvore que pode explicar as seqüências observadas com o número mínimo de substituições (Durbin *et al.*, 1998).

O *bootstrap* é uma medida de quanto a(s) árvore(s) podem ser confiáveis. Seu uso foi sugerido por Felsenstein (1985, *apud* Durbin *et al.*, 1998), como um método que mede a significância de alguma característica filogenética, tal como a segregação de um conjunto particular de espécies, em seus ramos ou *clades*. O *bootstrap* trabalha gerando conjunto de dados artificiais, a partir de um certo conjunto de dados, de mesmo tamanho, pinçando colunas do alinhamento inicial ao acaso, com substituições (uma dada coluna no conjunto de dados original pode, portanto, aparecer várias vezes no conjunto artificial). O algoritmo de construção de árvore é então aplicado ao novo conjunto de dados e a seleção completa e o procedimento de construção da árvore é repetido um certo número de vezes. A freqüência com que uma dada característica filogenética aparece é

### *Material e Métodos*

tomada como uma medida da confiança que nós podemos ter nesta característica (Durbin *et al.*, 1998).

O algoritmo *neighbor-joining* produz árvore sem raiz. A obtenção de uma raiz pode ser realizada acrescentando um grupo externo ou espécie, que se sabe ser mais distantemente relacionada com qualquer das espécies analisadas do que elas são entre si. O ponto na árvore onde o grupo externo se junta é, portanto, o melhor candidato para a posição da raiz (Durbin *et al.*, 1998).

### III. RESULTADOS

#### III.1. Padrão de bandas geradas por RAPD

Para a análise dos dados, foram consideradas apenas as bandas que apresentaram frequência maior ou igual que 10%, uma vez que bandas com frequência baixa e pouca repetibilidade poderiam ser consideradas resultantes de amplificação inespecífica.

A amplificação do DNA genômico das populações de *Haematobia irritans* e de *Drosophila prosaltans*, considerado grupo externo (*outgroup*), utilizando-se dez *primers* decaméricos aleatórios, produziu 198 fragmentos, selecionados pela frequência, como já mencionado, que podem ser vistos na **Tabela 3**. Desse total, 117 ocorreram em *H. irritans*, 81 em *Drosophila prosaltans* e 134 foram partilhados pelas duas espécies. Estes fragmentos variaram de 4072 a 284 pares de base (pb). O número total de bandas, produzidos por cada *primer*, variou de 13 (*primer* 83) a 23 (*primer* 60-36). Dos dez *primers* utilizados, sete geraram acima de 20 bandas. Com relação ao número total de bandas produzidas por população, a mais polimórfica foi Tu (115 bandas), seguida de Ker (112 bandas), SJRP (111 bandas) e RB (67 bandas).

As observações referentes a cada *primer*, serão relacionadas a seguir.



**Tabela 3.** Número de bandas produzidas por cada *primer*, em cada população de *H. irritans*:

São José do Rio Preto (SJRP), Turiúba (Tu), Cassilândia (Ca), Rio Branco (Acre),

Kerrville (Texas) e *D. prosaltans* (Dp), grupo externo. T= número total de bandas.

| <i>Primers</i>     | <b>T</b> | <b>Populações</b> |           |           |           |            |           |
|--------------------|----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
|                    |          | <b>SJRP</b>       | <b>Tu</b> | <b>Ca</b> | <b>RB</b> | <b>Ker</b> | <b>Dp</b> |
| <b>51</b>          | 20       | 7                 | 7         | 10        | 11        | 13         | 10        |
| <b>54</b>          | 22       | 11                | 11        | 8         | 6         | 12         | 13        |
| <b>60</b>          | 22       | 13                | 13        | 11        | 8         | 10         | 8         |
| <b>78</b>          | 21       | 11                | 12        | 14        | 8         | 13         | 10        |
| <b>81</b>          | 20       | 9                 | 11        | 9         | 5         | 11         | 11        |
| <b>83</b>          | 13       | 9                 | 9         | 6         | 1         | 11         | 3         |
| <b>88</b>          | 17       | 9                 | 9         | 9         | 4         | 11         | 5         |
| <b>91</b>          | 19       | 13                | 14        | 12        | 2         | 11         | 7         |
| <b>50-10</b>       | 21       | 13                | 13        | 9         | 11        | 8          | 8         |
| <b>60-36</b>       | 23       | 16                | 16        | 11        | 11        | 12         | 6         |
| <b>Total Geral</b> | 198      | 111               | 115       | 99        | 67        | 112        | 81        |

**a. primer 51**

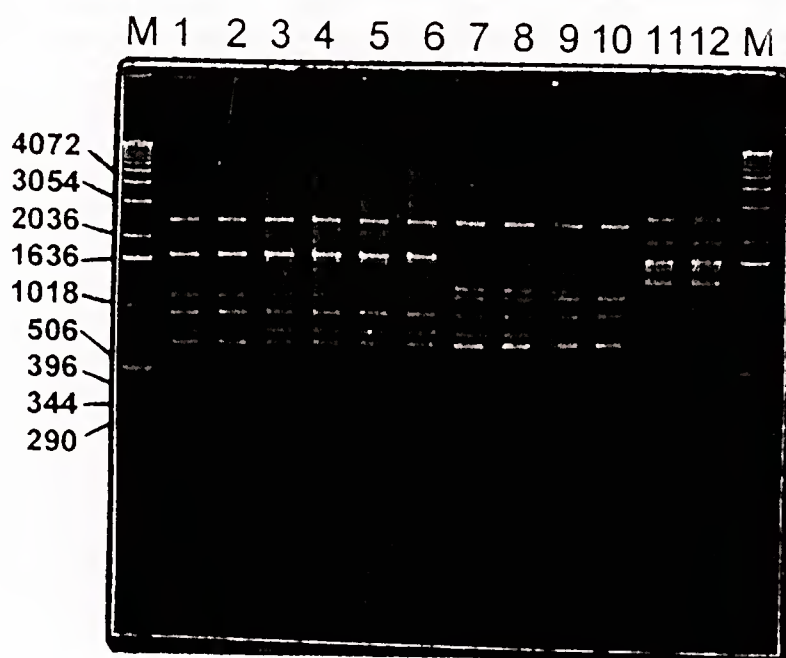
O *primer* 51 gerou 20 bandas, com peso molecular que variou de 3240 a 396 pb, aproximadamente, sendo, 10 em *H. irritans*, 3 no controle externo e 7 partilhadas pelas duas espécies. (Figura 2). As frequências dessas bandas podem ser visualizadas na Tabela 4. Em *H. irritans*, apresentaram altas frequências as bandas relacionadas a seguir, com os respectivos valores: 4 (Ca e Ker, 96,70% e 86,70%), 5 (Ca, 70%), 6 (SJRP e Tu, 76,70% e 70%), 7 (Ca, 73,30%), 9 (Ca e Ker, 73,30% e 83,30%), 10 (SJRP, Tu, Ca e Ker, 96,70%; 93,30%; 73,30% e 83,30%), 12 (SJRP, Tu, Ca e Ker, 96,70%; 93,30%; 93,30% e 76,70%), 13 e 14 (RB, 93,30%, ambas bandas), 15 (SJRP e Tu, 86,70 e 80%), e 19 (RB, 93,30%). Bandas com baixas frequências foram apenas duas, ambas na população Ker (13,30%).

Com relação aos fragmentos monomórficos (100%) gerados por este *primer*, podemos destacar os de números: 7 e 11 (RB) e 15 (Ca, RB e Ker).

Duas populações de *H. irritans* apresentaram bandas exclusivas: 13 e 19 em RB (ambas com 93,30% de frequência), 16 e 20 em Ker (com 26,70% e 13,30% de frequência). Com relação às bandas comuns, foram observadas seis: 9, 14 e 15 (em todas as populações de *H. irritans*, com frequências que variaram de 30% a 100%), e 4, 10 e 12 (em todas as populações, inclusive Dp, com frequências que variaram de 20% a 96,70%).

Na amostra de Dp foram observadas dez bandas produzidas por este *primer*, com tamanho que variou de 3240 a 814 pb, três das quais foram exclusivas: 1, 3 e 17 (com frequência de 46,70%; 96,70% e 20%, respectivamente). As bandas mais frequentes, nessa espécie, foram: 3, 5, 7, 10 e 12, todas com 96,70%.





**Figura 2.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 51. M: marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

**Tabela 4.** Frequências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 51. As frequências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda nº | Tamanho (pb) | Populações |       |        |        |        |       |
|----------|--------------|------------|-------|--------|--------|--------|-------|
|          |              | SJRP       | Tu    | Ca     | RB     | Ker    | Dp    |
| 1        | 3240         | -          | -     | -      | -      | -      | 46,70 |
| 2        | 3054         | -          | -     | 40,00  | 40,00  | 13,30  | -     |
| 3        | 2888         | -          | -     | -      | -      | -      | 96,70 |
| 4        | 2672         | 66,70      | 63,30 | 96,70  | 46,70  | 86,70  | 20,00 |
| 5        | 2036         | -          | -     | 86,70  | -      | 46,70  | 96,70 |
| 6        | 1824         | 76,70      | 70,00 | -      | -      | -      | -     |
| 7        | 1636         | -          | -     | 73,30  | 100,00 | 50,00  | 96,70 |
| 8        | 1573         | -          | -     | 53,30  | -      | 40,00  | 70,00 |
| 9        | 1410         | 36,70      | 30,00 | 73,30  | 46,70  | 83,30  | -     |
| 10       | 1363         | 96,70      | 93,30 | 73,30  | 53,30  | 83,30  | 96,70 |
| 11       | 1048         | -          | -     | -      | 100,00 | -      | 66,70 |
| 12       | 1018         | 96,70      | 93,30 | 93,30  | 46,70  | 76,70  | 96,70 |
| 13       | 921          | -          | -     | -      | 93,30  | -      | -     |
| 14       | 885          | 60,00      | 50,00 | 60,00  | 93,30  | 46,70  | -     |
| 15       | 865          | 86,70      | 80,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | -     |
| 16       | 845          | -          | -     | -      | -      | 26,70  | -     |
| 17       | 814          | -          | -     | -      | -      | -      | 20,00 |
| 18       | 506          | -          | -     | 40,00  |        | 36,70  | -     |
| 19       | 479          | -          | -     | -      | 93,30  | -      | -     |
| 20       | 396          | -          | -     | -      | -      | 13,30  | -     |

**b. primer 54**

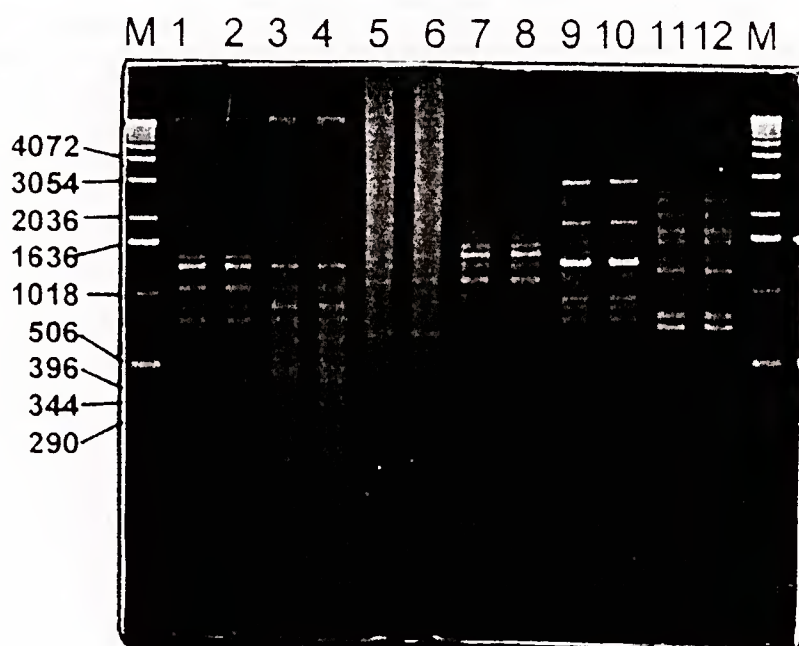
Este *primer* gerou 16 bandas nas cinco populações de *H. irritans*, e mais 6 no grupo externo, com peso molecular que variou de 3054 a 396 pb, aproximadamente (**Figura 3**). As frequências das bandas podem ser visualizadas na **Tabela 5**. As bandas que apresentaram altas frequências em *H. irritans*, representadas a seguir, com os respectivos valores, foram: 10 (Ca e Ker, ambas com 86,70%), 11 (Ca e RB, 80%, em ambas populações), 12 (SJRP, 70%), 14 (SJRP, Tu e Ker, 93,30%; 90% e 73,30%), 15 (Ca e Ker, 86,70% e 73,30%), 17 (Ker, 93,30%), 22 (Ker, 76,70%). A banda com mais baixa frequência foi a 18 (Ker, 16,70%).

Com relação aos fragmentos monomórficos (100%) gerados por este *primer*, podemos destacar os de números 10, em RB e 16, em Dp.

A única banda exclusiva de uma população de *H. irritans* foi a banda 6 (Ker, 66,70%). Quanto às bandas comuns, entre as populações de *H. irritans*, foram observadas quatro: 11 (em todas as populações de *H. irritans*, com frequências que variaram de 23,30 a 80%), e 1, 8 e 10 (em todas as populações, inclusive Dp, com frequências que variaram de 13,30 a 100%).

Na amostra de Dp foram observadas 13 bandas, com tamanho que variou de 3054 a 495 pb. Suas seis bandas exclusivas foram: 2, 3, 4, 7, 16 e 19 (20%; 20%; 13,30%; 83,30%; 100% e 56,70%). As sete bandas partilhadas por ambas as espécies foram: 1, 5, 8, 10, 15, 20 e 21, com frequências que variaram de 13,30% a 93,30%.





**Figura 3.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 54. **M:** marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

**Tabela 5.** Frequências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 54. As frequências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda nº | Tamanho (pb) | Populações |       |       |        |       |        |
|----------|--------------|------------|-------|-------|--------|-------|--------|
|          |              | SJRP       | Tu    | Ca    | RB     | Ker   | Dp     |
| 1        | 3054         | 30,00      | 36,70 | 33,30 | 33,30  | 60,00 | 33,30  |
| 2        | 2888         | -          | -     | -     | -      | -     | 20,00  |
| 3        | 2740         | -          | -     | -     | -      | -     | 20,00  |
| 4        | 2672         | -          | -     | -     | -      | -     | 13,30  |
| 5        | 2036         | -          | -     | -     | 33,30  | -     | 56,70  |
| 6        | 1945         | -          | -     | -     | -      | 66,70 | -      |
| 7        | 1824         | -          | -     | -     | -      | -     | 83,30  |
| 8        | 1636         | 23,30      | 20,00 | 26,70 | 40,00  | 46,70 | 13,30  |
| 9        | 1435         | 30,00      | 23,30 | -     | -      | 36,70 | -      |
| 10       | 1363         | 50,00      | 46,70 | 86,70 | 100,00 | 86,70 | 93,30  |
| 11       | 1048         | 26,70      | 23,30 | 80,00 | 80,00  | 40,00 | -      |
| 12       | 1033         | 70,00      | 50,00 | -     | -      | -     | -      |
| 13       | 1018         | -          | -     | 26,70 | 46,70  | 10,00 | -      |
| 14       | 1003         | 93,30      | 90,00 | -     | -      | 73,30 | -      |
| 15       | 921          | -          | -     | 86,70 | -      | 73,30 | 73,30  |
| 16       | 865          | -          | -     | -     | -      | -     | 100,00 |
| 17       | 854          | 23,30      | 20,00 | 46,70 | -      | 93,30 | -      |
| 18       | 814          | 20,00      | 26,70 | -     | -      | 16,70 | -      |
| 19       | 795          | -          | -     | -     | -      | -     | 56,70  |
| 20       | 506          | 46,70      | 50,00 | -     | -      | -     | 46,70  |
| 21       | 495          | 63,30      | 60,00 | -     | -      | -     | 30,00  |
| 22       | 396          | -          | -     | 40,00 | -      | 76,70 | -      |

---

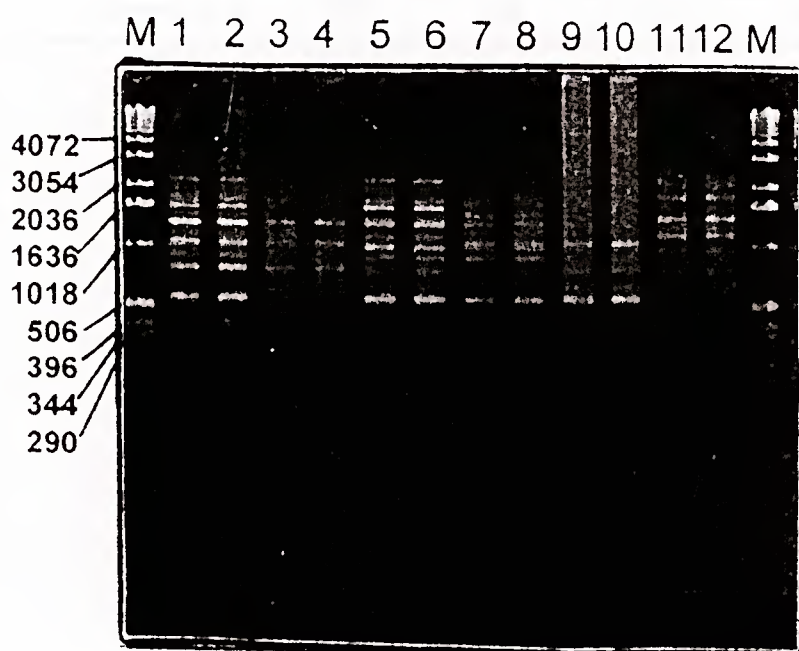
*c. primer 60*

Para este *primer* foram observadas 22 bandas, com peso molecular que variou de 3054 a 344 pb (**Figura 4**), sendo 16 exclusivas de *H. irritans* e 6 exclusivas do controle externo. Na **Tabela 6** estão relacionadas as frequências das bandas ou fragmentos em cada população. Podemos observar que as mesmas variaram de 10% a 100%. Todos os fragmentos amplificados por este *primer* foram polimórficos, com exceção das bandas 19 (Ker), 3 e 5 (Dp), que foram monomórficas, apresentando 100% de frequência.

Com alta frequência, nas populações de *H. irritans*, podemos destacar as bandas apresentadas a seguir, com os respectivos valores: 7 (SJRP e Ca, 80% e 76,70%), 8 e 9 (RB, 86,70% e 93,30%), 13 (SJRP, Tu, Ca e RB, 96,70%; 83,30%; 86,70% e 93,30%), 14 (RB, 93,30%), 15 (SJRP e Ker, 90% e 73,30%) e 18 (SJRP, Tu, Ca e RB, 96,70%; 70%; 86,70% e 93,30%). Os fragmentos com menores frequências foram: 1 (SJRP, 16,70%), 4 (Tu, 13,30%), 6 (Tu e RB, 16,70% e 13,30%), 9 e 10 (Ker, 13,30%), 17 (SJRP e Ker, 13,30% e 10%) e 21 (Tu, 16,70%).

As populações de SJRP e Tu apresentaram fragmentos exclusivos, sendo dois em SJRP (1 e 22, 16,70% e 20%) e um em Tu (4, 13,30%). Também foram observados seis fragmentos comuns a todas as populações de *H. irritans*: as bandas 7, 9, 13, 14, 15 e 18 (com frequências que variaram de 23,30% a 96,70%). A banda 13 também ocorreu em Dp, com frequência de 36,70%.





**Figura 4.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 60. **M:** marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

Tabela 6. Frequências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 60. As frequências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda nº | Tamanho (pb) | Populações |       |       |       |        |        |
|----------|--------------|------------|-------|-------|-------|--------|--------|
|          |              | SJRP       | Tu    | Ca    | RB    | Ker    | Dp     |
| 1        | 3054         | 16,70      | -     | -     | -     | -      | -      |
| 2        | 2672         | 63,30      | 43,30 | 20,00 | -     | 33,30  | -      |
| 3        | 2234         | -          | -     | -     | -     | -      | 100,00 |
| 4        | 2036         | -          | 13,30 | -     | -     | -      | -      |
| 5        | 1945         | -          | -     | -     | -     | -      | 100,00 |
| 6        | 1824         | 56,70      | 16,70 | 26,70 | 13,30 | -      | -      |
| 7        | 1636         | 80,00      | 66,70 | 76,70 | 60,00 | 20,00  | -      |
| 8        | 1573         | 46,70      | 23,30 | 33,30 | 86,70 | -      | -      |
| 9        | 1514         | 50,00      | 36,70 | 46,70 | 93,30 | 13,30  | -      |
| 10       | 1363         | -          | -     | -     | -     | 13,30  | 73,30  |
| 11       | 1319         | -          | -     | -     | -     | -      | 60,00  |
| 12       | 1278         | -          | -     | -     | -     | -      | 60,00  |
| 13       | 1018         | 96,70      | 83,30 | 86,70 | 93,30 | 60,00  | 36,70  |
| 14       | 989          | 66,70      | 40,00 | 23,30 | 93,30 | 30,00  | -      |
| 15       | 935          | 90,00      | 60,00 | 66,70 | 20,00 | 73,30  | -      |
| 16       | 865          | -          | -     | -     | -     | -      | 66,70  |
| 17       | 834          | 13,30      | 30,00 | 33,30 | -     | 10,00  | -      |
| 18       | 814          | 96,70      | 70,00 | 86,70 | 93,30 | 66,70  | -      |
| 19       | 795          | -          | 20,00 | -     | -     | 100,00 | -      |
| 20       | 571          | -          | -     | -     | -     | -      | 40,00  |
| 21       | 396          | 40,00      | 16,70 | 66,70 | -     | -      | -      |
| 22       | 344          | 20,00      | -     | -     | -     | -      | -      |

Na amostra de Dp este *primer* gerou 8 bandas, com tamanho que variou de 2234 a 571 pb. As seis bandas exclusivas foram: 3, 5, 11, 12, 16 e 20 (com frequências que variaram de 40% a 100%).

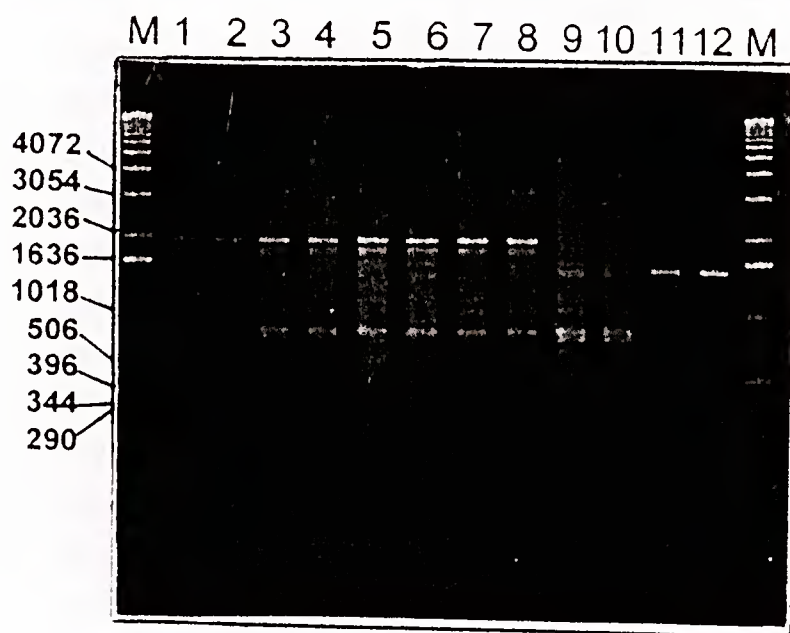
**d. *primer* 78**

Este *primer* gerou 21 bandas, com tamanho que variou de aproximadamente 4072 a 506 pb, sendo 11 exclusivos de *H. irritans*, 5 exclusivos do controle e 3 partilhados pelas duas espécies (**Figura 5**). Na **Tabela 7** estão relacionadas as frequências dessas bandas, em cada população. Em *H. irritans*, apresentaram altas frequências, as bandas relacionadas a seguir, com os respectivos valores: 4 e 5 (Tu e Ca, 96,70% em ambas), 8 (SJRP, 76,70%), 17 (SJRP, Tu, Ca e RB, 70%; 90%; 93,30% e 70%), 18 (SJRP, 80%), e 19 (Tu, 83,30%). Com as frequências mais baixas (entre 13,30% e 16,70%) , podemos destacar as bandas: 2 (Tu, 16,70%), 7, 8 e 9 (RB, 16,70%), 14 (Ker, 16,70%), 16 (RB, 16,70%), 19 (SJRP e RB, 13,30% e 16,70%), e 21 (Ca e Ker, 16,70% em ambas populações).

Foram observadas cinco bandas monomórficas em *H. irritans*: 4 (SJRP e RB), 5 (RB), 7 (Dp), 17 e 18 (Ker). Em Dp, foi observada apenas uma, a banda 7.

Duas populações de *H. irritans* apresentaram bandas exclusivas: 1, em Ca (43,30%) e 15 em Ker (43,30%). Também foram observados seis fragmentos comuns a todas as populações dessa espécie: 4, 7, 16, 19, 8 e 17 (com frequências que variaram de 13,30% a 100%). As quatro primeiras bandas desta





**Figura 5.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 78. M: marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

**Tabela 7.** Frequências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 78. As frequências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda nº | Tamanho (pb) | Populações |       |       |        |        |        |
|----------|--------------|------------|-------|-------|--------|--------|--------|
|          |              | SJRP       | Tu    | Ca    | RB     | Ker    | Dp     |
| 1        | 4072         | -          | -     | 43,30 | -      | -      | -      |
| 2        | 3054         | 40,00      | 16,70 | 63,30 | -      | -      | -      |
| 3        | 2672         | -          | -     | -     | -      | -      | 30,00  |
| 4        | 2036         | 100,00     | 96,70 | 96,70 | 100,00 | 40,00  | 40,00  |
| 5        | 1945         | 46,70      | 96,70 | 96,70 | 100,00 | -      | -      |
| 6        | 1862         | -          | -     | -     | -      | -      | 20,00  |
| 7        | 1636         | 56,70      | 36,70 | 46,70 | 16,70  | 46,70  | 100,00 |
| 8        | 1573         | 76,70      | 50,00 | 40,00 | 16,70  | 53,30  | -      |
| 9        | 1514         | -          | -     | 26,70 | 16,70  | 43,30  | -      |
| 10       | 1487         | -          | -     | -     | -      | -      | 40,00  |
| 11       | 1460         | -          | -     | -     | -      | -      | 50,00  |
| 12       | 1363         | 30,00      | 53,30 | 43,30 | -      | 23,30  | -      |
| 13       | 1340         | -          | -     | -     | -      | -      | 36,70  |
| 14       | 1319         | 50,00      | 36,70 | 36,70 | -      | 16,70  | -      |
| 15       | 1278         | -          | -     | -     | -      | 43,30  | -      |
| 16       | 1018         | 56,70      | 40,00 | 20,00 | 16,70  | 26,70  | 76,70  |
| 17       | 989          | 70,00      | 90,00 | 93,30 | 70,00  | 100,00 | -      |
| 18       | 960          | 80,00      | 20,00 | 23,30 | -      | 100,00 | -      |
| 19       | 865          | 13,30      | 83,30 | 40,00 | 16,70  | 43,30  | 76,70  |
| 20       | 845          | -          | -     | -     | -      | 30,00  | 40,00  |
| 21       | 506          | -          | 36,70 | 16,70 | -      | 16,70  | -      |

relação ocorreram também em Dp.

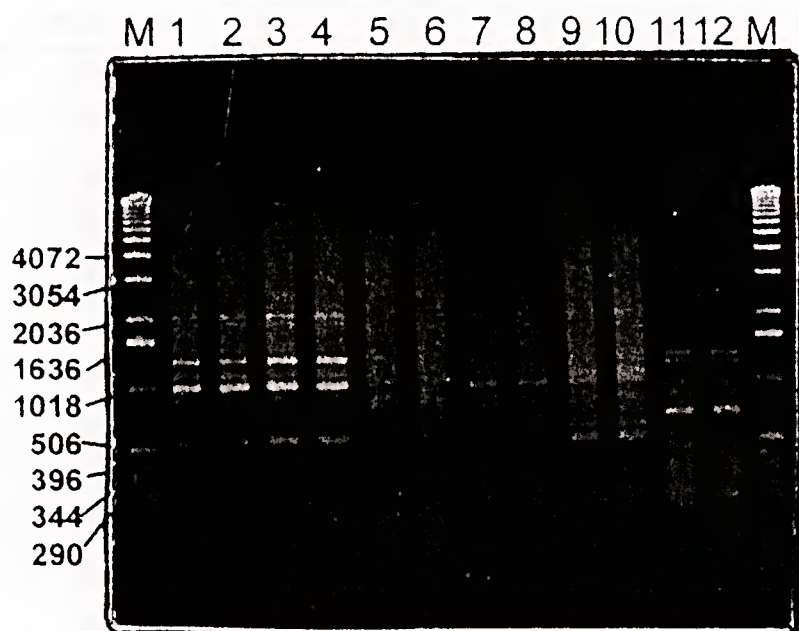
Para a amostra de Dp este *primer* gerou 10 bandas, com tamanho que variou de 2672 a 845 pb. As cinco bandas exclusivas apresentadas por essa espécie foram: 3, 6, 10, 11 e 13 (30%; 20%; 40%; 50% e 36,70%, respectivamente).

#### **e. *primer* 81**

O *primer* 81 gerou um total de 20 bandas, nas populações analisadas, com peso molecular que variou de 3563 a 479 pb, aproximadamente, sendo 9 exclusivas de *H. irritans*, 6 exclusivas de *D. prosaltans* e 5 comuns a ambas espécies (**Figura 6**), e estão relacionadas na **Tabela 8**. As bandas de *H. irritans* que apresentaram altas frequências, relacionadas a seguir, com seus respectivos valores, foram: 4 (SJRP, Tu e Ca, 70%; 73,30% e 70%), 8 (Tu e Ca, 80% e 70%), 11 (SJRP, Tu, Ca, RB, 73,30%; 86,70%; 70% e 80%), 12 (SJRP, Tu, Ca, RB e Ker, 96,70%; 96,70%; 96,70%; 80% e 83,30%), 17 (Ker, 76,70%), 18 (SJRP, Tu e Ca, 93,30%; 96,70% e 96,70%). Bandas com baixas frequências (entre 10% e 16,70%), foram quatro: 3 (Tu, com 16,70%), 6 (SJRP e Ca, 13,30% e 10%), 7 (Tu e Ker, 13,30% e 10%) e 13 (Ker, 16,70%).

Foram observados quatro fragmentos monomórficos nos produtos de amplificação gerados por este *primer*, sendo um em *H. irritans* (18 em Ker) e três em Dp (6, 9 e 16).





**Figura 6.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 81. M: marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

**Tabela 8.** Frequências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 81. As frequências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda nº | Tamanho (pb) | Populações |       |       |       |        |        |
|----------|--------------|------------|-------|-------|-------|--------|--------|
|          |              | SJRP       | Tu    | Ca    | RB    | Ker    | Dp     |
| 1        | 3563         | -          | -     | -     | -     | -      | 73,30  |
| 2        | 3054         | -          | -     | -     | -     | -      | 80,00  |
| 3        | 2606         | -          | 16,70 | -     | -     | -      | -      |
| 4        | 2036         | 70,00      | 73,30 | 70,00 | 60,00 | 46,70  | -      |
| 5        | 1945         | 56,70      | 63,30 | 50,00 | -     | -      | -      |
| 6        | 1636         | 13,30      | -     | 10,00 | 40,00 | 26,70  | 100,00 |
| 7        | 1603         | -          | 13,30 | -     | -     | 10,00  | -      |
| 8        | 1487         | 66,70      | 80,00 | 70,00 | -     | 50,00  | -      |
| 9        | 1363         | -          | -     | -     | -     | -      | 100,00 |
| 10       | 1319         | -          | -     | -     | -     | -      | 86,70  |
| 11       | 1048         | 73,30      | 86,70 | 70,00 | 80,00 | 50,00  | -      |
| 12       | 1018         | 96,70      | 96,70 | 96,70 | 80,00 | 83,30  | 26,70  |
| 13       | 989          | 26,70      | 50,00 | 30,00 | -     | 16,70  | -      |
| 14       | 921          | -          | -     | -     | -     | 46,70  | -      |
| 15       | 865          | -          | -     | -     | -     | 36,70  | 86,70  |
| 16       | 814          | -          | -     | -     | -     | -      | 100,00 |
| 17       | 804          | -          | 30,00 | -     | 50,00 | 76,70  | -      |
| 18       | 786          | 93,30      | 96,70 | 96,70 | -     | 100,00 | 26,70  |
| 19       | 506          | 20,00      | 20,00 | 23,30 | -     | -      | 26,70  |
| 20       | 479          | -          | -     | -     | -     | -      | 26,70  |

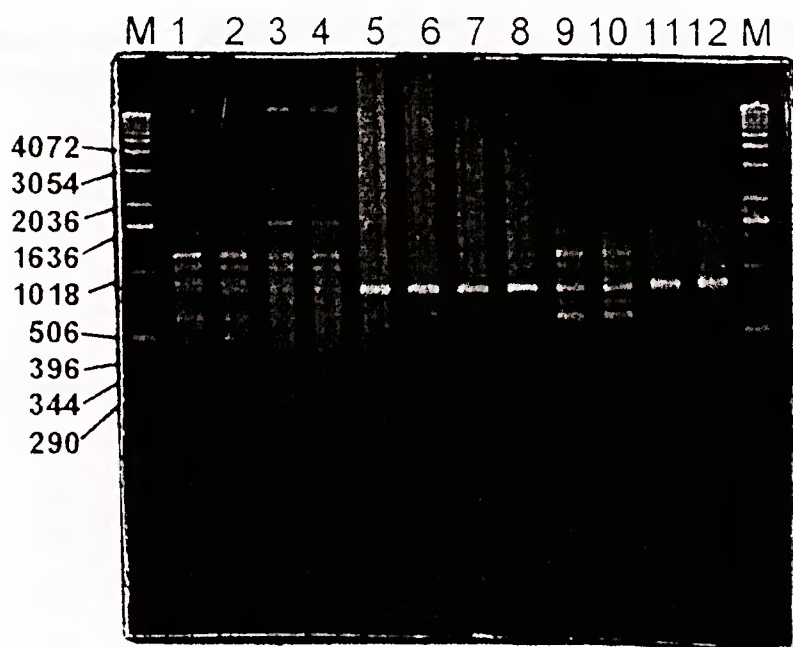
Duas populações de *H. irritans* apresentaram bandas exclusivas: as bandas 3 (Tu, 16,70%) e 14 (Ker, 46,70%). Quanto às bandas comuns às populações de *H. irritans*, foram observadas três: 4, 11 e 12 (em todas as populações, com frequências que variaram de 46,70% a 86,70%). A banda 12 ocorreu também em Dp, com frequência de 26,70%.

As 11 bandas de Dp apresentaram tamanho que variou de 3563 a 479 pb. As bandas 1, 2, 9, 10, 16 e 21 foram exclusivas para esta espécie (com 73,30%; 80%; 100%; 86,70%; 100% e 26,70%). Foram comuns às duas espécies analisadas, além da banda 12, as bandas 6, 15, 18 e 19, com frequências que variaram de 10% a 100%.

#### f. primer 83

O primer 83 gerou 13 produtos de amplificação nas populações analisadas, com peso molecular que variou de 1945 a 506 pb, aproximadamente, sendo 10 exclusivos em *H. irritans*, 1 em Dp e 2 comuns às duas espécies (Figura 7). As frequências das bandas podem ser visualizadas na Tabela 9. Em *H. irritans*, apresentaram altas frequências as bandas relacionadas a seguir, com os respectivos valores: 6 (SJRP e Tu, 80% e 86,70%), 7 (SJRP e Tu, 86,70% e 80%), 9 (SJRP, Tu, Ca e Ker, 93,30%; 93,30%; 86,70% e 96,70%) e 11 (Tu, Ca e Ker, 96,70%; 86,70%; e 96,70%). Foi observada apenas uma banda com baixa frequência, a de número 3, na população de Ker (16,70%).





**Figura 7.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 83. M: marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

**Tabela 9.** Frequências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 83. As frequências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda nº | Tamanho (pb) | Populações |       |       |        |        |        |
|----------|--------------|------------|-------|-------|--------|--------|--------|
|          |              | SJRP       | Tu    | Ca    | RB     | Ker    | Dp     |
| 1        | 1945         | -          | -     | -     | -      | 56,70  | -      |
| 2        | 1824         | 46,70      | 50,00 | -     | -      | -      | -      |
| 3        | 1636         | 56,70      | 50,00 | -     | -      | 16,70  | 20,00  |
| 4        | 1487         | -          | -     | -     | -      | -      | 20,00  |
| 5        | 1097         | -          | -     | -     | -      | 50,00  | -      |
| 6        | 1064         | 80,00      | 86,70 | 46,70 | -      | 100,00 | -      |
| 7        | 1018         | 86,70      | 80,00 | 60,00 | -      | 66,70  | -      |
| 8        | 946          | 56,70      | 46,70 | -     | -      | 56,70  | -      |
| 9        | 921          | 93,30      | 93,30 | 86,70 | 100,00 | 96,70  | 100,00 |
| 10       | 864          | -          | -     | -     | -      | 66,70  | -      |
| 11       | 814          | 100,00     | 96,70 | 86,70 | -      | 96,70  | -      |
| 12       | 795          | 50,00      | 50,00 | 46,70 | -      | 36,70  | -      |
| 13       | 506          | 26,70      | 20,00 | -     | -      | 43,30  | -      |

Os fragmentos monomórficos gerados por este *primer* em *H. irritans* foram três: os de números: 6 (Ker), 9 (RB) e 11 (SJRP). No controle externo, foi encontrado apenas um (o número 9).

A população de Ker foi a única que apresentou bandas exclusivas: 1, 5 e 10 (56,70%; 16,70% e 66,70%). A banda 9 foi a única presente em todas as populações, inclusive em Dp (com frequência que variou de 93,30% a 100%).

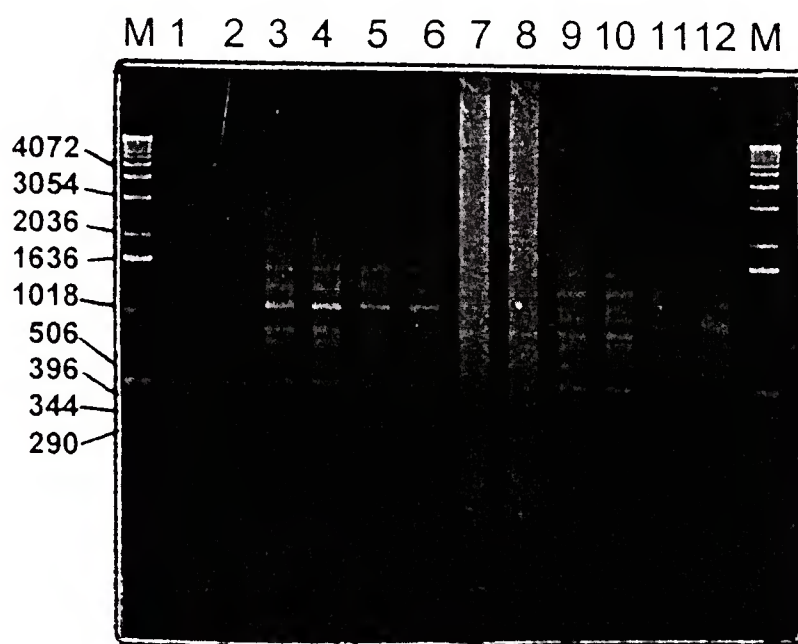
Os três produtos de amplificação da amostra de Dp, que variaram de 1636 a 921 pb, foram o 9, já mencionado, o 3 e o 4. Destes, apenas a banda 4 foi exclusiva desta espécie (com frequência de 20%).

#### ***g. primer 88***

Para este *primer* foram observadas 17 bandas, com tamanho que variou de aproximadamente 2672 a 284 pb, sendo 12 em *H. irritans*, 2 em Dp e 3 comuns às duas espécies (**Figura 8**). Na **Tabela 10** estão relacionadas as frequências das bandas em cada população. As bandas de *H. irritans* com maiores frequências, apresentadas a seguir, com seus respectivos valores, foram: 6 (Tu e Ker, 70% e 83,30%), 8 (Tu e RB, 80% e 93,30%), 10 (RB, 86,70%), e 17 (RB e Ker, 86,70 e 73,30%). Com frequências mais baixas (entre 10% e 16,70%), podemos destacar as bandas: 1 (Ca, 13,30%), 3 (Tu, 16,70%), 6 (RB, 16,70%), 9 (Ker, 10%), 11 (Tu, 10%), e 16 (Ca, 16,70%).

Também foram observadas quatro bandas monomórficas, sendo 2 em *H. irritans*: 15 (SJRP, Tu, Ca e Ker), e 16 (SJRP) e 2 em Dp (8 e 14).





**Figura 8.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 88. M: marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

**Tabela 10.** Freqüências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 88. As freqüências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda nº | Tamanho (pb) | Populações |        |        |       |        |        |
|----------|--------------|------------|--------|--------|-------|--------|--------|
|          |              | SJRP       | Tu     | Ca     | RB    | Ker    | Dp     |
| 1        | 2672         | -          | -      | 13,30  | -     | -      | -      |
| 2        | 2036         | 20,00      | 33,30  | 60,00  | -     | -      | -      |
| 3        | 1636         | 33,30      | 16,70  | 20,00  | -     | 63,30  | -      |
| 4        | 1487         | -          | -      | -      | -     | -      | 23,30  |
| 5        | 1410         | -          | -      | 50,00  | -     | -      | -      |
| 6        | 1363         | 53,30      | 70,00  | 63,30  | 16,70 | 83,30  | -      |
| 7        | 1048         | -          | -      | -      | -     | 20,00  | -      |
| 8        | 1018         | 56,70      | 80,00  | 50,00  | 93,30 | 56,70  | 100,00 |
| 9        | 989          | 20,00      | 56,70  | 26,70  | -     | 10,00  | -      |
| 10       | 960          | 26,70      | 46,70  | -      | 86,70 | 60,00  | -      |
| 11       | 934          | 20,00      | 10,00  | -      | -     | 23,30  | -      |
| 12       | 921          | -          | -      | -      | -     | 23,30  | -      |
| 13       | 865          | -          | -      | -      | -     | -      | 96,70  |
| 14       | 814          | -          | -      | -      | -     | 53,30  | 100,00 |
| 15       | 506          | 100,00     | 100,00 | 100,00 | -     | 100,00 | 96,70  |
| 16       | 290          | 100,00     | -      | 16,70  | -     | -      | -      |
| 17       | 284          | -          | 26,70  | -      | 86,70 | 73,30  | -      |

Duas populações de *H. irritans* apresentaram bandas exclusivas: Ca (bandas 1 e 5, 13,30% e 50%) e Ker (bandas 7 e 12, 20% e 23,30%). As bandas comuns às cinco populações de *H. irritans* foram duas: 6 (com frequências que variaram de 16,70% a 83,30%), e 8 (com frequências que variaram de 50% a 100%). Esta última também ocorreu em Dp, como já foi mencionado.

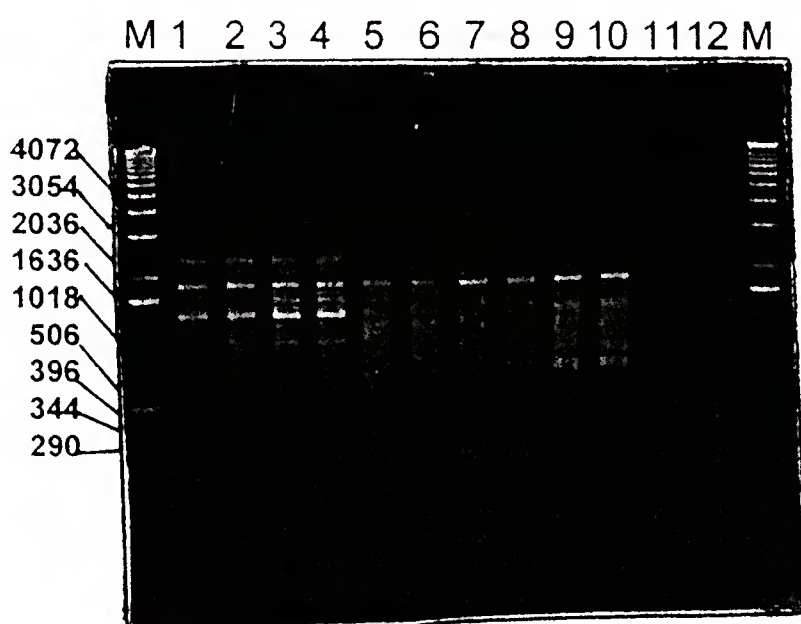
Os 5 produtos de amplificação, na amostra de Dp, apresentaram tamanho que variou de 1487 a 506 pb, incluindo, além das bandas 8 e 14, já mencionadas, a banda 4 (23,30%), e as bandas 13 e 15 (ambas com 96,70% de frequência). As bandas 4 e 13 foram exclusivas desta espécie.

#### ***h. primer 91***

Para este *primer*, foram observadas 19 bandas, que variaram de 2812 a 495 bp (**Figura 9**), aproximadamente, sendo 12 em *H. irritans*, 4 no grupo externo e 3 comuns à ambas as espécies. Na **Tabela 11** estão relacionadas as frequências das bandas em cada população. Em *H. irritans*, apresentaram altas frequências, as bandas relacionadas a seguir, com os respectivos valores: 4 (SJRP, Ca e Ker, 96,70%; 96,70% e 93,30%), 7 (SJRP, Tu e Ca, 96,70%; 93,30% e 96,70%), 8 (SJRP, Tu e Ca, 93,30%; 96,70% e 96,70%), 16 (Ker, 93,30%) e 17 (SJRP, Tu e Ca com 73,30%; 80%; 80%). As bandas com baixas frequências (entre 10% e 16,70%), foram cinco: 1 (SJRP, 10%), 3 (SJRP e Ker, 13,30% e 10%), 6 e 11 (Ker, 16,70% e 13,30%), e 15 (Tu, 16,70%).

Foram observados dois fragmentos monomórficos nos produtos de amplificação gerados por este *primer*: 4 (Tu e RB), e 19 (Dp).





**Figura 9.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 91. **M:** marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

**Tabela 11.** Frequências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 91. As frequências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda nº | Tamanho (pb) | Populações |        |       |        |       |        |
|----------|--------------|------------|--------|-------|--------|-------|--------|
|          |              | SJRP       | Tu     | Ca    | RB     | Ker   | Dp     |
| 1        | 2812         | 10,00      | -      | -     | -      | -     | -      |
| 2        | 2672         | 36,70      | 26,70  | 36,70 | -      | -     | -      |
| 3        | 2036         | 13,30      | 33,30  | 20,00 | -      | 10,00 | -      |
| 4        | 1945         | 96,70      | 100,00 | 96,70 | 100,00 | 93,30 | -      |
| 5        | 1824         | 20,00      | 30,00  | 20,00 | -      | -     | -      |
| 6        | 1636         | 50,00      | 66,70  | 50,00 | -      | 16,70 | -      |
| 7        | 1573         | 96,70      | 93,30  | 96,70 | -      | 63,30 | -      |
| 8        | 1487         | 93,30      | 96,70  | 96,70 | -      | 66,70 | -      |
| 9        | 1363         | -          | -      | -     | -      | -     | 66,70  |
| 10       | 1081         | -          | 30,00  | -     | -      | -     | -      |
| 11       | 1048         | -          | 30,00  | -     | -      | 13,30 | -      |
| 12       | 1018         | 46,70      | 46,70  | 50,00 | -      | 30,00 | 96,70  |
| 13       | 975          | -          | -      | -     | -      | -     | 80,00  |
| 14       | 946          | -          | -      | -     | -      | -     | 80,00  |
| 15       | 921          | 20,00      | 16,70  | 20,00 | -      | 30,00 | -      |
| 16       | 865          | 40,00      | 23,30  | 30,00 | -      | 93,30 | 30,00  |
| 17       | 814          | 73,30      | 80,00  | 80,00 | 40,00  | 43,30 | 96,70  |
| 18       | 506          | 33,30      | 30,00  | 30,00 | -      | 50,00 | -      |
| 19       | 495          | -          | -      | -     | -      | -     | 100,00 |

Quanto às populações de *H. irritans*, com fragmentos exclusivos, foram observados apenas duas: SJRP (banda 1, 10%), e Tu (banda 10, 30%). As bandas que foram partilhadas por todas as populações de *H. irritans* são duas: 4 e 17, com frequências que variaram de 40% a 100%. Esta última ocorreu também em Dp.

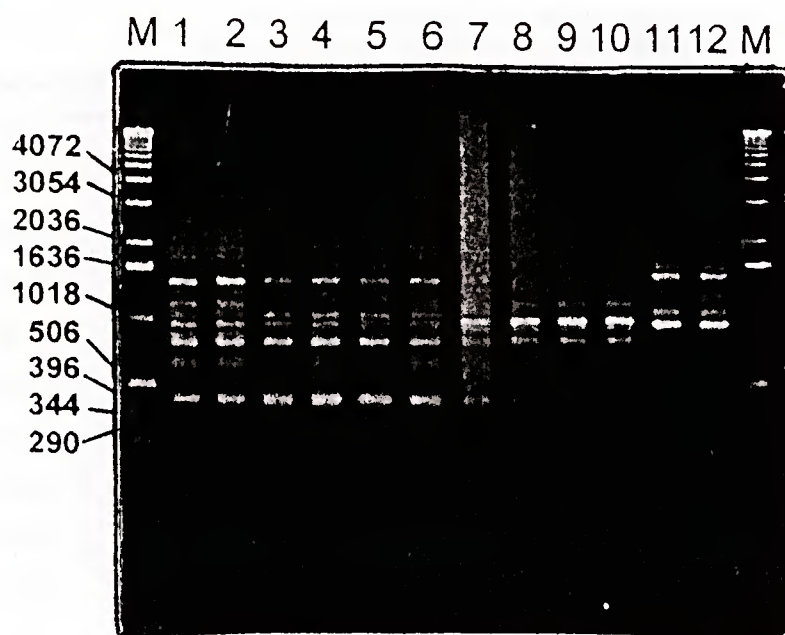
As 7 bandas geradas no grupo externo (Dp), pelo *primer* 91, apresentaram tamanho que variou de 1363 a 495 pb. As bandas 9, 13, 14 e 19 foram exclusivas desta espécie (com 66,70%; 96,70%; 80%; 80% e 100%, respectivamente).

#### i. *primer* 50-10

Este *primer* gerou 21 bandas nas populações analisadas, que variaram de 3054 a 396 pb, aproximadamente, sendo 13 em *H. irritans*, 2 em Dp e 6 comuns a ambas as espécies (**Figura 10**). As frequências das bandas estão na **Tabela 12**. Em *H. irritans*, apresentaram altas frequências, as bandas relacionadas a seguir, com os respectivos valores: 1 (Ca e RB, 80% e 86,70%), 3 (Tu, Ca e RB, 73,30%; 73,30% e 80%), 7 (SJRP e Tu, 83,30% e 93,30%), 9 (Ca e RB, 93,30% e 86,70%), 12 (Tu e Ker, 86,70% e 76,70%), 16 (Ker, 90%), 18 (SJRP, 70%), e 20 (SJRP, 90%). Com baixa frequência, podemos destacar apenas a banda 2 (13,30%), que foi observada no controle externo.

Foram observadas seis bandas monomórficas, em *H. irritans*: 7 (Ca e RB), 12 (Ca e RB), 16 (SJRP, Tu, Ca e RB), 20 (Tu), e 21 (Ca e RB). Em Dp, a banda 10 foi monomórfica.





**Figura 10.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 50-10. M: marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

Resultados

**Tabela 12.** Frequências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 50-10. As frequências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda nº | Tamanho (pb) | Populações |        |        |        |       |        |
|----------|--------------|------------|--------|--------|--------|-------|--------|
|          |              | SJRP       | Tu     | Ca     | RB     | Ker   | Dp     |
| 1        | 3054         | 43,30      | 63,30  | 80,00  | 86,70  | -     | -      |
| 2        | 2672         | -          | 40,00  | -      | 30,00  | -     | 13,30  |
| 3        | 2036         | 60,00      | 73,30  | 73,30  | 80,00  | -     | -      |
| 4        | 1945         | 60,00      | 20,00  | -      | -      | -     | -      |
| 5        | 1636         | -          | 40,00  | -      | -      | -     | 93,30  |
| 6        | 1573         | -          | -      | -      | -      | -     | 56,70  |
| 7        | 1543         | 83,30      | 93,30  | 100,00 | 100,00 | 26,70 | -      |
| 8        | 1410         | -          | 33,30  | -      | -      | -     | -      |
| 9        | 1098         | 33,30      | -      | 93,30  | 86,70  | 23,30 | -      |
| 10       | 1064         | 20,00      | -      | -      | -      | -     | 100,00 |
| 11       | 1048         | 30,00      | 46,70  | -      | -      | 16,70 | -      |
| 12       | 1018         | 60,00      | 86,70  | 100,00 | 100,00 | 76,70 | 100,00 |
| 13       | 989          | -          | -      | 100,00 | 100,00 | 50,00 | -      |
| 14       | 960          | -          | -      | -      | -      | -     | 33,30  |
| 15       | 946          | 46,70      | 46,70  | -      | -      | -     | -      |
| 16       | 921          | 100,00     | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 90,00 | -      |
| 17       | 865          | 20,00      | 46,70  | -      | -      | -     | 33,30  |
| 18       | 843          | 70,00      | -      | -      | -      | -     | 96,70  |
| 19       | 814          | -          | -      | -      | 33,30  | 33,30 | -      |
| 20       | 399          | 90,00      | 100,00 | 46,70  | 33,30  | -     | -      |
| 21       | 396          | -          | -      | 100,00 | 100,00 | 66,70 | -      |

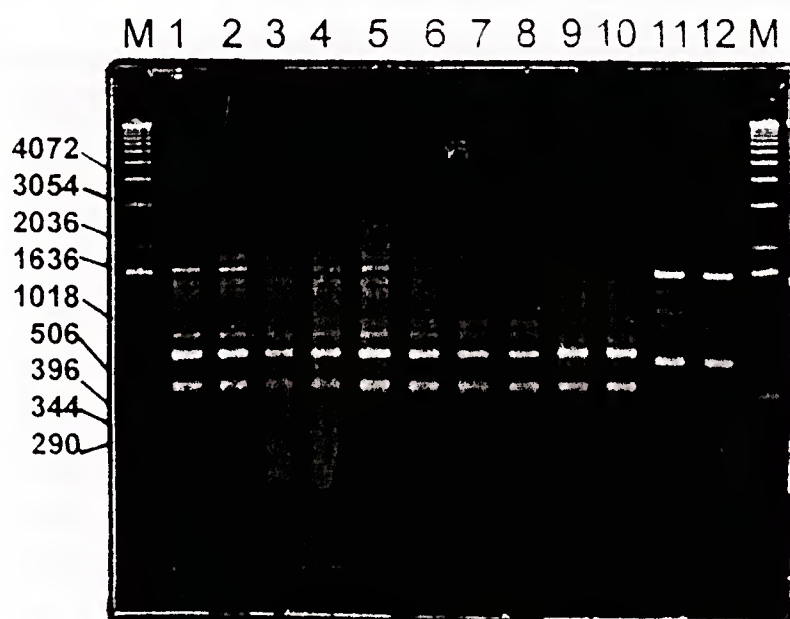
Uma única população de *H. irritans* apresentou banda exclusiva: Tu (5, 40%). As bandas comuns às cinco populações de *H. irritans* foram três: 7, 12 e 16 (com frequências que variaram de 26,70% a 100%). A banda 12 também ocorreu em Dp, com frequência 100%.

Os oito fragmentos da amostra de Dp, apresentaram tamanho que variou de 2672 a 843 pb, aproximadamente, abrangendo além das bandas 10 e 12, já mencionadas, as bandas 6 e 14, que foram exclusivas desta espécie (56,70 e 33,30%) e as bandas 2, 5, 17 e 18, com frequências de 13,30% a 96,70%.

#### j. *primer* 60-36

O *primer* 60-36 gerou um total de 23 bandas nas populações analisadas, que variaram de 3143 a 284 pb, sendo 17 em *H. irritans*, 3 em Dp e 3 comuns a ambas as espécies (**Figura 11**). As frequências das bandas, para cada população, encontram-se na **Tabela 13**. Em *H. irritans*, apresentaram altas frequências, as bandas relacionadas a seguir, com os respectivos valores: 4 e 6 (Tu, 96,70% e 83,30%), 7, 8, 10 e 11 (SJRP, 70%; 76,70%; 80% e 73,30%), 13 (SJRP e Tu, 73,30% e 86,70%), 15 (SJRP e Tu, 83,30% e 86,70%), 17 (SJRP, Ca, RB e Ker, 96,70%; 93,30%; 80% e 96,70%), 18 (Ca, 86,70%), 19 (Ca e RB, 93,30% e 86,70%), 20 (Ca, 86,70%). Com frequências mais baixas (entre 10% e 16,70%), podemos destacar as bandas: 1 (SJRP, 16,70%), 3 (SJRP, 13,30%), 5 (Tu, 13,30%), 6, 7, 8 e 10 (RB, 16,70%), e 14 (Tu, 10%).





**Figura 11.** Gel comparativo mostrando os produtos de amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans*, obtidos pelo *primer* 60-36. M: marcador de peso molecular. 1-2: SJRP, 3-4: Tu, 5-6: Ca, 7-8: RB, 9-10: Ker, 11-12: Dp.

**Tabela 13.** Frequências das bandas obtidas como produto de amplificação, nas populações de *H. irritans* e grupo externo, utilizando o *primer* 60-36. As frequências em vermelho correspondem às bandas exclusivas.

| Banda n° | Tamanho (pb) | Populações |        |       |       |        |        |
|----------|--------------|------------|--------|-------|-------|--------|--------|
|          |              | SJRP       | Tu     | Ca    | RB    | Ker    | Dp     |
| 1        | 3143         | 16,70      | 23,30  | -     | -     | -      | -      |
| 2        | 2672         | 20,00      | 30,00  | -     | -     | -      | -      |
| 3        | 2606         | 13,30      | 23,30  | -     | -     | -      | -      |
| 4        | 2036         | 66,70      | 96,70  | -     | -     | -      | -      |
| 5        | 1945         | -          | 13,30  | -     | -     | -      | -      |
| 6        | 1636         | 53,30      | 83,30  | 33,30 | 16,70 | 36,70  | 100,00 |
| 7        | 1573         | 70,00      | 60,00  | 33,30 | 16,70 | 36,70  | -      |
| 8        | 1514         | 76,70      | 43,30  | 33,30 | 16,70 | 33,30  | -      |
| 9        | 1487         | -          | -      | -     | -     | -      | 100,00 |
| 10       | 1459         | 80,00      | 60,00  | 33,30 | 16,70 | 20,00  | -      |
| 11       | 1408         | 73,30      | 40,00  | -     | -     | -      | -      |
| 12       | 1258         | -          | -      | -     | -     | -      | 100,00 |
| 13       | 1048         | 73,30      | 86,70  | -     | -     | -      | -      |
| 14       | 1018         | 46,70      | 10,00  | 60,00 | 46,70 | 50,00  | 100,00 |
| 15       | 989          | 83,30      | 86,70  | 40,00 | 60,00 | 33,30  | -      |
| 16       | 974          | 20,00      | -      | -     | -     | -      | -      |
| 17       | 921          | 96,70      | 100,00 | 93,30 | 80,00 | 96,70  | -      |
| 18       | 898          | 43,30      | 100,00 | 86,70 | 46,70 | 63,30  | 100,00 |
| 19       | 814          | 100,00     | 100,00 | 93,30 | 86,70 | 100,00 | -      |
| 20       | 795          | -          | -      | 86,70 | 66,70 | 20,00  | -      |
| 21       | 396          | -          | -      | -     | -     | -      | 23,30  |
| 22       | 290          | -          | -      | 60,00 | 46,70 | 46,70  | -      |
| 23       | 284          | -          | -      | -     | -     | 23,30  | -      |

Também foram observadas bandas monomórficas (apresentando 100% de frequência), em um total de 3 em *H. irritans*: 17 e 18 (ambas em Tu), e 19 (partilhada por SJRP, Tu e Ker) e 5 em Dp: 6, 9, 12, 14 e 18.

Os produtos de amplificação exclusivos nas populações de *H. irritans*, com seus respectivos valores, foram: 5 (Tu, 13,30%), 16 (SJRP, 20%) e 23 (Ker, 23,30%). Com relação às bandas comuns às cinco populações de *H. irritans*, foram observadas as seguintes: 6, 7, 8, 10, 14, 15, 17, 18 e 19 (com frequências que variaram de 10% a 100%). As bandas 6, 14 e 18 ocorreram também em Dp, (com frequências que variaram de 16,70% a 100%).

Os seis fragmentos da amostra de Dp, apresentaram tamanho que variou de 1636 a 396 pb, aproximadamente. A análise dos mesmos mostrou que todos são monomórficos, já mencionados, com exceção da banda 21, cuja frequência foi de 23,30%.

A Tabela 14 mostra o número total de bandas exclusivas para cada população, produzidas por cada um dos dez *primers* utilizados no presente estudo. No total, para *H. irritans*, foram produzidas 25 bandas exclusivas. O grupo externo produziu 38 bandas exclusivas.

As populações de *H. irritans* onde foram observados maiores números de bandas exclusivas foram: Ker (12 bandas), seguida pelas populações Tu e SJRP (5 e 4 bandas exclusivas, respectivamente), e as que menos apresentaram estas bandas foram as de Ca e RB (ambas com 2 bandas cada).



**Tabela 14.** Número total de bandas exclusivas, produzidas por cada *primer*, em cada população de *H. irritans* analisada e no grupo externo.

| <i>Primers</i> | Populações |    |    |    |     |       |    |             |
|----------------|------------|----|----|----|-----|-------|----|-------------|
|                | SJRP       | Tu | Ca | RB | Ker | Total | Dp | Total Geral |
| 51             | -          | -  | -  | 2  | 2   | 4     | 3  | 7           |
| 54             | -          | -  | -  | -  | 1   | 1     | 6  | 7           |
| 60             | 2          | 1  | -  | -  | -   | 3     | 6  | 9           |
| 78             | -          | -  | -  | -  | 2   | 2     | 5  | 7           |
| 81             | -          | 1  | -  | -  | 1   | 2     | 6  | 8           |
| 83             | -          | -  | -  | -  | 3   | 3     | 1  | 4           |
| 88             | -          | -  | 2  | -  | 2   | 4     | 2  | 6           |
| 91             | 1          | 1  | -  | -  | -   | 2     | 4  | 6           |
| 50-10          | -          | 1  | -  | -  | -   | 1     | 2  | 3           |
| 60-36          | 1          | 1  | -  | -  | 1   | 3     | 3  | 6           |
| <b>Total</b>   | 4          | 5  | 2  | 2  | 12  | 25    | 38 | 63          |

Um resumo do número e da frequência de bandas monomórficas, por *primer*, nas cinco populações de *H. irritans* e no grupo externo (Dp), está apresentado na **Tabela 15**. Observa-se que a população de *H. irritans* com menor número de bandas monomórficas e mais baixa frequência é SJRP, enquanto que a de maior número e frequência é RB. Já o grupo externo apresentou uma alta taxa de bandas monomórficas, correspondendo a 22,22% do total de bandas detectadas nesta linhagem.

A **Tabela 16** mostra o número total de bandas comuns, separadas por *primer*, que foi encontrada em todas as populações de *H. irritans*, nestas e também na amostra de Dp, e, ainda, em uma ou mais populações de *H. irritans*, e inclusive em Dp. Foram produzidas 23 bandas comuns, partilhadas por todas as amostras de *H. irritans*. O *primer* que mais produziu este tipo de banda foi o 60-36 (6 bandas), seguido pelos *primers* 60 (5 bandas), 51 (3 bandas), 78, 81 e 50-10 (os três com 2 bandas cada). Já o *primer* 83 não produziu fragmentos comuns às cinco populações de *H. irritans*.



**Tabela 15.** Bandas monomórficas, por *primer*, nas cinco populações de *H. irritans* e no grupo externo (Dp). N= número total de bandas, produzidas por todos os *primers*. BM= porcentagem de bandas monomórficas, por amostra.

| Populações | Bandas monomórficas por <i>primer</i> |    |       |         |           |    |         |    |                    |                   | N   | BM          |
|------------|---------------------------------------|----|-------|---------|-----------|----|---------|----|--------------------|-------------------|-----|-------------|
|            | 51                                    | 54 | 60    | 78      | 81        | 83 | 88      | 91 | 50-10              | 60-36             |     |             |
| SJRP       | -                                     | -  | -     | 4       | -         | 11 | 15 e 16 | -  | 16                 | 19                | 111 | 6 (5,40%)   |
| Tu         | -                                     | -  | -     | -       | -         | -  | 15      | 4  | 16 e 20            | 17, 18 e 19       | 115 | 7 (6,08%)   |
| Ca         | 15                                    | -  | -     | -       | -         | -  | 15      | -  | 7, 12, 13, 16 e 21 | -                 | 99  | 7 (7,07%)   |
| RB         | 7, 11 e 15                            | 10 | -     | 4 e 5   | -         | 9  | -       | 4  | 7, 12, 13, 16 e 21 | -                 | 67  | 13 (10,44%) |
| Ker        | 15                                    | -  | 19    | 17 e 18 | 18        | 6  | 15      | -  | -                  | 19                | 112 | 8 (7,14%)   |
| Dp         | -                                     | 16 | 3 e 5 | 7       | 6, 9 e 16 | 9  | 8 e 14  | 19 | 10 e 12            | 6, 9, 12, 14 e 18 | 81  | 18 (22,22%) |

**Tabela 16.** Número de bandas comuns, geradas por cada *primer*: (a) encontradas em todas as populações de *H. irritans*; (b) encontradas nestas e no grupo externo (Dp); (c) encontradas em algumas populações de *H. irritans* e no grupo externo.

| Presença de bandas comuns                                | <i>Primers</i> |    |    |    |    |    |    |    |       |       | Total de bandas comuns |
|----------------------------------------------------------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|-------|-------|------------------------|
|                                                          | 51             | 54 | 60 | 78 | 81 | 83 | 88 | 91 | 50-10 | 60-36 |                        |
| (a) Em todas as populações de<br><i>H. irritans</i>      | 3              | 1  | 5  | 2  | 2  | -  | 1  | 1  | 2     | 6     | 23                     |
| (b) Em todas as populações de<br><i>H. irritans</i> e Dp | 3              | 3  | 1  | 4  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1     | 3     | 19                     |
| (c) Em algumas populações de<br><i>H. irritans</i> e Dp  | 4              | 4  | 1  | 1  | 4  | 1  | 2  | 2  | 5     | -     | 24                     |

### III.2. Similaridade genética

A Tabela 17 refere-se aos Índices de Similaridade entre as populações de *H. irritans*, considerando-se as bandas produzidas pelos 10 *primers* utilizados e suas médias. Conforme descrito em Materiais e Métodos, estes índices foram calculados computando-se o número de bandas ausentes e presentes na comparação das populações duas a duas. As médias obtidas em cada comparação envolvendo a população de SJRP mostraram maior similaridade entre esta e Tu, seguida de Ca, Ker e RB. As demais comparações confirmam essas similaridades.

A Tabela 18 apresenta os Índices de Similaridade obtidos na comparação entre o grupo externo e as cinco populações de *H. irritans*. Observa-se que as médias são baixas em todas as comparações, denotando a diferenciação maior daquelas populações com o grupo externo.



**Tabela 17.** Índices de Similaridade entre as populações de *H. irritans*, considerando as bandas produzidas pelos 10 primers utilizados.

|                       |   |     | Primers |       |       |       |       |       |       |       |       |       | Médias |
|-----------------------|---|-----|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Populações Comparadas |   |     | 51      | 54    | 60    | 78    | 81    | 83    | 88    | 91    | 50-10 | 60-36 |        |
| SJRP                  | X | Tu  | 1       | 1     | 0,846 | 0,956 | 0,800 | 1     | 0,880 | 0,888 | 0,937 | 0,769 | 0,907  |
|                       |   | Ca  | 0,666   | 0,526 | 0,916 | 0,880 | 1     | 0,714 | 0,770 | 0,960 | 0,666 | 0,636 | 0,773  |
|                       |   | RB  | 0,666   | 0,470 | 0,761 | 0,736 | 0,571 | 0,200 | 0,600 | 0,266 | 0,666 | 0,583 | 0,551  |
|                       |   | Ker | 0,600   | 0,695 | 0,695 | 0,750 | 0,700 | 0,800 | 0,700 | 0,833 | 0,785 | 0,476 | 0,703  |
| Tu                    | X | Ca  | 0,666   | 0,526 | 0,916 | 0,960 | 0,800 | 0,714 | 0,666 | 0,923 | 0,666 | 0,545 | 0,732  |
|                       |   | RB  | 0,666   | 0,470 | 0,761 | 0,700 | 0,500 | 0,200 | 0,615 | 0,250 | 0,666 | 0,580 | 0,540  |
|                       |   | Ker | 0,600   | 0,695 | 0,782 | 0,800 | 0,727 | 0,800 | 0,800 | 0,888 | 0,642 | 0,285 | 0,702  |
| Ca                    | X | RB  | 0,727   | 0,714 | 0,846 | 0,727 | 0,571 | 0,333 | 0,300 | 0,285 | 1     | 0,900 | 0,640  |
|                       |   | Ker | 0,833   | 0,800 | 0,761 | 0,814 | 0,700 | 0,625 | 0,500 | 0,869 | 0,956 | 0,700 | 0,758  |
| RB                    | X | Ker | 0,666   | 0,500 | 0,666 | 0,666 | 0,625 | 0,166 | 0,533 | 0,173 | 0,956 | 0,631 | 0,558  |

**Tabela 18.** Índices de Similaridade entre a amostra utilizada como grupo externo (Dp) e as populações de *H. irritans*, considerando as bandas produzidas pelos 10 *primers* utilizados.

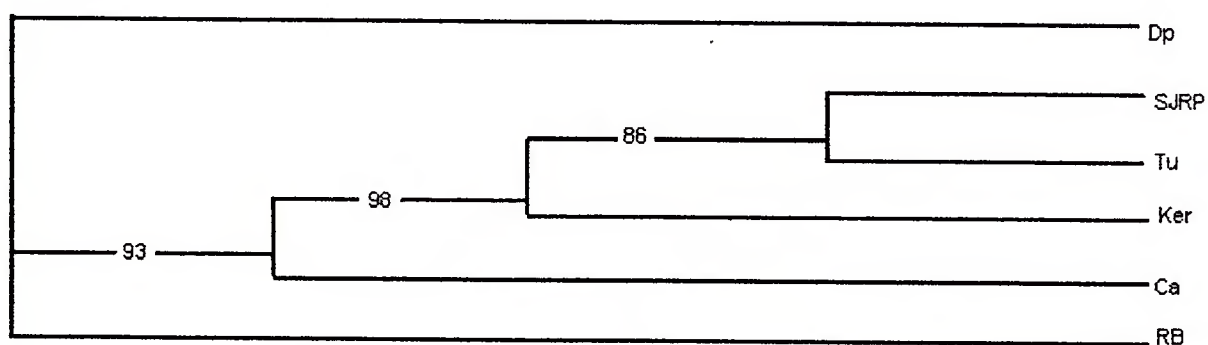
|                       |   |      | Primers |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |
|-----------------------|---|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Populações Comparadas |   |      | 51      | 54    | 60    | 78    | 81    | 83    | 88    | 91    | 50-10 | 60-36 | Médias |
| Dp                    | X | SJRP | 0,352   | 0,416 | 0,095 | 0,380 | 0,200 | 0,333 | 0,285 | 0,300 | 0,666 | 0,380 | 0,340  |
|                       |   | Tu   | 0,352   | 0,416 | 0,095 | 0,363 | 0,272 | 0,333 | 0,285 | 0,285 | 0,272 | 0,380 | 0,305  |
|                       |   | Ca   | 0,571   | 0,380 | 0,105 | 0,333 | 0,400 | 0,250 | 0,285 | 0,315 | 0,352 | 0,117 | 0,310  |
|                       |   | RB   | 0,476   | 0,380 | 0,125 | 0,444 | 0,500 | 0,500 | 0,222 | 0,105 | 0,352 | 0,210 | 0,331  |
|                       |   | Ker  | 0,521   | 0,320 | 0,222 | 0,434 | 0,363 | 0,285 | 0,375 | 0,315 | 0,333 | 0,125 | 0,329  |

### III.3. Análise filogenética

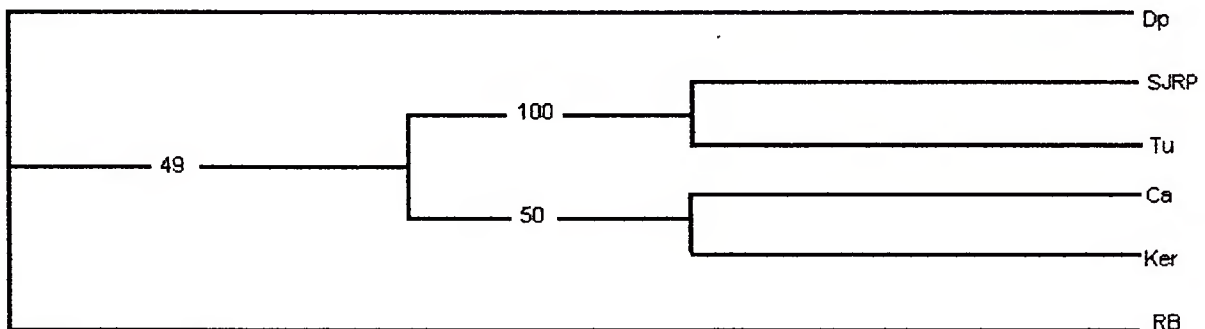
Na análise filogenética com base nos dados obtidos neste trabalho, avaliados discretamente (presença/ausência), foi utilizado o algoritmo *neighbor-joining* (programa PAUP 4.0) e aplicado o método de *bootstrap* (com 100 réplicas). As análises foram realizadas separadamente, para cada *primer* e para cada todos eles juntos, produzindo as sete árvores filogenéticas mostradas nas Figuras 12 a 18. Cada figura representa uma árvore diferente das demais, correspondente a um ou mais *primers*.

Essas figuras diferem especialmente pela posição das linhagens RB e Ker. Em quatro das sete figuras (Figuras 12, 13, 17, 18), correspondentes a sete *primers*, a população RB constitui um ramo mais periférico, sendo, portanto, a mais diferenciada entre as populações de *H. irritans* analisadas. Nas outras três figuras (Figuras 14 a 16), correspondentes a três *primers*, observa-se uma mudança nesta relação. Na Figura 14, RB encontra-se filogeneticamente mais próxima de Ker e Ca do que de SJRP e Tu. Na Figura 15 esta situação se inverte, estando RB mais próxima de Tu e SJRP do que de Ca e Ker. Já na Figura 16, RB está mais próxima de Ca do que de Ker, e estas três populações mantêm-se distantes de SJRP e Tu. Na árvore apresentada na Figura 17, correspondente a quatro *primers*, Ca está mais próxima de SJRP (constituem ramos irmãos), enquanto que nas seis demais árvores, correspondentes a seis *primers*, SJRP está mais próxima de Tu do que de Ca.

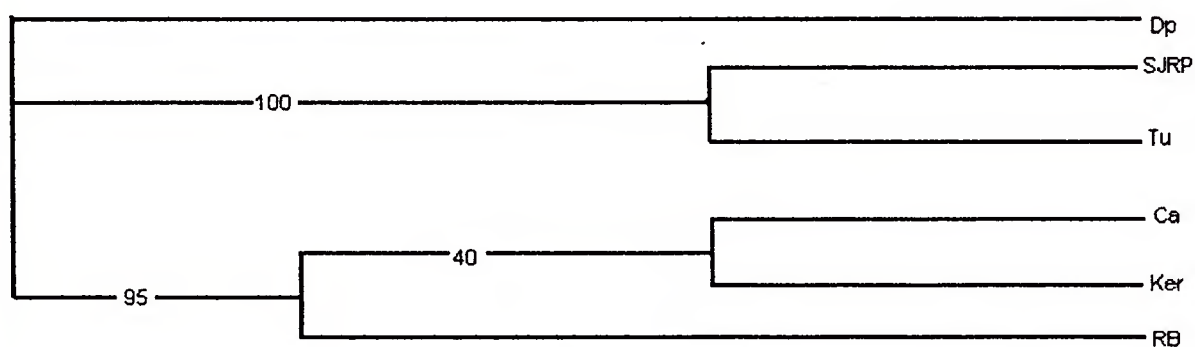




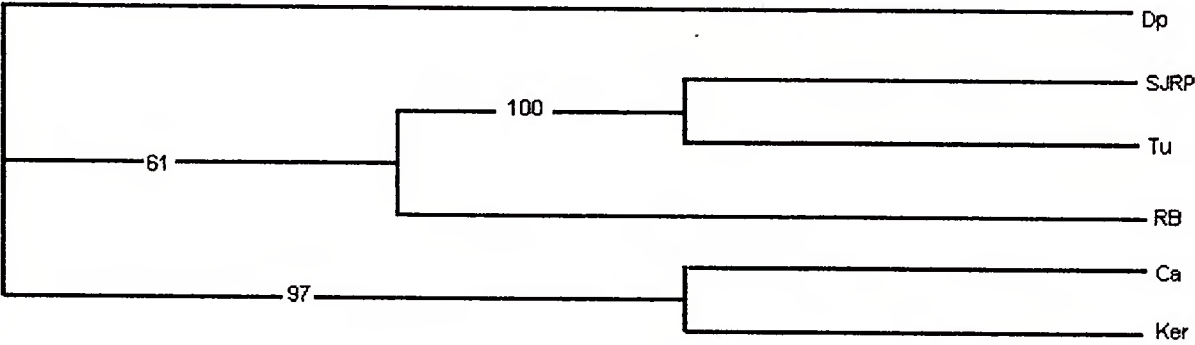
**Figura 12.** Árvore filogenética baseada nos resultados obtidos com o *primer* 83, utilizando o algoritmo *neighbor-joining* e o método de *bootstrap* (programa PAUP 4.0).



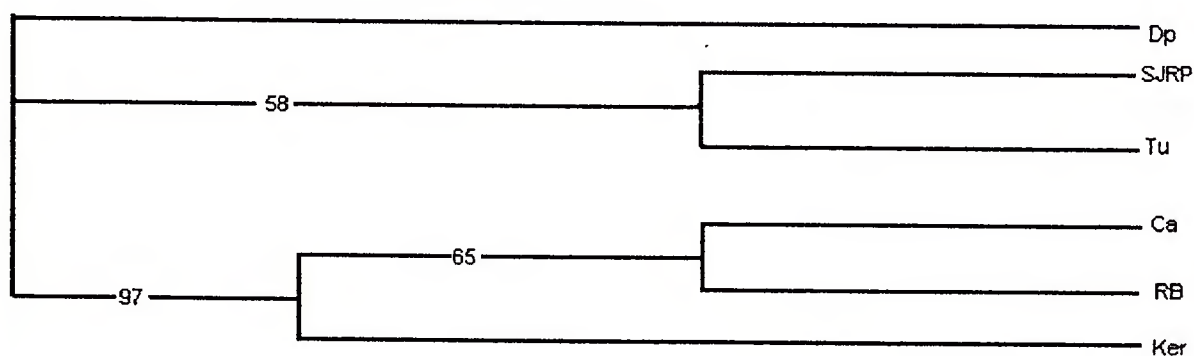
**Figura 13.** Árvore filogenética baseada nos resultados obtidos com o *primer* 54, utilizando o algoritmo *neighbor-joining* e o método de *bootstrap* (programa PAUP 4.0).



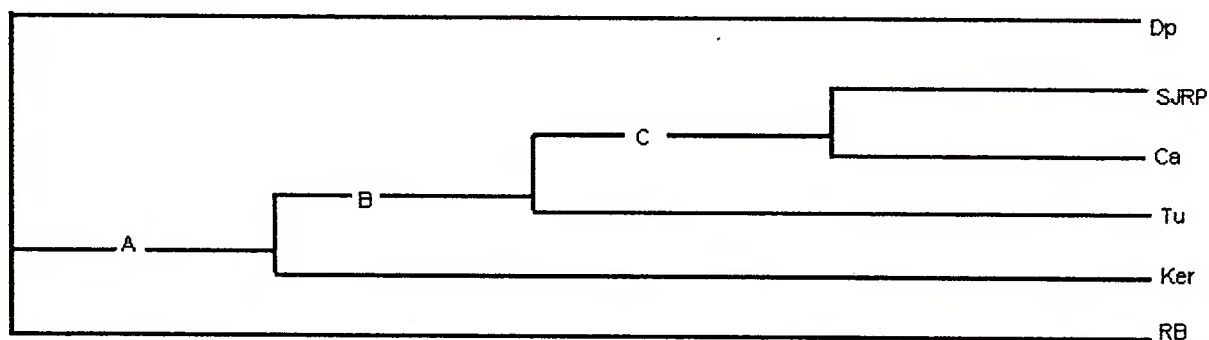
**Figura 14.** Árvore filogenética baseada nos resultados obtidos com o *primer* 60-36, utilizando o algoritmo *neighbor-joining* e o método de *bootstrap* (programa PAUP 4.0).



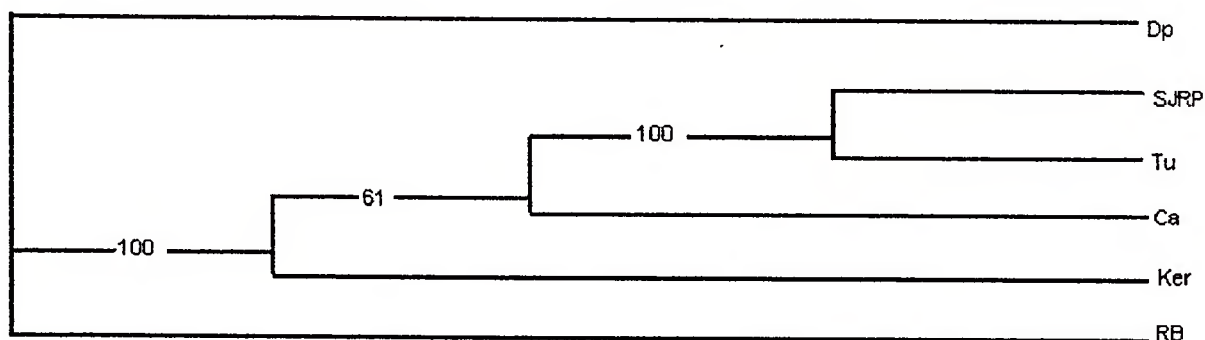
**Figura 15.** Árvore filogenética baseada nos resultados obtidos com o *primer* 51, utilizando o algoritmo *neighbor-joining* e o método de *bootstrap* (programa PAUP 4.0).



**Figura 16.** Árvore filogenética baseada nos resultados obtidos com o *primer* 50-10, utilizando o algoritmo *neighbor-joining* e o método de *bootstrap* (programa PAUP 4.0).



**Figura 17.** Árvore filogenética baseada nos resultados obtidos com os *primers* 60, 81, 88 e 91, utilizando o algoritmo *neighbor-joining* e o método de *bootstrap* (programa PAUP 4.0). Valores de *bootstrap*, respectivamente, para cada *primer*: A= 55, 55, 55, 99; B=76, 60, 76, 80; C=75, 95, 75, 80.



**Figura 18.** Árvore filogenética baseada nos resultados obtidos com o *primer* 78, e, também, para todos os *primers* em conjunto, utilizando o algoritmo *neighbor-joining* e o método de *bootstrap* (programa PAUP 4.0).

---

*Resultados*

Também foram analisados todos os *primers* conjuntamente, procurando inferir as relações filogenéticas utilizando o total de dados. Excluindo os caracteres considerados não-informativos, utilizando algoritmo *neighbor-joining* e aplicando o método de *bootstrap* (100 réplicas), a relação entre as linhagens analisadas neste trabalho é a mesma observada para o *primer* 78, apresentada na **Figura 18**. Considerando-se o consenso de 50% do *bootstrap*, todas as posições de dicotomia são altamente significantes.



#### IV. DISCUSSÃO

Um dos desafios da biologia atual é o de utilizar a grande quantidade de dados moleculares disponíveis, organizando-os no sentido de tentar compreender como os organismos se relacionam e como eles se derivaram no processo evolutivo. Entre as técnicas disponíveis hoje, RAPD tem sido bastante utilizada, devido às suas características, já mencionadas, com resultados considerados importantes para esse objetivo.

Particularmente nos insetos, os marcadores RAPDs estão sendo utilizados em estudos filogenéticos, na identificação de espécies, subespécies e biótipos (Cognato *et al.*, 1995).

No presente trabalho, foi empregada a técnica de RAPD para o estudo da variabilidade genética em cinco populações de *H. irritans*, utilizando *Drosophila prosaltans* como grupo externo, e 10 *primers* decaméricos aleatórios, que foram previamente selecionados entre 23. A mosca-do-chifre é um díptero de grande interesse econômico, uma vez que afeta os nossos rebanhos bovinos, exigindo grandes gastos com inseticidas para o seu controle, além das perdas em termos de produção de carne, leite e reprodução. Acresce a isto, o fato de que, conforme mencionam os pecuaristas, freqüentemente é necessário mudar o tipo de inseticida utilizado, dada a facilidade com que estas populações tornam-se resistentes.

Nossa preocupação com o estudo da variabilidade genética dessa espécie teve início com a análise dos padrões de esterases de algumas populações brasileiras. Esses estudos mostraram uma relativa homogeneidade das mesmas,



### *Discussão*

que foi atribuída ao seu habitat restrito e condições de hematofagia obrigatória (Castiglioni-Ruiz *et al.*, 1997). Outros autores também detectaram homogeneidade nesse organismo, estudando outros sistemas enzimáticos. McDonald *et al.* (1987) utilizaram a técnica de eletroforese em gel de amido, em mais de 11 sistemas enzimáticos, inclusive esterases, e nove populações de *H. irritans* dos Estados Unidos da América do Norte e do Havai. Os resultados obtidos mostraram elevada identidade genética entre as populações analisadas, sugerindo que, pela falta de diferenciação significativa, não deve haver barreiras ao fluxo gênico, entre essas populações. Segundo esses autores, esta situação foi descrita em outros parasitas e as consequências genéticas de um estilo de vida parasítico são a homogeneidade intrapopulacional e a divergência interpopulacional, acrescentando ainda, que isto não ocorre na mosca-do-chifre, talvez porque os rebanhos (hospedeiros) são numerosos e móveis.

No presente trabalho, na análise da variabilidade genética pelo uso da técnica de RAPD foram consideradas apenas as bandas com frequência igual ou maior a 10%, com o objetivo de possivelmente evitar a inclusão de bandas com amplificação inespecífica (Castro & Madi-Ravazzi, 2000). Foram obtidos 117 fragmentos em *H. irritans*, sendo que a população mais polimórfica foi a de Turiúba, SP (Tu), seguida de Kerrville (Texas) e São José do Rio Preto, SP (SJRP). A amostra de Rio Branco, Ac (RB) foi a menos polimórfica, com um número de bandas que corresponde a aproximadamente metade do número encontrado nas demais populações.

*Discussão*

Numa discussão referente às causas dessa diferença entre RB e as demais populações, podemos aventar algumas hipóteses.

Segundo Williams *et al.* (1994), diferenças genéticas em uma população introduzida podem resultar da variação existente na população fundadora, do número de eventos do fundador e da pressão de seleção. Ainda segundo esses autores, o entendimento dessa variação em populações geográficas pode ser um importante aspecto no estudo de pestes, fornecendo dados a respeito da origem geográfica das mesmas. A quantidade de variação entre populações geográficas depende, por sua vez, de vários fatores, incluindo o fluxo gênico e o tempo de separação.

No caso de RB, observa-se que é a população geograficamente mais afastada, sendo certamente a mais isolada em função dessa localização, tendo, conseqüentemente, sofrido menor índice de trocas gênicas do que as demais, que estão localizadas em regiões sujeitas a intenso comércio pecuarista. Como as moscas são veiculadas junto com o gado, espera-se que seja promovido um maior fluxo entre as moscas destas últimas regiões. O isolamento gera o endocruzamento que leva à homozigose e conseqüentemente à redução da variabilidade.

Um outro aspecto das populações de *H. irritans* analisadas, refere-se a bandas exclusivas de cada população, produzidas pelos 10 *primers* utilizados. A população de Ker, que é criada em laboratório, nos Estados Unidos, é considerada altamente resistente a inseticidas piretróides (Guerrero *et al.*, 1997). Ela é mantida nestas condições por pressão de seleção contínua e foi a que

### *Discussão*

apresentou o maior número de bandas exclusivas, em um total de 12. Seguiram-se Tu e SJRP, com 5 e 4 bandas, respectivamente, e as demais, Ca e RB com 2 bandas cada uma.

A presença de bandas exclusivas pode constituir uma forma de diferenciar a origem geográfica dessas moscas, ampliando, assim, a aplicação da técnica de RAPD para identificação de taxa geneticamente distintos. Na Introdução, mencionamos vários trabalhos, em outros organismos, em que isto foi também possível.

Quanto ao número bem maior de bandas exclusivas na população americana, podemos supor que envolva também o produto da seleção de genes relacionados com o desenvolvimento da resistência ao inseticida, mantida, como já mencionamos, por pressão contínua de um mesmo inseticida piretróide.

Particularmente nos insetos vetores de doenças, pragas agrícolas e de animais, o fenômeno de aquisição de resistência a certos inseticidas constitui um grande problema enfrentado atualmente pelos programas de erradicação destes organismos, pois os mesmos causam sérios prejuízos à saúde e economia mundiais. Há, ainda, que considerar os problemas relacionados ao uso excessivo de inseticidas, contaminando o ambiente.

Vários mecanismos genéticos estão envolvidos na aquisição de resistência. Esta pode se originar por mutações em ponto na estrutura dos genes-alvo do inseticida ou por modificações no número ou atividade de genes envolvidos. As alterações decorrentes podem resultar em problemas na ligação ou na desintoxicação metabólica destes compostos. A técnica de RAPD tem sido



### Discussão

utilizada com sucesso, também, para produzir marcadores moleculares que possam detectar modificações ao nível do DNA, envolvidos com resistência a inseticidas, identificando assim, indivíduos e populações com essa característica.

Inseticidas amplamente utilizados no combate à mosca-do-chifre pertencem, em grande parte, à classe dos piretróides. O sítio de ação destes compostos parece estar relacionado com a permeabilidade iônica dos canais de sódio. A rápida resistência aos piretróides é conhecida como efeito *kdr* (do inglês *knockdown effect*) e foi mapeada em um *locus* que codifica para proteínas destes canais em vários insetos, tais como: a mosca doméstica, a barata germânica e *Drosophila melanogaster* (Williamson *et al.*, 1993; 1996; Myazaki *et al.*, 1996). Vários destes estudos mostraram diferenças na estrutura gênica entre linhagens susceptíveis e resistentes.

Guerrero *et al.* (1997) utilizaram a técnica de RAPD, juntamente com técnicas toxicológicas, para comparar populações de *H. irritans* susceptíveis, resistentes e super resistentes ao inseticida piretróide cyhalothrin. Estas populações são mantidas em laboratório, sendo que, a população super resistente é submetida à pressão de seleção do inseticida, aplicado semanalmente. Esses autores utilizaram dois *primers* com 20 nucleotídeos cada, que são utilizados na clonagem de fragmentos dos genes dos canais de sódio de outra espécie de díptero (a mosca do estábulo) mas, devido ao alto nível de conservação da sequência primária das proteínas destes canais e sua associação com a resistência, foram utilizados na mosca-do-chifre a fim de produzir marcadores moleculares capazes de diagnosticar este fenômeno. Em seus resultados, foi encontrado um fragmento

### *Discussão*

com 1.4 Kb, presente em 18% e 14% dos indivíduos resistentes e super resistentes, respectivamente. Esse fragmento não foi encontrado em indivíduos susceptíveis. Em suas conclusões, os autores comentam as vantagens do uso da técnica de RAPD e sua versatilidade, produzindo um marcador molecular capaz de diagnosticar as populações resistentes, enfatizando a relevância desses estudos para o monitoramento de populações de insetos de importância econômica. Portanto, os resultados desses estudos corroboram a nossa suposição de que alguns dos fragmentos exclusivos da população de Ker, sejam decorrentes de mutações selecionadas pela pressão de seleção estabelecida em laboratório.

Temos, ainda, a considerar, no presente trabalho, a porcentagem de fragmentos monomórficos em cada população de *H. irritans* analisada. Como já foi mencionado, consideram-se fragmentos monomórficos aqueles que ocorrem em 100% dos indivíduos analisados. A população RB foi a que apresentou maior frequência desse tipo de bandas. Esse achado concorda com os dados já mencionados de maior homogeneidade dessa população, referentes ao menor número total de bandas, produzidas com o uso desses *primers*.

Quanto ao partilhamento de bandas, nas populações analisadas, do total de 117 bandas produzidas pelos 10 *primers*, em *H. irritans*, 23 foram comuns às cinco populações. Essas bandas devem corresponder às seqüências gênicas derivadas da população ancestral de *H. irritans*. Contudo, 19 dessas 23 bandas ocorreram também no grupo externo (Dp) e, portanto, podem ser derivadas do ancestral comum, que originou os dois gêneros.



---

*Discussão*

Há também algumas bandas que não são comuns a todas as populações de *H. irritans*, mas que estão também presentes no grupo externo, em um total de 24. Essas seqüências devem ter sido perdidas na divergência das populações.

Neste trabalho, os resultados obtidos por RAPD foram utilizados para inferir a similaridade e as relações filogenéticas entre as populações. Os Índices de Similaridade foram calculados com base no número de bandas comuns entre duas populações e o número de bandas presentes em uma ou outra população, de acordo com o método de Nei & Li (1979), descrito em Materiais e Métodos. Os valores obtidos obedecem à mesma seqüência de proximidade mostrada nas árvores filogenéticas que são discutidas a seguir.

As árvores filogenéticas para cada *primer* e para o total de *primers* foram obtidas por parcimônia, utilizando-se o algoritmo *neighbor-joining* e aplicando-se o método de *bootstrap* (Swofford, 2001). Conforme mostram as árvores obtidas, há uma boa confiabilidade nos resultados, determinada pela obtenção de uma só árvore e pelos valores de *bootstrap*, superiores a 50% na maioria dos casos.

Analisando separadamente a árvore produzida por cada *primer*, observa-se que, em sete deles, a população RB constitui um ramo mais periférico, sendo, portanto, a mais diferenciada entre as populações de *H. irritans* analisadas. Outro aspecto a ser salientado, é que a árvore gerada pela análise conjunta com

*Discussão*

todos os *primers* mostra as mesmas relações filogenéticas produzidas pelos dados do *primer* 78.

As populações Tu e SJRP são as mais próximas entre si em seis *primers*, aparecendo reunidas, na árvore filogenética derivada da análise conjunta com todos os *primers*, em 100% dos testes de *bootstrap*. Seguem-se, mais distantes na relação de proximidade, as populações de Ca (valor de *bootstrap* 61) e depois Ker (valor de *bootstrap* 100).

No que se refere à tentativa de reunir dados que possam futuramente auxiliar na elucidação da origem geográfica das populações que colonizaram o Brasil, nossos dados mostraram-se insuficientes, principalmente pelo fato de termos obtido uma só amostra de DNA de moscas do exterior.

Para determinar a origem de uma população é necessário demonstrar as similaridades genéticas entre ela e sua possível ancestral. Reyes & Ochando (1998) utilizaram a técnica de RAPD para detectar a origem geográfica de populações de *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae), a mosca da fruta do Mediterrâneo. Para este estudo foram analisadas quatro populações (três naturais e uma mantida em laboratório). Foram utilizadas isoenzimas, DNA mitocondrial e a técnica de RAPD. Com base nos resultados obtidos, os autores verificaram que apenas os marcadores RAPD e de DNA mitocondrial foram capazes de agrupar uma população natural com a população mantida em laboratório. As demais populações formaram um ramo diferente no dendograma. Segundo os autores, esse agrupamento seria esperado, uma vez que as duas populações pertencem à

### Discussão

mesma área geográfica e apresentaram os menores valores de distância genética.

O polimorfismo genético revelado por estes dois marcadores de DNA, entre as populações analisadas, permitiu, ainda, traçar a possível origem geográfica das mesmas. Mesmo considerando o longo tempo de isolamento da população mantida em laboratório (20 anos), o fenômeno inicial do gargalo da garrafa e a adaptação às novas condições, extremamente diferentes, os marcadores RAPDs e de DNA mitocondrial foram capazes de agrupar as duas populações de mesma origem geográfica.

Yotoko (1998) também utilizou a técnica de RAPD para caracterizar geneticamente seis populações naturais de *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae, Cuterebrinae), conhecida como a mosca do berne, principal causadora de miíase em animais domésticos, sendo portanto uma praga pecuária que também causa graves prejuízos econômicos. Os resultados obtidos nesse trabalho sugeriram que as populações analisadas, apesar de terem sido coletadas em localidades relativamente distantes, encontram-se em contato, com sucessivas migrações de indivíduos de uma região para outra. Isto ocorre devido às práticas inadequadas de manejo e à falta de fiscalização efetiva do transporte do rebanho entre as diferentes regiões do País. Assim, as populações de *D. hominis* não apresentaram diferença estrutural genética detectável pelos marcadores RAPD, sugerindo que as mesmas estejam em processo dinâmico de homogeneização, não havendo barreiras ao fluxo gênico. Nossos dados referentes às populações SJRP, Tu e Ca, como já mencionamos, mostram situação semelhante.



*Discussão*

De acordo com McDowell & Prakash (1976) uma das mais importantes questões da biologia evolutiva reside na quantidade de variação genética que existe nas populações, do seu significado e de como ela é mantida nas populações naturais. Muitos trabalhos têm se voltado ao estudo de polimorfismos genéticos em diferentes populações e espécies e às modificações na sequência de aminoácidos das proteínas e enzimas ao longo da evolução, evidenciando a grande quantidade de variação genética existente nessas populações. Estudos ao nível de DNA devem fornecer a complementação necessária para que, ao longo do tempo, seja possível conhecer melhor as questões relacionadas à variabilidade e à diferenciação das populações.

Assim, apesar de suas limitações, já mencionadas, a técnica de RAPD tem se mostrado eficaz em muitos trabalhos encontrados na literatura, referentes aos mais diversos organismos. No presente estudo, estes marcadores permitiram a obtenção de algumas informações em relação à mosca-do-chifre, tais como a identificação da origem geográfica das populações analisadas, de que as populações geograficamente mais próximas são, também, geneticamente mais semelhantes, pelas oportunidades de ocorrência de fluxo gênico e que a população geograficamente mais afastada e isolada é a que apresenta a menor variabilidade. Desta forma, consideramos que, também no presente estudo, a técnica se mostrou eficiente para estes fins.

## V. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de RAPD para o estudo da variabilidade genética em cinco populações de *H. irritans*, coletadas em São José do Rio Preto e Turiúba, SP (respectivamente, SJRP e Tu), Cassilândia, MS (Ca), Rio Branco, Ac (RB) e Kerrville, Tx, (Ker). Como grupo externo foi utilizada *D. prosaltans*. Foram empregados, neste estudo, 10 *primers* decaaméricos aleatórios, previamente selecionados entre 23. Os resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. A amplificação do DNA genômico dessas populações produziu 198 fragmentos, que variaram de 4072 a 284 pb. Desse total, 117 ocorreram em *H. irritans*, 81 em *D. prosaltans* e 135 foram partilhados pelas duas espécies. Com relação ao número total de bandas produzidas por população, as mais polimórficas foram Tu (com 115 bandas), Ker (com 112 bandas) e SJRP (com 111 bandas). A população menos polimórfica foi RB (com 67 bandas).

2. Bandas exclusivas foram obtidas em todas as populações, o que permite caracterizá-las. A população Ker produziu o maior número (12 bandas), seguida por Tu, SJRP, Ca e RB. Podemos supor que a diferença entre a população Ker e as populações brasileiras seja devida à seleção de genes relacionados com o desenvolvimento de resistência a inseticidas piretróides, característica específica daquela população.

3. Bandas monomórficas foram observadas em todas as populações e, novamente, a amostra RB produziu o maior número (13 bandas), indicando uma homogeneidade genética mais elevada, que poderia ser explicada com base em



### Conclusões

sua localização geográfica. Como esta população é geograficamente mais afastada, permanecendo mais isolada, deve ter sofrido menor índice de trocas gênicas do que as demais, localizadas em regiões sujeitas a intenso comércio pecuarista.

4. Quanto ao partilhamento de bandas, das 117 bandas produzidas pelos 10 *primers*, em *H. irritans*, 23 foram comuns às cinco populações dessa espécie e devem corresponder à seqüências gênicas derivadas da população ancestral. Dezenove bandas foram comuns a *H. irritans* e *D. prosaltans*, sugerindo uma origem filogenética mais distante.

5. As médias dos Índices de Similaridade obtidas a partir da comparação das populações analisadas mostraram uma maior semelhança entre as populações de SJRP e Tu, seguida, na ordem, de Ca, Ker e RB.

6. As relações filogenéticas entre as populações, obtidas pelo programa PAUP 4.0 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) mostraram resultados semelhantes aos Índices de Similaridade. Na árvore produzida pelo programa, a população RB constitui um ramo mais isolado, sendo, portanto, a mais diferenciada entre as populações de *H. irritans* analisadas. SJRP e Tu ao contrário, estão mais próximas, seguidas, em proximidade, por Ca e Ker. Os valores de *bootstrap* são elevados em todos os nodos, o que atesta a confiabilidade das árvores filogenéticas produzidas.

Os dados obtidos pela técnica de RAPD mostraram-se , portanto, adequados aos objetivos básicos pretendidos no presente trabalho, relacionados com o estudo da variabilidade genética de populações de *H. irritans*.



---

**VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABE, H., SUGASAKI, T., KANEHARA, M., SHIMADA, T. Identification and genetic mapping of RAPD markers linked to the desonucleosis refractoriness gene. *Genes Genetic Syst.*, v. 75, n. 2, p. 93-96, 2000.

APOSTOL, B.L., BLACK IV, W.C., REITER, P., MILLER, B.R. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, v. 76, p. 215-221, 1996.

AYLIFFE, M.A., LAWRENCE, G.J., ELLIS, J.G., PRYOR, J. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 1632-1636, 1994.

ARGENTINE, J.A., JAMES, A.A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v. 25, p. 621-630, 1995.

BALLINGER-CRABTREE, M.E., BLACK IV, W.C., MILLER, B.R. Use of genetic polymorphisms detected by the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 47, p. 893-901, 1992.

BANULS, A.L., JONQUIERES, R., GUERRINI, F., LE PONT, F., BARRERS, C., ESPINEL, I., GUDERIAN, R., ECHEVERRIA, R., TIBAYRENC, M. Genetic analysis of leishmania parasites in Ecuador: are *Leishmania panamensis*



*Referências Bibliográficas*

and *Leishmania guyanensis* distinct taxa? *Am J. Trop. Med. Hyg.*, v. 61, p. 838-845, 1999.

BARRO, P.J., DRIVER, F. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Australian Journal of Entomol.*, v. 36, p. 149-152, 1997.

BARROS, AT. Dynamics of *Haematobia irritans* infestation on nelore cattle in the Pantanal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 445-450, 2001.

BARROS, AT., OTTEA, J., SANSON, D., FOIL, L.D. Horn fly resistance to organophosphate insecticides. *Vet. Parasitol.*, v. 96, p. 243-256, 2001.

BECKMANN, J.S. Oligonucleotide polymorphisms: a new tool for genomic genetics. *Biol. Technology*, v. 6, p. 1061-1064, 1988.

BEEMAN, R.W., BROWN, S.J. RAPD-based genetic linkage maps of *Tribolium castaneum*. *Genetics*, v. 153, n. 1, p. 333-338, 1999.

BLACK IV, W.C. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molec. Biol.*, v. 21, n. 2, p. 1-6, 1993.

BLACK IV, W.C., DUTEAU, N.M., PUTERKA, G.J., NECHOLS, J.R., PETTORINI, J.M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomol. Research*, v. 82, p. 151-159, 1992.

BORGES, E.C., DUJARDIN, J.P, SCHOFIELD, C.J., ROMANHA, AJ. Genetic variability of *Triatoma brasiliensis* populations. *J. Med. Entomol.*, v. 37, n. 6, p. 872-877, 2000.

*Referências Bibliográficas*

- BOURNOVILLE, R., SIMON, J.C., BADENHAUSSER, I., GIROUSSE, C., GUILLOX, T., ANDRE, S. Clones of pea aphid distinguished using genetic markers, differ in their damaging effect on a resistant alfafa cultivar. *Bull. Entomol. Res.*, v. 90, n. 1, p. 33-39, 2000.
- BYFORD, R.L., CRAIG, M.E., DEROUEN, S.M., KIMBALL, M.D., MORRISON, D.G., WYATT, W.E., FOIL, L.D. Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). *International Journal for Parasitol.*, v. 29, n. 1, p. 125-135, 1999.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: new developments and applications. *Nature Biotechnology*, v. 14, p. 1668-1674, 1996.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J., GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, v. 9, p. 553-557, 1991a.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J., GRESSHOFF. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol.*, v. 4, p. 295-307, 1991b.
- CAMPBELL, J.B. Effect of horn fly control on cows as expressed by increased weigths of calves. *J. Econ. Entomol.*, v. 69, p. 711, 1976.
- CAMPBELL, J.B., THOMAS, G.D. The history, biology, economics and control of the horn fly, *Haematobia irritans*. *Agri-practice.*, v. 13, n. 4, p. 31-36, 1992.



Referências Bibliográficas

- CASTIGLIONI-RUIZ, L., BICUDO, H.E.M.C., CERON, C.R. Esterase patterns in four Brazilian populations of *Haematobia irritans*. *Cytobios*, v. 90, p.81-94, 1997.
- CASTRO, J.P, MADI-RAVAZZI, L. RAPD as genetic marker in taxonomic and evolutionary studies in the *Drosophila buzzatii* cluster. *DIS*, v. 83, p. 26-32, 2000.
- COGNATO, A.I., ROGERS, S.O., TEALE, S.A. Species diagnosis and phylogeny of the *Ipis grandicollis* group using random amplified polymorphic DNA. *Annals of the Entomol. Soc. of America*, v. 88, p. 397-405, 1995.
- CURTSINGER, J.W., FUKUI, H.H., RESLER, A.S., KELLY, K., KHAZAELI, A.A. Genetic analysis of extended life span in *Drosophila melanogaster*. I. RAPD screen for genetic divergence between selected and control lines. *Genetica*, v. 104, p. 21-32, 1998.
- CUSHING, P.E. Population structure of the ant nest symbiont *Masoncus pogonophilus* (Araneae: inyphiidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 91, n. 5, p. 602-607, 1998.
- DAVIN-REGLI, A., ABED, Y., CHARREL, R.N., BOLLET, C., MICCO, P. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.*, v. 146, p. 561-568, 1995.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J., HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DRUMMOND, R.O., GEORGE, J.E., KUNZ, S.E. Control of arthropod pests of livestock: a review of technology. *CRC. Press, Boca Raton, Fla.*, p. 245, 1988.



*Referências Bibliográficas*

DURBIN, R., EDDY, S., KROGH, A., MITCHSON, G. In:\_\_. Biological sequence analysis building phylogenetic trees. 1. Ed., Cambridge: University Press, 1998, cap. 7, 356p.

ELLSWORTH, D., RITTENHOUSE, K.D., HONEYCUTT, R.L. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioFeedback*, v. 14, n. 2, p. 214-217, 1993.

FAVIA, G., DIMOPUOLOS, G., LOUIS, C. Analysis of the *Anopheles gambiae* using random amplified polymorphic DNA markers. *Insect Molec. Biol.*, v. 3, p.149-157, 1994.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. Polimorfismo de DNA amplificados ao acaso (RAPD). In:\_. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: LUMMA, 1996. cap. 6, p. 38-51.

FOURNIER, D., MUTERO, A., RUNGGER, D. *Drosophila* acetylcholinesterase: Expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.*, v. 203, 513-519, 1992.

FOURNIER, D., MUTERO, A., PRALAVORIO, M., MARC, J. *Drosophila* acetylcolinesterase: mecanism of resistance to organophosphates. *Chem. Biol. Interaction*, v. 87, p. 233-238, 1993.

GARCIA, A.L., CARRASCO, H.J., SCHOFIELD, C.J., STOTHARD, J.R., FRAME, I. A., VALENTE, S.A S., MILES, M.A. Random amplified polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *Journal Med. Entomol.*, v. 35, n. 1, p. 38-45, 1998.



---

*Referências Bibliográficas*

---

GOOKOL, S., CURTIS, C.F., SMITH, D.F. Analysis of mosquito bloodmeals by DNA profiling. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 7, p. 208-215, 1993.

GUERRERO, F.D., JAMROZ, R.C., KAMMLAH, D. KUNZ, S.E. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and *super-kdr* point mutations. *Insect Bioch. Molec. Biol.*, v. 27, p. 745-755, 1997.

GUGLIELMONE, A.A., GIMENO, E., IDIART, J. Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. *J. Med. Entomol.*, v. 13, n. 3, p. 324-329, 1999.

GUGLIELMONE, AA, VOLPOGNI, M.M., SCHERLING, N., COBENAS, M.M., MANGOLD, AJ. Chlorfenapyr ear tags to control *Haematobia irritans* on cattle. *Vet. Parasitol.*, v. 93, p. 77-82, 2000.

GUIMARÃES, J. H. A. *Haematobia irritans* no Brasil, biologia, importância econômica e controle. *I Simpósio Internacional da Mosca-do-Chifre*, p. 17-19, 1983.

HADRY, H., BALICK, M., SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, v. 1, p. 55-63, 1992.

HARVEY, T.L., LAUNCHBAUGH, J.L. Effect of horn flies on behavior of cattle. *J. Econ. Entomol.*, v. 75, p. 25-27, 1982.



Referências Bibliográficas

HAYMER, D.S. Random Amplified Polymorphic DNAs & Microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? *Annals Entomol. Soc. of America*, v. 87, p. 717-722, 1994.

HAYMER, D.S., McINNIS, D.O. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*, v. 37, p. 244-248, 1994.

HOEY, B.K., CROWE, K.R., JONES, V.M., POLANS, N.O. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, v. 92, p. 92-100, 1996.

HUNT, G.J., PAGE Jr, R.E. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics*, v. 139, p. 1371-1382, 1995a.

JONSSON, N.N, MAYER, D.G. Estimation of the effects of buffalo fly on the milk production of dairy cattle based on a meta-analysis of literature data. *Med. Vet. Entomol.*, v. 13, n. 4, p. 372-376, 1999.

KAMBHAMPATI, S., BLACK IV, W.C., RAI, K.S. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. *J. Med. Entomol.*, v. 26, n. 6, p. 939-945, 1992.

KAUFMAN, P.E., LLOYD, J.E., KUMAR, R. Horn fly susceptibility to diazinon, fenthion, and permethrin at selected elevations in Wyoming. *J. Agr. Urban Entomol.*, v. 16, n. 2, p. 141-157, 1999.



*Referências Bibliográficas*

- KAZAN, K., MANNERS, J.M., CAMERON, D.F. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. *Genome*, v. 36, p. 50-56, 1992.
- KORT, C.A.D., GRANGER, N.A. Regulation of the juvenile hormone titer. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 26, p. 1-28, 1981.
- KUNZ, S.E., MILLER, J.A., SIMS, P.L. MEYERHOEFFER, D.C. Economics of controlling horn flies (Diptera: Muscidae) in range cattle management. *J. Econ. Entomol.*, v. 77, p. 657, 1984.
- LANDRY, B.S., DEXTRAZE, L., BOIVIN, G. Random Amplified Polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome*, v. 36, p. 580-587, 1993.
- LANHAM, P.G., FENNELL, S., MOSS, J.P., POWEL, W. Detection of polymorphic loci in *Arachis* germplasm using random amplified polymorphic DNAs. *Genome*, v. 35, p. 885-889, 1992.
- LEVI, A., ROWLAND, J., HARTUNG, J.S. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woods plants. *Hort. Science*, , v. 28, p. 1188-1190, 1993.
- LOHE, A., ROBERTS, P. Evolution of satellite DNA sequences in *Drosophila*. In: *Heterochromatin*. Cambridge: R. Verma, 1988, p. 148-186.
- LYNCH, M., MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic struture with RAPD markers. *Molecular Ecology*, v. 3, p. 91-99, 1994.



*Referências Bibliográficas*

- MANGUIN, S., WILKERSON, R.C., CONN, J.E., RUBIO-PALLIS, Y., DANOFF-BURG, J.A., ROBERTS, D.R. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 60, p. 364-376, 1999.
- MARGARITOPOULOS, J.T., MAMURIS, Z., TSITSIPIS, J.A. Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* by RAPD-PCR. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 91, p. 602-607, 1998.
- McDONALD, P.T., HILBURN, L.R., KUNZ, S.E. Genetic similarities among natural populations of the horn fly. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 80, p. 288-292, 1987.
- McDOWELL, R.E., PRAKASH, S. Allelic heterogeneity within allozymes separated by electrophoresis in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 73, n. 11, p. 4150-4153, 1976.
- MEUNIER, J.R., GRIMONT, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.*, v. 144, p. 373-379, 1993.
- MORGAN, D.J., REITZZ, S.R., ATKINSON, P.W., TRUMBLE, J.T. The resolution of Californian populations of *Liriomyza huidobrensis* using PCR. *Heredity*, v. 85, n. 1, p. 53-61, 2001.
- MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, v. 55, p. 335-350, 1987.



---

*Referências Bibliográficas*

- MUNOZ, M.L., FERNANDEZ-SALAS, I., BEATY, B.J. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 62, n. 2, p. 200-209, 2000.
- MURALIDHARAN, K., WAKELAND, E.K. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechniques*, v. 14, p. 362-363, 1993.
- MYAZAKI, M., OHYAMA, K., DUNLAP, D.Y., MATSUMURA, F. Cloning and sequencing of the *para-type* sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches. *Mol. Gen. Genet.*, v. 252, p. 61-68, 1996.
- NEI, M., LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.76, p. 5269-5273, 1979.
- PAN, Y.B., BURNER, D.M., EHRLICH, K.C., GRISHAM, M.P., WEI, Q. Analysis of primer-derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR. *BioTechniques*, v. 22, p. 1071-1075, 1997.
- PASCUAL, M., BALANYA, J. LATORRE, A., SERRA, L. Analysis of the variability of *Drosophila azteca* and *D. athabasca* populations revealed by random amplified polymorphic DNA. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v. 35, p. 159-164, 1997.
- PENNER, G.A., BUSH, A., WISE, R., KIM, W., DOMIER, L., KASHA, K., LAROCHE, A., SCOLES, G., MOLNAR, S.J., FEDAK, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.*, v. 2, p. 341-345, 1993.



---

*Referências Bibliográficas*

---

- PILLARY, C.J., KENNY, F.S. . Homology among RAPD and RFLP fragments in *Humulus lupulus*. *Benchmarks*, v. 24, p. 32-36, 1995.
- PRUETT, J.H., OEHLER, D.D., KAMMLAH, D.M., GUERRERO, F.D. Evaluation of horn fly from a pyrethroid susceptible colony for general and permethrin esterase actities. *J. Econ. Entomol.*, v. 93, p. 920-924, 2000.
- REINEKE, A., KARLOVSKY, P., ZEBITZ, C.P. Suppression of randomly primed polymerase chain reaction products (random amplified polymorphic DNA) in heterozygous diploids. *Mol. Ecol.*, v. 8, n. 9, p. 1449-1455, 1999.
- REINEKE, A., ZEBITZ, C.P. Suitability of polymerase chain reaction-based approaches for identification of different gypsy moth genotypes in central Europe. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 92, n. 5, p. 737-741, 1999.
- REITER, R.S., WILLIAMS, J.G.K., FELDMANN, K.A., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., SCOLNIK, P.A. Global and local genome mapping in *A. thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, p. 1477-1481, 1992.
- REYES, A., OCHANDO, M.D. Use of molecular markers for detecting the geographical origin of *Ceratitis capitata* populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 91, n. 2, p. 222-227, 1998.
- RIESBERG, L.H. Homology among RAPD fragments interspecific comparisons. *Mol. Ecology*, v. 5, p. 99-105, 1996.



---

*Referências Bibliográficas*

SCATAGLINI, M.A, CONFALONIERE, V.A, LANTERI, AA. Dispersal of the cotton boll weevil in South America: evidence of RAPD analysis. *Genetica*, v. 108, n. 2, p. 127-136, 2000.

SCHWEDER, M.E., SHATTERS, G. Jr., WEST, S.H., SMITH, R.L. Effect of transition interval between melting and annealing temperatures on RAPD analyses. *Benchmarks*, v. 19, n. 1, p. 38-42, 1995.

SOUSA, G.B., BLANCO, A., GARDENAL, C.N. Genetic relationships among *Aedes aegypti* populations from Argentina using RAPD-PCR. *Genetica*, v. 108, n. 2, p. 127-136, 2001.

SOUSA, G.B., PANZETTA de DUTARI, G.P., GARDENAL, C.N. Genetic structure of *Aedes albifasciatus* populations in central Argentina determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction markers. *J. Med. Entomol.*, v. 36, p. 400-404, 1999.

STEVENS, J., WALL, R. Genetic variation in populations of the blowflies *L. cuprina* and *L. sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. *Biochemical Syst. Ecol.*, v. 25, n. 2, p. 81-97, 1997.

SWOFFORD, D.L. PAUP 4.0 – Phylogenetics Analysis Using Parsimony. Beta Version. Executable for Windows Systems, 2001.

TAVARES, M.G. *Mapa de ligação de Melipona quadrifasciata anthidioides (Hymenoptera:Apidae, Melipona) construído com base em marcadores*



---

*Referências Bibliográficas*

*moleculares*. São José do Rio Preto, 1999. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

TINGEY, S.V., del TUFO, J.P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.*, v. 101, p. 349-352, 1993.

VANLERBERGHE-MASUTTI, F. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. *Insect Mol. Biol.*, v. 3, p. 229-237, 1994.

WANG, G.L., PATERSON, A.H. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. *Theor. Appl. Genet.*, v. 88, p. 355-361, 1994.

WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILKERSON, R.C., GAFFIGAN, T.V., LIMA, J.B. Identification of species related to *Anopheles albitarsis* by RAPD-PCR (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 90, n. 6, p. 721-732, 1995.

WILLIAMS, C.L., GOLDSON, S.L., BAIRD, D.B., BULLOCK, D.W. Geographical origin of an introduced pest, *L. bonariensis*, determined by RAPD analysis. *Heredity*, v. 72, p. 412-419, 1994

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFASLKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.K., RAFASLKI, J.A., TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods Enzymol.*, v. 218, p. 704-740, 1993.



Referências Bibliográficas

WILLIAMSON, M.S., DENHOLM, I., BELL, C., DEVONSHIRE, A.L. Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticide maps to sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.*, v. 240, p. 17-22, 1993.

WILLIAMSON, M.S., MARTINEZ-TORRES, D., HICK, C.A., DEVONSHIRE, A.L. Identification of mutations in the housefly *para-type* sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*). *Mol. Gen. Genet.*, v. 252, p. 51-60, 1996.

YOTOKO, K.S.C. Caracterização da variabilidade genética da mosca do berne *Dermatobia hominis*, através da técnica de RAPD-PCR. Campinas, 1998. Dissertação (Mestrado). Unicamp. 69p.

YU, Y., PAULS, K.P. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Res.*, v. 20, p. 2606, 1992.



## VII. RESUMO

Foi utilizada a técnica de RAPD para o estudo da variabilidade genética em quatro populações brasileiras e uma americana de *H. irritans* (mosca-do-chifre). Como grupo externo foi utilizada *D. prosaltans*. Na amplificação do DNA genômico foram utilizados 10 *primers*, que produziram 198 fragmentos, sendo 117 em *H. irritans*, 81 em *D. prosaltans* e 135 partilhados pelas duas espécies. A população mais polimórfica foi Turiúba (115 bandas) e a menos, Rio Branco (67 bandas). Rio Branco também produziu o maior número de bandas monomórficas (13), sugerindo maior homogeneidade genética, explicada por sua localização geográfica isolada, com menor índice de trocas gênicas do que as demais populações, localizadas em regiões sujeitas a intenso comércio pecuarista. O maior número de bandas exclusivas foi produzido pela população americana Kerrville (12), que pode ser devido à ação da seleção de genes relacionados com a resistência aos inseticidas, sua característica específica. Tanto as médias dos Índices de Similaridade quanto as relações filogenéticas entre as populações, mostraram maior semelhança entre São José do Rio Preto e Turiúba, seguida, na ordem, por Cassilândia, Kerrville e Rio Branco. Os resultados obtidos fornecem elementos que permitem caracterizar a origem geográfica de cada população analisada e confirmam dados da literatura quanto a uma maior homogeneidade genética de *H. irritans*, que deve ser consequência do estilo de vida parasítico, hematófago restrito.

**Palavras-chaves:** variabilidade genética; *Haematobia irritans*; mosca-do-chifre; RAPD; caracterização genética; polimorfismo.



## VIII. ABSTRACT

Four Brazilian and one American populations of *H. irritans* (horn fly), were studied using RAPD in order to detect their genetic variability. The outgroup used was *D. prosaltans*. Ten different decamer random primers, were involved in the genomic DNA amplification yielding 198 fragments, being 117 in *H. irritans*, 81 in *D. prosaltans* and 135 in both species. The most polymorphic population was Turiúba (115 bands) and the less polymorphic was Rio Branco (67 bands). This last population also produced the greatest number of monomorphic bands (13). Both observations indicated high genetic homogeneity of Rio Branco that may be due to its most distant geographical localization, consequently higher isolation and lower gene flow than those occurring among the other populations, submitted to intensive bovine trade. Kerrville produced the greatest number of exclusive bands (12) that could be due to selection of genes involved in the insecticide resistance, that is a characteristic of that population. The Similarity Index (Nei & Li, 1979) and Phylogenetic Relationships (PAUP 4.0) among the analyzed populations showed higher similarity between São José do Rio Preto and Turiúba followed by Cassilândia and Kerrville. In the phylogenetic tree, Rio Branco was considered the most distant *H. irritans* population. These results showed that the some of the primers used allow to detect the origin of these populations. They also confirmed the high genetic homogeneity of *H. irritans* when compared to other flies, which may be explained by their strict habitat and food behavior. **Key words:** genetic variability; *Haematobia irritans*; horn fly; RAPD; genetic characterization; polymorphism.



## ANEXO I

**ANEXO I.** Matriz construída para a análise filogenética (descrita no item II.6.b.), com base na presença (1) e ausência (0) das 198 bandas produzidas pelos 10 *primers* utilizados no presente estudo. As linhas representam as bandas, e as colunas, as amostras analisadas. As bandas foram numeradas a partir da sequência de apresentação dos *primers*: 51 (1-20), 54 (21-42), 60 (43-64), 78 (65-85), 81 (86-105), 83 (106-118), 88 (119-135), 91 (136-154), 50-10 (137-175) e 60-36 (176-198).

| Banda nº | SJRP | Tu | Ca | RB | Ker | Dp | Banda nº | SJRP | Tu | Ca | RB | Ker | Dp |
|----------|------|----|----|----|-----|----|----------|------|----|----|----|-----|----|
| 1        | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 101      | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  |
| 2        | 0    | 0  | 1  | 1  | 1   | 0  | 102      | 0    | 1  | 0  | 1  | 1   | 0  |
| 3        | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 103      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 1  |
| 4        | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 1  | 104      | 1    | 1  | 1  | 0  | 0   | 1  |
| 5        | 0    | 0  | 1  | 0  | 1   | 1  | 105      | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  |
| 6        | 1    | 1  | 0  | 0  | 0   | 0  | 106      | 0    | 0  | 0  | 0  | 1   | 0  |
| 7        | 0    | 0  | 1  | 1  | 1   | 1  | 107      | 1    | 1  | 0  | 0  | 0   | 0  |
| 8        | 0    | 0  | 1  | 0  | 1   | 1  | 108      | 1    | 1  | 0  | 0  | 1   | 1  |
| 9        | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 0  | 109      | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  |
| 10       | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 1  | 110      | 0    | 0  | 0  | 0  | 1   | 0  |
| 11       | 0    | 0  | 0  | 1  | 0   | 1  | 111      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 12       | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 1  | 112      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 13       | 0    | 0  | 0  | 1  | 0   | 0  | 113      | 1    | 1  | 0  | 0  | 1   | 0  |
| 14       | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 0  | 114      | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 1  |
| 15       | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 0  | 115      | 0    | 0  | 0  | 0  | 1   | 0  |
| 16       | 0    | 0  | 0  | 0  | 1   | 0  | 116      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 17       | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 117      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 18       | 0    | 0  | 1  | 0  | 1   | 0  | 118      | 1    | 1  | 0  | 0  | 1   | 0  |
| 19       | 0    | 0  | 0  | 1  | 0   | 0  | 119      | 0    | 0  | 1  | 0  | 0   | 0  |
| 20       | 0    | 0  | 0  | 0  | 1   | 0  | 120      | 1    | 1  | 1  | 0  | 0   | 0  |
| 21       | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 1  | 121      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 22       | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 122      | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  |
| 23       | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 123      | 0    | 0  | 1  | 0  | 0   | 0  |
| 24       | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 124      | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 0  |
| 25       | 0    | 0  | 0  | 1  | 0   | 1  | 125      | 0    | 0  | 0  | 0  | 1   | 0  |
| 26       | 0    | 0  | 0  | 0  | 1   | 0  | 126      | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 1  |
| 27       | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 127      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 28       | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 1  | 128      | 1    | 1  | 0  | 1  | 1   | 0  |
| 29       | 1    | 1  | 0  | 0  | 1   | 0  | 129      | 1    | 1  | 0  | 0  | 1   | 0  |
| 30       | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 1  | 130      | 0    | 0  | 0  | 0  | 1   | 0  |
| 31       | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 0  | 131      | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  |
| 32       | 1    | 1  | 0  | 0  | 0   | 0  | 132      | 0    | 0  | 0  | 0  | 1   | 1  |
| 33       | 0    | 0  | 1  | 1  | 1   | 0  | 133      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 1  |
| 34       | 1    | 1  | 0  | 0  | 1   | 0  | 134      | 1    | 0  | 1  | 0  | 0   | 0  |
| 35       | 0    | 0  | 1  | 0  | 1   | 1  | 135      | 0    | 1  | 0  | 1  | 1   | 0  |
| 36       | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 136      | 1    | 0  | 0  | 0  | 0   | 0  |
| 37       | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  | 137      | 1    | 1  | 1  | 0  | 0   | 0  |
| 38       | 1    | 1  | 0  | 0  | 1   | 0  | 138      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 39       | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 139      | 1    | 1  | 1  | 1  | 1   | 0  |
| 40       | 1    | 1  | 0  | 0  | 0   | 1  | 140      | 1    | 1  | 1  | 0  | 0   | 0  |
| 41       | 1    | 1  | 0  | 0  | 0   | 1  | 141      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 42       | 0    | 0  | 1  | 0  | 1   | 0  | 142      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 43       | 1    | 0  | 0  | 0  | 0   | 0  | 143      | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  |
| 44       | 1    | 1  | 1  | 0  | 1   | 0  | 144      | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  |
| 45       | 0    | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 145      | 0    | 1  | 0  | 0  | 0   | 0  |
| 46       | 0    | 1  | 0  | 0  | 0   | 0  | 146      | 0    | 1  | 0  | 0  | 1   | 0  |

ANEXO I

|     |   |   |   |   |   |   |     |   |   |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| 47  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 147 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 48  | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 148 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 49  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 149 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 50  | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 150 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 51  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 151 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 52  | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 152 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 53  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 153 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 54  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 154 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 55  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 155 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 56  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 156 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 57  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 157 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 58  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 158 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 59  | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 159 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 60  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 160 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 61  | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 161 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 62  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 162 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 63  | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 163 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 64  | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 164 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 65  | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 165 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 66  | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 166 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 67  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 167 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 68  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 69  | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 169 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 70  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 170 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 71  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 171 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 72  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 172 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 73  | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 173 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 74  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 174 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 75  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 175 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 76  | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 176 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 77  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 177 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 78  | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 178 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 79  | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 179 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 80  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 180 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 81  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 181 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 82  | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 182 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 83  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 183 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 84  | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 184 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 85  | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 185 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 86  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 186 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 87  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 187 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 88  | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 188 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 89  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 189 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 90  | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 190 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 91  | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 191 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 92  | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 192 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 93  | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 193 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 94  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 194 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 95  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 195 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 96  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 196 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 97  | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 197 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 98  | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 198 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 99  | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |     |   |   |   |   |   |   |
| 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |     |   |   |   |   |   |   |

