

**Caracterização genotípica e variabilidade genética de diferentes populações de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) procedentes do Brasil, Colômbia e República Dominicana através da técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD PCR)**





ISSN 1677-8618  
Setembro, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 34***

**Caracterização genotípica e variabilidade genética de diferentes populações de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) procedentes do Brasil, Colômbia e República Dominicana através da técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD PCR)**

Luciana Gatto Brito  
Gonzalo Efrain Moya Borja

Porto Velho, RO  
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Rondônia**

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO  
Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409  
www.cpaфро.embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Flávio de França Souza*  
Secretária: *Marly de Souza Medeiros*  
Membros:  
*Abadio Hermes Vieira*  
*André Rostand Ramalho*  
*Luciana Gatto Brito*  
*Michelliny de Matos Bentes Gama*  
*Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira*

Normalização: *Daniela Maciel*  
Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*  
Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

**1ª edição**

1ª impressão: 2006, tiragem: 100 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa Rondônia.

---

Brito, Luciana Gatto.

Caracterização genotípica e variabilidade genética de diferentes populações de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) procedentes do Brasil, Colômbia e República Dominicana através da técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD PCR) / por Luciana Gatto Brito e Gonzalo Efraim Moya Borja. – Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006.

23 p. (Série Boletim de pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondônia / ISSN 1677-8618 ; 34).

1. Parasitologia. 2. *Haematobia irritans*. I. Borja, Gonzalo Efraim Moya. II. Título. III. Série.

---

CDD 636

© Embrapa – 2006

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e métodos</b> .....	8
Obtenção das amostras de <i>Haematobia irritans</i> .....	8
Extração e quantificação do DNA genômico .....	9
Amplificação do DNA genômico .....	11
Escolha dos iniciadores (primers).....	11
Análises estatísticas .....	12
<b>Resultados e discussão</b> .....	13
Extração e quantificação do DNA genômico .....	13
Análise das populações de <i>Haematobia irritans</i> por RAPD.....	15
<b>Conclusões</b> .....	22
<b>Referências bibliográficas</b> .....	23



**Caracterização genotípica e variabilidade genética de diferentes populações de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) procedentes do Brasil, Colômbia e República Dominicana através da técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD PCR)**

---

***Luciana Gatto Brito***  
***Gonzalo Efrain Moya Borja***

**Resumo**

Dípteros hematófagos são importantes parasitas dentro de sistemas de produção de bovinos, especialmente em confinamento. *Haematobia irritans*, a mosca-dos-chifres, é uma das espécies que maiores problemas causa em sistemas de produção de bovinos, dado ao intenso estresse que impõe aos animais. Um importante aspecto quando se estuda a variabilidade genética dentro das espécies é o estudo da estrutura geográfica destas populações. Buscando-se estimar a similaridade genotípica das diferentes populações brasileiras e latino-americanas da mosca-dos-chifre utilizou-se a técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD-PCR), que mostrou-se eficiente para tal propósito. A utilização dos marcadores moleculares gerados através da técnica de RAPD-PCR tornou possível a identificação da origem geográfica das amostras das diferentes regiões geográficas amostradas, assim como, estimar o fluxo genotípico entre as diferentes populações brasileiras e latino-americanas da mosca-dos-chifres.

Termos para indexação: *Haematobia irritans*, diversidade genética, RAPD-PCR, marcadores moleculares.

<sup>1</sup> Méd. Vet., D.Sc., Embrapa Rondônia, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO. E-mail: luciana@cpafro.embrapa.br.

<sup>2</sup> Eng. Agrôn., PhD., Professor voluntário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. E-mail: gemoya@ufrj.br.

**Genotype characterization and genetic variability of diferents populations of *Haematobia irritans* from Brazil, Dominican Republic and Colombia based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis**

---

**Abstract**

*Blood-sucking diptera are important parasites in bovine production systems, especially regarding confinement conditions. Haematobia irritans, the horn fly, is one of the most troublesome species within bovine production systems, due to the intense stress imposed to the animals. An important aspect while studying the variability within a species is the study of the geographic structure of its populations and, attempting to find out the genetic flow of Brazilian populations of horn fly, the RAPD technique, which is suited for this purpose, has been used. The use of molecular markers generated from RAPD made it possible to identify the geographic origin of samples from different geographic regions, as well as to estimate the genotypic flow among the different brazilian and latin americans populations of the horn fly.*

**Index terms:** *Haematobia irritans; genetic diversity; RAPD-PCR; molecular markers.*



## Introdução

A mosca-dos-chifres *Haematobia irritans*, foi descrita por Linnaeus em 1758 e reconhecida como uma praga de bovinos na França em 1830. Foi introduzida acidentalmente em países onde a bovinocultura encontrava-se em expansão, tornando-se uma das principais pragas da pecuária na atualidade. Nos Estados Unidos da América (EUA), a presença de *H. irritans* foi relatada inicialmente no estado da Filadélfia no século XIX entre os anos de 1884 e 1886 vinda com animais importados do sul da Europa e difundiu-se para toda a América do Norte, surgindo posteriormente no Canadá em 1900, Havai e ilhas do Caribe. Foi identificada na América do Sul no início do século XX, mais precisamente na Venezuela e Colômbia na segunda metade da década de 30 (Campbell & Thomas, 1992).

No Brasil, constatou-se a presença da mosca-dos-chifres inicialmente em Roraima entre 1976 e 1977, oriunda da Guiana e não da Venezuela, como se acreditava inicialmente (Valério & Guimarães, 1983). A disseminação da mosca-dos-chifres foi bastante rápida no então Território de Roraima devido às características propícias encontradas na região, como: a maioria das propriedades produtoras de bovinos estarem localizadas em regiões com vegetação de cerrado onde o clima é tropical com verões chuvosos, e a predominância do gado Nelore, criado de forma extensiva, onde o animal movimenta-se por grandes áreas, facilitando a disseminação da mosca. A expansão de *H. irritans* no Brasil a partir de 1984 foi mais rápida por ter atingido regiões com forte pecuária de corte, onde a produção era escoada em direção ao centro-sul do país (Araújo, 1991).

A atividade hematófaga da mosca-dos-chifres não é seu aspecto mais nocivo. O acometimento das picadas dolorosas e incessantes durante todo o dia sobre os bovinos parasitados, sem haver aparentemente, influência da incidência de luz sobre o repasto, explica o epíteto específico da mosca em latim, "irritans", uma vez que seu efeito principal é a irritação causada ao animal infestado, deixando-o extremamente agitado, conduzindo-o ao estado crítico de estresse (Schreiber & Campbell, 1986). Os maiores prejuízos de um rebanho infestado, como perda de peso, ganho de peso zero e queda na produção de leite, são em consequência, principalmente, do estresse provocado pela ação irritante das moscas e não, apenas, da perda de sangue (McLintock & Depner, 1954; Harris et al., 1974).

Esta parasitose tem impacto negativo sobre a produção e o desempenho do gado, expresso pela diminuição do ganho de peso, da produção de leite, do apetite e da conversão alimentar (Byford et al., 1992), sendo que a infestação por tempo prolongado pode levar os animais à morte (Baron & Lysyk, 1995). Segundo Byford et al. (1992), anualmente nos EUA as perdas na produção animal causadas por ectoparasitas excedem a U\$ 2,26 bilhões sendo U\$ 730 milhões causados exclusivamente pela *H. irritans*.

Outro prejuízo importante causado pela mosca-dos-chifres estaria relacionado à qualidade do couro dos animais infestados. O grande número de picadas sofridas pelo animal acarreta uma reação local na pele podendo torná-la grossa e inflexível e, portanto de menor qualidade (Guglielmone et al., 1999).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiram diversas técnicas capazes de estudar e caracterizar os indivíduos a partir de sua unidade molecular básica, o ácido desoxirribonucleico (DNA). Diversas aplicações de técnicas moleculares vêm sendo desenvolvidas na Parasitologia Veterinária, sendo uma delas a detecção de polimorfismos genéticos que permitem a obtenção de marcadores capazes de cobrir todo o genoma do organismo a ser estudado. Tais marcadores são tecnicamente denominados como marcadores moleculares e podem ser utilizados em diversas aplicações, como estudos evolutivos, de populações, ecológicos, filogenéticos e taxonômicos (Lynch & Milligan, 1994; Reineke & Zebitz, 1999).

Um avanço na área de marcadores moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) ocorreu em 1990, com a utilização de iniciadores (*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. A técnica foi desenvolvida, independentemente, por dois grupos de pesquisadores nos EUA. Williams et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais utilizado, *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

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 relacionam-se e como estes se derivam no processo evolutivo. Entre as técnicas moleculares disponíveis, a RAPD tem sido bastante útil neste aspecto.

Na tentativa de se observar a variabilidade genética das populações de *H. irritans* provenientes das cinco regiões geográficas brasileiras, e também de espécimens provenientes da República Dominicana (América Central) e Colômbia (América do Sul), utilizou-se a técnica de RAPD, buscando-se atingir os seguintes objetivos:

- Avaliar a variabilidade genética das populações brasileiras de *H. irritans*.
- Avaliar a variabilidade genética entre as populações de *H. irritans* provenientes do Brasil, Colômbia e República Dominicana.
- Obter um marcador molecular através de RAPD capaz de identificar a origem geográfica de cada uma das populações brasileiras de *H. irritans*, e também entre as provenientes do Brasil, Colômbia e República Dominicana.

## Material e métodos

### Obtenção das amostras de *Haematobia irritans*

#### Amostras provenientes do Brasil

O DNA analisado foi obtido através de amostras de populações de *H. irritans* adultas, procedentes de cinco localidades brasileiras, cada qual localizada em uma região geográfica do país (Tabela 1).

**Tabela 1.** Origem geográfica das populações brasileiras de *Haematobia irritans* analisadas.

Estado	Município	Região geográfica	Notação
Roraima <sup>1</sup>	Boa Vista	Norte	RR
Rio Grande do Norte <sup>2</sup>	Mossoró	Nordeste	RN
Rio de Janeiro	Seropédica	Sudeste	RJ
Mato Grosso do Sul <sup>3</sup>	Campo Grande	Centro-Oeste	MS
Rio Grande do Sul <sup>4</sup>	Rosário do Sul	Sul	RS

<sup>1</sup> Moscas coletadas pelo Médico Veterinário Sylvio Botelho (Secretaria de Agricultura e Abastecimento de Roraima).

<sup>2</sup> Moscas coletadas pela Dra. Maria José Paes Santos (Escola Superior de Agricultura de Mossoró).

<sup>3</sup> Moscas coletadas pelo Dr. Renato Andreotti (CNPGC-Embrapa).

<sup>4</sup> Moscas coletadas pelo Dr. Francisco Alves Branco (CPPSul- Embrapa).

As moscas foram capturadas diretamente sobre os bovinos quando estes se encontravam imobilizados em tronco de contenção. As moscas coletadas foram cuidadosamente

transferidas para frascos de 125 ml contendo álcool etílico a 70%, e enviadas ao laboratório de Biotecnologia Animal do Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CPPSE-Embrapa), localizado no Município de São Carlos, SP. No laboratório as moscas foram identificadas através de chave dicotômica de Zumpt (1973) para a espécie.

Os vidros contendo as amostras pertencentes as diferentes regiões geográficas brasileiras foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise.

As análises foram efetuadas com amostras de DNA genômico obtidas a partir de 250 moscas procedentes das diferentes regiões brasileiras. A obtenção do DNA foi feita por grupos de cada região, cada qual composto por 5 exemplares, com 10 repetições para cada localidade. Utilizou-se somente as patas, porção cefálica e torácica das moscas para evitar a contaminação por DNA proveniente do sangue do hospedeiro vertebrado.

### Amostras provenientes do Brasil, Colômbia e República Dominicana

Para a obtenção da amostra Brasil, foi misturado em partes iguais e homogeneizado o DNA genômico proveniente dos espécimens de *H. irritans* de todas as regiões brasileiras.

As amostras americanas de *H. irritans* foram obtidas através de espécimens alocados em frascos de vidros de 125 ml contendo álcool etílico a 70% , enviados por pesquisadores da Colômbia e República Dominicana ao Prof. Dr. Gonzalo Efrain Moya Borja (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro) (Tabela 2). Posteriormente, as amostras latino-americanas de *H. irritans* foram enviadas ao laboratório de Biotecnologia Animal do Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CPPSE-Embrapa), localizado no Município de São Carlos, SP, onde foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise.

**Tabela 2.** Origem geográfica das populações americanas de *Haematobia irritans* analisadas.

Pais	Região Geográfica	Notação
Brasil	América do Sul	BR
Colômbia	América do Sul	CO
República Dominicana	Caribe	RD

Para o estudo das populações latino-americanas de *H. irritans* foi utilizado DNA genômico obtido a partir de 150 moscas, sendo 50 moscas brasileiras, e 50 moscas provenientes da Colômbia e outras 50 moscas provenientes da República Dominicana. A extração do DNA genômico foi realizada através de grupos, cada qual com 5 moscas, com 10 repetições para cada país. Utilizou-se somente as patas, porção cefálica e torácica das moscas para evitar a contaminação por DNA proveniente do sangue do hospedeiro vertebrado.

### Extração e quantificação do DNA genômico

Objetivando a obtenção de DNA celular através de espécimens de *H. irritans*, foram testados diferentes protocolos de extração, onde se avaliou a eficiência destes em fornecer material a ser utilizado em futuros estudos envolvendo a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Dellaporta et al. 1983; Taylor et al., 1996; Guerrero et al., 1997; Lessinger & Azeredo-Espin, 2000).

A quantificação do DNA genômico baseia-se na propriedade das bases aromáticas dos ácidos nucleicos em absorver radiação ultra-violeta ao comprimento de onda de 260 nm. A medida da absorbância de 260 nm ( $A_{260}$ ) é utilizada para a determinação da concentração de ácidos

nucléicos. A pureza do DNA pode ser avaliada pela relação A260/A280, pois proteínas absorvem radiação ultra-violeta ao comprimento de onda de 280 nm: para o DNA puro, o valor desta relação é de 1,8, sendo que valores abaixo sugerem contaminação protéica (Zaha, 1996).

Utilizou-se adultos de *H. irritans* conservados em álcool a 70% e mantidos à temperatura de congelamento. Para a obtenção de DNA genômico, os espécimens foram divididos em 15 amostras, cada qual contendo cinco moscas. Os protocolos testados seguiram as técnicas descritas por Dellaporta et al. (1983); Lessinger & Azeredo-Espin (2000) e Taylor et al. (1996), denominados por protocolos I, II e III, respectivamente.

**Protocolo I:** Os espécimens foram colocados em tubos de polipropileno para centrífuga, com capacidade de 1,5 ml, e macerados com auxílio de bastão de vidro em 160 µl de solução contendo TRIS 100 mM, NaCl 60 mM, Sacarose 5% e EDTA 10 mM. Após este procedimento, foram adicionados 450 µl de uma segunda solução contendo TRIS 300 mM, SDS 1,25%, Sacarose 5% e EDTA 10 mM, por tubo. Os tubos foram agitados por inversão e mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se 150 µl de acetato de potássio (3M, pH 5,0) e as amostras foram novamente agitadas por inversão e colocadas por 20 minutos a -20°C. Após esse período, estas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante transferido para novo tubo de centrífuga, quando adicionou-se igual volume de isopropanol. Os tubos foram agitados por inversão e mantidos por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado (*pellet*) foi lavado com 500 µl de etanol 70% por tubo e novamente centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após a extração, os pellets foram desidratados em capela de fluxo laminar e, após completamente secos, os mesmos foram hidratados em 100 µl de tampão TE (TRIS HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e armazenados a -20°C.

**Protocolo II:** Os espécimens foram colocados em tubos de polipropileno, com capacidade de 1,5 ml, e macerados com auxílio de bastão de vidro em 100 µl de NaCl 100 mM, EDTA 100 mM, TRIS 100 mM e SDS 0,5%. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 55°C por 3 horas, e após este período adicionou-se 2 µg de RNase por tubo e estes permaneceram a 55°C por 10 minutos. Foram adicionados 100 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e as amostras centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de centrífuga contendo 200 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e novamente centrifugou-se as amostras por 5 minutos, sendo este procedimento repetido duas vezes. Os sobrenadantes obtidos após as centrifugações foram transferidos para novos tubos de centrífuga, onde adicionou-se 400 µl de etanol 100%, sendo as amostras centrifugadas por 20 minutos a 13.000 rpm. Os pellets de DNA obtidos foram lavados em 500 µl de etanol 70%, e centrifugados a 13000 rpm por 7 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após a extração, os pellets foram secos em capela de fluxo laminar, e após completamente desidratado, o DNA foi ressuspensionado em 100 µl de água estéril auto-clavada e armazenado a -20°C.

**Protocolo III:** Os espécimens foram colocados em tubos de polipropileno para centrífuga, com capacidade de 1,5 ml, e macerados com auxílio de bastão de vidro em 200 µl de NaCl 100 mM, EDTA 100 mM, TRIS 100 mM e SDS 0,5%, sendo também adicionado 4 µg de proteinase K por tubo. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C por 3 horas. Após esse período adicionou-se 2 µg de RNase por tubo, e estes permaneceram a 37°C por 20 minutos. Foram adicionados às amostras 100 µl de acetato de potássio, e essas permaneceram por 10 minutos a 55°C. Após este período, adicionou-se 100 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sendo as amostras centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo de centrífuga contendo 200 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguindo-se nova centrifugação em igual velocidade

por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo de centrifuga, e adicionou-se etanol 100%, em volume correspondente a duas vezes o volume do sobrenadante obtido. As amostras foram novamente centrifugadas por 20 minutos a 13.000 rpm, para que se obtivesse a decantação do etanol. Os pellets de DNA obtidos foram lavados em 500 µl de etanol 70%, e centrifugados a 13.000 rpm por 7 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após a extração, os pellets foram secos em capela de fluxo laminar. Após completa desidratação, o DNA foi ressuscitado em 100 µl de água estéril auto-clavada e armazenado a -20°C.

A quantificação do DNA genômico obtido nas amostras foi feita utilizando-se espectrofotômetro. Para a leitura, foram retirados 10 µl de cada amostra de DNA e diluídos em 490 µl de água estéril autoclavada, e a partir da absorbância obtida, foi possível determinar a concentração de DNA em solução (ng/µl), utilizando-se a seguinte fórmula: [DNA] = OD 260 x 2500.

A fim de se verificar a integridade do DNA obtido a partir dos protocolos testados, foi feita uma corrida eletroforética, sendo que as amostras não foram diluídas.

### **Amplificação do DNA genômico**

A amplificação foi conduzida em termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf AG, Hamburg, GE) conforme protocolo descrito por Williams et al. (1990), utilizando-se primers decaméricos ("kits" OPE, OPG e OPH) (Operon Technologies, Alameda, CA) cada qual com 20 primers. Foram preparadas soluções de trabalho contendo 20 µM de cada primer diluído em água estéril autoclavada mantidas a -20°C.

Nas amostras a serem amplificadas utilizou-se 0,4 µM de primer e 15 ng de DNA, em um volume de reação de 15 µl, e as mesmas submetidas a um pré-aquecimento de 94°C por três minutos antes da inicialização dos 40 ciclos, cada qual conduzido a 94°C, onde a fita molde de DNA é desnaturada, 35°C por 1 minuto para o anelamento do primer; e extensão, a 72°C catalizada pela atividade da DNA polimerase, e então uma extensão final por cinco minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados por RAPD-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a 70 V, por aproximadamente 2:30 horas. O gel foi preparado com tampão TBE (1x), corado com brometo de etídio. Os marcadores de peso molecular utilizados foram 50 bp DNA Ladder (Amersham Pharmacia) e 250 bp DNA Ladder (Amersham Pharmacia), sendo sempre aplicado 3 µl do marcador de pares de base misturado a 1 µl de "loading buffer". Às amostras amplificadas nos microtubos, incluindo os controles negativos, foram adicionados 5 µl de "loading buffer", e visando a homogeneização das amostras, as mesmas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 segundos.

### **Escolha dos iniciadores (*primers*)**

Amostras das diferentes populações de *H. irritans* foram amplificadas com 60 *primers* (Tabela 3). Depois de realizada uma seleção (*screening*) obtiveram-se os 16 melhores primers, sendo a mesma feita a partir daqueles iniciadores que apresentaram: maior polimorfismo, maior diferenciação entre as amostras e que apresentaram repetibilidade.

Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transluminador ultravioleta, e as imagens digitalizadas e analisadas através do Sistema de Fotodocumentação Kodak EDAS ("Electrophoresis Documentation and Analysis System") 290.

Os pesos moleculares dos fragmentos foram estimados através do Kodak 1D Image Analyses Software mediante comparação com um marcador de peso molecular conhecido pelo programa.

Objetivando maior acuidade na detecção dos polimorfismos gerados por RAPD, utilizou-se o Agilent 2100 Bionalyzer, que utiliza microchips de vidros capazes de processar até 12 amostras de 1 $\mu$ L em aproximadamente 30 minutos, uma vez que cada chip de vidro possui 16 placas conectadas através de uma rede de microcanais, dentro dos quais as amostras são conduzidas através de um polímero linear e um corante intercalante fluorescente, que carrega os produtos de amplificação e os marcadores utilizados na análise, e no momento em que a mistura gel-corante-amostras é conduzida através dos microcanais do chip, há uma leve homogeneização destes componentes, e os chips são inseridos imediatamente no bioanalisador e as amostras processadas. Utilizou-se o kit DNA 7500 LabChips, sendo seguidas as especificações recomendadas pelo fabricante. Todas as amostras foram analisadas através do uso do software Agilent Biosizing (versão A. 01.10). Estudos anteriores demonstraram que o uso de bioanalisadores em produtos de PCR propiciam uma determinação precisa, maior resolução e uma quantificação acurada das amostras a serem processadas (Nachamkin et al., 2001).

**Tabela 3.** Primers decaméricos Operon© E, G e H e suas seqüências nucleotídicas.

<i>Primers</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Primers</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Primers</i>	<i>Seqüência</i>
E-01	CCCAAGGTCC	G-01	CTACGGAGGA	H-01	GGTCGGAGAA
E-02	GGTGCGGGAA	G-02	GGCACTGAGG	H-02	TCGGACGTGA
E-03	CCAGATGCAC	G-03	GAGCCCTCCA	H-03	AGACGTCCAC
E-04	GTGACATGCC	G-04	AGCGTGCTG	H-04	GGAAGTCGCC
E-05	TCAGGGAGGT	G-05	CTGAGACGGA	H-05	AGTCGTCCCC
E-06	AAGACCCCTC	G-06	GTGCCTAACC	H-06	ACGCATCGCA
E-07	AGATGCAGCC	G-07	GAACCTGCGG	H-07	CTGCATCGTG
E-08	TCACCACGGT	G-08	TCACGTCCAC	H-08	GAAACACCCC
E-09	CTTCACCCGA	G-09	CTGACGTCCAC	H-09	TGTAGCTGGG
E-10	CACCAGGTGA	G-10	AGGGCCGTCT	H-10	CCTACGTCAG
E-11	GAGTCTCAGG	G-11	TGCCCGTCTG	H-11	CTTCCGCAGT
E-12	TTATCGCCCC	G-12	CAGCTCACGA	H-12	ACGCGCATGT
E-13	CCCATTCCGG	G-13	CTCTCCGCCA	H-13	GACGCCACAC
E-14	TGCGGCTGAG	G-14	GGATGAGACC	H-14	ACCAGGTTGG
E-15	ACGCACAACC	G-15	ACTGGGACTC	H-15	AATGGCGCAG
E-16	GGTGACTIONG	G-16	AGCGTCCTCC	H-16	TCTCAGCTGG
E-17	CTACTGCCGT"	G-17	ACGACCGACA	H-17	CACTCTCCTC
E-18	GGACTIONCAGA	G-18	GGCTCATGTG	H-18	GAATCGGCCA
E-19	ACGGCGTATG	G-19	GTCAGGGCAA	H-19	CTGACCAGCC
E-20	AACGGTGACC	G-20	TCTCCCTCAG	H-20	GGGAGACATC

### Análises estatísticas

Uma vez selecionados os fragmentos a serem utilizados na análise, uma matriz de dados contendo nas colunas o local de origem da amostra, e nas linhas as bandas expressas em pares de base. As informações a respeito das bandas produzidas por RAPD-PCR foram plotadas de forma que '1' representasse a presença e '0' a ausência do fragmento na amostra.

Convencionou-se na análise que, alelos de diferentes locus não migram para a mesma posição no gel, e que cada fragmento representa um locus Mendeliano, em que o alelo visível dominante encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg com o alelo nulo recessivo não visível (Lynch & Milligan, 1994). Desta forma, através do uso do programa NTSYS versão 1.7

(*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 1993) foram construídas as matrizes de similaridade, através da utilização do coeficiente de Jaccard (J) (Jaccard, 1901).

A partir da matriz dos índices de similaridade obtida com dados provenientes das bandas polimórficas geradas por RAPD, foi feita a análise quimiométrica utilizando o software EINSIGHT 3.0 (Infometrix Inc., Seattle, WA), que utiliza os métodos de análises por agrupamentos hierárquicos (HCA) e também de componentes principais (PCA) para a construção de dendrogramas que possibilitaram observar as inter-relações entre os vários genótipos analisados, e também permite estimar a distância Euclidiana entre as amostras.

Para a estimativa da distância genotípica entre as populações de *H. irritans* utilizou-se os métodos de Penrose que testa distâncias multivariadas de duas ou mais populações, considerando dados sobre média, variância e covariâncias, e Mahalanobis que considera ainda as correlações entre as variáveis, além dos valores numéricos utilizados no teste de Penrose (Ayres et al., 2000).

## Resultados e discussão

### Extração e quantificação do DNA genômico

A partir dos protocolos testados, obteve-se a extração de DNA genômico apenas nos protocolos I e II, sendo que os melhores rendimentos, após a espectrofotometria, foram observados no protocolo I.

Tal resultado demonstra que, no caso de *H. irritans*, a extração do DNA genômico através de acetato de potássio, sal utilizado para propiciar a precipitação protéica, assim como o uso de álcool isopropílico, se mostrou uma boa opção, já que para esta espécie, o DNA na presença do sal e do álcool formou um precipitado, freqüentemente visível, que pôde ser sedimentado por centrifugação, e depois de hidratado em tampão TE, foi quantificado ao comprimento de onda de 260 nm, e baseando-se na absorbância obtida, calculou-se a concentração das amostras em ng/μl (Fig. 1).

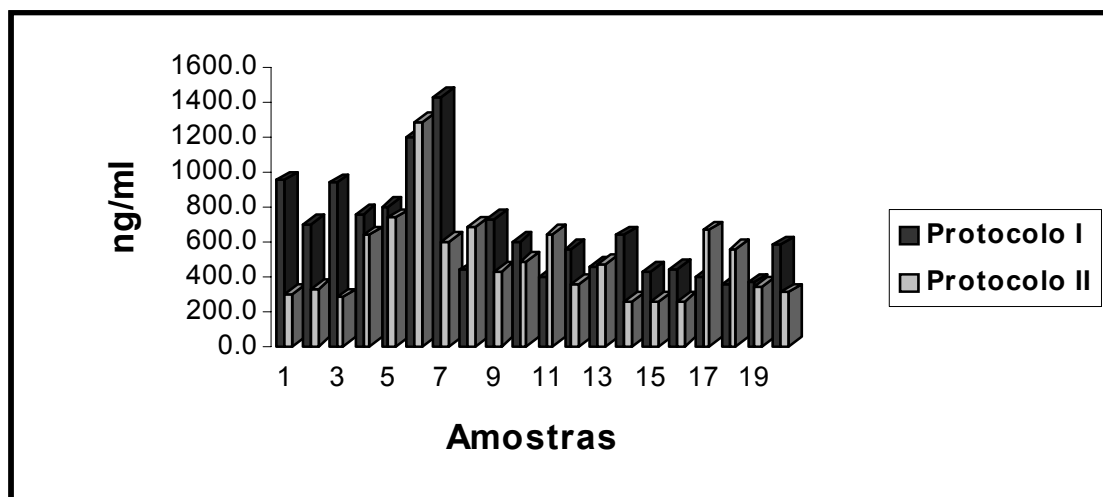


Fig. 1. Concentrações de DNA genômico de *Haematobia irritans*, obtido pelos diferentes protocolos, expressas em ng/μl.

A pureza das preparações contendo DNA foi analisada através da relação entre as leituras realizadas ao comprimento de onda de 260 nm e 280 nm (Fig. 2), pois enquanto que ácidos nucleicos absorvem luz ao comprimento de onda de 260 nm, proteínas absorvem luz no

comprimento de onda de 280 nm, assim a relação  $A_{260}/A_{280}$  nos dá um parâmetro para a avaliação da qualidade das preparações de DNA, já que valores menores que 1,80 revelam contaminação do DNA por proteína. Com o protocolo utilizado obteve-se o DNA em solução com baixa contaminação protéica, com uma média de relação  $A_{260}/A_{280}$  de 1,82 para as amostras testadas.

A precipitação de ácidos nucleicos através do uso de etanol é útil para concentrar soluções de DNA, pois na presença de concentrações relativamente altas de cátions monovalentes, o etanol induz a transição estrutural na molécula do ácido nucleico, promovendo a precipitação do DNA (Eickbush & Moudrianakis, 1978).

O uso de etanol absoluto baseia-se na propriedade do álcool em modificar estruturalmente a molécula dos ácidos nucleicos a fim de promover sua precipitação, sendo que, as posteriores lavagens do DNA precipitado com etanol 70% visam promover a dessalinização do DNA, pois a maioria dos sais e pequenas moléculas orgânicas são solúveis em etanol 70%. Outros sais como o cloreto de sódio, acetato de potássio e acetato de amônia também são capazes de induzir a precipitação de ácidos nucleicos, porém são mais difíceis de serem removidos do precipitado contendo o DNA devido à baixa solubilidade dos mesmos em etanol 70% (Ausubel et al., 1998).

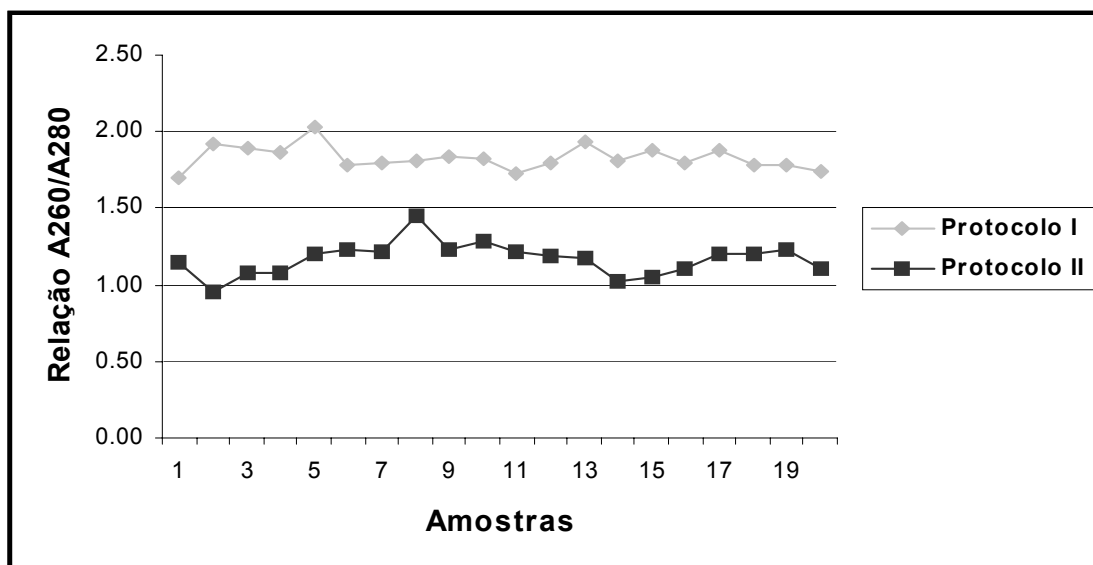


Fig. 2. Relação entre as leituras utilizando-se espectrofotômetro ao comprimento de onda de 260nm e 280nm para avaliação da qualidade das preparações de DNA obtidas pelos diferentes protocolos.

A maior eficiência do protocolo I de extração de DNA genômico em fornecer maiores quantidades de DNA, assim como um precipitado menos contaminado por proteínas, talvez seja uma consequência do uso da sacarose no processo de maceração dos espécimens, que por aumentar a osmolaridade da solução, conseguiu promover melhor desidratação celular, sendo que, a adição de acetato de potássio com posterior incubação das amostras a  $-20^{\circ}\text{C}$  também propiciou a eficiente precipitação das proteínas, diminuindo a contaminação protéica. A precipitação do DNA extraído, mesmo que em baixa concentração na solução, foi favorecido pela incubação a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pois baixas temperaturas favorecem a precipitação dos ácidos nucleicos, proporcionando uma boa recuperação do DNA (Ausubel et al., 1998).

Após a extração das amostras de DNA genômico das diferentes populações de *H. irritans*, o mesmo foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, onde se observou a integridade do DNA (Fig. 3).



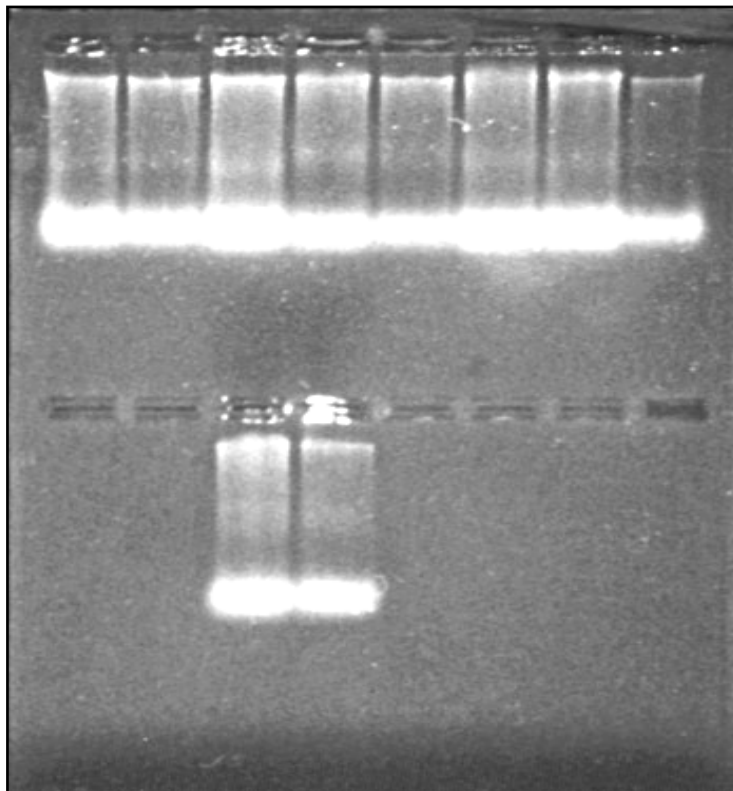


Fig. 3. Gel de agarose a 1% contendo amostras de DNA genômico extraído pela utilização do protocolo I nas diferentes populações de *Haematobia irritans* analisadas.

## **Análise das populações de *Haematobia irritans* por RAPD**

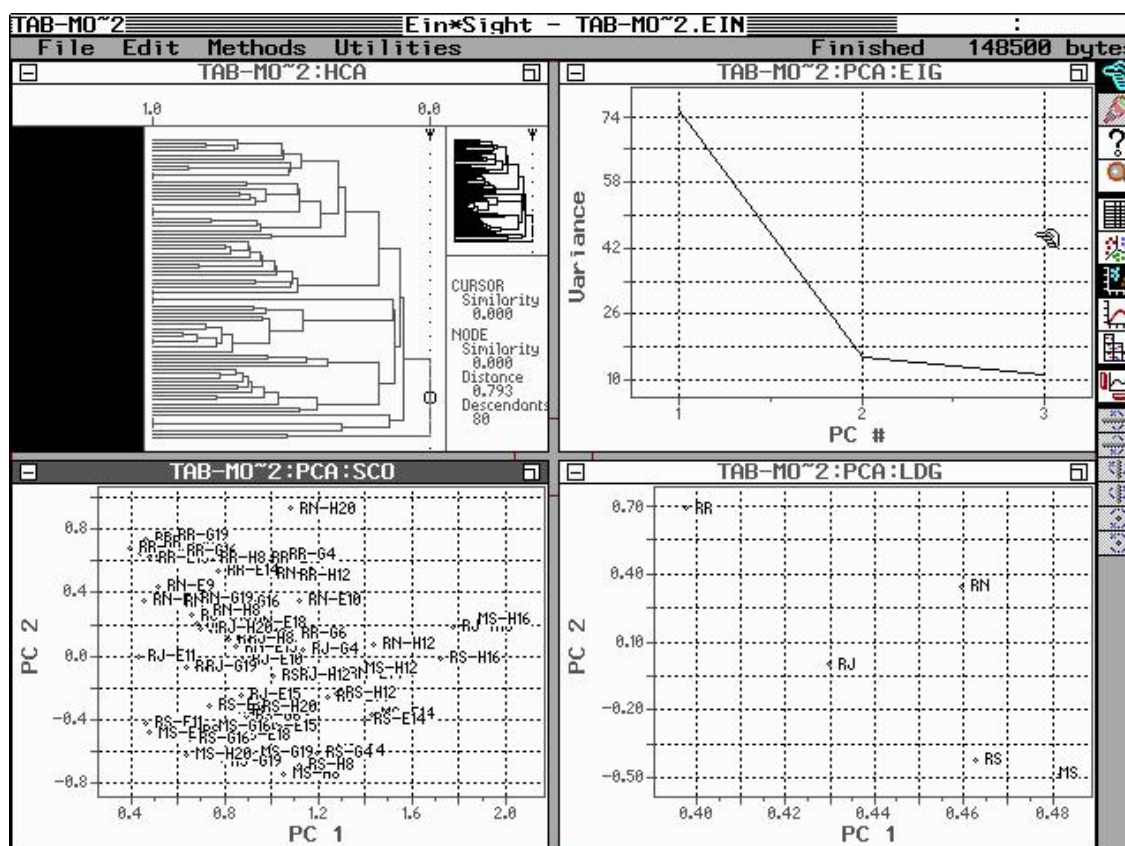
### **Populações brasileiras de *Haematobia irritans***

A amplificação do DNA genômico das populações brasileiras de *H. irritans* utilizando os 16 primers RAPD selecionados produziu 321 fragmentos. Estes fragmentos variaram de 1.714 a 229 pb. O número total de bandas produzidas por cada primer, variou de 10 (primer H20) a 28 (primers G4 e G16), dos 16 primers selecionados, 12 geraram 15 bandas ou mais. Com relação ao número total de bandas produzidas por população, a mais polimórfica foi RN (70 bandas), seguida por RJ (68 bandas), MS e RS (62 bandas) e RR (59 bandas) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Iniciadores RAPD, suas seqüências nucleotídicas e números de fragmentos RAPDs gerados em cinco diferentes populações brasileiras de *Haematobia irritans*.

Primer	Sequência	Nº bandas RAPD
OPE1	5' CCCAAGGTCC 3'	21
OPE9	5' CTTACCCGA 3'	14
OPE11	5' GAGTCTCAGG 3'	15
OPE10	5' CACCAGGTGA 3'	13
OPE13	5' CCCGATTCGG 3'	17
OPE14	5' TGGCGCTGAC 3'	14
OPE15	5' ACGACAACC 3'	24
OPE18	5' GGACTGCAGA 3'	27
OPG4	5' AGCGTGTCTG 3'	28
OPG6	5' GTGACTAACC 3'	27
OPG16	5' AGCGTCCTCC 3'	20
OPG19	5' GTCAGGGCAA 3'	15
OPH8	5' GAAACACCCC 3'	29
OPH12	5' ACGCGCATGT 3'	26
OPH16	5' TCTCAGCTGG 3'	21
OPH20	5' GGGAGACATC 3'	10
Total		321

A partir da matriz dos índices de similaridade obtida com dados provenientes das 321 bandas polimórficas geradas por RAPD, foi feita a análise quimiométrica utilizando o software EINSIGHT 3.0, onde utilizando-se os métodos de análises por agrupamentos hierárquicos (HCA) e também de componentes principais (PCA) foram estimadas as similaridades entre as amostras amplificadas pelos *primers* selecionados e a distância Euclidiana entre as amostras (Fig. 4).



**Fig. 4.** Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e componentes principais (PCA) das populações brasileiras de *Haematobia irritans* utilizando os *primers* selecionados.

As análises demonstraram a presença de *primers* desnecessários que acabavam por diminuir a exatidão dos métodos, denominados como "outliers" (desalinhados), e que devem ser excluídos da análise, para que a visualização dos resultados torne-se mais apurada e ao final, baseando-se na análise de componentes principais tenha-se como observar os *primers* que distinguem quanto a origem geográfica as populações de *H. irritans* brasileiras.

A exclusão das amostras consideradas como *outliers* baseou-se na similaridade entre as amostras, e a escolha se deu a partir das amostras que apresentavam menor similaridade dentro dos agrupamentos, buscando-se aumentar a acuidade da análise, pelo aumento da similaridade e diminuição da distância Euclidiana entre as amostras (Fig. 5).

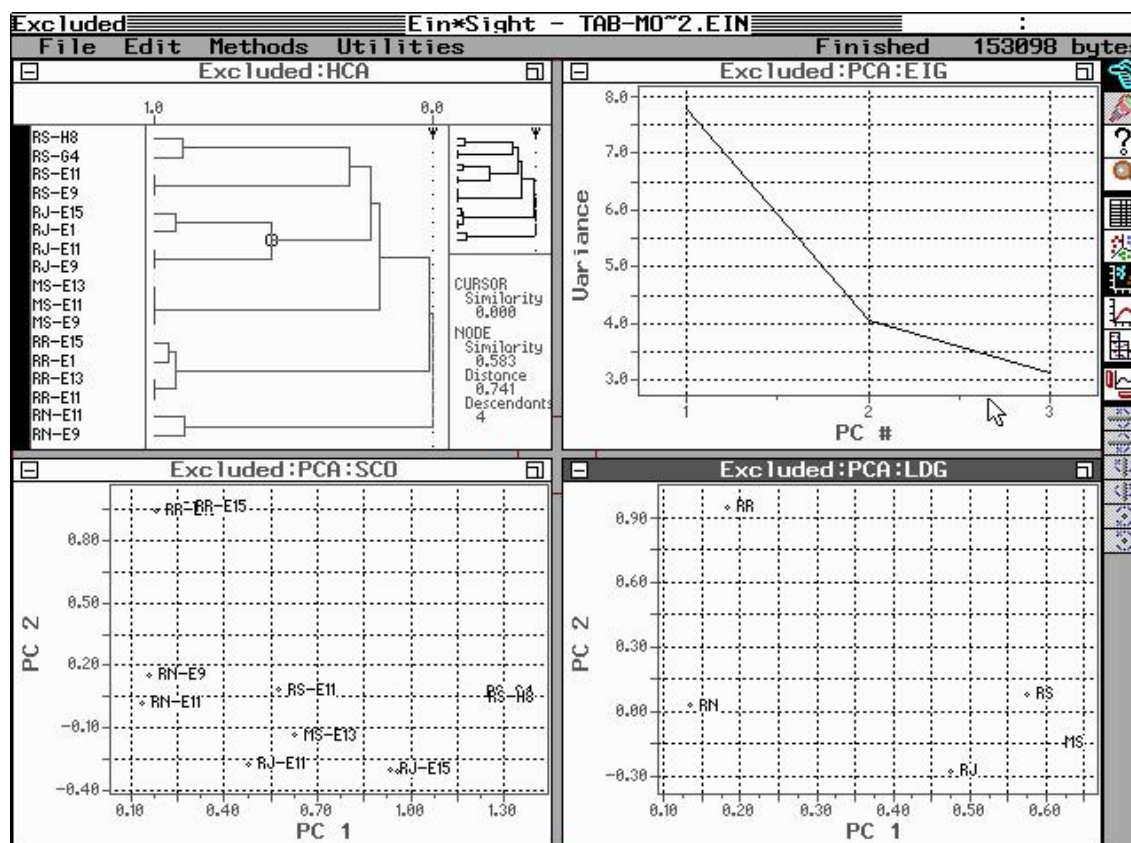


Fig. 5. Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e componentes principais (PCA) das populações brasileiras de *Haematobia irritans* após a exclusão dos *primers* considerados como *outliers*.

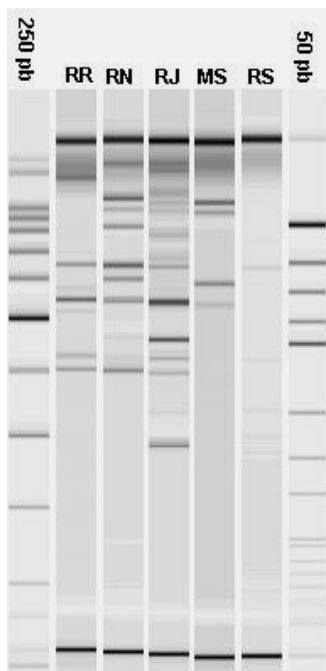
A análise de agrupamentos hierárquicos demonstra que Roraima (RR) foi a população de mosca-dos-chifres mais distante, apresentando similaridade zero com as demais populações de *H. irritans*, enquanto que as populações mais próximas foram Rio Grande do Sul (RS) e Mato Grosso do Sul (MS), com similaridade de 0,063, e o agrupamento Rio de Janeiro (RJ) e Rio Grande do Norte (RN) apresentaram similaridade de 0,036 entre estas populações, e a similaridade entre o nodo RJ/RN com o nodo RS/MS foi de 0,025, demonstrando que as populações brasileiras, com exceção de Roraima, compartilham aproximadamente 2,5% das seqüências nucleotídicas complementares aos *primers* selecionados, o que propicia a distinção genotípica entre as populações brasileiras de diferentes origens geográficas.

Os testes de Penrose e Mahalanobis também demonstraram que as populações mais semelhantes genotipicamente foram Rio Grande do Sul (RS) e Campo Grande (MS) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comparação entre as populações brasileiras de *Haematobia irritans* através dos testes de Penrose e Mahalanobis.

	RR	RN	RJ	MS	RS
Teste de Penrose:	---	---	---	---	---
RR	0	---	---	---	---
RN	1.1469	0	---	---	---
RJ	1.4336	0.0194	0	---	---
MS	1.2892	0.0042	0.0056	0	---
RS	1.4647	0.016	0.0038	0.0002	0
Maior distância (RR e RS) =	1.4647	---	---	---	---
Menor distância (MS e RS) =	0.0002	---	---	---	---
	---	---	---	---	---
Teste de Mahalanobis:	---	---	---	---	---
RR	0	---	---	---	---
RN	1.1469	0	---	---	---
RJ	1.4336	0.0194	0	---	---
MS	1.2892	0.0042	0.0056	0	---
RS	1.4647	0.016	0.0038	0.0002	0
Maior distância (RR e RS)	1.4647	---	---	---	---
Menor distância (MS e RS)	0.0002	---	---	---	---

O primer que melhor caracterizou genotipicamente as diferentes populações brasileiras de *H. irritans* foi OpE11 (Fig. 6), uma vez que, gerou um padrão genotípico único para cada uma das populações estudadas, sendo este padrão o melhor marcador molecular para a distinção da origem geográfica das amostras.



**Fig. 6.** Gel virtual obtido através do Agilent 2100 BioAnalyzer dos produtos de amplificação a partir do primer OpE11 para as populações brasileiras de *Haematobia irritans*, utilizado como marcador molecular para identificar a origem geográfica das amostras.

Em estudo conduzido por Castiglioni-Ruiz (2001) utilizando a técnica de RAPD-PCR comparando diferentes populações de *H. irritans* provenientes dos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Acre, além de uma amostra americana procedente do Texas (EUA), não foram observados loci polimórficos capazes de caracterizar genotipicamente a origem geográfica das populações estudadas, uma vez que as mesmas apresentaram altos índices de similaridade.

A análise dos resultados obtidos demonstra que as populações brasileiras de mosca-dos-chifres que encontram-se mais próximas são MS e RS, e tal fato pode ser explicado pelo contato entre estas populações através do trânsito de animais, já que alguns dos rebanhos nacionais de maior relevância pecuária encontram-se nestes estados, pois tanto Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul apresentam-se como centros exportadores de animais para o abate, aquisição de matrizes e animais para engorda (Araújo, 1991).

#### Populações Brasil, República Dominicana e Colômbia de *Haematobia irritans*

A amplificação do DNA genômico das populações de *H. irritans* provenientes do Brasil, República Dominicana e Colômbia, utilizando os 15 *primers* selecionados, produziu 196 fragmentos (Tabela 6). Estes fragmentos variaram de 2.020 a 204 pb. O número total de bandas produzidas por *primer*, variou de 8 (*primer* G2) a 19 (*primer* E6). Com relação ao número total de bandas produzidas por população, as mais polimórficas foram Brasil (BR) e República Dominicana (RD), cada qual com 67 bandas, seguidas pela Colômbia, com 62 bandas.

**Tabela 6.** Iniciadores RAPD selecionados, suas seqüências nucleotídicas e números de fragmentos RAPD gerados para as populações de *Haematobia irritans* do Brasil, Colômbia e República Dominicana.

<i>Primer</i>		Seqüência nucleotídica	Nº bandas RAPD
E1	5'	CCCAAGGTCC 3'	16
E5	5'	TCAGGGAGGT 3'	14
E6	5'	AAGACCCCTC 3'	19
E12	5'	TTATCGCCCC 3'	14
E15	5'	ACGCACAACC 3'	13
G2	5'	GGCACTGAGG 3'	08
G8	5'	TCACGTCCAC 3'	10
G10	5'	AGGGCCGTCT 3'	14
G16	5'	AGCGTCCTCC 3'	15
G18	5'	GGCTCATGTG 3'	13
H2	5'	TCGGACGTGA 3'	13
H6	5'	ACGCATCGCA 3'	13
H9	5'	TGTAGCTGGG 3'	09
H12	5'	ACGCGCATGT 3'	13
H19	5'	CTGACCAGCC 3'	12
<b>Total</b>			<b>196</b>

A partir da matriz dos índices de similaridade obtida com dados provenientes das 197 bandas geradas por RAPD, foi feita a análise quimiométrica utilizando o software EINSIGHT, onde, através da utilização de métodos de análises por agrupamentos hierárquicos (HCA) e de componentes principais (PCA), foram estimados a similaridade entre os primers e a distância Euclidiana entre as amostras de *H. irritans* (Fig. 7).

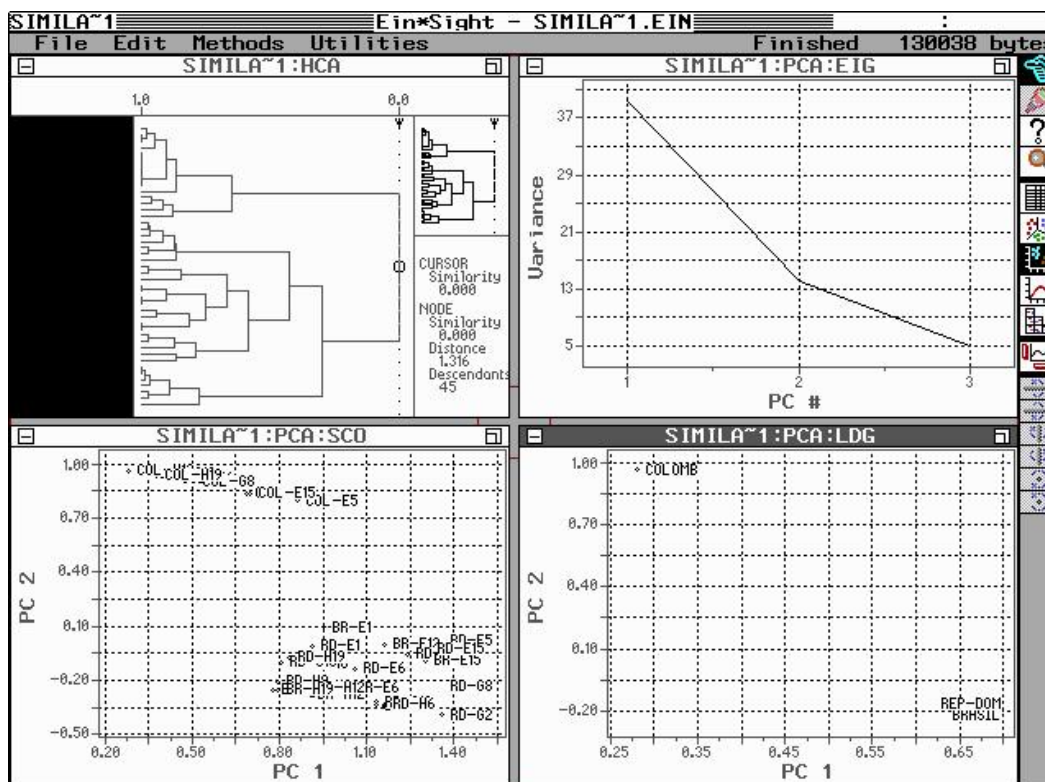


Fig. 7. Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e componentes principais (PCA) das populações latino-americanas de *Haematobia irritans* utilizando os *primers* selecionados.

A exclusão das amostras consideradas como *outliers* baseou-se na similaridade entre as amostras, e a escolha se deu a partir dos *primers* que apresentavam menor similaridade dentro dos agrupamentos, buscando-se aumentar a acuidade da análise, pelo aumento da similaridade e diminuição da distância Euclidiana entre as amostras (Fig. 8).

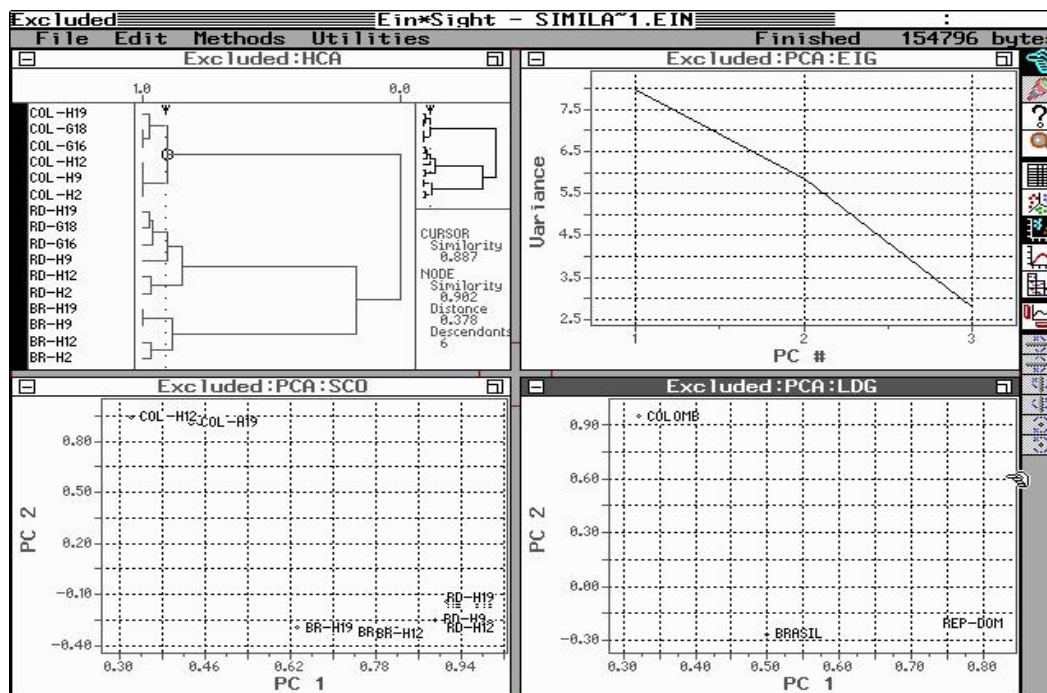


Fig. 8. Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e componentes principais (PCA) das populações latino-americanas de *Haematobia irritans* após a exclusão dos *primers* considerados como *outliers*.

Com relação ao dendrograma gerado pela análise de agrupamentos hierárquicos das populações, observa-se que a Colômbia foi a população de *H. irritans* que apresentou maior distância genotípica entre as populações analisadas, apresentando similaridade zero com as demais, enquanto que as populações de mosca-dos-chifres mais próximas foram Brasil e República Dominicana com similaridade de 0,250. Tal similaridade permite concluir que as populações Brasil e República Dominicana compartilham aproximadamente 25% das seqüências nucleotídicas complementares aos *primers* selecionados.

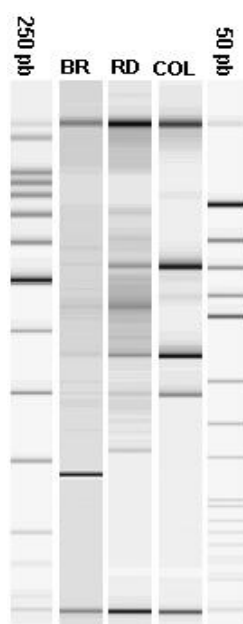
Os testes de Penrose e Mahalanobis também demonstraram que as populações mais semelhantes genotipicamente foram Brasil (BR) e República Dominicana (RD) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Comparação entre as populações Brasil, República Dominicana e Colômbia de *Haematobia irritans* através do teste de Penrose e Mahalanobis.

	BR	RD	COL
Teste de Penrose:	---	---	---
BR	0	---	---
RD	0,0003	0	---
COL	0,1140	0,1267	0
Maior distância (RD e COL) =	0,1267	---	---
Menor distância (BR e RD) =	0,0003	---	---
Teste de Mahalanobis:	---	---	---
BR	0	---	---
RD	0,0003	0	---
COL	0,1140	0,1267	0
Maior distância (RD e COL)	0,1267	---	---
Menor distância (BR e RD)	0,0003	---	---

Por meio da análise de componentes principais foi possível observar que as populações latino-americanas de *H. irritans* apresentam loci polimórficos capazes de caracterizá-las genotipicamente através dos *primers* OpG16, OpG18, OpH9 e OpH19.

O *primer* que melhor caracterizou genotipicamente as diferentes populações latino-americanas de *H. irritans* foi OpH19, que apesar de gerar um fragmento de 318,2 pb comum às populações BR e RD, foi o que produziu um padrão de bandas com maior potencial para ser utilizado como o marcador molecular que melhor distingue as populações latino-americanas estudadas (Fig. 9).



**Fig. 9.** Gel virtual obtido através do Agilent 2100 Bionalyzer dos produtos de amplificação a partir do *primer* OpH19 para as populações latino-americanas de *Haematobia irritans*, utilizados como marcadores moleculares para identificar a origem geográfica das amostras.

## Conclusões

As populações brasileiras de *Haematobia irritans* apresentam loci polimórficos capazes de caracterizá-las genotipicamente através dos primers OpE9, OpE11, OpE13, OpE15, OpG4 e OpH8.

O primer que melhor caracterizou genotipicamente as diferentes populações brasileiras de *Haematobia irritans* foi OpE11.

As populações latino-americanas de *Haematobia irritans* estudadas apresentam loci polimórficos capazes de caracterizá-las genotipicamente através dos primers OpG16, OpG18, OpH9 e OpH19.

O primer que melhor caracterizou genotipicamente as populações Brasil, República Dominicana e Colômbia de *Haematobia irritans* foi OpH19.

Genotipicamente as populações latino-americanas de *Hematobia irritans* mais distintas foram República Dominicana (RD) e Colômbia (COL).

## Referências bibliográficas

ARAÚJO, A. M. D. **Relatório interno da seção de doenças parasitárias e carenciais**. SEPAC/SNAD/MARA. Brasília, DF, Brasil. 1991.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, v. 01, p. 205-245. 1998.

AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat**. Versão 2.0. Belém, PA: Sociedade Civil Mamirauá; MCT-CNPq, 2000.

BARON, R. W.; LYSYK, T. J. Antibody responses in cattle infested with *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 5, p. 630-635, 1995.

BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E.; CROSBY, B. L. Review of ectoparasites and their effect on cattle production. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 597-602, 1992.

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.

CASTIGLIONI-RUIZ, L. **Caracterização molecular de populações de *Haematobia irritans* (mosca do chifre), pela técnica de RAPD-PCR**. 2001. 111 p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP, 2001.

DELLAPORTA, S. L., WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reproduction**, v. 1, p. 19-21, 1983.

EICKBUSH, T. H.; MOUDRIANAKIS, E. N. The compaction of DNA helices into either continuous supercolis or folded-fiber roas and toroids. **Cell**, v. 13, p. 295-306, 1978.

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



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

HARRIS, R. L.; MILLER, J. A.; FRAZAR, E. D. Horn flies and stable flies: feeding activity. **Annual Entomology Society American**, v. 67, n. 6, p. 891-894, 1974.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans portion des Alpes et des Jura. **Bulletin of Society Vaudoise Science Nature**, v. 37, p. 547-579, 1901.

LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, M. L. Evolution and structural organisation of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. **Medical Veterinary Entomology**, v. 14, p. 71-80, 2000.

LYNCK, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 91-99, 1994.

McLINTOCK, J.; DEPNER, K. R. A review of the life-history and habits of the horn fly, *Siphona irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). **Revista Canadian Entomology**, v. 86, p. 20-33, 1954.

NACHAKIN, I.; NICHOLAS, J. P., LI, M., UNG, H.; YUEN, P. K.; KRICKA, L. J.; WILDING, P. Agilent 2100 Bionalyzer for restriction fragment length polymorphisms analysis of the *Compylobacter jejuni* flagellin gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 754-757, 2001.

REINEKE, A.; ZEBITZ, C. P. Suitability of polymerase chain reaction – based approaches for identification of different gypsy moth genotypes in Central Europe. **Annual Entomology Society American**, v. 92, n. 5, p. 737-741, 1999.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.7. Steaket, NY: Applied Biostatistic, 1993. 1 disquete 3 ½ pol.

SCHREIBER, E. T.; CAMPBELL, J. B. Horn fly (Diptera: Muscidae) distribution on cattle as influenced by host color and time of day. **Environmental Entomology**, v. 15, n. 6, p. 1307-1309, 1986.

TAYLOR, D. B.; SZALANSKY, A. L.; PETERSON, R. D. Identification of screwworm species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Medical Veterinary Entomology**, v. 10, p. 63-70, 1996.

VALÉRIO, J. R.; GUIMARÃES, J. G. Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 4, p. 417-418, 1983.

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.

ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 56 p.

ZUMPT, F. **The stomoxyne biting flies of the world (Diptera: Muscidae): Taxonomy, biology, economic importance and control measures**. Gustav Fisher, Verlag, Stuttgart. 175 p., 1973.

**Embrapa**

---

**Rondônia**

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**