

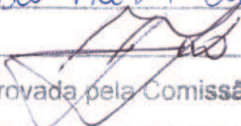


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PABLO FRESIA CORONEL

“Análise filogeográfica da mosca da bicheira, *Cochliomyia*
hominivorax”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PABLO FRESIA CORONEL

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia como parte dos requisitos
necessários para obtenção do Título
de Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética
Animal e Evolução.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Ana Maria Lima de Azeredo-Espin.

Campinas, SP
Janeiro 2011

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

C816a	<p>Coronel, Pablo Fresia Análise filogeográfica da mosca da bicheira, <i>Cochliomyia hominivorax</i> / Pablo Fresia Coronel. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Cochliomyia hominivorax</i>. 2. DNA mitocondrial. 3. Estrutura populacional. 4. Filogeografia. 5. Mosca da bicheira. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Phylogeographic analysis of the New World Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*.

Palavras-chave em inglês: *Cochliomyia hominivorax*; Mitochondrial DNA; Population structure; Phylogeography; New world screwworm fly.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, Carlos Augusto Colombo, Wesley Augusto Conde Godoy, Cláudio José Von Zuben, Louis Bernard Klaczko.

Data da defesa: 31/01/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 31 de Janeiro de 2011

BANCA EXAMINADORA


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


Assinatura

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo


Assinatura

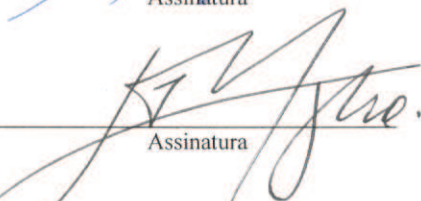
Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben


Assinatura


Prof. Dr. Wesley Augusto Conde Godoy


Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko


Assinatura

Profa. Dra. Karina Lucas Silva-Brandão


Assinatura

Prof. Dr. Ana Claudia Lessinger

Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Arias

Assinatura

Aos meus pais Hortencia e Eduardo,
meu irmão Carlos e Mateo seu filho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Ana Maria pela confiança e oportunidade de fazer o meu doutorado no seu laboratório, me beneficiando com a experiência de muitos anos de trabalho em *Cochliomyia hominivorax*. Também agradeço a oportunidade de participar como monitor da disciplina de Genética Fisiológica e Molecular, que certamente contribuiu para minha formação.

Agradeço especialmente à minha amiga Mariana, por compartilhar suas idéias e discutir as minhas em todo momento. À tese deve muito à sua visão crítica e capacidade. Também, por me mostrar o mundo da biologia molecular e sempre estar disposta a me ajudar na bancada no que for necessário. Agradeço também sua disposição a resolver tudo!

Também, quero agradecer a Rosângela, à *alma matter* do nosso dia a dia no laboratório; sempre disposta a revelar os segredos daquela PCR que não funciona. À Alessandra, pelo seu companheirismo, dedicação e a produção das seqüências das amostras de Artigas-Quaraí. À Salete, que cuida com dedicação da criação de larvas e pelo papo legal nos corredores, além do “café da Salete”.

Meu reconhecimento e agradecimento a Norma, Renato e Marco Antonio-Palocci com quem começamos esta história do doutorado e que sempre estiveram a fim de discutir meus resultados, opinar e me ajudar com isto de escrever em português (os erros são todos meus!). Além de se transformarem em meus amigos, agradeço pela parceria e disposição, junto a Mariana, para compartilhar uma mesa de bar.

Também sou grato às pessoas que integraram e integram o Laboratório de Genética e Evolução Animal, e fazem que o ambiente de trabalho seja muito agradável, Ana Cláudia, Ana Carolina, Tatiana, Túlio, Gustavo, Luciane, Karina, Aline, Priscila, Joan, Bárbara, Pedro, Daniel, Alberto, Ana Paula e Giselle.

Agradeço aos professores Dr. Louis Bernard Klazcko, Dr. Cláudio José Von Zuben, Dr. Wesley Augusto Godoy e Dr. Carlos Augusto Colombo, pelas contribuições e discussão na banca e/ou pré-banca que melhoraram a tese.

Agradeço enormemente a todos os amigos que fiz aqui em Campinas, particularmente aos moradores e achegados da República do Matão: Maria e André, Shin, Renato, Pedro, Karina e Marcelo, Fernanda e Dário, e Vinícius que fizeram de Barão Geraldo a força de jantares, churrascos, cerveja e vinhos um lugar de boa vida. Agradeço a Sônia e Christiano por sempre ter me acolhido e compartilhar infinitas histórias.

Agradeço enormemente à minha família e amigos de Uruguai, pelas alegrias e fazer que isto valga a pena. Agradeço aos meus pais, Hortencia e Eduardo, pelo apoio incondicional e por ser meu maior exemplo na vida. A meu irmão Carlos, um grande amigo que a vida me deu. À Maria, minha cunhada e Mateo, meu sobrinho que veio para comemorar a incrível vitória de *La Celeste* contra Ghana. A meus tios Charo e Pedro. A todos meus primos e especialmente a Federico que junto com meu irmão rodamos o Uruguai, atrás de larvas, no verão de 2008. A Dona Coca, por seu especial carinho. Aos meus amigos Ronald e Gonzalo, grandes irmãos que a vida me deu; a minha amiga Valentina. Aos grandes amigos do Morrocoyo (bastião do futebol uruguaio de pelada), pelos melhores terceiros tempos que conheço.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram, enviando amostras ou nos recebendo nos distintos estabelecimentos rurais de Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. Especialmente a Laura Marques e autoridades da DGSG-MGAP; a Matín Altuna, Joal Pontes e todo o pessoal de campo do “Plano Piloto de Liberação de Moscas Estéreis” de Artigas-Quaraí; a Soledad Valledor e seu grupo, Facultad de Veterinaria - UdelaR. A René Garcia, Alfredo Coronado e o IAEA pela coleta de Equador, Colômbia, Venezuela, Trinidad e Tobago, República Dominicana e Cuba. A Richard Roherdanz e o USDA pelas amostras de América Central e do Norte.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho (bolsa do Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação, PEC-PG). A FAPESP, CNPq, CAPES e IAEA pelo financiamento de diversos projetos do laboratório.

RESUMO

A mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax*, é um ectoparasito obrigatório dos animais de sangue quente endêmico das Américas. As míases causadas por esta praga geram severos prejuízos econômicos na produção pecuária da América do Sul e da região do Caribe, devido à mortalidade e redução na produtividade dos animais infestados. Nesta tese, abordamos alguns aspectos da distribuição da variação de seqüências do DNA mitocondrial de *C. hominivorax* em duas escalas geográficas e os eventos históricos que podem explicar os padrões observados. As principais contribuições foram compiladas em três artigos científicos. No primeiro artigo, (artigo 1) investigamos o padrão geral de estruturação geográfica da variabilidade genética em 38 localidades ao longo de toda a distribuição da espécie. As análises das seqüências parciais da região controle (CR) e dos genes COI e COII mitocondriais revelaram que a diversidade genética da espécie está estruturada em quatro grupos regionais principais, denominados Cuba (CG), República Dominicana (DRG), região norte e região sul da Amazônia (NAG e SAG, respectivamente). Foi sugerido que o padrão observado foi principalmente formado por eventos históricos, como a colonização das ilhas do Caribe, vicariância na região Amazônica e expansão das populações desde o último máximo glacial. O segundo artigo (artigo 2) apresenta um teste da hipótese de perturbação-vicariância na região Amazônica, que foi realizado através de simulações de coalescência e modelagem ecológica da espécie. Os resultados indicaram que os ciclos climáticos do Pleistoceno promoveram a expansão, fragmentação e mistura das populações na região Amazônica em diferentes momentos do passado. Detectamos que o primeiro momento de divergência dos grupos de populações analisadas (SAG, NAG e amostras da América Central e do Norte) é mais antigo que o último período glacial e deve ter acontecido no interglacial Yarmouth (~250.000 anos atrás). Porém, a demografia histórica da espécie e as relações filogenéticas das seqüências mitocondriais sugerem um padrão mais complexo, incluindo reticulação, para a evolução e divergência das populações na região Amazônica. No terceiro artigo (artigo 3), apresentamos o primeiro estudo da variabilidade genética de *C. hominivorax* em escala local, em que se analisaram indivíduos de 25 sítios de coleta distribuídos numa área de 90 km por 60 km próxima às cidades de Quaraí e Artigas, na fronteira entre Brasil e Uruguai.

Os resultados sugerem que os indivíduos pertencem a uma única população com alto grau de polimorfismo, indicando que esta é uma população estável capaz de sobreviver às condições adversas do inverno local e que flutua demograficamente de acordo com o clima da região. Porém, há evidências de que estas amostras não estão em equilíbrio e, portanto, a ausência de estruturação baseada nas estimativas tradicionais deve ser interpretada com cuidado. Como esta é uma região importante para a atividade pecuária do Brasil e Uruguai, estes resultados são de interesse para um possível plano de controle na região. No entanto, serão necessárias análises de amostras seriadas ao longo de um ano, assim como de diferentes anos na mesma escala geográfica, para melhor entender o padrão de fluxo gênico na região.

ABSTRACT

The New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*, is an obligate ectoparasite of warm blooded vertebrates, endemic of the Americas. Myiasis caused by this pest fly generate great profit losses to the livestock sector in South America and the Caribbean region, due to mortality and productivity reduction of infested animals. In this thesis, we approach some aspects of mitochondrial DNA sequences variation of *C. hominivorax* in two geographic scales, and the historical events that could explain the observed patterns. The main contributions were compiled in three research articles. In the first (article 1), we investigate the general pattern of genetic variability distribution in 38 localities encompassing the species geographic range. The analysis of partial sequences of the mitochondrial control region (CR), COI and COII genes revealed four main regional groups of genetic diversity, denominated Cuba (CG), Dominican Republic (DRG), north region (NAG) and south region (SAG) of the Amazon basin. Results suggest that current distribution of *C. hominivorax* genetic diversity was mainly shaped for historical events, i.e. Caribbean islands colonization, vicariance in the Amazon region and population expansion since the last glacial maximum. The second article (article 2) presents a hypotheses test of vicariance-perturbation in the Amazon region, through coalescent simulations and ecological niche modeling of the species. The results indicate that Pleistocene climatic cycles promote expansion, fragmentation and mixture of Amazon region populations during the past. We detected that the divergence among groups of analyzed populations (SAG, NAG and samples from North and Central America) occurred before the last glacial maximum and may have happened during the interglacial Yarmouth (~250.000 years ago). However, the species demographic history and the phylogenetic relationships of the mitochondrial sequences suggest a more complex pattern, including reticulation, for the evolution and divergence of the Amazonian region populations. Finally, in the third article (article 3) we present the first study of the genetic variability of *C. hominivorax* in a local scale, in which individuals of 25 localities in a 90 km for 60 km area in the proximity of Artigas city and Quaraí city, in the border between Brazil and Uruguay, were analyzed. The results suggest that the individuals are from a unique population, with high level of polymorphism, indicating that this is a stable population

which is capable of survive the adverse local winter conditions and demographically fluctuate in accordance to the region climate. However, there are evidences that these samples are not in equilibrium hence the absence of structure interpretation based on traditional estimates must be done carefully. As this is an important region for livestock industry of Brazil and Uruguay, these results are interesting for a possible control program in the region. However, studies of serially collected samples throughout the year and in different years at the same geographic scale will be necessary to better understand the gene flow pattern in the region.

INDICE

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	xiv
APRESENTAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	xvi
PARTE I – Introdução geral ao problema	
Introdução	
1. Importância da produção animal.....	18
2. A mosca-da-bicheira: importância, ciclo de vida, distribuição, abundância e controle.....	19
3. A mosca-da-bicheira: variabilidade e estrutura genética das populações.....	23
4. Objetivos do trabalho.....	25
PARTE II – Artigos	
Artigo 1: “Genetic structure and demographic history of the New World Screwworm fly across its current geographic range”.....	27
Artigo 2: “Efeitos das oscilações climáticas do Pleistoceno na estrutura populacional e demografia histórica de <i>Cochliomyia hominivorax</i> ”	40
Artigo 3: “Análise da variabilidade mitocondrial e de microssatélites em uma localidade da distribuição sul de <i>Cochliomyia hominivorax</i> ”	75
PARTE III	
Discussão geral.....	98
Conclusões.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabelas

Artigo 1 – Table 1. New World Screwworm sampled sites, haplotype distribution and genetic variability indices.....	31
Artigo 1 – Table 2. Pairwise F_{ST} estimates among 38 populations of <i>Cochliomyia hominivorax</i>	33
Artigo 2 – Tabela 1. Localidades de amostragem, tamanho das amostras e distribuição dos haplótipos mitocondriais dos dados concatenados (CR-COI-COII) de <i>C. hominivorax</i>	46
Artigo 2 – Tabela 2. Estimativas de θ para cada grupo de populações e de S para cada modelo nos tempos de divergência propostos.....	61
Artigo 3 – Tabela 1. Variabilidade genética de <i>C. hominivorax</i> nos sítios amostrados, investigada através das seqüências do DNAm.....	84
Artigo 3 – Tabela 2. Variabilidade genética de <i>C. hominivorax</i> nos sítios de coleta, investigada através de microssatélites.....	86

Figuras

Artigo 1 – Figure 1. Geographical distribution of the New World Screwworm fly sampled.....	32
Artigo 1 – Figure 2. Haplotype network of CR/COI/COII concatenated sequence data.	35
Artigo 1 – Figure 3. Haplotype network for the 1 st and 2 nd codon position of COI/COII concatenated sequences.....	35
Artigo 1 – Figure 4. <i>Bayesian Skyline Plot</i> using COI sequences of the New World Screwworm fly.....	36
Artigo 2 – Figura 1. Representação esquemática dos modelos de divergência populacional testados.....	49
Artigo 2 – Figura 2. Genealogia bayesiana dos dados mitocondriais de <i>C. hominivorax</i> combinados (CR-COI-COII).....	55
Artigo 2 – Figura 3. Mapa com as probabilidades de ocorrência de <i>C. hominivorax</i>	

produzidos no Maxent correspondente a distribuição atual.....	58
Artigo 2 – Figura 4. Mapas com as probabilidades de ocorrência de <i>C. hominivorax</i> produzido no Maxent correspondente a distribuição projetada no último máximo glacial (LGM ~21.000 anos atrás). A) modelo paleoclimático CCSM e B) modelo paleoclimático MIROC.....	59
Artigo 2 – Figura 5. Mapa com as probabilidades de ocorrência de <i>C. hominivorax</i> produzido no Maxent correspondente a distribuição no último máximo quente (LIG ~120.000-140.000 anos atrás) usando o modelo paleoclimático LIG.....	60
Artigo 2 – Figura 6. Teste de hipótese comparando os valores de <i>S</i> observados para a genealogia bayesiana dos dados mitocondriais de <i>C. hominivorax</i> , com a distribuição dos valores de <i>S</i> obtidos nas simulações dentro dos modelos de divergência populacional.....	62
Artigo 2 – Figura 7. <i>Bayesian Skyline Plot</i> dos haplogrupos I, II-a, II-b e III de <i>C. hominivorax</i>	64
Artigo 3 – Figura 1. Sítios de coleta de <i>C. hominivorax</i> na fronteira entre Brasil e Uruguai.....	78
Artigo 3 – Figura 2. Gráfico das estimativas de F_{ST} versus a distância geográfica entre sítios de coleta.	87
Artigo 3 – Figura 3. Valores dos índices de fixação obtidos no Samova, para as seqüências do DNAMt, como função do número de grupos de sítios de coleta <i>k</i>	88
Artigo 3 – Figura 4. Rede de haplótipos dos dados de seqüências do DNAMt concatenadas (CR-COII).....	90
Artigo 3 – Figura 5. Distribuição das diferenças entre pares de seqüências do DNAMt de <i>C. hominivorax</i> e testes de neutralidade de Tajima (<i>D</i>) e Fu (<i>FS</i>).....	91
Artigo 3 – Figura 6. Análise de agrupamento bayesiano dos indivíduos de <i>C. hominivorax</i> realizado no programa Structure.....	92
Discussão – Figura 1. a) Mapa indicando as localidades de coleta de <i>C. hominivorax</i> de Cuba e da Biofábrica do USDA Fargo. b) Árvore bayesiana exemplificando a relação entre as seqüências do DNAMt dos indivíduos de Cuba e da Biofábrica	100

APRESENTAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese está inserida dentro de uma linha de pesquisa que tem como objetivo geral caracterizar a diversidade genética da mosca-da-bicheira, de maneira a aumentar o entendimento dos aspectos evolutivos da espécie para auxiliar em futuras discussões sobre a aplicação de programas de manejo e controle da mesma na América do Sul e o Caribe. A tese contém um trabalho dos mais abrangentes já realizados até o momento sobre a variabilidade genética e distribuição da diversidade em populações naturais da espécie, sendo o primeiro a utilizar seqüências do DNA mitocondrial com esse objetivo. Para tal, foram analisadas amostras de quase toda a distribuição geográfica atual da mosca-da-bicheira, incluindo localidades desde a região do Caribe até a Argentina.

O texto está organizado da seguinte forma:

Na Parte I está descrito o contexto geral em que o trabalho está inserido, incluindo a importância da produção animal e o desafio que representa o controle eficiente das pragas. Além disso, foram descritas as características da mosca-da-bicheira e uma breve revisão do conhecimento atual sobre a diversidade genética, finalizando com a apresentação dos objetivos do trabalho.

Na Parte II se apresentam os resultados obtidos na tese, organizados em três artigos científicos. O artigo 1, já aceito para publicação, aborda a questão da distribuição da diversidade genética e alguns aspectos da demografia histórica da espécie ao longo de sua atual distribuição geográfica. No artigo 2 foi testada a hipótese de perturbação-vicariância na região Amazônica. Essa hipótese surgiu na discussão do artigo 1 e nos trabalhos de PCR-RFLP anteriores como uma explicação possível dos efeitos das mudanças climáticas do Pleistoceno na divergência das populações que vivem ao norte e ao sul da região Amazônica. No artigo 3, foi realizado pela primeira vez nessa espécie um estudo da variabilidade genética numa escala local (microgeográfica).

A Parte III apresenta uma discussão geral sobre os principais resultados obtidos nos três trabalhos apresentados e as conclusões gerais da tese.

PARTE I

Introdução

1. Importância da produção animal

Um dos grandes desafios do século 21 será alimentar os nove bilhões de habitantes estimados para o ano 2050, 40% a mais dos que atualmente habitam o planeta (ONU 2004). Este aumento da população humana, junto ao aumento da urbanização¹ e de renda nos países em desenvolvimento, tem aumentado a demanda por alimentos de origem animal (Steinfeld 2004). Da década de 1970 até hoje, o consumo *per capita* de carne, ovos e leite duplicou nos países em desenvolvimento, e essa tendência de aumento deve continuar por mais 10 a 20 anos antes de se estabilizar (Delgado *et al.* 1999). Esse cenário, somado a grande demanda dos países desenvolvidos por produtos de origem animal, deve afetar seriamente os sistemas de produção animal e vegetal, o ambiente, a saúde pública, os fluxos de comércio e mais amplamente a economia mundial de alimentos (Delgado *et al.* 1999, Pica-Ciamarra & Otte 2009). Portanto, o desafio é como aumentar a oferta de alimentos, especialmente os de origem animal, atendendo a demanda de uma população predominantemente urbana sem estressar ainda mais o ambiente.

Neste contexto, a América Latina aparece como uma área de grande importância, pois representa uma área com uma grande capacidade de produzir e exportar produtos de origem animal. Como exemplo, o Brasil é o principal exportador mundial de carne bovina, tendo sido responsável por 16% da produção mundial de carne no ano 2009 (ABIEC 2010). Esses números podem ser ainda maiores, já que o Brasil possui um grande potencial para aumentar a produtividade pecuária, à medida que aumentar a eficiência da ocupação das pastagens e investir em programas de sanidade animal. Nosso continente, por abrigar importantes *hotspots* de biodiversidade, como a floresta Amazônica, possui também um grande desafio em que o sistema produtivo deve se desenvolver num contexto de conservação dos recursos naturais.

¹Atualmente, mais da metade da população mundial vive em comunidades urbanas (Cheneau *et al.* 2004). O crescimento esperado da população irá acelerar essa tendência, no equivalente à criação de uma cidade do tamanho de Los Angeles, Califórnia (população: 3.834.340), a cada três semanas pelos próximos 40 anos. Alguns demógrafos projetam que, na China, 900 milhões de pessoas viverão em cidades até 2020 (Zijun 2006).

De forma direta, através do pastoreio dos animais, ou indireta, pela produção de culturas para alimentação dos mesmos, a pecuária ocupa aproximadamente 30% da superfície terrestre livre de gelo (Steinfeld *et al.* 2006). Os esforços para atender a demanda por produtos de origem animal têm sido principalmente através do aumento do número de animais, mas não da produtividade por animal. Este aumento da densidade de animais levou à degradação de áreas rurais, desmatamento de florestas, aumento rápido da incidência de doenças zoonóticas (ex. transmissão de animais para humanos) e um acúmulo de pesticidas na cadeia de alimentos (Piedrafita *et al.* 2010). Para diminuir estes efeitos negativos sem deixar de atender a demanda por produtos animais, os incrementos da produção deverão ser resultado do aumento da produtividade por unidade de terra (Steinfeld *et al.* 2006). Um dos principais entraves ao aumento da produtividade pecuária mundial é a perda provocada pelas doenças animais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal, essa perda representa aproximadamente um quinto das perdas na produção global (OIE 2008). Dentre essas causas, as doenças parasitárias (ecto e endoparasitos) têm sido reconhecidas como limitantes da produção animal, devido à mortalidade, redução da fertilidade e perda de peso (Vargas-Terán *et al.* 2005). Assim, a busca de soluções para o controle mais eficiente dessas parasitoses pode contribuir para o aumento da produtividade pecuária.

2. A mosca-da-bicheira: importância, ciclo de vida, distribuição, abundância e controle

A mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel 1858) (Diptera: Calliphoridae), é uma espécie endêmica das Américas que na fase larval causa, em vertebrados de sangue quente, a parasitose denominada miíase (Guimarães *et al.* 1983). Miíase, como definido por Zumpt (1965), é a “infestação de animais vivos por larvas de dípteros que, pelo menos durante alguma fase do seu desenvolvimento, se alimentam dos tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de suas substâncias corporais ou alimentos por ele ingeridos”. Esta doença parasitária causa severos prejuízos econômicos devido à mortalidade e à redução na produtividade dos animais infestados (Guimarães & Papavero 1999), sendo portanto, considerada um problema sanitário grave na produção pecuária da

América do Sul e da região do Caribe. Embora, as estimativas de perdas econômicas devido à infestação por *C. hominivorax* não sejam precisas, para o Brasil estas variam desde U\$S 150 milhões (Grisi *et al.* 2002) a U\$S 1,77 bilhão anuais (Vargas-Terán *et al.* 2005), os valores são significativos.

Cochliomyia hominivorax é um parasito obrigatório que tem metamorfose completa. Em temperaturas médias de 22°C, o ciclo de vida ocorre em aproximadamente 24 dias, mas dependendo das condições do ambiente, este pode se estender até por 50 dias (Cushing & Patton 1933, Hall 1948, Guimarães *et al.* 1983). As fêmeas dessa espécie depositam seus ovos na borda de feridas ou nas mucosas de animais; após 24 horas, as larvas eclodem e começam a se alimentar dos fluidos corporais e tecidos vivos do hospedeiro (Laake *et al.* 1936, Guimarães & Papavero 1999). Cada fêmea pode colocar uma média de 200 ovos (variando de 10 a 500), e quando atraídas pelo odor característico das feridas infestadas, pode resultar em infestações com centenas ou milhares de larvas capazes de ocasionar a morte do hospedeiro (Thomas & Mangan 1989). As larvas completam seu desenvolvimento em 4-8 dias, abandonam a ferida e em seguida se enterram para transformarem-se em pupas (Laake *et al.* 1936, Travis *et al.* 1940 *apud* Hall 1991). Os adultos emergem em aproximadamente oito dias, estando prontos para copular após os primeiros três dias. As fêmeas são monógamas (Crystal 1967) e autógenas pelo menos para o primeiro ciclo gonadotrófico, estando prontas para oviposição quatro dias após o acasalamento (Hall 1991).

A distribuição geográfica histórica de *C. hominivorax* se estendia desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina, incluindo as ilhas do Caribe (Hall & Wall 1995). O Planalto de *Edwards*, no Texas, foi indicado como o limite norte da distribuição, sendo que as regiões ao norte eram recolonizadas em cada verão (Barrett 1937) podendo alcançar regiões tão extremas como o norte do estado de Iowa nos meses quentes (Laake 1950). O limite sul da distribuição foi indicado no paralelo 45°, na Província de Chubut, Argentina (Boero & Morini 1961 *apud* Suárez 2002). A espécie não sobrevive em regiões com temperatura média inferior a 9°C durante três meses seguidos, ou inferior a 12°C durante cinco meses seguidos (FAO 1992), observando-se uma sobrevivência de adultos de 1% a temperaturas mínimas de -6,7°C (Parman 1945).

Cochliomyia hominivorax foi erradicada entre 1957 a 2000 da América do Norte e América Central continental através de uma abordagem de Manejo Integrado de Pragas em Áreas Extensas (sigla em inglês AW-IPM) baseada na Técnica do Inseto Estéril (sigla em inglês SIT) (revisado em Hall & Wall 1995, Klassen & Curtis 2005). Portanto, a atual distribuição compreende América do Sul e a região do Caribe, exceto Chile. Desde 2001, moscas estéreis estão sendo liberadas na região do estreito de Darien, Panamá, num esforço de proteger as áreas livres da possível re-infestação vinda da América do Sul (Robinson *et al.* 2009).

Os efeitos do clima sobre o ciclo de vida, distribuição e abundância de *C. hominivorax* são controversos (Readshaw 1989). Trabalhos que testaram formalmente a relação entre a abundância e as variáveis meteorológicas obtiveram resultados opostos, sendo que alguns não encontraram uma correlação significativa entre as variáveis (Rahn & Barger 1973, Krafur 1985) e outros sim (Readshaw 1986, Krafur 1987). Parman (1945) sugeriu que no inverno, as pupas eram favorecidas por condições mais secas do solo e que solos com maior umidade reduziam a viabilidade das pupas em qualquer estação do ano. Porém, Thomas (1986, 1989) encontrou que as pupas são muito resistentes ao afogamento, além de não encontrar um efeito negativo da umidade na emergência de adultos no sul do México. Também tem sido largamente aceito que as pupas da mosca-da-bicheira morrem devido à dessecação no calor e aridez do solo (Krafur & Linqvist 1996). Estimativas de perda de peso e sobrevivência entre larvas maduras, pré-pupa e adultos em vários regimes de temperatura e umidade demonstraram uma alta mortalidade em atmosferas dessecantes (Baumhover 1963). Apesar destas controvérsias, climas quentes e úmidos têm sido associados com abundância populacional da mosca-da-bicheira, e climas secos, tanto frios como quentes, com uma baixa atividade das populações (Parman 1945, Hightower *et al.* 1966, Hightower 1969, Goodenough *et al.* 1983, Carballo *et al.* 1991, Coronado & Kowalski 2009). Esta noção de que o clima governa a abundância da mosca-da-bicheira está implícita na natureza sazonal das mífases nos animais domésticos (Hightower *et al.* 1966).

O ecótono entre florestas e pastagens tem sido identificado como o habitat de maior atividade das populações da mosca-da-bicheira (Mangan & Thomas 1989, Parker *et*

al. 1993, Phillips *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2007). Thomas (1993) sugeriu que *C. hominivorax* tem locais distintos de alimentação, acasalamento e oviposição. Observações de campo e experimentos em que o habitat foi reproduzido artificialmente indicam que as moscas recém emergidas procuram a floresta para se alimentar e descansar (Hightower & Alley 1963, Thomas 1991), preferindo árvores em flor. Dados de marcação, liberação e recaptura mostraram que as fêmeas preferem o habitat de floresta, mas procuram por hospedeiros onde ovipor nas áreas abertas de pastagem próximas (Thomas & Mangan 1989). Phillips *et al.* (2004), estudando sua distribuição nas regiões de floresta tropical no Panamá, encontraram que *C. hominivorax* é mais abundante nas florestas semi-abertas e bordas de florestas assim como na transição entre as estações úmida e seca. Estes autores também encontraram diferenças significativas de abundância entre sítios dentro de um mesmo habitat, mostrando a sensibilidade desta mosca às variações micro-ambientais.

O controle das populações de espécies praga mediante inseticidas é a estratégia convencional, tanto na pecuária quanto na agricultura, e a única atualmente usada para a mosca-da-bicheira (com exceção da Jamaica, Vargas-Terán *et al.* 2005). Este tipo de controle é aplicado de forma independente por cada produtor de acordo com as suas necessidades de curto prazo sem um programa coordenado. Porém, o uso de inseticidas pode selecionar linhagens de insetos resistentes (Cassida & Gary 1998, Hemingway & Ranson 2000). De fato, em *C. hominivorax*, Carvalho *et al.* (2009) e Silva *et al.* (2009) identificaram mutações correlacionadas com resistência a alguns inseticidas em populações do Brasil e Uruguai. Essa forma de controle também pode trazer problemas como a contaminação do ambiente (Porretta *et al.* 2007) e acúmulo de resíduos químicos (ex. organofosforados e piretróides) na carne e no leite (Nolan & Schnitzerling 1986). Deste modo, com a necessidade de reduzir o uso de produtos químicos, a adoção de programas de controle com maior especificidade em uma escala geográfica apropriada tem sido destacado como uma alternativa mais adequada (ex. Kongan 1998, Porretta *et al.* 2007).

O Manejo Integrado de Pragas em Áreas Extensas representa uma estratégia alternativa focada no manejo preventivo das populações da praga em todos os habitat do ecossistema, evitando que potenciais migrantes sejam capazes de restabelecer infestações em áreas de interesse (Klassen 2005). O AW-IPM baseado na Técnica do Inseto Estéril

(SIT) é uma forma específica, eficaz e ambientalmente segura para o controle de pragas, podendo contribuir para o aumento da eficiência da produção animal na América do Sul e Caribe através do controle da mosca-da-bicheira.

3. A mosca-da-bicheira: variabilidade e estrutura genética das populações

O estudo da estrutura genética das populações de espécies praga tem sido apontado como um componente importante na delimitação de regiões e escalas geográficas adequadas para programas de controle (Tabachnick & Black 1995, Kafsur 2005). Em *C. hominivorax*, a variabilidade genética e a estrutura das populações naturais têm sido caracterizadas através de marcadores citogenéticos (McInnis 1981, McInnis *et al.* 1983, LaChance *et al.* 1982, LaChance & Whitten 1986, Azeredo-Espin 1987), isozimas (Bush & Neck 1976, Whitten 1980, Krasfur & Whitten 1993, Taylor & Peterson 1994, Taylor *et al.* 1996, Infante-Malachias 1999), RAPDs (Infante-Malachias *et al.* 1999), RFLP e PCR-RFLP do DNAm_t (Roehrdanz & Johnson 1988, Roehrdanz 1989, Azeredo-Espin 1993, Infante Vargas & Azeredo-Espin 1995, Lyra *et al.* 2005, Lyra 2008, Lyra *et al.* 2009) e microssatélites (Torres 2006, Torres *et al.* 2007, Torres & Azeredo-Espin 2009). De forma geral, tem sido observado que a mosca-da-bicheira é uma espécie com alto grau de polimorfismo, mas que as divergências populacionais estimadas estão de acordo com os valores observados e aceitos para o nível intra-específico.

Até o momento, os trabalhos mais conclusivos (Torres 2006, Lyra *et al.* 2009) mostraram que as populações desta espécie estão estruturadas na região do Caribe, mas apresentam baixos níveis de diferenciação na América do Sul. Lyra *et al.* (2009) é o único trabalho que inclui amostras de toda a distribuição atual de *C. hominivorax*, observando um padrão de diferenciação populacional moderado nessa escala geográfica. Neste trabalho, os maiores níveis de diferenciação foram observados entre as populações da região do Caribe, em contraste aos baixos níveis de diferenciação das populações continentais. Os autores concluíram que as populações das ilhas do Caribe encontram-se isoladas geograficamente pelo Mar do Caribe e que na América do Sul a baixa diferenciação na ampla região considerada poderia ser devida a fatores históricos (ex. expansão demográfica e espacial). Também marcadores microssatélites, em concordância com os resultados encontrados com

PCR-RFLP mitocondrial, revelaram baixos níveis de diferenciação populacional na América do Sul e estruturação na região do Caribe (Torres 2006, Torres & Azeredo-Espin 2009). Nenhum dos trabalhos detectou uma correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas na América do Sul, apontando que o modelo populacional de isolamento-por-distância (IBD, do inglês *Isolation By Distance*) não explica a distribuição da diversidade genética encontrada. Assim, estudos que incluam análises das populações em diferentes escalas geográficas e investiguem os efeitos da flutuação sazonal na demografia de *C. hominivorax* são necessários para identificar e explicar padrões de distribuição da diversidade genética.

4. Objetivos do trabalho

Dentro do contexto apresentado, o objetivo geral desta tese foi estudar o padrão de distribuição da variabilidade genética da mosca-da-bicheira em diferentes escalas geográficas, buscando entender os fatores históricos e atuais que moldam esse padrão.

Para isso, foram estudadas seqüências do DNA mitocondrial de indivíduos de toda a distribuição geográfica da espécie, investigando a divergência das populações e a demografia histórica da espécie. Também foram analisadas a diversidade e diferenciação numa escala microgeográfica através da análise de seqüências do DNA mitocondrial e marcadores microssatélites de indivíduos de uma localidade da fronteira entre Brasil e Uruguai.

Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho permitam a identificação de unidades de manejo que ajudem a desenhar programas de controle para esta praga.

PARTE II

Artigo 1

Genetic structure and demographic history of the New World Screwworm fly across its current geographic range

Pablo Fresia, Mariana L. Lyra, Alfredo Coronado and Ana Maria L. de Azeredo-Espin

Publicado no *Journal of Medical Entomology*, 2011, 48(2): 280-290.

Estrutura genética e demografia histórica da mosca-da-bicheira ao longo da sua atual distribuição geográfica

Resumo

A mosca-da-bicheira, *Cochliomyia hominivorax*, é um ectoparasito obrigatório dos vertebrados de sangue quente e uma das pragas mais nocivas para a produção animal que causa um declínio na produção de carne e leite. É uma espécie endêmica das Américas, que foi erradicada da América do Norte e Central, mas que ainda é um grande problema para a produção animal na América do Sul e o Caribe. O objetivo deste trabalho foi investigar a variabilidade e estrutura genética das populações da mosca-da-bicheira na sua atual distribuição geográfica utilizando seqüências do DNA mitocondrial (região controle - CR, COI e COII), assim como os eventos demográficos históricos que influenciaram a atual distribuição espacial da variabilidade genética. Analisamos 361 indivíduos de *C. hominivorax* coletados em 38 localidades distribuídas de Cuba até Argentina. As análises mostraram um padrão de diferenciação genética na escala macrogeográfica analisada, no qual a diversidade está estruturada em quatro grupos regionais principais, que correspondem a Cuba (CG), República Dominicana (DRG), norte e sul da região Amazônica (NAG e SAG). Os resultados indicaram que a distribuição da diversidade genética em *C. hominivorax* foi principalmente moldada por eventos históricos, i.e. colonização das ilhas do Caribe a partir do continente, vicariância na região amazônica e expansão populacional. A história demográfica revela que a espécie atravessou um processo de expansão populacional que começou aproximadamente 20-25 mil anos atrás.

Os resultados sugeriram que o período inicial de expansão está provavelmente associado às mudanças climáticas ocorridas no Pleistoceno tardio, e que o aumento mais recente pode estar associado à disponibilidade de recursos nos últimos tempos (i.e. introdução e aumento do gado na América). O processo demográfico de expansão populacional é provavelmente responsável pela baixa divergência entre as populações dentro dos grupos da América do Sul, assim como da ausência de correlação genética e geográfica na região Sul do Amazonas. Mas essa expansão populacional não apaga o padrão de estrutura geográfica na escala continental. Este padrão de distribuição da variabilidade genética sugere que a região do Caribe, o Norte e o Sul da Amazônia poderiam ser considerados unidades independentes, o que tem importância na discussão e desenho de futuros programas de controle desta praga na região.

Genetic Structure and Demographic History of New World Screwworm Across Its Current Geographic Range

PABLO FRESIA,^{1,2,3} MARIANA L. LYRA,^{1,2} ALFREDO CORONADO,⁴
AND ANA MARIA L. DE AZEREDO-ESPIN^{†1,5}

J. Med. Entomol. 48(2): 280–290 (2011); DOI: 10.1603/ME10153

ABSTRACT The phylogeographical history of the pest fly screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), was studied using partial mitochondrial DNA sequences of the control region, *Cytochrome c oxidase* (CO) subunit I and CO subunit II from 361 individuals collected across its current geographic range. Analyses showed marked genetic differentiation on a macrogeographic scale. The genetic diversity in the species is structured into four main “regional groups,” corresponding to Cuba, the Dominican Republic, and the North and South Amazon region. Results indicated that the distribution of screwworm genetic diversity was mainly shaped by historical events, i.e., colonization of Caribbean islands, vicariance in the Amazon region and population expansion. Demographic history analyses revealed that the population expansion started ≈ 20 –25,000 yr ago and recently increased exponentially. We hypothesized that the initial period of expansion was probably associated with environmental amelioration in the late Pleistocene and the exponential increase with resource availability in recent times. The population expansion is probably responsible for the low divergence and the lack of genetic and geographic correlation in the South Amazon region but did not erase the genetic structure pattern on a continental scale. The screwworm is one of the most damaging livestock pests in South and Central America, and the pattern of genetic variability distribution reported here suggests that the Caribbean area and the North and South Amazon regions could be considered as independent units for future pest control programs.

KEY WORDS *Cochliomyia hominivorax*, mitochondrial DNA, phylogeography, livestock pest, target management units

The increasing demand for protein by the growing human population makes animal production a high priority in world agriculture (Delgado et al. 1999, Vargas-Terán et al. 2005). To satisfy this demand, mechanisms that increase production efficiencies must be found, to prevent further deterioration of the environment (FAO 2000). Part of the productivity efficiency increase can be carried out through improvements in animal health (Vargas-Terán et al. 2005), by controlling ectoparasites that cause severe losses to livestock systems and that are considered a major limiting factor in production.

The screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), is one of the most damaging pests for livestock production, causing damage to leather and a decline in meat and milk production (Hall and Wall 1995, IAEA/

FAO 2000, Vargas-Terán et al. 2005, Robinson et al. 2009). In its larval stages, this myiasis-causing fly is an obligate ectoparasite of a wide range of warm-blooded hosts, ranging from wildlife to humans. Gravid female flies are attracted to wounds, where they lay their eggs. Emerging larvae invade and feed on the living tissues, possibly leading to host mortality unless adequate treatment is provided. When they reach maturity, larvae fall to the ground, where they burrow to pupate, and the adults emerge in few days (Guimarães et al. 1983, IAEA/FAO 2000).

Formerly, the geographic distribution of the screwworm was throughout the southern United States to central Argentina, including some Caribbean islands; however the species has been eradicated from North America and continental Central America by using an areawide integrated pest management approach (AW-IPM) based on the sterile insect technique (Klassen and Curtis 2005). Since 2001, sterile screwworm adults are being released in the Darien Gap, Panama, in an effort to protect the pest-free areas from reinfestation from South America (Robinson et al. 2009).

The screwworm is still a great problem for livestock production in South America and Caribbean, and the only current control strategy is strongly based on in-

¹ Laboratório de Genética e Evolução Animal-Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética and Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-875, Campinas, São Paulo, Brazil.

² These authors contributed equally to this work.

³ Corresponding author, e-mail: pfresia@unicamp.br.

⁴ Area de Parasitología Veterinaria, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto, Lara, Venezuela.

⁵ Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-875, Campinas, São Paulo, Brazil.

secticide use (except for Jamaica; Vargas-Terán et al. 2005). This type of control is independently applied by breeders, in accordance with individual and short-term necessity, without any coordinated program. The wide range of insecticides used to control pests can cause problems, such as environmental contamination (see Porretta et al. 2007) and the selection of insecticide resistant strains (Cassida and Gary 1998, Hemingway and Ranson 2000). In the screwworm, Carvalho et al. (2009) and Silva and Azeredo-Espin (2009) found mutations that are correlated with insecticide resistance. Thus, the necessity to reduce the use of chemicals and adopt control programs with enhanced specificity for the target species, on the appropriate geographic scale, has been highlighted as a more suitable alternative (Kongan 1998, Porretta et al. 2007).

Identification of regions with isolated populations, or groups of populations connected by current gene flow, is of utmost importance to the design of effective control programs for insect pests (Krafsur 2005, Porretta et al. 2007). These "target management units" identification requires a clear understanding of the species' spatial dynamics, specifically the migration patterns and dispersion abilities (i.e., population structure). However, this information is often difficult to obtain for species by using classical direct methods based on mark recapture trials (Roderick 1996). As such, the importance of the use of genetic markers and the study of the levels and patterns of genetic diversity in insect vectors and pests is growing (David et al. 2003, Conn and Mirabello 2007, Porretta et al. 2007).

Contemporary population structure is determined by both dispersal ability and demographic history, for this reason historical demography of a species should be taken into account when interpreting its breeding structure and gene flow among demes (Bossart and Prowell 1998). Phylogeography has been providing considerable information about the historical processes responsible for current geographic distribution of genetic diversity (Avice et al. 1987, reviewed in Avice 2009). The most widely used genetic marker for phylogeographic studies has so far been mitochondrial DNA (mtDNA), because it allows the chance of recovering the pattern and tempo of historical events (Avice 2009).

Various studies have recently attempted to assess the structure of screwworm populations by using molecular markers (Roehrdanz 1989, Taylor et al. 1996, Lyra et al. 2005, Torres et al. 2007, Lyra et al. 2009, Torres and Azeredo-Espin 2009). These studies have provided valuable insights into the population genetics of screwworm, showing that the species has both structured and undifferentiated populations throughout its current range. Such studies, however, have led to few insights about the historical and current processes that influence the distribution of screwworm genetic diversity.

The present work was aimed at unraveling the phylogeographical history of screwworm by using mtDNA markers. The objectives were 1) to explore the genetic population structure of screwworm in its current geographic range and 2) to investigate historical demo-

graphic events that might have influenced the current spatial distribution of genetic variability.

Materials and Methods

Sampling and DNA Protocols. Larvae of screwworm were collected from 38 geographic sites from South America and the Caribbean (Table 1; Fig. 1), encompassing almost all of the species' current range. Four to 18 individuals were sampled per location, following procedures described in Lyra et al. (2009). Thirty-four sites included in this study were previously analyzed using a polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism-based approach by Lyra et al. (2009).

Total DNA was extracted by the phenol:chloroform method, adapted for microcentrifuge tubes (Lyra et al. 2009), and resuspended in 100 μ l of TE buffer and stored at -20°C . Three mitochondrial DNA fragments, corresponding to the B domain of the control region (CR) (Lessinger and Azeredo-Espin 2000) and partial sequences of the genes *cytochrome c oxidase* subunit I (COI) and subunit II (COII) were amplified by PCR and sequenced from 361 individuals. The CR fragment was amplified using the primers CRc-N-BVII-R (Duarte et al. 2008) and SR-J-14875 (5'-AAGTCACACAAAATTAC-3'; this work); the COI fragment was amplified with primers TW-J1287 (Lyra et al. 2009) and C1-N2320 (5'AATCCTAATAATC-CAATAGC-3'; this work); and COII was amplified with primers TL2-J3034 and TK-N3785 (Simon et al. 1994). The PCRs were conducted separately and the PCR cocktails contained 1 μ l of extracted DNA, 10 \times PCR buffer, 1.0 mM MgCl_2 , 10 μ g of bovine serum albumin, 0.2 μ M of each dNTPs, 0.4 μ M of each primer, and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Fermentas International Inc., Burlington, ON, Canada) in a total volume of 25 μ l. The cycling conditions for all reactions consisted of an initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 60°C for 1:30 s, plus a final extension at 60°C for 7 min. PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit, according to the supplier's protocol (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Sequencing reactions were conducted with the ABI BigDye Terminator cycle sequencing kit version 3.1 and run on an ABI 3700 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Sequence Analysis. The COI fragments were sequenced bidirectionally and sequences were assembled into a contig for each individual by using CAP3 software (Huang and Madan 1999), considering *Phred* values (Ewing and Green 1998, Ewing et al. 1998). CR and COII fragments had one strand sequenced. All sequences were aligned for each of the three fragments by using the automatic multiple sequences alignment algorithm implemented in ClustalX (Thompson et al. 1997). Protein coding sequences (COI and COII) were checked for open reading frames in MEGA software version 4.0 (Tamura et al. 2007). For the CR fragment, each insertion/deletion (indel) was considered as a single mutational step, and

Table 1. Screwworm sampled sites, haplotype distribution, and genetic variability indices

	ID	Geographic location	Latitude	Longitude	N	Nhp	Haplotype (no. individuals)	\hat{H}	π	Group
CB	CPR	Pinar del Río	22° 25' N	83° 41' W	6	3	95(1) 196(1) 204(4)	0.600	0.0040	CG
	CCA	Ciego de Ávila	21° 50' N	78° 46' W	15	7	195(1) 201(1) 202(2) 207(1) 210(1) 211(7) 214(2)	0.781	0.0024	CG
	CLT	Las Tunas	21° 04' N	77° 05' W	6	5	91(1) 92(1) 202(2) 209(1) 213(1)	0.933	0.0075	CG
	CSC	Santiago de Cuba	20° 01' N	75° 49' W	9	7	202(1) 203(1) 205(1) 206(2) 208(1) 212(1) 214(2)	0.944	0.0029	CG
DR	CCR	Ciro Redondo	21° 53' N	82° 54' W	10	4	197(1) 198(7) 199(1) 200(1)	0.533	0.0010	CG
	DRP	Santo Domingo	18° 28' N	59° 53' W	13	7	7(1) 18(1) 45(1) 46(1) 47(1) 48(6) 109(2)	0.795	0.0016	DRG
JM TT	JAM	Kingston	17° 59' N	76° 47' W	9	6	32(1) 33(1) 35(1) 38(2) 54(1) 61(3)	0.889	0.0022	NAG
	TPE	Puerto España	10° 40' N	61° 28' W	5	4	17(1) 40(1) 153(1) 173(2)	0.900	0.0035	NAG
VE	TSF	San Fernando	10° 16' N	61° 27' W	6	4	17(2) 89(1) 90(1) 153(2)	0.867	0.0045	NAG
	VBA	Barquisimeto	10° 03' N	69° 19' W	10	6	28(1) 36(1) 84(1) 89(3) 106(2) 174(2)	0.889	0.0046	NAG
	VEN	Encontrados	09° 03' N	72° 14' W	11	10	26(1) 38(2) 58(1) 87(1) 94(1) 102(1) 106(1) 156(1) 157(1) 158(1)	0.982	0.0048	NAG
CO EC BR	COT	Turbo	08° 05' N	76° 43' W	12	6	34(2) 37(1) 39(2) 54(5) 89(1) 93(1)	0.818	0.0038	NAG
	ERV	Río Verde	02° 19' S	80° 42' W	4	3	44(1) 58(1) 60(2)	0.833	0.0012	NAG
BR	BTO	Touros	05° 17' S	35° 33' W	10	7	53(1) 64(2) 78(1) 140(3) 159(1) 166(1) 175(1)	0.933	0.0045	SAG
	BSM	Sta. Ma. das Barreiras	08° 52' S	49° 42' W	11	11	3(1) 4(1) 13(1) 50(1) 62(1) 121(1) 124(1) 132(1) 140(1) 163(1) 175(1)	1.000	0.0040	SAG
BR	BCO	Cocalinhos	14° 22' S	51° 00' W	6	6	10(1) 11(1) 29(1) 57(1) 69(1) 168(1)	1.000	0.0037	SAG
	BGN	Goianira	16° 32' S	49° 22' W	8	8	43(1) 59(1) 66(1) 80(1) 96(1) 131(1) 134(1) 165(1)	1.000	0.0051	SAG
BR	BGO	Goiânia	16° 43' S	49° 15' W	9	8	1(2) 73(1) 88(1) 107(1) 111(1) 164(1) 185(1) 191(1)	0.972	0.0039	SAG
	BCA	Caiapônia	16° 57' S	51° 48' W	18	11	1(1) 8(1) 19(2) 24(1) 51(2) 140(6) 145(1) 150(1) 155(1) 169(1) 183(1)	0.882	0.0031	SAG
BR	BCR	Costa Rica City	18° 32' S	53° 07' W	7	6	30(1) 120(1) 125(1) 140(1) 143(2) 146(1)	0.952	0.0022	SAG
	BAQ	Aquidauana	19° 35' S	56° 05' W	6	5	112(2) 140(1) 141(1) 142(1) 189(1)	0.933	0.0043	SAG
BR	BCG	Campo Grande	20° 27' S	54° 36' W	10	6	76(1) 129(1) 140(5) 160(1) 172(1) 184(1)	0.778	0.0036	SAG
	BSS	São Seb. Paraíso	20° 55' S	46° 59' W	7	5	41(2) 118(1) 140(2) 187(1) 190(1)	0.905	0.0040	SAG
BR	BES	Estiva	22° 27' S	46° 01' W	18	12	15(1) 50(3) 56(1) 77(1) 103(1) 110(1) 123(1) 133(1) 140(3) 184(1) 187(3) 192(1)	0.954	0.0039	SAG
	BCP	Campinas	22° 48' S	47° 03' W	11	11	20(1) 55(1) 70(1) 116(1) 117(1) 126(1) 127(1) 135(1) 149(1) 151(1) 181(1)	1.000	0.0043	SAG
BR	BCI	Carambé	24° 55' S	50° 05' W	13	9	51(1) 123(1) 130(1) 140(4) 147(1) 154(1) 169(1) 187(2) 193(1)	0.949	0.0037	SAG
	BFV	Fagundes Varela	28° 52' S	51° 41' W	5	5	14(1) 23(1) 78(1) 82(1) 145(1)	1.000	0.0045	SAG
BR	BSA	Sto. Ant. Missões	29° 04' S	56° 19' W	10	10	21(1) 65(1) 67(1) 83(1) 115(1) 140(1) 170(1) 171(1) 178(1) 187(1)	1.000	0.0052	SAG
	BPM	Pinheiro Machado	31° 34' S	53° 23' W	9	9	2(1) 67(1) 78(1) 85(1) 100(1) 122(1) 139(1) 186(1) 188(1)	1.000	0.0052	SAG
PY	PYB	Ybytymi	25° 46' S	56° 41' W	17	14	9(1) 43(1) 49(1) 63(1) 78(2) 137(1) 140(3) 147(1) 148(1) 167(1) 169(1) 176(1) 188(1) 194(1)	0.971	0.0050	SAG
	UY	UPM	Paso Muñoz	31° 27' S	56° 23' W	7	4	75(2) 78(1) 99(1) 140(3)	0.810	0.0033
UY	UST	San Antonio	31° 24' S	57° 58' W	8	6	42(2) 50(1) 67(1) 81(1) 114(1) 140(2)	0.929	0.0036	SAG
	UDA	Daymán	31° 33' S	57° 57' W	9	9	79(1) 101(1) 104(1) 105(1) 119(1) 140(1) 144(1) 152(1) 169(1)	1.000	0.0043	SAG
UY	UBM	Bañ. Medina	32° 23' S	54° 21' W	12	9	12(1) 25(1) 31(1) 74(1) 78(2) 86(1) 111(1) 140(3) 176(1)	0.939	0.0051	SAG
	UCC	Cer. Colorado	33° 52' S	55° 33' W	16	14	2(2) 27(2) 43(1) 97(1) 98(1) 108(1) 113(1) 136(1) 138(1) 140(1) 161(1) 162(1) 177(1) 180(1)	0.983	0.0057	SAG
UY	UCO	Colonia	34° 28' S	57° 51' W	7	7	1(1) 16(1) 22(1) 140(1) 159(1) 179(1) 182(1)	1.000	0.0053	SAG
	UJS	Juaquín Suarez	34° 44' S	56° 02' W	6	6	5(1) 6(1) 71(1) 72(1) 121(1) 128(1)	1.000	0.0051	SAG
AR	APL	Lezama	35° 52' S	57° 53' W	5	4	52(1) 68(2) 78(1) 140(1)	0.900	0.0038	SAG
Total					361		214 haplotypes	0.909	0.0039	

ID, site identification code; N, number of individuals analyzed; Nhp, number of haplotypes found in each locality; \hat{H} , haplotype diversity; π , nucleotide diversity and geographic groups (CG, Cuban group; DRG, Dominican Republic group; NAG, North Amazon group; SAG, South Amazon Group). CB, Cuba; DR, Dominican Republic; JM, Jamaica; TT, Trinidad & Tobago; VE, Venezuela; CO, Colombia; EC, Ecuador; BR, Brazil; PY, Paraguay; UY, Uruguay; AY, Argentina.

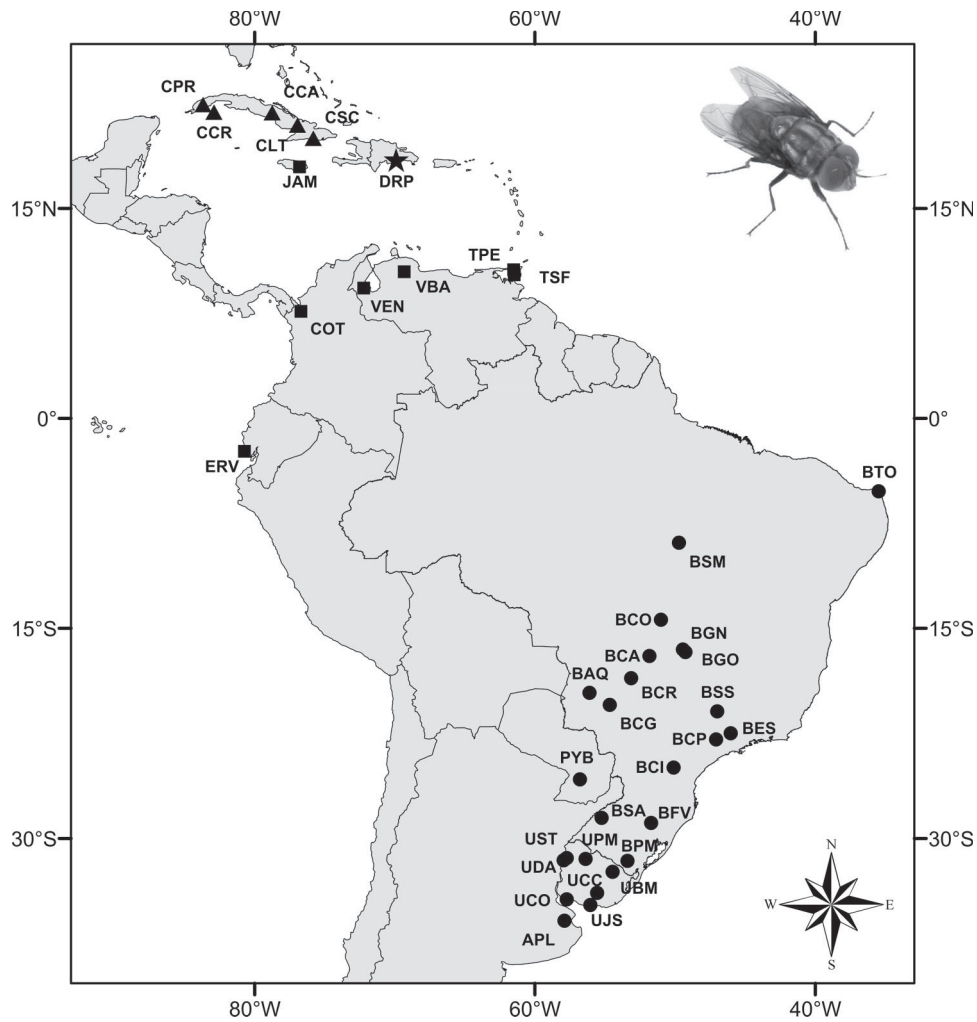


Fig. 1. Geographical distribution of screwworm fly sampled. Each site belongs to one of the four regional groups, according to results (see Table 1 for population ID). Triangles, CG; star, DRG; squares, NAG; and circles, SAG.

all indels were recoded as single positions in the final alignment.

The three different sequence data sets were first analyzed separately then combined. Individual sequences were collapsed in haplotypes for all data sets. Haplotype frequencies, nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (\hat{H}), as defined by Nei (1987), were estimated using Arlequin version 3.1 (Excoffier et al. 2005).

Phylogeographic Analyses. Genetic differentiation among populations was determined using pairwise F_{ST} statistics (Reynolds et al. 1983, Slatkin 1995). Statistical significance was assessed by 10,000 permutations. Based on haplotype distribution and pairwise F_{ST} a priori population groupings were constructed and tested by hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992). The partition that maximized the among-group variance component was considered the best-fit divergence scenario. Nonhierarchical AMOVA also was conducted within groups of

populations to explore group heterogeneity. The AMOVAs, as well as pairwise F_{ST} , were conducted using Arlequin version 3.1 (Excoffier et al. 2005).

Partial Mantel tests (Smouse et al. 1986, Sokal et al. 1997) were used to partition the contemporary (isolation by distance [IBD]) and historical effects of the divergence between groups of populations from South America. This procedure was carried out using a third matrix that included a categorical variable, in which the value one indicates that populations belong to the same group and 0 elsewhere, in addition to the genetic distance matrix (Slatkin's linearized F_{ST} s, Slatkin 1995) and geographic distance matrix (linear distance between two localities in kilometers). Partial Mantel tests were conducted in Arlequin version 3.1 (Excoffier et al. 2005).

A haplotype network was inferred for concatenated sequences by using TCS version 1.21 (Clement et al. 2000). Statistical parsimony analysis was used to establish the links among pairs of haplotypes by the

Table 2. Continued

BCA	BCR	BAQ	BCG	BSS	BES	BCP	BCI	BFV	BSA	BPM	PYB	UPM	UST	UDA	UBM	UCC	UCO	UJS	APL
0.00																			
0.05	0.00																		
0.01	0.10	0.00																	
-0.04	0.03	-0.02	0.00																
0.17	0.29	0.02	0.11	0.00															
0.08	0.22	-0.01	0.06	0.01	0.00														
-0.01	0.04	0.01	-0.03	0.11	0.06	0.00													
-0.03	0.07	-0.03	-0.03	0.04	0.02	0.00	0.00												
0.07	0.25	-0.02	0.00	0.05	-0.01	0.02	0.05	0.00											
0.08	0.20	0.03	0.07	0.13	0.05	0.06	0.06	-0.01	0.00										
0.21	0.33	0.05	0.16	0.01	0.01	0.16	0.11	0.00	0.07	0.00									
0.05	0.17	0.00	0.04	0.08	-0.01	0.04	0.03	-0.04	-0.01	0.02	0.00								
0.07	0.25	0.01	0.00	0.15	0.02	0.04	0.07	-0.11	0.02	0.07	-0.03	0.00							
-0.02	0.04	0.03	-0.03	0.20	0.10	-0.02	0.02	0.09	0.04	0.20	0.04	0.06	0.00						
0.00	0.09	0.02	0.01	0.18	0.07	0.01	0.02	0.05	0.02	0.16	0.00	0.03	-0.03	0.00					
0.09	0.21	0.01	0.04	0.11	0.01	0.06	0.08	-0.08	0.02	0.03	-0.04	-0.08	0.07	0.03	0.00				
0.12	0.22	0.01	0.08	0.04	0.00	0.08	0.07	-0.05	0.05	-0.03	-0.01	-0.02	0.11	0.09	-0.02	0.00			
0.04	0.18	-0.05	0.02	-0.03	-0.05	0.02	-0.03	-0.05	0.00	-0.02	-0.04	0.02	0.06	0.03	0.00	-0.03	0.00		
0.13	0.26	0.05	0.06	0.17	0.09	0.08	0.13	-0.07	0.06	0.09	0.03	-0.06	0.11	0.07	-0.02	0.02	0.04	0.00	
0.24	0.40	0.15	0.16	0.26	0.12	0.16	0.23	-0.05	0.08	0.10	0.03	-0.05	0.19	0.12	-0.05	0.03	0.11	-0.03	0.00

mtDNA fragment from 361 screwworm individuals (Table 1). The mean genetic distance among concatenated haplotypes was 0.0057 (range, 0–0.0148).

Nucleotide diversity (π) and haplotype diversity (\hat{H}) estimated from the concatenated mtDNA fragments are shown in Table 1. In general, low nucleotide diversity (π -mean = 0.39%, range, 0.1–0.75%) and high haplotype diversity (\hat{H} -mean = 0.90; range, 0.53–1.0) was observed for the locations analyzed. Lowest diversity indices were found for the location of *Ciro Redondo-CCR* in Cuba (π_{CCR} = 0.001, \hat{H}_{CCR} = 0.533).

Approximately 77% (165/214) of the haplotypes were rare (single individuals). Just 27 haplotypes (12.6%) occurred in more than one sampling location and the other 22 (10.4%) were site private (Table 1). Haplotype mapping (data not shown) illustrated four “regional groups,” corresponding to samples from 1) Cuba (Cuban group [CG]), 2) the Dominican Republic (Dominican Republic group [DRG]), 3) Jamaica, Trinidad & Tobago, Colombia, Ecuador, and Venezuela (North Amazon group [NAG]), and 5) south of the Amazon region (South Amazon group [SAG]) (Fig. 1). No haplotype was shared between groups. The haplotype composition of each sampling location and group allocation are given in Table 1.

Phylogeographic Analyses. The pairwise F_{ST} estimated for the 38 sampled locations of screwworm are

shown in Table 2. Comparisons among the Cuban or the Dominican Republic sites, with all other sites showed significant and the highest F_{ST} values. Most comparisons among locations from the South and the North of the Amazon region were also significant (150/175 pairwise comparisons). In concordance with haplotype distribution, the same four “regional groups” (CG, DRG, NAG, and SAG; Table 2) were identified. In the CG group, most of the comparisons had significant values (6/10), largely due to the sample from *Ciro Redondo*, which was significantly different to all other sites (Table 2). Most comparisons at the intra-group level for NAG and SAG were nonsignificant (12/20 and 234/276, respectively), but some differentiations were observed.

Hierarchical AMOVA tests for the four group scenario were statistically significant and attributed 45.3% of the total variance to among group comparison, 4.3% of the variance to within group, and 50.4% to the within sampling locations comparison. Results revealed that screwworm has genetic structure (AMOVA: Φ_{ST} = 0.496, P < 0.001) over the current geographic distribution. Nonhierarchical AMOVA within groups revealed a different degree of intra-group variation, where 4.8% in SAG, 14.9% in NAG, and 18.7% in CG total variance was attributed to among sampling locations comparisons.

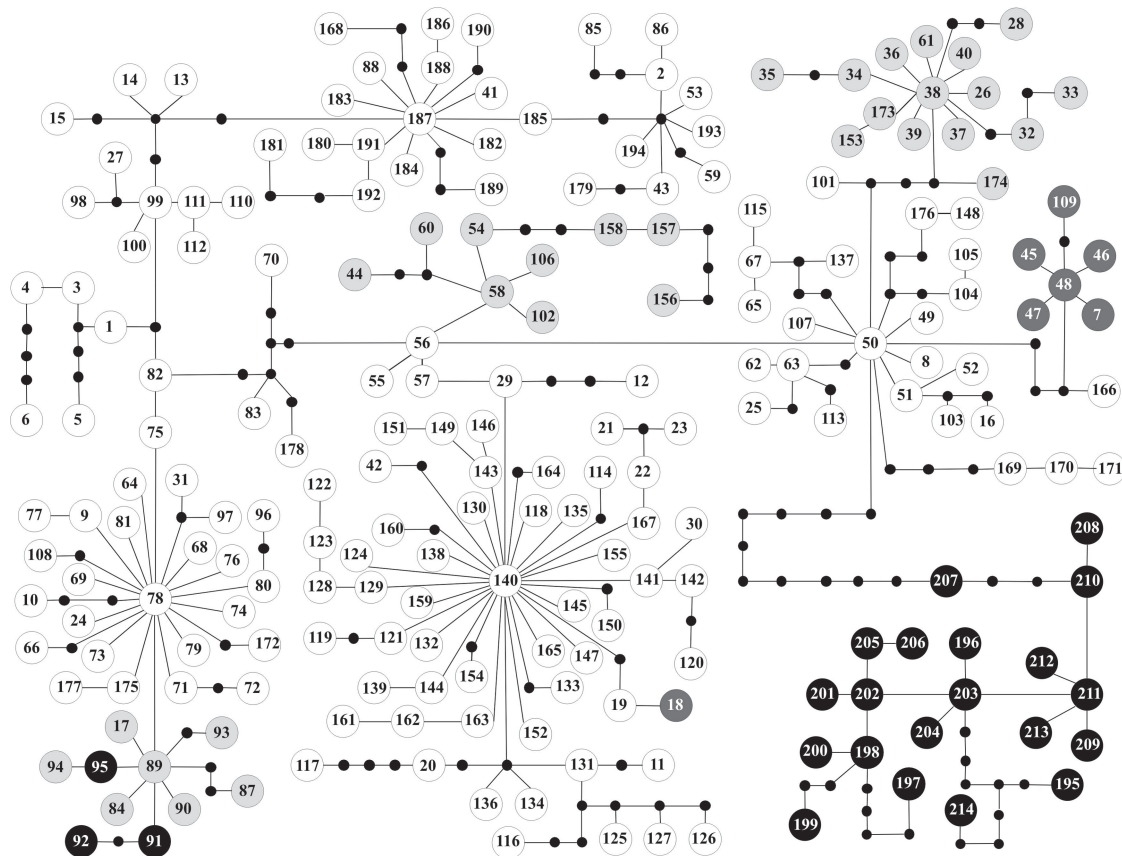


Fig. 2. Haplotype network of CR/COI/COII concatenated sequence data. In black, haplotypes from CG; in dark gray, haplotypes from DRG; in gray, haplotypes from NAG; and in white, haplotypes from SAG. Lines between haplotypes represent one mutational step. Dots along lines are presumptive intermediate haplotypes that were not observed.

The partial Mantel test for the South American locations (NAG plus SAG) showed that genetic variance was not correlated with geographic distance ($r = -0.07$, $P = 0.9$) but rather with the grouping of the sampling locations ($r = 0.46$, $P < 0.001$). Therefore, in total 38% of variance found in the genetic matrix was due to the presence of barriers rather than IBD.

The 214 concatenated mtDNA haplotypes were linked in a unique parsimony network (Fig. 2). The general topology of the network showed one clade containing almost all haplotypes from CG (20/23), separated by 11 steps from a group that contained haplotypes from NAG, SAG, and DRG and the three remaining haplotypes from CG (Fig. 2). Haplotypes from NAG and DRG are located in the outer arms of this group. The majority of haplotypes were tip alleles and geographically restricted (Fig. 2) and would be considered to be more recently derived (Crandall and Templeton 1993, Castellote and Templeton 1994). Common haplotypes (haplotypes that appear in at least five individuals) were always interior haplotypes (Table 1; Fig. 2) and are most likely to be ancestral (Castellote and Templeton 1994).

For the first and second codon positions of the COI and COII sequences, in total 22 haplotypes were found

that linked in a star-like network (Fig. 3). Haplotype h1, was the hub of this network, was the most frequent (286/361 individuals) and was present in all sampling locations, except in DRG. In this haplotype (h1), the

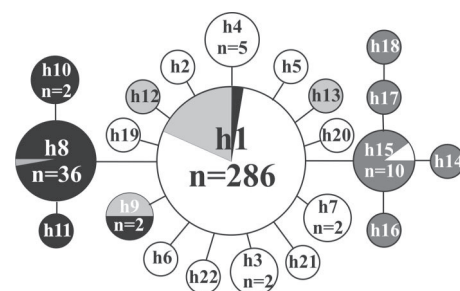


Fig. 3. Haplotype network for the first and second codon position of COI/COII concatenated sequences. The haplotypes are represented by circles, and n within circles indicates the number of individuals per haplotype. Circles without n represent haplotypes found in one individual. Lines between haplotypes represent one mutational step. The colored sectors represent the proportion of individuals with the haplotype in the respective regional groups (black, CG; dark gray, DRG; gray, NAG; and white, SAG).

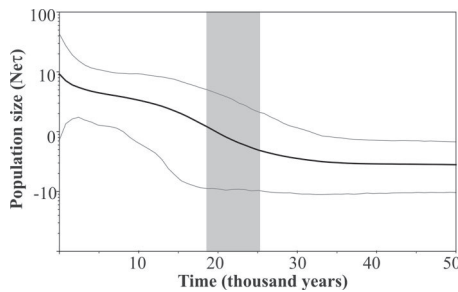


Fig. 4. Bayesian skyline plot by using COI sequences of the screwworm. The x-axis is in units of thousand years and the y-axis is equal to relative population size ($N_e\tau$; the product of the effective population size and the generation length in years). The dark solid line is the median estimate, and the gray lines show the 95% highest posterior density limits. Shaded bar corresponds to the Last Glacial Maximum (≈ 18 – $23,000$ yr ago).

most frequent haplotypes of DRG and CG are linked, the Jamaican private haplotypes (h12 and h13) and the low frequency mainland haplotypes. Haplotype h8 was present in 36 individuals, 35 from Cuban locations and one from Rio Verde (Ecuador). Haplotype h15 was present in 10 individuals, nine from Santo Domingo (Dominican Republic), and one from Cerro Colorado (Uruguay). The remaining haplotypes are found at low frequencies among the sampling locations.

The demographic history of screwworm samples was estimated using a BSP, and the results suggest a population expansion for this species that started ≈ 20 – $25,000$ yr ago and exponentially increased recently (Fig. 4). The star-like topology of both haplotype networks also suggests population expansion for the screwworm. Bayesian Skyline Plots, obtained for the COII and CR sequences, were concordant with COI results and diagrams were very similar in shape, indicating the same two periods of population expansion (data not shown). When a 2% molecular clock rate was applied to COII sequences, the time of demographic expansion was also similar.

Discussion

The range-wide phylogeographical structure of the screwworm is characterized by island colonization, geographic isolation, and population expansion. Results of the pairwise F_{ST} , hierarchical AMOVA, and haplotype distribution showed that screwworm is structured over its current geographical distribution. The general distribution pattern of genetic variability was characterized by the presence of four “regional groups,” a Cuban group (CG), a Dominican Republic group (DRG), a North of Amazon region group (NAG), and a South of Amazon region group (SAG). The divergence between screwworm locations from the North and South Amazon region (NAG and SAG) are reported here for the first time.

The Caribbean (CG and DRG) was the major area of divergence between populations of screwworm.

Our results are in accordance with previous studies of screwworm based on mtDNA PCR-restriction fragment length polymorphism markers and microsatellites (Lyra et al. 2009, Torres and Azeredo-Espin 2009), supporting the hypothesis that the Caribbean Sea is a geographic barrier that limits gene flow in this species. Although, from the data presented here, three haplotypes from Cuba and one from the Dominican Republic were genetically distant from the frequent haplotypes of the same sampling location, the presence of these haplotypes in these locations was interpreted as anthropogenic migration rather than natural migration. Molina-Cruz et al. (2004) suggested that Caribbean Sea also represents a partial barrier to gene flow in the mosquito *Anopheles albimanus* Wiedemann. Examples of large bodies of water (including seas) acting as geographic barriers to shape the population structure of a terrestrial species were also found for the bumblebee *Bombus terrestris* (L.) between the European continent and some Mediterranean islands (Estoup et al. 1996) and for the flies *Ceratitis rosa* Karsch and *Ceratitis fasciventris* (Bezzi) in Africa (Baliraine et al. 2004).

The site of Ciro Redondo (Isla de la Juventud), in CG, does not share haplotypes with Cuba Island and significant pairwise F_{ST} values were observed between it and other Cuban sites. These results further support the hypothesis that the Caribbean Sea is a geographic barrier to gene flow in the screwworm. As Ciro Redondo showed the lowest variability indices, we suppose that this could be a result of the effective suppression program in the Isla de la Juventud (Garcia et al. 2007) that occurred just before collecting the samples analyzed here. The suppression may have induced a population bottleneck that explains the low variability found.

The tip positions of most haplotypes from Caribbean locations in both networks, CR/COI/COII (Fig. 2) and COI/COII (Fig. 3), suggest colonization of islands from mainland. The deep divergence (11 mutational steps) observed between the Cuban haplotypes and all others in the CR/COI/COII network indicates different colonization histories for the Caribbean region. The haplotype distance and high pairwise F_{ST} values (Fig. 2; Table 2) among Cuban and the remaining Caribbean sites suggest a North American colonization, Central American colonization, or both of Cuba, in contrast to the other Caribbean populations that were colonized from South America. Unfortunately, the colonization of Cuba is now difficult to test because screwworm has been eradicated from North and Central America. Yet, analyzing strains from North, Central America and Jamaica, Roehrdanz (1989) found the highest pairwise genetic distance between the Jamaican strain and the others. In concordance, Taylor et al. (1996) found that the screwworm strains of South American, Jamaican, and Trinidad & Tobago were closely related, whereas Cuban samples were more similar to Costa Rican strains. This phylogeographic break between Central and South America is consistent with studies of other Neotropical taxa, such as a mosquito (Mirabello and Conn

2006), Neotropical butterflies (Brower 1994), toads (Slade and Moritz 1998), bats (Hoffmann and Baker 2003), and even a tropical rain forest tree (Dick et al. 2003).

In South America, the two “regional groups” of screwworm populations (NAG and SAG) do not share haplotypes. However, the low genetic divergence found among the haplotypes and non significant differentiation among some SAG and NAG populations suggest that these “regional groups” were recently separated. The partial Mantel test indicated that historical effects explain this genetic divergence, suggesting the presence of a barrier that limits current gene flow. The Amazon rain forest represents this putative geographic barrier. Because the screwworm inhabits the interface between savannah and forest borders (Thomas 1993, Phillips et al. 2004, Garcia et al. 2007), processes involved in this forest fragmentation and recover (Clapperton 1993, Haffer and Prance 2001) might be responsible for the observed geographic structure of screwworm populations.

The among populations variance found in NAG is mainly correlated with the inclusion of Jamaica and Trinidad & Tobago in this group. Kingston (Jamaica) and San Fernando (Trinidad & Tobago) present the majority of the significant pairwise F_{ST} values, within the group, but share common haplotypes with the mainland. The location of Puerto España (Trinidad & Tobago) does not share haplotypes with mainland localities. The observed pattern seems to be the effect of the Caribbean Sea acting as a barrier and similarities are probably due to the maintenance of ancestral haplotypes (incomplete lineage sorting), anthropogenic migration, or both, instead of current gene flow.

Low population differentiation, with no geographic pattern, was detected at the intragroup level for SAG, despite the large area studied. Although this result could be interpreted as extent gene flow among demes, the demographic analysis presented here shows significant population expansion in screwworm. This historical demographic process (i.e., population expansion) is probably responsible for the low genetic divergence and the lack of geographical association of mitochondrial haplotypes at the intragroup level, instead of current gene flow. In fact, low but significant differentiation among Uruguayan populations was reported previously by using microsatellites markers (Torres et al. 2007).

The population expansion detected in the BSP started ≈ 20 – $25,000$ yr ago. The first period of expansion seems to be related to the climatic oscillations that occurred in the late Pleistocene, which could have permitted the screwworm range and demographic expansion. The exponential period of demographic expansion detected using BSP may be closely associated with the availability of resources. Livestock introduction to the Americas, ≈ 500 yr ago, may have contributed to screwworm population expansion by increasing resource availability. This resource availability should be more evident in the central and southern areas of South America, because these regions are the most important areas of livestock breeding on the

continent (GLiPHA 2010). Livestock introduction also could have influenced species migration by natural and anthropogenic host movement, confounding the current geographic structure of the screwworm. The identification of screwworm strains in Libya at the end of the 1980s (Vargas-Terán et al. 1994) is an example of anthropogenic migration.

The characterization of the spatial genetic structure and connectivity among populations, using molecular markers, can help in the design of a screwworm control program. Data presented here show that the Caribbean islands should be considered as isolated management units in control efforts. This finding is in accordance with previous population genetic studies (Lyra et al. 2009, Torres and Azeredo-Espin, 2009). The current study is the first report of isolation between the North and South Amazon region. Although results show that these regions could be managed independently in AW-IPM programs, target management units still need to be found within each of these large geographic groups.

The mitochondrial molecular markers properly characterize the population genetic structure and the historical demography of the screwworm on a continental scale. However, the population expansion detected here suggests that similarities among populations are probably due to this historical event, rather than current gene flow among demes preventing local differentiation.

This result points out the necessity of understanding population structure and demographic dynamics on a finer spatial scale. The genetic diversity distribution pattern of screwworm reported here represents a critical step toward the management unit identification of this pest and is necessary for a more effective and preventive pest management strategy for the Caribbean and South America.

Acknowledgments

We thank Rosangela A. Rodrigues, Alessandra Staffocker, and Maria Salette Couto for technical and laboratory assistance. We are also grateful to René Garcia for providing samples from the Caribbean islands, Colombia, and Ecuador and to FAO/IAEA (Division of Vienna) for helping with the sample collection. We thank Jessica Morgan and two anonymous reviewers for helpful comments and improvements on an earlier version of this manuscript. P.F. was supported by a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). M.L.L. was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant 03/13598-0). This work was supported by grants from FAO/IAEA (11822/RO) and FAPESP.

References Cited

- Avise, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.* 36: 3–15.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, Jr., E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reed, and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489–522.

- Baliraine, F. N., M. Bonizzoni, C. R. Guglielmino, E. O. Osir, S. A. Lux, F. J. Mulaa, L. M. Gomulski, L. Zheng, S. Quilici, G. Gasperi, et al. 2004. Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitits rosa* and *Ceratitits fasciventris* (Diptera: Tephritidae). *Mol. Ecol.* 13: 683–695.
- Bossart, J. L., and D. P. Prowell. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends Ecol. Evol.* 13: 202–206.
- Brower, A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6491–6495.
- Carvalho, R. A., T. T. Torres, M. G. Paniago, M. G., and A.M.L. Azeredo-Espin. 2009. Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med. Vet. Entomol.* 23: 86–91.
- Cassida, J. E., and B. Q. Gary. 1998. Golden age of insecticide research: past, present and future. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 1–16.
- Castelloe, J., and A. R. Templeton. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Mol. Phylogenet. Evol.* 3: 102–113.
- Clapperton, C. M. 1993. Nature of environmental change in South America at the Last Glacial Maximum. *Palaeogeogr. Palaeoclim. Palaeoecol.* 101: 189–208.
- Clement, M., D. Posada, and K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657–1660.
- Conn, J. E., and L. Mirabello. 2007. The biogeography and population genetics of Neotropical vector species. *Heredity* 99: 245–256.
- Crandall, K. A., and A. R. Templeton. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959–969.
- David, J. P., K. Huber, A. B. Failloux, D. Rey, and J. C. Meyran. 2003. The role of environment in shaping the genetic diversity of the subalpine mosquito, *Aedes rusticus* (Diptera, Culicidae). *Mol. Ecol.* 12: 1951–1961.
- Delgado, C., M. Rosegrant, H. Steinfeld, C. Ehui, and C. Courbois. 1999. Livestock to 2020: the next food revolution. Food, agriculture, and the environment. Discussion Paper 28, International Food Policy Research Institute, Washington, DC.
- DeSalle, R., T. Freedman, E. M. Prager, and A. C. Wilson. 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 26: 157–164.
- Dick, C. W., K. Abdul-Salim, and E. Bermingham. 2003. Molecular systematics reveals cryptic Tertiary diversification of a widespread tropical rainforest tree. *Am. Nat.* 162: 691–703.
- Drummond, A. J., and A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7: 214.
- Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro, and O. G. Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1185–1192.
- Duarte, G. T., A.M.L. Azeredo-Espin, and A.C.M. Junqueira. 2008. The mitochondrial control region of blowflies (Diptera: Calliphoridae): a hot spot for mitochondrial genome rearrangements. *J. Med. Entomol.* 45: 667–676.
- Estoup, A., M. Solignac, J. M. Cornuet, J. Goudet, and A. Scholl. 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Mol. Ecol.* 5: 19–31.
- Ewing, B., and P. Green. 1998. Phred. Base calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Gen. Res.* 8: 186–194.
- Ewing, B., L. Hillier, M. Wendl, and P. Green. 1998. Base calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Gen. Res.* 8: 175–185.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 1: 47–50.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of United Nations. 2000. The Strategic Framework for FAO 2000–2015. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome, Italy.
- Garcia, R., L. Mendez, E. Serrano, T. Gil Morales, and M.J.B. Vreysen. 2007. Insecticidal wound treatment of livestock on Isla de la Juventud, Cuba: an efficient suppression method of New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* prior to the release of sterile insect, pp. 393–403. In M.J.B. Vreysen, A. S. Robinson and J. Hendrichs (eds.), Area-wide control of insect pests: from research to field implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- [GLiPHA] Global Livestock Production and Health Atlas. 2010. Global livestock production and health atlas. (<http://kids.fao.org/glipha/>).
- Guimarães, J. H., N. Papavero, and A. P. do Prado. 1983. As mífases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1: 239–416.
- Haffer, J., and G. T. Prance. 2001. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana* 16: 579–607.
- Hall, M., and R. Wall. 1995. Myiasis of human and domestic animals. *Adv. Parasitol.* 35: 256–333.
- Hemingway, J., and H. Ranson. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 371–391.
- Hoffmann, F. G., and R. J. Baker. 2003. Comparative phylogeography of short-tailed bats (Carollia: Phyllostomidae). *Mol. Ecol.* 12: 3403–3414.
- Huang, X., and A. Madan. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Gen. Res.* 9: 868–877.
- [IAEA/FAO] International Atomic Energy Agency/Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2000. Genetic sexing and population genetics of screwworms. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- Klassen, W., and C. F. Curtis. 2005. History of the sterile insect technique, pp. 3–36. In V. A. Dyck, J. Hendrichs and A. S. Robinson (eds.), Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Kongan, M. 1998. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 243–270.
- Krafsur, E. S. 2005. Role of population genetics in the sterile insect technique, pp. 389–406. In V. A. Dyck, J. Hendrichs, and A. S. Robinson (eds.), Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Lessinger, A. C., and A.M.L. Azeredo-Espin. 2000. Evolution and structural organization of mitochondrial DNA

- control region of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 14: 71–80.
- Lyra, M. L., P. Fresia, S. Gama, J. Cristina, L. B. Klaczko, and A.M.L. Azeredo-Espin. 2005. Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of new world screw worm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *J. Med. Entomol.* 42: 589–595.
- Lyra, M. L., L. B. Klaczko, and A.M.L. Azeredo-Espin. 2009. Complex pattern of genetic distribution in populations of the New World screw worm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Med. Vet. Entomol.* 23: 32–42.
- Mirabello, L., and J. E. Conn. 2006. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in central and South America. *Heredity* 96: 311–321.
- Molina-Cruz, A., A.M.P. Mérida, K. Mills, F. Rodríguez, C. Schoua, M. M. Yurrita, E. Molina, M. Palmieri, and W. C. Black, IV. 2004. Gene flow among *Anopheles albimanus* populations in Central America, South America, and the Caribbean assessed by microsatellites and mitochondrial DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71: 350–359.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Phillips, P. L., J. B. Welch, and M. Kramer. 2004. Seasonal and spatial and distributions of adult screw worms (Diptera: Calliphoridae) in the Panama Canal area, Republic of Panama. *J. Med. Entomol.* 41: 121–129.
- Porretta, D., D. Canestrelli, R. Bellini, G. Celli, and S. Urbanelli. 2007. Improving insect pest management through population genetic data: a case study of the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Pallas). *J. Appl. Ecol.* 44: 682–691.
- Posada, D., and K. A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Reynolds, J., B. S. Weir, and C. C. Cockerham. 1983. Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767–779.
- Robinson, A. S., M.J.B. Vreysen, J. Hendrichs, and U. Feldmann. 2009. Enabling technologies to improve area-wide integrated pest management programmes for the control of screw worms. *Med. Vet. Entomol.* 23: 1–7.
- Roderick, G. K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 325–352.
- Rochrdanz, R. L. 1989. Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the screw worm fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochem. Genet.* 27: 551–569.
- Silva, N. M., and A.M.L. Azeredo-Espin. 2009. Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World screw worm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genet. Mol. Res.* 8: 1067–1078.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651–701.
- Slade, R., and C. Moritz. 1998. Phylogeography of *Bufo marinus* from its natural and introduced range. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 265: 769–777.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457–462.
- Smouse, P. E., J. C. Long, and R. R. Sokal. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Syst. Zool.* 35: 627–632.
- Sokal, R. R., N. L. Oden, J. Walker, and D. M. Waddle. 1997. Using distance matrices to choose between competing theories and an application to the origin of modern humans. *J. Hum. Evol.* 32: 501–522.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- Taylor, D. B., A. L. Szalanski, and R. D. Peterson, I. I. 1996. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique for identification of screw worms (Diptera: Calliphoridae). *Med. Vet. Entomol.* 10: 63–70.
- Thomas, D. B. 1993. Behavioral aspects of screw worm ecology. *J. Kans. Entomol. Soc.* 66: 13–30.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876–4882.
- Torres, T. T., M. L. Lyra, P. Fresia, and A.M.L. Azeredo-Espin. 2007. Assessing Genetic Variation in the New World Screw worm *Cochliomyia hominivorax* populations from Uruguay, pp. 183–191. *In* M.J.B. Vreysen, A. S. Robinson, and J. Hendrichs (eds.), *Area-wide control of insect pests: from research to field implementation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Torres, T. T., and A.M.L. Azeredo-Espin. 2009. Population structuring in new world screw-worm populations from the Caribbean: insights from microsatellite data. *Med. Vet. Entomol.* 23: 23–31.
- Vargas-Terán, M., B. S. Hursey, and E. P. Cunningham. 1994. Eradication of the screw-worm from Libya using the sterile insect technique. *Parasitol. Today* 10: 119–122.
- Vargas-Terán, M., H. C. Hofmann, and N. E. Tweddle. 2005. Impact of Screw worm eradication programmes using insect sterile technique, pp. 629–650. *In* V. A. Dyck, J. Hendrichs, and A. S. Robinson (eds.), *Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Received 9 June 2010; accepted 25 October 2010.

Artigo 2

Efeitos das oscilações climáticas do Pleistoceno na estrutura populacional e demografia histórica de *Cochliomyia hominivorax*

Pablo Fresia, Mariana L. Lyra, Ana Maria L. de Azeredo-Espin

Resumo

Os ciclos climáticos do Pleistoceno foram fundamentais em moldar o padrão atual de distribuição da diversidade de diversas espécies. Como essas flutuações e as mudanças na vegetação acontecidas nos períodos glaciais e interglaciais, têm impactado na evolução das espécies na região Neotropical, é matéria de debate. Para testar hipóteses de divergência entre os grupos de populações de *C. hominivorax* integramos análises da demografia histórica, simulações de coalescência e modelagem ecológica. Investigamos a variação de três fragmentos (CR, COI e COII) do genoma mitocondrial de indivíduos coletados na América do Norte, Central e do Sul, e foram construídos dois modelos filogeográficos em função de três eventos paleoclimáticos do Pleistoceno (o último máximo glacial, ~20.000 anos atrás; o interglacial Sangamon, ~140.000 anos atrás e o pico frio mais recente do interglacial Yarmouth, ~250.000 anos atrás). Foram identificados 132 haplótipos para os fragmentos do DNAm_t combinados, alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica. Através da genealogia das seqüências combinadas, foi possível identificar três haplogrupos principais, um formado pelas amostras da América do Norte e Central e os outros dois por amostras do norte e do sul da região Amazônica. Os grupos da América do Sul formam grupos monofileticamente recíprocos correlacionados com a distribuição geográfica. O tempo ao ancestral comum mais recente foi ~250.000 anos e as simulações de coalescência não rejeitaram apenas o modelo de fragmentação simultânea a partir de um ancestral comum há ~240.000 anos. A modelagem ecológica mostrou que no presente e no último período interglacial, *C. hominivorax* esteve ausente na região Amazônica de floresta densa, mas que no último máximo glacial essa região foi propícia para a espécie. As análises sugerem que os ciclos climáticos do Pleistoceno promoveram a expansão e mistura das populações na região Amazônica em diferentes momentos da história, o que pode ter inibido processos de divergência maiores que os observados atualmente em *C. hominivorax*.

Palavras-chave: *Cochliomyia hominivorax*, Pleistoceno, modelagem ecológica, simulação coalescente, DNA mitocondrial.

Introdução

Eventos biogeográficos, como as flutuações climáticas e da vegetação que ocorreram no Pleistoceno, foram destacados como fatores fundamentais que moldaram o padrão atual de distribuição da diversidade das espécies (Hewitt 2004, Wüster *et al.* 2005). Estes eventos são bem documentados nas espécies de climas temperados, porém são menos conhecidos nas espécies tropicais e subtropicais (Hewitt 2004).

A região Neotropical é um dos lugares biologicamente mais diversos da terra e as explicações para este fato têm sido motivo de intenso debate, particularmente desde que Haffer (1969) e Vanzolini & Williams (1970) propuseram que a retração da floresta Amazônica e da fauna acompanhante, em distintos refúgios durante os ciclos glaciais do Pleistoceno, pode ter favorecido eventos de especiação geográfica (Lessa *et al.* 2003). Estudos mais recentes de datação baseados em DNA têm sugerido que estes eventos de especiação na região amazônica antecedem o Pleistoceno (Moritz *et al.* 2000, Rull 2008), mas os ciclos glaciais podem ter papel importante na formação dos padrões de distribuição da diversidade genética dentro das espécies.

A natureza, significância e até mesmo a veracidade dos efeitos das mudanças climáticas do Pleistoceno na fragmentação da floresta amazônica ainda são bastante controversos (Clapperton 1993, Colinvaux *et al.* 1996, 2000, 2001, Haffer & Prance 200, Hooghiemstra 2001). Tem sido proposto que no último máximo glacial (LGM, do inglês *Last Glacial Maximum*) do Pleistoceno (~18-25.000 anos atrás), o clima era mais seco que na atualidade, e nesse cenário os habitat de florestas tropicais foram reduzidos a um mosaico de florestas abertas e savanas (Clapperton 1993, Vivo & Carmignotto 2004, Hewitt 2004). No Holoceno (~10.000 até o presente), o clima mudou novamente e gradualmente ficou mais úmido, o que pode ter levado ao restabelecimento da floresta amazônica (Haffer 1997). As críticas a esse cenário de fragmentação se apóiam em evidências palinológicas, que não provêm suporte a existência de uma vegetação de cerrado generalizada na região Amazônica durante o LGM (ex. Colinvaux *et al.* 1996, 2001; Kastner & Goñi 2003). Estes registros palinológicos provêm informações de alguns milhares de anos, porém dificilmente conseguem recuperar com precisão informações de

algumas centenas de milhares, ou seja, dos períodos glaciais do Pleistoceno prévios ao último período glacial.

Recentes pesquisas paleoclimáticas sugerem que as variações climáticas na Amazônia ao longo do Pleistoceno foram mais frequentes do que o previamente reconhecido, trazendo uma mudança teórica que passa das flutuações influenciadas pelas glaciações para aquelas dirigidas pelos ritmos de precessão dos equinócios (Mayle *et al.* 2004, Noonan & Gaucher 2006). Portanto, à fragmentação da paisagem associada com o aumento da aridez e os ciclos glaciais, se somam estes efeitos mais regulares associados aos ciclos de Milancovitch, para explicar a distribuição da diversidade biológica. De um modo geral, isto desloca as expectativas filogeográficas de (i) grandes áreas de simpatria de espécies intimamente relacionadas (mas não irmãs) originadas em refúgios separados, com as distribuições atuais como resultado da conectividade cíclica dos dois refúgios (hipótese dos refúgios), para as de (ii) estrutura genética e níveis de divergência bem abaixo do esperado para especiação (hipótese de perturbação-vicariância, DV). Esta hipótese (DV), que procura relacionar padrões biogeográficos observados às flutuações climáticas históricas, foi proposta inicialmente por Colinvaux (1993), expandida por Bush (1994, Bush *et al.* 2002, 2005) e Mayle *et al.* (2004).

A maioria dos estudos com o objetivo de elucidar a história biogeográfica da floresta Amazônica usando métodos genéticos tem focado em espécies encontradas dentro da floresta (Pennington *et al.* 2000). Alguns autores apontam que estudos genéticos de taxas que vivem fora das florestas podem potencialmente prover informação útil para entender esse suposto processo de fragmentação e recuperação da Amazônia (Pennington *et al.* 2004, Wüster *et al.* 2005). Nesses estudos, postula-se que as espécies distribuídas fora da floresta Amazônica, atualmente separadas pela floresta, devem ter tido uma distribuição contígua em algum momento no passado se a mata esteve fragmentada ou menos densa (i.e. evento de vicariância), e, portanto o momento deste evento de vicariância pode ser estimado e representa a época do último intercâmbio genético através da Amazônia. Wüster *et al.* (2005, Quijada-Mascareñas *et al.* 2007) argumentam que a vicariância de taxas de fora da floresta, separados atualmente pela Amazônia, representam evidência consistente da fragmentação.

Cochliomyia hominivorax (Calliphoridae) é um díptero endêmico das Américas, cuja fase larval se alimenta obrigatoriamente de tecidos vivos de hospedeiros de sangue quente (Guimarães *et al.* 1983). O habitat preferencial desse inseto é a interfase entre as florestas, onde vivem os adultos, e as áreas de pastagem, onde as fêmeas buscam os hospedeiros para depositarem seus ovos (Mangan & Thomas 1989, Parker *et al.* 1993, Phillips *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2007). A atual distribuição dessa espécie compreende a América do Sul e algumas ilhas do Caribe, tendo sido erradicada da América do Norte e Central continental entre os anos 1957 e 2000 (Klassen & Curtis 2005).

Em um trabalho recente, Fresia *et al.* (no prelo) identificaram que a diversidade genética de *C. hominivorax* na América do Sul está estruturada em dois grupos de populações, que se distribuem ao norte (NAG) e ao sul (SAG) da região Amazônica e sugeriram que os mesmos se separaram recentemente. Além disso, sugeriram que a floresta Amazônica deve atuar como barreira ao fluxo gênico nessa espécie. As oscilações climáticas do Pleistoceno parecem ter induzido a fragmentação da floresta Amazônica nos períodos de glaciação e a recuperação da mesma nos períodos interglaciais. Desta forma, as populações de *C. hominivorax* dos grupos NAG e SAG tiveram oportunidades de contato nos períodos glaciais, devido ao surgimento de regiões habitáveis na região Amazônica, assim como foram e são separadas nos períodos interglaciais. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi testar a hipótese de perturbação-vicariância (DV) devido aos efeitos das flutuações climáticas do Pleistoceno na distribuição da diversidade genética da espécie, através de estimativas de tempo de divergência, simulações de coalescência e modelagem ecológica. Com isso pretendemos contribuir, considerando dados de uma espécie que habita no ecótono entre a floresta e as pastagens, para o entendimento dos efeitos dessas flutuações na formação da atual floresta Amazônica.

Material e métodos

Seleção das amostras

No total, foram analisados 194 indivíduos de 36 localidades distribuídas na América do Sul, Central e do Norte (**Tabela 1**). Destes, 158 indivíduos de 16 localidades foram previamente analisados por Fresia *et al.* (no prelo), os restantes 21 indivíduos de 15

novas localidades da América do Sul foram incluídos nesse trabalho. Além das amostras de populações naturais, foram analisados 15 indivíduos provenientes de cinco linhagens de laboratório mantidas na Biofábrica de *C. hominivorax* do APHIS-USDA, Fargo, Dakota do Norte, EUA. Essas amostras foram doadas pelo pesquisador Richard L. Roehrdanz (APHIS-USDA) e armazenadas em freezer -70°C até o momento da extração de DNA. As linhagens analisadas foram: (1) 009, proveniente do Texas, EUA, (2) Cañas da localidade de Cañas, Costa Rica, (3) OW87 de Orange Walk, Belize, (4) FC96 de Chiapas, México e (5) V81 de Veracruz, México. Todas as amostras foram coletadas originalmente nas localidades indicadas e transferidas para a Biofábrica (detalhes em Dev, La Chance & Whitten 1986, Roehrdanz 1989). As amostras coletadas em populações da América do Norte e Central continental foram obtidas antes da erradicação da espécie nos países e são representativas da diversidade das localidades citadas.

Obtenção e análise das seqüências

A extração do DNA total, a amplificação por PCR, bem como o sequenciamento dos fragmentos da região controle (CR), COI e COII mitocondriais, foram realizados seguindo os procedimentos descritos em Fresia *et al.* (no prelo).

As seqüências foram alinhadas e comparadas com todas as seqüências obtidas por Fresia *et al.* (no prelo) para definição de haplótipos de cada fragmento gênico e das seqüências combinadas. A distância genética p entre os haplótipos, não corrigida, foi estimada no programa Mega versão 4.0 (Tamura *et al.* 2007), as estimativas de diversidade haplotípica (\hat{H}) e nucleotídica (π) foram feitas usando o programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

Tabela 1. Localidades de amostragem, tamanho das amostras e distribuição dos haplótipos mitocondriais dos dados concatenados (CR-COI-COII) de *C. hominivorax*. ID: identificação da localidade, N: número de indivíduos amostrados na localidade.

Grupo	ID	Localidade	Lat.	Long.	N	Haplótipos (N indivíduos)
NC	FAR1	Texas	29,424	-98,493	4	225 237 238 239
NC	FAR2	Veracruz	19,200	-96,133	1	240
NC	FAR3	Orange Walk	17,833	-88,833	4	230 231 234 235
NC	FAR4	Chiapa de Corzo	16,700	-93,000	1	228
NC	FAR5	Cañas	10,433	-85,100	5	226 227 232 233 236
NAG	VPF	Punto Fijo	11,709	-70,204	1	89
NAG	VJG	Juangriego	11,083	-63,950	2	89 173
NAG	VPO	Porlamar	10,950	-63,850	1	86
NAG	VEV	El Vigia	10,603	-66,889	1	91
NAG	VCA	Carora	10,178	-70,073	1	85
NAG	VCR	Caripe	10,166	-63,416	1	36
NAG	VLG	La Guaira	10,166	-63,502	1	106
NAG	VBA	Barquisimeto	10,050	-69,316	10	28 36 84 89(3) 174(2) 202(2)
NAG	VEN	Encontrados	9,333	-72,216	11	26 38(2) 58 87 94 102 156 157 158 202
NAG	VSA	Sarare	8,623	-71,650	2	88 153
NAG	COT	Turbo	7,676	-76,686	12	34(2) 37 39(2) 54(5) 89 93
NAG	EAT	Atacames	0,854	-79,835	1	59
NAG	ESD	Santo Domingo	-0,192	-78,501	1	54
NAG	ECH	Chone	-0,695	-80,088	2	43 60
NAG	EAR	Archidona	-0,906	-77,801	2	2 54
NAG	EPA	Pangua	-1,182	-79,049	1	54
NAG	ECL	Colimes	-1,547	-80,008	2	38 53
NAG	ERV	Rio Verde	-2,324	-80,719	4	44 58 60(2)
SAG	BTO	Touros	-5,198	-35,460	10	64(2) 78 140(3) 159 166 175 197
SAG	BPT	Patos	-7,024	-37,280	2	78(2)
SAG	BSM	Santa Maria das Barreiras	-8,871	-49,712	11	3 4 13 50 62 121 124 132 140 163 175
SAG	BCO	Cocalinhos	-14,367	-51,000	6	10 11 29 57 69 168
SAG	BGN	Goianira	-16,496	-49,426	8	66 80 96 131 134 165 196 198
SAG	BGO	Goiânia	-16,678	-49,253	9	1(2) 73 107 111 164 185 191 201
SAG	BCA	Caiaponia	-16,956	-51,810	18	1 8 19(2) 24 51(2) 140(6) 145 150 155 169 183
SAG	BCR	Cidade Costa Rica	-18,543	-53,129	7	30 120 125 140 143(2) 146
SAG	BAQ	Aquidauana	-19,589	-56,088	6	112(2) 140 141 142 189
SAG	BCG	Campo Grande	-20,442	-54,646	10	76 129 140(5) 160 172 184
SAG	BSS	São Sebastião do Paraíso	-20,916	-46,991	7	41(2) 118 140(2) 187 190
SAG	BES	Estiva	-22,462	-46,017	18	15 50(3) 56 77 103 110 123 133 140(3) 184 187(3) 192
SAG	BCP	Campinas	-22,905	-47,060	11	20 55 70 116 117 126 127 135 149 151 181

Inferência filogenética e estimativas de tempo de divergência

Para estimar as relações filogenéticas em *C. hominivorax* foi utilizado o conjunto de dados combinados dos genes CR, COI e COII.

A inferência da genealogia e o suporte dos nós foram realizados no programa Beast versão 1.6 (Drummond & Rambaut 2007), com modelos particionados para incorporar informação evolutiva de cada gene. Os modelos de substituição nucleotídica para cada conjunto de dados foram selecionados no programa jModelTest versão 0.1.1 (Posada 2008, Guindon & Gascuel, 2003). Foram selecionados os modelos HKY + I para o gene COI, HKY + I + G para o gene COII e HKY + G para CR. Foram realizadas duas corridas independentes de 20 milhões de gerações, os parâmetros foram amostrados a cada 2000 gerações e foram descartados 10% dos valores iniciais (considerados aquecimento de cadeia - *burn-in*). As corridas foram analisadas e combinadas no programa Tracer (Rambaut & Drummond 2007). As estimativas de tempo de divergência dos clados obtidos, com probabilidade posterior maior que 50%, foram realizadas aplicando-se uma taxa de 2% por milhão de ano para o gene COI. A média das estimativas, bem como o limite de 95% de maior densidade posterior (HPD), foram obtidos no programa Tracer (Rambaut & Drummond 2007) após os dados das corridas independentes terem sido combinados.

Demografia histórica

A dinâmica populacional no passado das linhagens filogeográficas de *C. hominivorax* foi investigada através de *Bayesian skyline plots* (BSP; Drummond *et al.* 2005). Este método genealógico permite estimar o tamanho efetivo (*N_{ef}*, tamanho efetivo das fêmeas para dados mitocondriais) das populações através do tempo e não requer para a análise, a especificação *a priori* de um modelo demográfico (ex. tamanho constante, crescimento exponencial, crescimento logístico ou crescimento expansivo). As genealogias e parâmetros do modelo estimados nesta análise foram amostrados a cada 2000 iterações em corridas de 20 milhões de gerações com 10% das amostras iniciais descartadas como aquecimento das cadeias (*burn-in*).

As mudanças do *N_{ef}* foram também investigadas através das estimativas do *D* de Tajima (Tajima 1989), o *F_s* de Fu (Fu 1997) e da distribuição das diferenças pareadas

entre seqüências de DNA (*mismatch distributions*). Para ambos os testes de neutralidade, valores próximos a zero são esperados se os tamanhos das populações têm se mantido estáveis, assim como valores negativos e significativos se as populações atravessaram uma expansão populacional recente e valores positivos significativos se as populações experimentaram gargalos (Tajima 1989, Fu 1997). A comparação entre as distribuições teóricas com as observadas das diferenças pareadas entre seqüências de DNA também ajuda a interpretar a demografia das populações. Uma distribuição unimodal indica uma expansão recente e uma distribuição multimodal indica diminuição do tamanho populacional ou estruturação (Excoffier *et al.* 1992; Rogers & Harpending 1992; Rogers *et al.* 1996; Schneider & Excoffier 1999). Uma distribuição multimodal também pode indicar que a população está influenciada por migração, é subdividida e/ou atravessou uma contração histórica (Marjoram & Donnelly 1994, Bertorelle & Slatkin 1995, Ray *et al.* 2003). Os testes de neutralidade, as distribuições pareadas e a significância estatística, avaliada por 10.000 permutações, foram estimados no programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

Biogeografia histórica

A estruturação filogeográfica do DNAm_t previamente encontrada em *C. hominivorax* (Fresia *et al.* no prelo) forneceu uma oportunidade para testar hipóteses sobre eventos históricos de vicariância na região Amazônica. Devido ao fato de que as ilhas do Caribe apresentam uma história mais recente e são produto da colonização a partir de populações continentais, neste trabalho centramos a atenção na região continental e tropical.

Duas hipóteses filogeográficas simples foram testadas através de simulações de coalescência neutras de genealogias contidas dentro de dois modelos de divergência populacional (**Figura 1**). Uma vez que não foi detectado isolamento por distância na região estudada (Lyra *et al.* 2009; Fresia *et al.* no prelo), o primeiro modelo adotado (hipótese 1 - H1) foi a fragmentação de uma única população ancestral. Este modelo postula que todas as populações (aqui, grupos de populações) ocorreram simultaneamente a partir de uma população ancestral única. O segundo modelo de divergência (hipótese 2 - H2) considera

que as populações inicialmente se separam em dois refúgios, um na América do Sul e outro na América Central, e em um momento posterior ocorreu um evento de vicariância que separou as populações do norte e do sul da região Amazônica. Uma vez que nosso objetivo foi testar o ajuste dos dados do DNAm_t de *C. hominivorax* a estes modelos, diferentes tempos de divergência foram usados. Estes tempos correspondem a diferentes episódios paleoclimáticos do Pleistoceno (revisado em Gradstein *et al.* 2004): o período posterior ao ultimo máximo glacial (T1, ~10.000 anos atrás), o interglacial Sangamon (T2, ~140.000 anos atrás) e o pico frio mais recente do interglacial Yarmouth (T3, ~240.000 anos atrás).

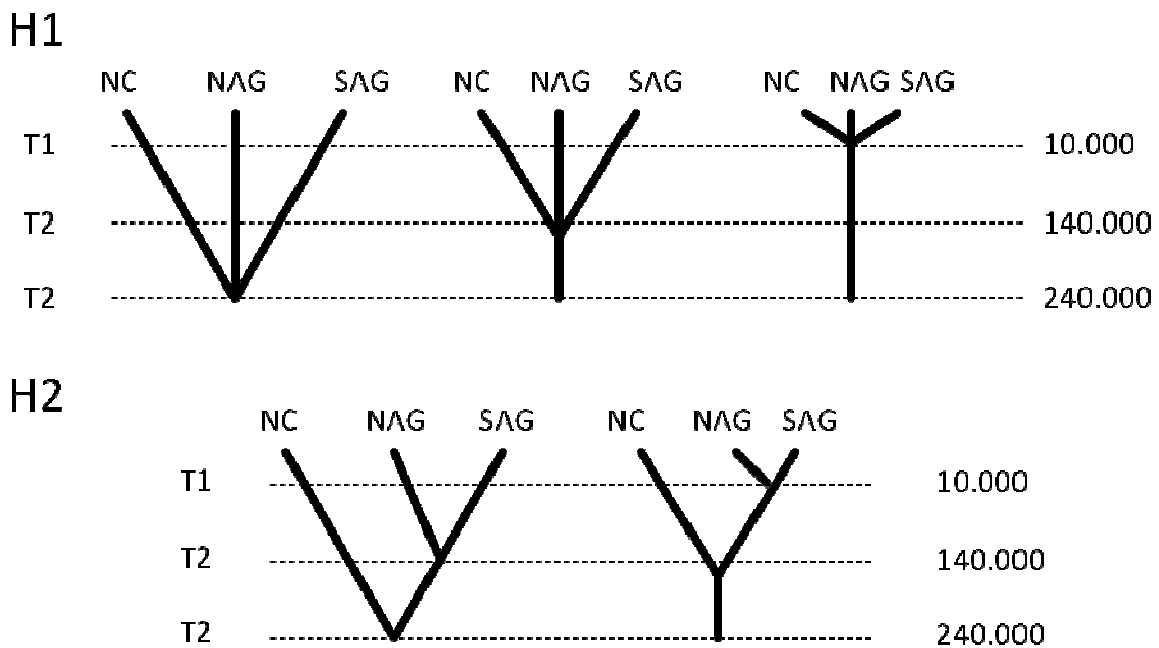


Figura 1. Duas hipóteses testadas em modelos de divergência dos grupos de populações. NC, grupo que inclui América do Norte e América Central, NAG, norte da região Amazônica e SAG, sul da região Amazônica.

Os testes das hipóteses foram realizados no programa Mesquite versão 2.73 (Maddison & Maddison 2010), levando-se em consideração os resultados de estruturação obtidos por Fresia *et al.* (no prelo), o comprimento do ramo e largura do ramo (tamanho efetivo da população, N_e). Para definir N_e , primeiro se estimou a diversidade genética θ ($=N_e\mu$), dentro da espécie e dentro dos grupos definidos pelos modelos de divergência.

Uma estimativa geral de θ foi calculada usando o método de Watterson no programa dnaSP versão 5 (Librado & Rozas 2009) para fornecer uma medida imparcial da diversidade ancestral. Para cada grupo, as estimativas de θ por sítio foram feitas no programa Lamarc versão 2.1.3 (Kuhner 2006), que permite o crescimento ou declínio dentro de uma população. Foi usada uma abordagem bayesiana com os seguintes parâmetros de busca: uma cadeia curta de 10.000 gerações e uma cadeia comprida de dois milhões de gerações com três repetições, as cadeias foram amostradas cada 20 gerações seguindo aquecimento (*burn-in*) de 100.000 gerações, árvores iniciais aleatórias, razão de transições/transversões, frequências nucleotídicas empíricas e um valor inicial de θ estimado pelo método de Watterson. Para assegurar a convergência sobre valores similares de θ , os cálculos foram repetidos três vezes. A partir das estimativas de θ e a taxa de mutação de 2% por milhão de anos (aproximação média de mutação para genes mitocondriais DeSalle *et al.* 1987, Brower 1994, Megens *et al.* 2004), o *Nef* foi obtido. O tempo de geração usado foi de 23,95 dias, calculado com base na formula $T = \alpha + [s/(1 - s)]$ (Lande *et al.* 2003), sendo que α é a idade de maturidade e s a taxa de sobrevivência anual dos adultos, estimada em 0,798 para *C. hominivorax* (Matlock & Skoda 2009). Estimativas de parâmetros populacionais, como θ , calculados a partir de um único *locus* têm um erro inerentemente grande (Edwards & Beerli 2000). Portanto, para garantir a robustez de nossas conclusões frente a mudanças na estimativa, as simulações foram realizadas utilizando *Nef* calculados a partir da estimativa pontual de θ e dos limites inferior e superior (IC 95%).

A discordância entre a genealogia gênica dos dados combinados do DNAMt de *C. hominivorax* e o modelo de divergência populacional foi medida pelo valor S , o qual corresponde ao número mínimo de eventos de amostragem (*sorting events*) necessários para produzir a genealogia dentro do modelo de divergência populacional (Slatkin & Maddison 1989). O valor S é uma medida do número de passos no caminho mais parcimonioso para um caráter em uma árvore gênica reconstruída, de forma tal que quanto maior a discordância entre as árvores populacional e gênica, maior será o valor de S . Para essas árvores gênicas o estado de caráter do haplótipo é definido como sua população de origem. Se partirmos do pressuposto que as populações foram separadas por um longo período de tempo (e $N \gg$ tamanho amostral), o único processo que causa discordância é a

migração. Caso contrário, o processo evolutivo de separação das linhagens genéticas (*lineage sorting*) pode contribuir nas diferenças. A significância do S observado, para as genealogias gênicas, sob cada hipótese, foi testada gerando distribuições nulas simulando 1000 árvores num processo coalescente sem migração. Para rejeitar uma hipótese, devemos observar um valor de S significativamente menor da genealogia dos nossos dados em relação aos das simulações. Para calcular os p valores para os S observados nestas análises, foi realizado um ajuste à distribuição normal com média e desvio padrão dado de cada simulação.

Modelagem ecológica

O programa Maxent versão 3.3.3a (Phillips *et al.* 2006) foi usado para prever a distribuição atual de *C. hominivorax* e projetá-la no passado. Este programa tem sido desenvolvido dentro da comunidade científica de aprendizado da máquina (*machine learning*) implementando um algoritmo para fazer previsões e inferências a partir de informações incompletas. O algoritmo do Maxent realiza estimativas da distribuição geográfica de uma espécie a partir dos dados ambientais das localidades em que a ocorrência da espécie foi reportada, encontrando a distribuição de máxima entropia (Phillips *et al.* 2006) para prever onde mais a espécie pode ocorrer devido a semelhanças ambientais com as localidades onde foi registrada. Este foi o modelo escolhido, pois em geral supera outros modelos em prever a distribuição atual de uma espécie usando unicamente dados de presença (Elith *et al.* 2006).

Dados de distintas localidades da atual distribuição geográfica de *C. hominivorax*, assim como de regiões ocupadas previamente à erradicação, foram usados para produzir o modelo de nicho ecológico. De um total de 121 registros para a espécie (Anexo I), 60 foram obtidos na literatura e 61 foram localidades amostradas para trabalhos do Laboratório de Genética e Evolução Animal (LGEA) – UNICAMP. A latitude e longitude das localidades de amostragem foram obtidas por GPS e as referências geográficas obtidas na literatura foram checadas para erros. Utilizando a base de dados WorldClim (<http://www.worldclim.org>), obtivemos 19 variáveis climáticas para o presente, para o último máximo glacial (LGM, ~21.000 anos atrás) e para o último período inter-

glacial (LIG, ~120.000 – 140.000 anos atrás) em formato *raster* com uma resolução espacial de 2,5 arc-min (~5 km², Hijmans *et al.* 2005). As variáveis dos três períodos foram recortadas para uma área que contém América do Sul, América Central, América do Norte até o centro dos EUA e o Caribe. A correlação entre as 19 variáveis climáticas para a área de interesse foi estimada usando o programa ENMTools versão 1.1 (Warren *et al.* 2008, Warren *et al.* 2010). Foram selecionadas as seis variáveis independentes na área de interesse, *temperatura máxima do mês mais quente* (BIO5), *temperatura mínima do mês mais frio* (BIO6), *o coeficiente de variação da sazonalidade das precipitações* (BIO15), *a precipitação do trimestre mais seco do ano* (BIO17), *a precipitação do trimestre mais quente do ano* (BIO18) e *a precipitação do trimestre mais frio do ano* (BIO19). O modelo foi desenvolvido para ocorrências dentro da área representada nas **Figuras 3, 4 e 5**. As ocorrências foram divididas em dados de treinamento e de teste, sendo 75% dos dados usados para a predição do modelo e 25% para validação do modelo. O modelo resultante foi avaliado com a *Receiver Operating Characteristics Curve* (ROC) calculando a área abaixo da curva (AUC), um índice limiar independente amplamente utilizado em estudos ecológicos. A curva ROC foi criada através da plotagem dos valores de sensibilidade, a fração de verdadeiros-positivos contra 1 – especificidade, e a fração de falsos-positivos para todos os limiares de probabilidade disponíveis (Manel *et al.* 2001). A AUC é uma medida da área sob a ROC variando de 0,5 (precisão aleatória) a um valor máximo de 1,0 (discriminação perfeita). Um valor mínimo de AUC de 0,75 para o grupo teste foi considerado para um bom desempenho do modelo (Elith *et al.* 2006, Suárez-Seoane *et al.* 2008). A saída do Maxent consiste num mapa contínuo em que cada célula tem um índice de adequação entre 0 e 1. Valores baixos indicam que as condições são inadequadas para a ocorrência da espécie, enquanto que valores altos indicam que as condições são adequadas. Para representar a adequação ambiental como um caráter binário (presença/ausência), foi utilizado um limiar acumulativo que equilibra omissão do treinamento, área prevista, e o limiar, i.e. que equilibra os erros de comissões e omissões (Phillips *et al.* 2006). Entre os limiares testados pelo programa, a probabilidade acumulativa de 10 foi escolhida como corte, nível que rejeita 10% dos menores valores. Apesar de arbitrário, este nível foi selecionado para uma interpretação mais conservadora de adequação do habitat, já que

ainda mantém uma baixa taxa de omissão (Pearson *et al.* 2007). Os valores abaixo do limiar foram transformados em zero. O modelo resultante foi projetado no último máximo glacial (LGM ~21.000 anos atrás, modelos CCSM e MIROC) e o último máximo interglacial (LIG ~120.000 – 140.000 anos atrás) para avaliar visualmente as possíveis conexões entre as regiões onde os distintos grupos regionais de *C. hominivorax* estão distribuídos.

Resultados e Discussão

Foram seqüenciados 1752pb (510pb da CR, 731pb do COI e 511pb do COII) do genoma mitocondrial de 194 indivíduos de *C. hominivorax* da região tropical de América do Sul, América Central e América do Norte. Foram observados 45 sítios variáveis nas seqüências de CR, 41 em COI e 27 em COII, e identificados 55, 49 e 28 haplótipos, respectivamente. Os três fragmentos foram combinados (CR-COI-COII = 1752pb) e um total de 132 haplótipos foram identificados. A distância genética média entre os haplótipos combinados foi 0,0037 (0-0,0099), a diversidade nucleotídica (π), 0,005336 (s.d. $\pm 0,002724$) e a diversidade haplotípica (\hat{H}), 0,9832 (s.d. $\pm 0,0050$).

Entre os 132 haplótipos mitocondriais de *C. hominivorax* encontrados em toda a área estudada, 23 foram encontrados em mais de um indivíduo, e os restantes (109 haplótipos) em um único indivíduo. O haplótipo 140, o mais freqüente (11,34%) em toda a amostra, esteve presente em oito das 13 localidades do sul da região Amazônica (SAG), assim como já havia sido identificado anteriormente em Fresia *et al.* (no prelo). O segundo mais freqüente (4,12%), o haplótipo 54, só esteve presente em localidades do norte da região Amazônica (NAG). O haplótipo 89, que representa 3,09% da amostra, também foi unicamente encontrado em NAG. Interessantemente, estes dois haplótipos (54 e 89) freqüentes em NAG só foram encontrados juntos na Colômbia, sendo que o 54 foi também encontrado no Equador e o 89 na Venezuela. Para as amostras das localidades da América do Norte e Central, foram identificados haplótipos novos e únicos para cada indivíduo (**Tabela 1**). A análise conjunta dos dados revelou que esses haplótipos estão proximamente relacionados com as amostras coletadas em Cuba (analisadas por Fresia *et al.* no prelo, para dados de comparação ver Discussão Geral) e distantes geneticamente das amostras de NAG

e SAG. O grupo formado por estas amostras foi denominado NC e é equivalente ao grupo CG de Fresia *et al.* (no prelo).

Na **Figura 2** está representada a genealogia gênica inferida pelo método bayesiano e as estimativas de tempo de divergência dos nós com probabilidade superior a 80%. Nesta genealogia é possível identificar três haplogrupos principais, sendo que o haplogrupo I, formado pelas amostras da América do Norte e Central continental (NC), está geneticamente mais distante das amostras da América do Sul. As amostras de SAG e NAG aparecem nos dois outros haplogrupos e não formam grupos monofileticamente recíprocos correlacionados com a distribuição geográfica. Apesar disso, as amostras de cada grupo geográfico tendem a agrupar sempre juntas (exceto 4 amostras de NAG), mesmo com probabilidades posteriores inferiores a 80% (em azul e verde na figura), sendo que no haplogrupo II aparecem dois subgrupos (II-a e II-b, na **Figura 2**) com alta probabilidade posterior. As quatro amostras de NAG agrupadas com SAG foram interpretadas como efeito de migração mediada pelo homem, ou *aliens*, a exemplo de outros trabalhos (ex. Beheregaray *et al.* 2004).

O tempo de coalescência a um ancestral comum mais recente (tMRCA) desta amostra de *C. hominivorax* (que junta os três haplogrupos) foi estimado em 249,5 mil anos (limites: 146-361), entre o Pleistoceno médio e tardio, e representa a separação entre América do Norte/Central (NC) e América do Sul (NAG e SAG). Essa datação média é aproximadamente o período mais quente do interglacial Yarmouth (~240.000, Gradstein *et al.* 2004). Estima-se que a separação entre os haplogrupos II e III (Figura 3) tenha ocorrido há aproximadamente 150 mil anos (limites: 93-212) e a separação entre os subgrupos II-a e II-b há aproximadamente 58.000 anos atrás (limites: 35-76).

Neste cenário, as separações entre os haplogrupos I, II e III ocorreram antes do LGM (~21.000 anos atrás), sendo que estas separações parecem ter ocorrido em períodos de transição entre máximos frios e máximos quentes (na média em períodos de picos quentes de temperatura; Petit *et al.* 1999). Estas separações estão, portanto, correlacionadas com oscilações climáticas do Pleistoceno. Apenas a separação entre II-a e II-b parece ter ocorrido em momentos de clima mais frio e mais estável, e nesse caso outros fatores, que não o clima, podem ter influenciado essa divergência.

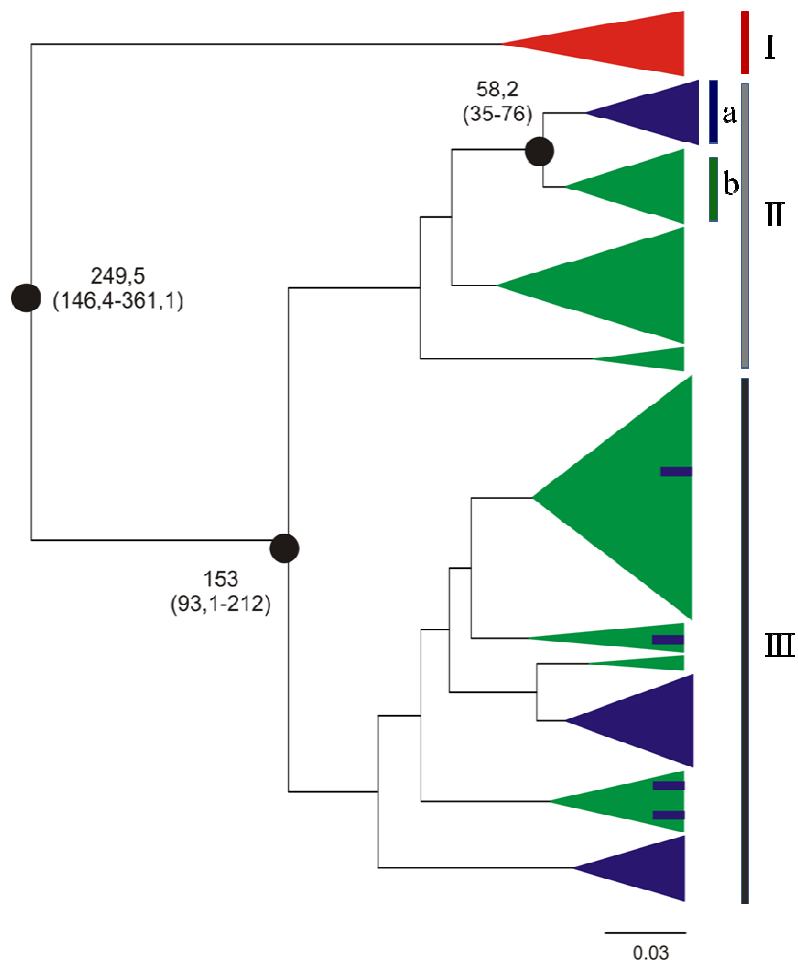


Figura 2. Genealogia bayesiana dos dados mitocondriais de *C. hominivorax* combinados (CR-COI-COII). Os pontos negros indicam divergência de clados com probabilidade posterior > 80%. Os valores juntos aos pontos são os tempos de divergência em milhares de anos (95% HPD). A cor azul indica os agrupamentos de indivíduos do norte da Amazônia (NAG), a cor verde os do sul da Amazônia (SAG) e a cor vermelha os indivíduos de América Central e do Norte (NC). Os números I, II e III designam os haplogrupos e (a, b) os sub-haplogrupos de II.

Fresia *et al.* (artigo 1 – no prelo) analisaram populações de *C. hominivorax* em toda a distribuição geográfica atual da espécie e identificaram que a diversidade genética dessa espécie na América do Sul estava estruturada em dois grupos regionais principais. Esses dois grupos de populações (NAG e SAG) não compartilham haplótipos, porém a

divergência genética encontrada entre os mesmos foi baixa. Isto levou os autores a sugerir uma separação recente que não se reflete na divergência dos haplótipos, que deve levar mais tempo. Estes resultados, junto aos dados ecológicos que mostram *C. hominivorax* como uma espécie que principalmente habita o ecótono entre as florestas e áreas abertas de pastagem, sugerem que a recuperação da floresta Amazônica nos momentos interglaciais pode representar uma barreira ao fluxo gênico entre NAG e SAG. Os resultados obtidos aqui na inferência genealógica para estruturação das amostras nos haplogrupos II e III sugerem momentos de contato e separação entre NAG e SAG, o que parece estar associado com os ciclos do Pleistoceno e não indicam um único momento de separação. Isso sugere que a floresta Amazônica passou por momentos de fragmentação permitindo o contato entre os grupos em diferentes períodos do Pleistoceno. Espécies associadas a habitats abertos, ao contrário de taxas de floresta, podem ter sido favorecidas em um cenário de redução de mata e aumento de savana ou florestas semi-abertas (Hewitt 2004, Vivo & Carmignotto 2004). Isto parece estar refletido na expansão populacional que experimentou *C. hominivorax* desde o último máximo glacial.

Um modelo da distribuição atual de *C. hominivorax* foi criado com base nos 121 registros (**Anexo I**) e nas seis variáveis climáticas escolhidas (**Figuras 3**). Este modelo foi projetado no último máximo glacial (LGM) usando os modelos CCSM e MIROC (**Figura 4**) e no último período interglacial (LIG, **Figura 5**). O grupo teste para investigar o desempenho do modelo consistiu em 30 registros e resultou em um AUC de 0,786. Para os dados de treinamento, o AUC foi de 0,829, mostrando a boa capacidade de prever do modelo. As probabilidades abaixo de um limiar de 0,275 foram classificadas como ausências e transformadas em valores nulos.

O modelo da distribuição atual de *C. hominivorax* mostra amplas áreas com probabilidades que vão de médias a altas no Uruguai, Bolívia, Paraguai, assim como no sul, centro-oeste, nordeste e o estado de Acre no Brasil. No norte da região Amazônica, se observam regiões de alta probabilidade no Panamá, Colômbia, Venezuela e Equador. Este modelo também detectou uma grande área de ausência na região de floresta Amazônica densa, de acordo com trabalhos prévios que indicam que *C. hominivorax* não habita dentro de florestas fechadas (Thomas & Mangan 1989, Thomas 1993, Phillips *et al.* 2004). Ambas

as projeções no LGM (CCSM e MIROC) mostram um aumento da probabilidade de ocorrência de *C. hominivorax* na região Amazônica, particularmente na região de floresta densa. Este cenário, do LGM, pode ter brindado a possibilidade de intercâmbio de migrantes entre as duas regiões. O modelo CCSM indica áreas de alta probabilidade no nordeste do Brasil, Equador, Colômbia, Venezuela e Panamá. Finalmente, a projeção no LIG mostra que as maiores regiões com probabilidade alta se encontram no norte do continente (Colômbia, Venezuela e Guianas) e América Central, porém se detectaram algumas pequenas regiões no nordeste do Brasil e na Bolívia. Esta projeção, assim como o modelo da distribuição atual, mostra uma grande região de ausência na Amazônia.

De forma geral, a modelagem ecológica mostra a ausência de *C. hominivorax* na região de floresta densa no LIG e no presente, assim como indica que no LGM essa região foi mais propícia para a espécie. Isto está de acordo com os dados ecológicos que indicam que a espécie não habita regiões que possuem matas fechadas e indica que em momentos de temperatura mais quente, as populações do norte e do sul da região Amazônica se encontram separadas pela floresta. A modelagem ecológica também indica que as regiões de maior probabilidade de ocorrência se encontravam ao norte no último interglacial (LIG) e foram trasladando-se para o sul da região Amazônica.

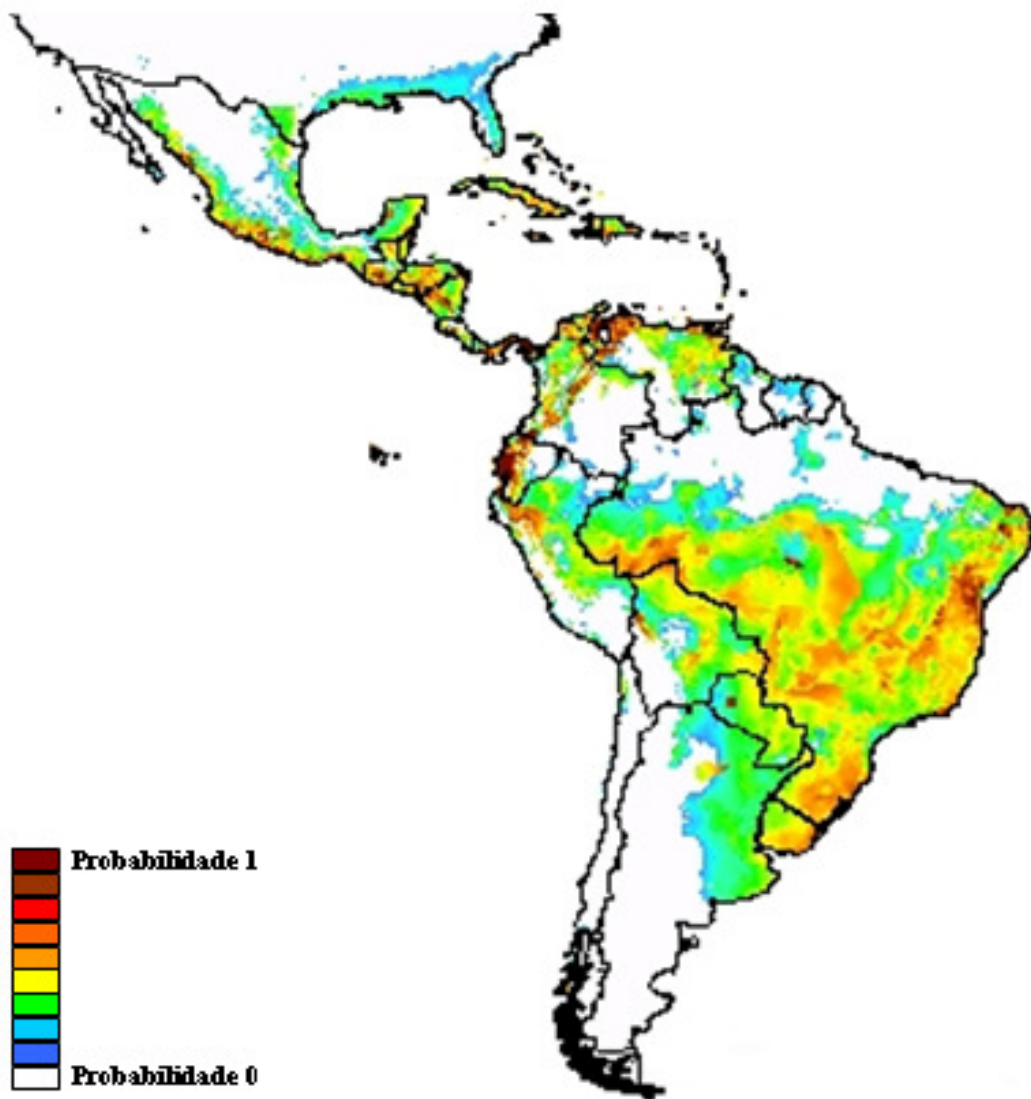


Figura 3. Mapa com as probabilidades de ocorrência de *C. hominivorax* produzidos no Maxent correspondente à distribuição atual.

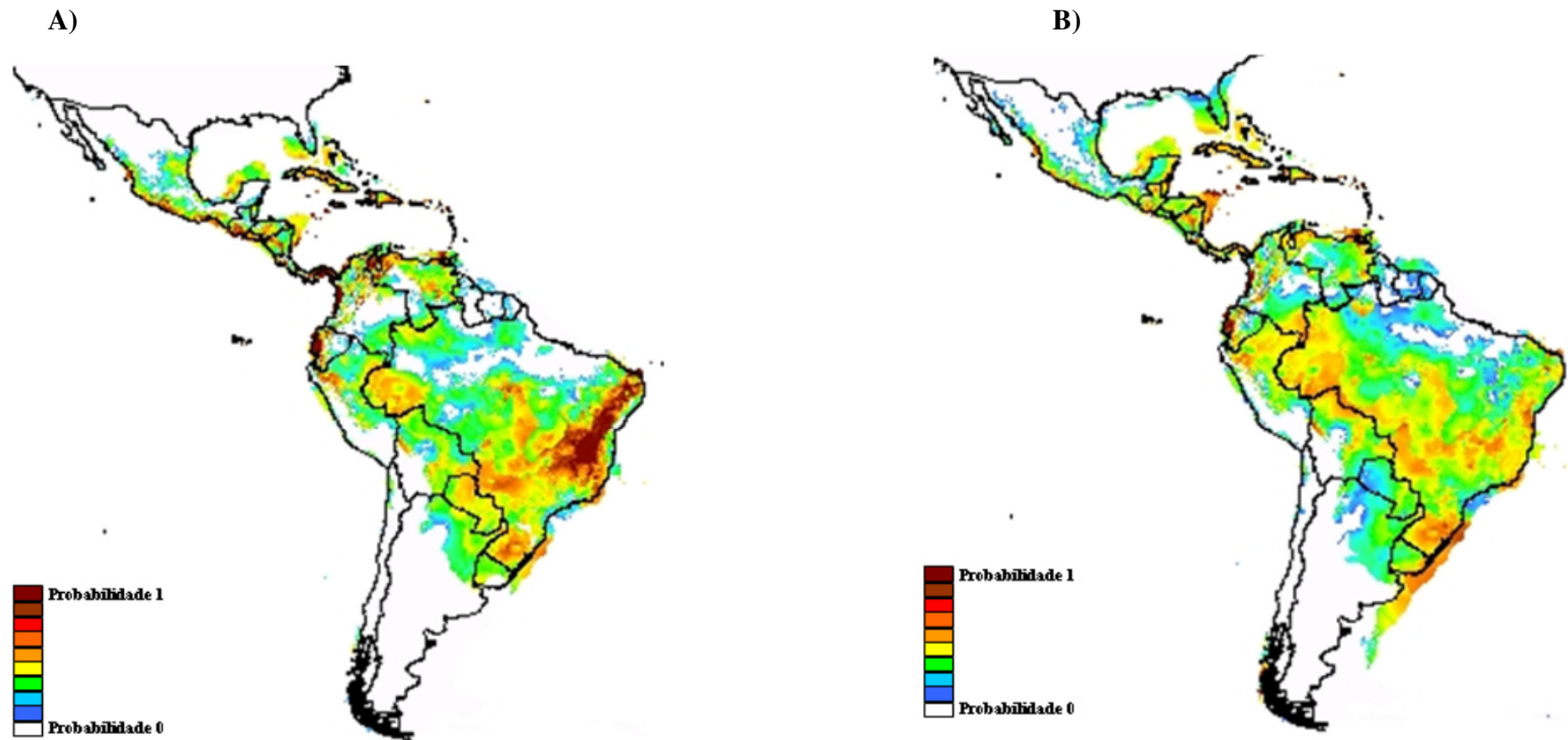


Figura 4. Mapas com as probabilidades de ocorrência de *C. hominivorax* produzido no Maxent correspondente a distribuição projetada no último máximo glacial (LGM ~21.000 anos atrás). **A)** modelo paleoclimático CCSM e **B)** modelo paleoclimático MIROC.

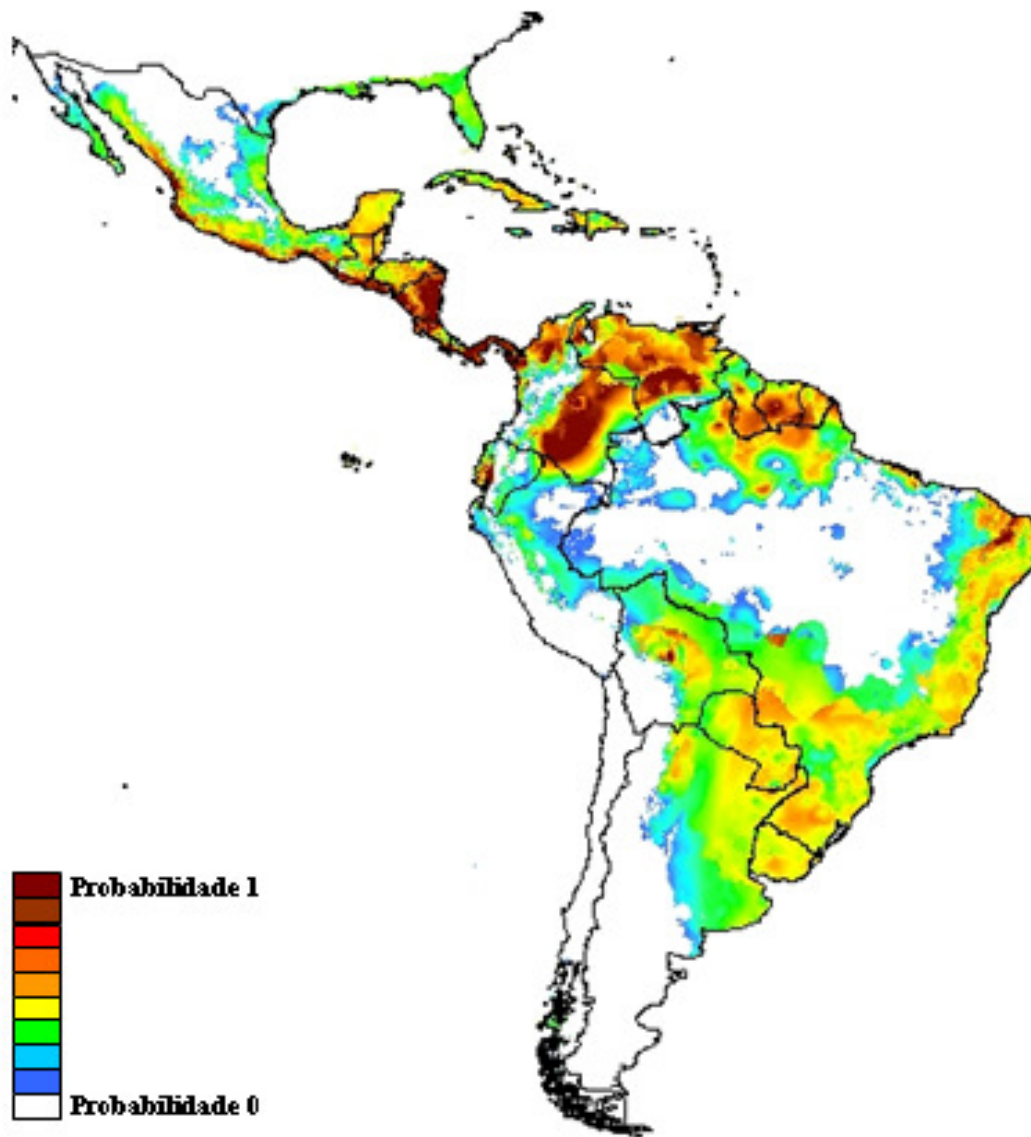


Figura 5. Mapa com as probabilidades de ocorrência de *C. hominivorax* produzido no Maxent correspondente à distribuição no último máximo quente (LIG ~120.000-140.000 anos atrás) usando o modelo paleoclimático LIG.

Para determinar se os dados de *C. hominivorax* se ajustavam a algum dos modelos populacionais propostos (H1 e H2) e investigar os possíveis tempos de divergência (10.000, 140.000 e 240.000), valores de S (Slatkin & Maddison 1989) foram calculados para a genealogia dos dados e comparados com a distribuição dos valores de S das simulações de coalescência (**Figura 6**). O valor de S para a genealogia bayesiana dos dados mitocondriais combinados de *C. hominivorax* foi igual a quatro ($S = 4$). A **Tabela 2** apresenta os dados estimados para cada um dos grupos de populações (para θ médio, limite inferior e superior) e modelo, além da probabilidade do S observado estar ajustado ao modelo.

Tabela 2. Estimativas de θ para cada grupo de populações e de S para cada modelo nos tempos de divergência propostos (ver **Figura 2**). H1 e H2: modelos; A, B e C: tempos de divergência considerados em cada modelo (em milhares de anos); S_{me} : estimativa de S médio do modelo; σ : desvio padrão da distribuição de S_{me} . Em negrito, modelo em que S observado ($S = 4$) para os dados tem probabilidade maior que 0,05 de se ajustar a distribuição de S estimada no modelo. * $p < 0.05$.

		Médio	Inferior	Superior	T
θ	NC	0,00181	0,00067	0,00410	
	NAG	0,00964	0,00634	0,01521	
	SAG	0,02960	0,02152	0,03917	
$\theta_{ancestral}$		0,00993	0,00759	0,01227	
H1	A	S_{me} 4,85	4,313	6,048	240
		σ 1,018	0,89	1,14	
	B	S_{me} 8,052*	6,87*	10,157*	140
		σ 1,12	0,97	1,07	
	C	S_{me} 39,88*	35,27*	43,309*	10
		σ 1,79	1,024	0,89	
H2	A	S_{me} 7,56*	6,77*	9,17*	240, 140
		σ 1,13	0,97	0,86	
	B	S_{me} 1,16*	7,37*	10,728*	140, 10
		σ 1,62	1,14	1,21	

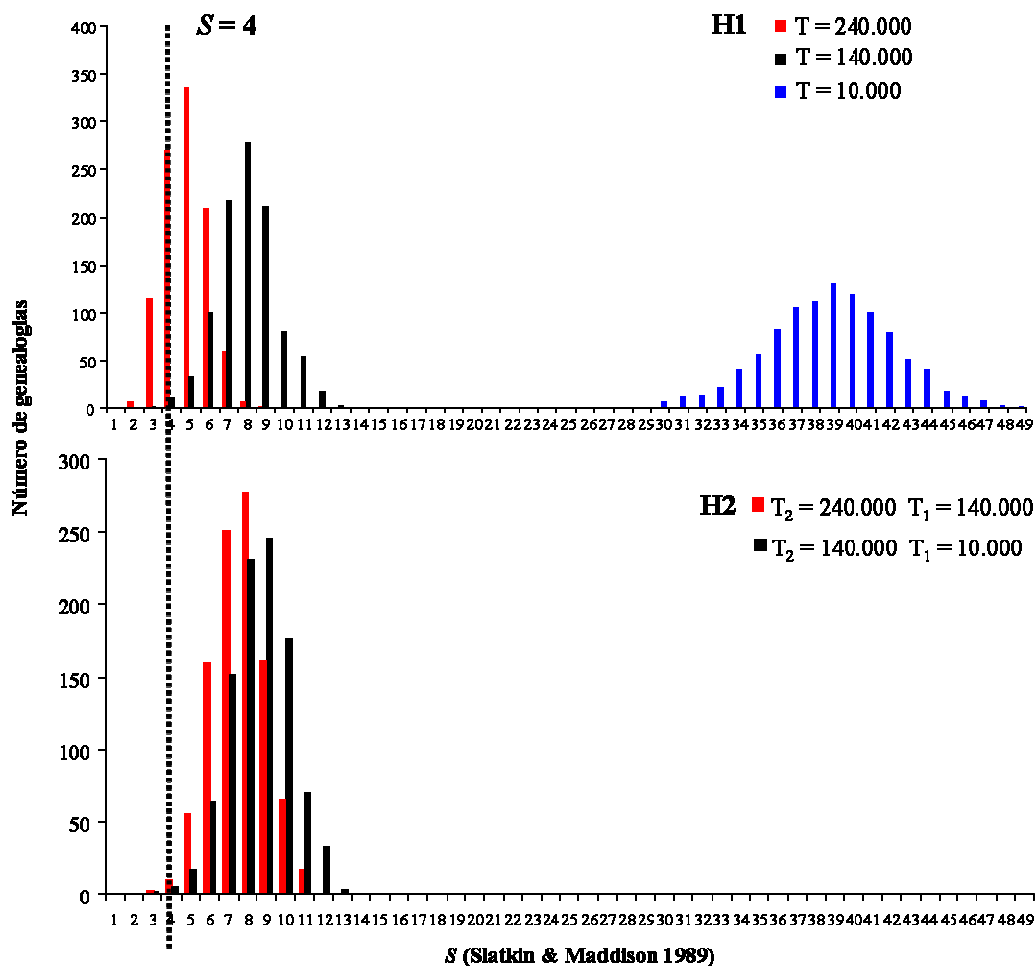


Figura 6. Testes das hipóteses filogeográficas comparando os valores de S observados para a genealogia bayesiana dos dados mitocondriais de *C. hominivorax* (linha ponteadada), com a distribuição dos valores de S obtidos nas simulações dentro dos modelos de divergência populacional. No primeiro gráfico estão apresentadas as distribuições estimadas para o modelo H1 e no segundo gráfico as distribuições para H2 (ver **Figura 2**).

As simulações realizadas mostram que apenas o modelo de fragmentação simultânea a partir de um ancestral comum amplamente distribuído (H1) há aproximadamente 240.000 anos não pode ser rejeitado (para θ médio, inferior e superior). A **Figura 6** apresenta as distribuições de S estimados para as hipóteses H1 e H2 com θ médio. As simulações rejeitaram a divergência posterior ao LGM (~10.000 anos atrás) para os dois modelos, além de rejeitar o modelo H2, em que as divergências populacionais

acontecem de forma seqüencial, com uma primeira divergência entre as populações de América Central e do Norte das de América do Sul.

É importante notar que esse cenário pode estar de acordo com os resultados da genealogia bayesiana e os tempos de divergência estimados (**Figura 2**), em que as estimativas de tempo de separação para os haplogrupos I, II e III se sobrepõem quando considerados os intervalos de confiança das estimativas. E por causa disso, podem não refletir a separação de NAG, SAG e NC em um momento único no passado, e sim a separação dos haplogrupos I, II e III (mesmo que o modelo tenha considerado valores populacionais para cada grupo). Portanto, a relação entre os grupos NAG e SAG deve ser reticulada refletindo as oscilações climáticas do Pleistoceno, e assim os eventos de separação e contato entre as duas regiões.

A demografia histórica de *C. hominivorax* foi investigada para haplogrupos (ou sub haplogrupos) inferidos na genealogia gênica com probabilidade posterior maior que 80%. Encontramos valores negativos e significativos de F_s e D para o haplogrupo III e sub-haplogrupos II-a e II-b (III: $F_s = -25,28$, $p < 0,0001$, $D = -1,90$, $p < 0,01$; II-a: $F_s = -6,65$, $p < 0,0001$, $D = -1,97$, $p < 0,05$; II-b: $F_s = -9,87$, $p < 0,0001$; $D = -1,92$, $p < 0,05$) indicando expansão populacional na América do Sul, como anteriormente identificado por Fresia *et al.* (no prelo). No haplogrupo I, que agrupa os indivíduos distribuídos na América Central e do Norte (NC), encontramos valores negativos significativos do F_s ($-13,40$, $p \leq 0,0001$) e valores não significativos do D ($p = 0,837$). A distribuição das diferenças pareadas foi analisada através da comparação das curvas observadas e esperadas para um modelo de expansão populacional recente. Os sub-haplogrupos II-a, II-b e o haplogrupo III mostraram distribuições unimodais e não diferem significativamente do modelo sugerido de expansão. O haplogrupo I apresentou uma distribuição bimodal, porém não se detectaram diferenças significativas com o modelo de expansão ($SSD = 0,227$, $rg = 0,109$, $p = 0,484$). Estes resultados se espelham na inferência feita na análise de BSP (*Bayesian skyline plot*), para cada haplogrupo (**Figura 7**). Nesta análise pudemos observar o crescimento do tamanho efetivo populacional do haplogrupo III, único que apresenta um valor elevado de F_s . Este clado é o mais amplamente distribuído agrupando indivíduos de NAG e SAG que ainda não apresentam sinais de divergência significativa, refletindo, portanto, a história e o processo

de expansão detectado para *C. hominivorax* na América do Sul (artigo 1 – Fresia *et al.* no prelo).

Os sub-haplogrupos II-a e II-b apresentam aumentos populacionais graduais moderados. Para II-a, esse resultado provavelmente está relacionado à distribuição geográfica restrita do mesmo (Venezuela e somente 2 amostras da Colômbia). Para II-b isso não é tão claro, já que este haplogrupo agrupa indivíduos do Centro-Oeste e do Nordeste do Brasil. O haplogrupo I apresenta uma diminuição e um aumento populacional recente. Porém, devido ao tamanho amostral e ao fato de que esses indivíduos foram mantidos no laboratório, provavelmente atravessando um gargalo populacional, é difícil fazer inferências sobre sua demografia histórica.

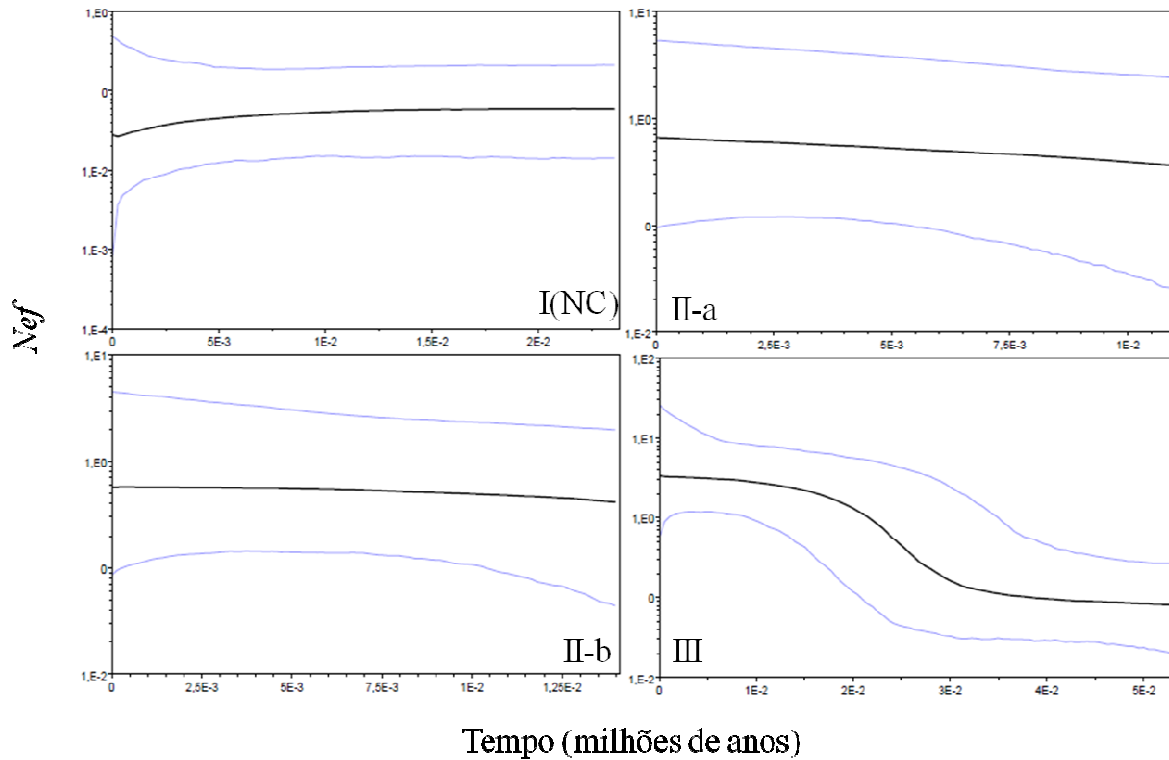


Figura 7. Bayesian Skyline Plot dos haplogrupos I, II-a, II-b e III de *C. hominivorax* (Figura 2). O eixo x representa o tempo em milhões de anos e o eixo y o tamanho efetivo relativo da população (N_{ef}). A linha negra representa à mediana, e as linhas azuis mostram os limites 95% HPD.

Os resultados obtidos nos permitem concluir que as populações de *C. hominivorax* têm atravessado períodos de separação e posterior contato nos distintos ciclos de aumento e diminuição da temperatura. Isto está de acordo com a hipótese de perturbação-vicariância (DV) em que se espera a estruturação das populações de espécies influenciadas por estes ciclos, mas com níveis baixos de divergência. A baixa divergência das seqüências mitocondriais se reflete na topologia da genealogia, na qual foi difícil observar clados que refletissem a estrutura geográfica de NAG e SAG previamente detectada (artigo 1), apesar dos haplogrupos II-a e II-b. Porém, estes últimos agrupam relativamente poucos indivíduos. A demografia histórica da espécie mostra um processo de expansão populacional no haplogrupo III o que pode ser responsável pela baixa diferenciação das populações de *C. hominivorax* na região norte e sul da América do Sul (Fresia *et al.* no prelo). As simulações permitiram estabelecer o momento de separação de NC em relação à NAG e SAG, porém o resultado sugere que modelos mais complexos que permitam incluir reticulação deveram ser considerados (ex. modelos de simulação baseados no ABC – *Approximate Bayesian Computation*).

A integração das distintas abordagens, como simulações de coalescência e a modelagem ecológica, permitiram avaliar o processo de divergência em *C. hominivorax*. As análises realizadas sugerem que as mudanças climáticas promoveram a separação, expansão e mistura das populações na região Amazônica nos diferentes ciclos ao longo do Pleistoceno. Estes processos históricos parecem ter inibido uma divergência maior que a observada atualmente em *C. hominivorax* mas não o fluxo gênico atual entre os grupos de populações.

Referências bibliográficas

- Avice, J.C. 2000.** Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Beheregaray, L.B., Havill, N., Gibbs, J., Fritts, T., Powell, J.R. & G. Caccone. 2004.** Giant tortoises are not so slow: rapid diversification and biogeographic consensus in the Galápagos. *PNAS*. 101: 6514-6519.
- Bertorelle, G. & M. Slatkin. 1995.** The Number of Segregating Sites in Expanding Human Populations, with Implications for Estimates of Demographic Parameters. *Mol. Biol. Evol.* 12(5): 887-892.
- Brower, A.V.Z. 1994.** Phylogeny of Heliconius butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae) *Mol. Phylogenet. Evol.* 3: 159-174
- Bush, M. 1994.** Amazonian speciation: a necessarily complex model. *J. Biogeogr.* 21: 5-17.
- Bush, M. 2005.** Of orogeny, precipitation, precession and parrots. *J. Biogeogr.* 32: 1301-1302.
- Bush, M.B., Miller, M.C., De Oliveira, P.E. & P.A. Colinvaux. 2002.** Orbital forcing signal in sediments of two Amazonian lakes. *J. Paleoclim.* 27: 341-352.
- Clapperton, C.M. 1993.** Quaternary geology and geomorphology of South America. Elsevier, Amsterdam.
- Colinvaux, P. 1993.** Pleistocene biogeography and diversity in tropical forests of South America. In: *Biological Relationships Between Africa and South America*, 16: 473-499. (ed. P. Goldblatt).
- Colinvaux, P.A. De Oliveira, P.E., Moreno, J.E., Miller, M.C. & M.B. Bush. 1996.** A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. *Science*. 274: 85-88.
- Colinvaux, P.A., De Oliveira, P.E. & M.B. Bush. 2000.** Amazonian and Neotropical plant communities on glacial timescales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. *Quaternary Sci. Rev.* 19: 141-169.
- Colinvaux, P.A., Irion, G., Räsänen, M.E., Bush, M.B. & J.A.S. Nunes de Mello. 2001.** A paradigm to be discarded: geological and paleoecological data falsify the Haffer & Prance refuge hypothesis of Amazonian speciation. *Amazoniana*. 16: 609-646.
- DeSalle, R. Freedman, T., Prager, E. & A.C. Wilson. 1987.** Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 26: 157-164
- Dev, Y., LaChance, L.E. & Whitten, C.J. 1986.** Polytene chromosomes, karyotype correlations and population cytology of the primaryscrewworm fly. *J. Hered.* 77: 427-434.
- Drummond, A. & A. Rambaut. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7: 214.
- Drummond, A., Rambaut, A., Shapiro, B. & O. Pybus. 2005.** Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1185-1192.

- Edwards, S.V. & P. Beerli. 2000.** Perspective: Gene divergence, Population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*. 54(6): 1839-1854.
- Elith, J. Graham, C.H., Anderson, R.P., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, R.J., Huettmann, F., Leathwick, J.R., Lehmann, A., Li, J., Lohmann, L.G., Loiselle, B.A., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, J.McC.M., Townsend Peterson, A., Phillips, S.J., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., Schapire, R.E., Soberón, J., Williams, S., Wisz, M.S., Zimmermann, N.E. 2006.** Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*. 29: 129-151.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & J.M. Quattro. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G. & S. Schneider. 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf.* 1: 47-50.
- Fresia, P., Lyra, M.L., Coronado, A. & A.M.L. Azeredo-Espin.** Genetic structure and demographic history of the New World Screwworm fly across its current geographic range. **no prelo.**
- Fu, Y. X. 1997.** Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147: 915-925.
- Garcia, R., Mendez, L., Serrano, E., Gil Morales, T. & M.J.B. Vreysen. 2007.** Insecticidal Wound Treatment of Livestock on Isla de la Juventud, Cuba: an efficient suppression method of New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* prior to the release of Sterile Insect, pp. 393-403. In M. J. B. Vreysen, A. S. Robinson and J. Hendrichs (eds.), Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Gradstein, F., Ogg, J. & A. Smith. 2004.** A geologic time scale. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
- Guimarães, J.H., Papavero, N. & A.P. do Prado. 1983.** As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1: 239-416.
- Guindon S. & O. Gascuel. 2003.** A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.
- Haffer, J. & G.T. Prance. 2001.** Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana*. 16: 579-607.
- Haffer, J. 1969.** Speciation in Amazonian forest birds. *Science*. 165: 131-137.
- Hewitt, G.M. 2000.** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405: 907-913.
- Hewitt, G.M. 2003.** Ice Ages: their impact on species distributions and evolution. In *Evolution on planet Earth* (ed. L. J. Rothschild & A. M. Lister), pp. 339-361. New York: Academic Press.
- Hewitt, G.M. 2004.** Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. London. Series B, Biol. Sci.* 359: 183-195.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P. & A. Jarvis. 2005.** Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Clim.* 25: 1965-1978.

- Hooghiemstra, H. 2001.** The continuing debate on the history of the Amazonian rain forest. *Amazoniana*. 16: 653-656.
- Kastner, T.P. & M.A. Goñi. 2003.** Constancy in the vegetation of the Amazon basin during the late Pleistocene: evidence from the organic matter composition of Amazon deep sea fan sediments. *Geology*. 31: 291-294.
- Klassen, W. & C. F. Curtis. 2005.** History of the sterile insect technique, pp.3-36. In V. A. Dyck, J. Hendrichs, and A. S. Robinson (eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Kuhner, M. K. 2006.** LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*. 22(6): 768-770.
- Lande, R., Engen, S. & B.E. Sæther. 2003.** *Stochastic population dynamics in ecology and conservation*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Lessa, E.P., Cook, J.A. & J.L. Patton. 2003.** Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *PNAS*. 100: 10331-10334.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Lyra, M.L., Klaczko, L.B. & A.M.L. Azeredo-Espin. 2009.** Complex pattern of genetic distribution in populations of the New World screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Med. Vet. Entomol.* 23: 32-42.
- Maddison, W. P. & D.R. Maddison. 2010.** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73 <http://mesquiteproject.org>
- Manel, S., Williams, H.C. & S.J. Ormerod. 2001.** Evaluating presence-absence models in ecology: the need to account for prevalence. *J. Appl. Ecol.* 38: 921-931
- Mangan, R.L. & D.B. Thomas. 1989.** Habitat preferences and dispersal patterns in native screwworm fly (Diptera:Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 332-339.
- Marjoram, P. & P. Donnelly. 1994.** Pairwise comparisons of mitochondrial-DNA sequences in subdivided populations and implications for early human-evolution. *Genetics*. 136: 673-683.
- Matlock, R.B.Jr. & S.R. Skoda. 2009.** Mark-recapture estimates of recruitment, survivorship and population growth rate for the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med. Vet. Entomol.* 23 (1): 111-125.
- Mayle, F.E.; Beerling, D.J.; Gosling, W.D. & M.B. Bush. 2004.** Responses of Amazonian ecosystems to climatic and atmospheric carbon dioxide changes since the Last Glacial Maximum. *Phil. Trans. R. Soc. London. Series B, Biol. Sci.* 359: 499-514.
- Megens, H.J., van Moorsel, C.H.M., Piel, W.H., Pierce, N.E. & R. de Jong. 2004.** Tempo of speciation in a butterfly genus from the Southeast Asian tropics, inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 1181-1196.
- Moritz, C. Patton, J.L., Schneider, C.J. & T.B. Smith. 2000.** Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 31: 533-563.
- Noonan, B.P. & P. Gaucher. 2006.** Refugial isolation and secondary contact in the dyeing poison frog *Dendrobates tinctorius*. *Mol. Ecol.* 15(14): 4425-4435.

- Parker, F.D., Welch, J.B. & R.B. Matlock, Jr. 1993.** Influence of habitat, season and attractant on adult behavior of the screwworm (Diptera: Calliphoridae) in tropical dry zone in Costa Rica. *J. Econ. Entomol.* 86: 1359-1375.
- Pearson, R.G., Raxworthy, C.J., Nakamura, M. & A.T. Peterson. 2007.** Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *J. Biogeogr.* 34: 102-117.
- Pennington, R.T., Prado, D.E. & C.A. Pendry. 2000.** Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *J. Biogeogr.* 27: 261-273.
- Pennington, R.T., Lavin, M., Prado, D.E., Pendry, C.A., Pell, S.K. & C.A. Butterworth. 2004.** Historical climate change and speciation: Neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary Diversification. *Phil. Trans. R. Soc. London. Series B, Biol. Sci.* 359: 515-538.
- Petit, J.R., J. Jouzel, D. Raynaud, N.I. Barkov, J.-M. Barnola, I. Basile, M. Bender, J. Chappellaz, M. Davis, G. Delayque, M. Delmotte, V.M. Kotlyakov, M. Legrand, V.Y. Lipenkov, C. Lorius, L. Pépin, C. Ritz, E. Saltzman, & M. Stievenard. 1999.** Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature.* 399: 429-436.
- Phillips, P.L., Welch, J.B. & M. Kramer. 2004.** Seasonal and Spatial and Distributions of Adult Screwworms (Diptera: Calliphoridae) in the Panama Canal Area, Republic of Panama. *J. Med. Entomol.* 41: 121-129.
- Phillips, S.R., Anderson, R.P. & R.E. Schapire. 2006.** Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* 190: 231-259.
- Posada D. 2008.** jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25(7): 1253-1256.
- Quijada-Mascareñas A, JE Ferguson, CE Pook, MG Salomão, RS Thorpe, & W Wüster. 2007.** Phylogeographic patterns of Trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: The Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. *J. Biogeogr.* 34: 1296–1312.
- Rambaut, A. & A.J. Drummond. 2007.** Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ray, N., Currat, M. & L. Excoffier. 2003.** Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Mol. Biol. Evol.* 20: 76–86.
- Rogers, A.R. & H. Harpending. 1992.** Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569.
- Rogers, A.R., Fraley, A.E., Bamshad, M.J., Watkins, W.S. & L.B. Jorde. 1996.** Mitochondrial mismatch analysis is insensitive to the mutational process. *Mol. Biol. Evol.* 13: 895-902
- Roehrdanz, R.L. 1989.** Intraspecific Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm Fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochem. Genet.* 27 (9-10): 551-569.
- Rull, V. 2008.** Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Mol. Ecol.* 17: 2722-2729.
- Schneider S. & L. Excoffier. 1999.** Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152(3): 1079-1089.

- Schneider, S., Roessli, D. & L. Excoffier. 2000.** Arlequin: A software for population genetics data analysis. <http://lgb.unige.ch/arlequin/>
- Slatkin, M. & Maddison, W.P. 1989.** A cladistic measure of gene flow inferred from phylogenies of alleles. *Genetics*. 123: 603-613.
- Suárez-Seoane, S., García de la Morena, E.L., Morales Prieto, M.B., Osborne, P.E. & E. de Juana. 2008.** Maximum entropy niche-based modelling of seasonal changes in little bustard (*Tetrax tetrax*) distribution. *Ecol. Model.* 219: 17-29.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.
- Tamura, K., J. Dudley, Nei, M. & S. Kumar. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thomas, D.B. & R.L. Mangan. 1989.** Oviposition and wound visiting behavior of the screw worm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 1140-1144.
- Thomas, D.B. 1993.** Behavioral aspects of screw worm ecology. *J. Kansas. Entomol. Soc.* 66: 13-30.
- Vanzolini, P.E. & E.E. Williams. 1970.** South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arq. Zool. S. Paulo.* 19: 1-298.
- Vivo, M. & A.P. Carmignoto. 2004.** Holocene vegetation change and the mammal faunas of South America and Africa. *J. Biogeogr.* 31: 943-957.
- Warren, D.L., Glor, R.E. & M. Turelli. 2008.** Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution.* 62: 2868-2883.
- Warren, D.L., Glor, R.E. & M. Turelli. 2010.** ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography.* 33: 607-611.
- Wüster, W., Ferguson, J.E., Quijada-Mascareñas, A., Pook, C.E., Salomao, M. da G. & R.S. Thorpe. 2005.** Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Mol. Ecol.* 14: 1095-1108.

ANEXO I: Localidade de ocorrência de *C. hominivorax* utilizadas para produzir o modelo de nicho ecológico. LGEA: Laboratório de Genética e Evolução Animal-UNICAMP.

	País	Estado	Localidade	Ano	Lat.	Long.	Referência
1	EUA	Texas	Brooks County	1976	27,03	-98,23	Whitten, 1980
2		Sonora	Sinaloa	1982–1985	28,58	-111,52	Roehrdanz, 1989
3		Tamaulipas	Gonzalez	1993	22,80	-98,70	Taylor <i>et al.</i> , 1996b
4		Veracruz	Panuco	1993	22,05	-98,17	Taylor <i>et al.</i> , 1996b
5		Colima	Colima	1980	19,23	-103,72	Krafsur & Whitten, 1993
6		Veracruz	Veracruz	1982-1985	19,20	-96,13	Roehrdanz, 1989
7		Colima	Manzanillo	1980	19,05	-104,32	Krafsur & Whitten, 1993
8	México	Quintana Roo	Calderitas	1985	18,55	-88,25	Thomas & Mangan, 1989
9		Quintana Roo	Chetumal	1982-1985/1984	18,50	-88,30	Roehrdanz, 1989 / LaChance & Whitten, 1986
10		Chiapas	Cintalapa	1994	16,92	-91,35	Taylor <i>et al.</i> , 1996b
11		Chiapas	Chiapa de Corzo	1994	16,70	-93,00	Taylor <i>et al.</i> , 1996b
12		Oaxaca	Jamiltepec	1983	16,28	-97,82	LaChance & Whitten, 1986
13		Chiapas	Arriaga	1982–1985	16,23	-93,90	Roehrdanz, 1989
14		Chiapas	Villa Flores	1983	16,23	-93,23	LaChance & Whitten, 1986
15		Chiapas	Palenque	1983	15,63	-92,65	LaChance & Whitten, 1986
16		Chiapas	Acapetuhua	1982–1983	15,28	-92,70	LaChance & Whitten, 1986
17	Guatemala	Guatemala	Guatemala	1982–1985	14,62	-90,53	Roehrdanz, 1989
18	Belize	Orange Walk	Orange Walk	1986	18,07	-88,55	Thomas & Mangan, 1989
19		Alajuela	Bijagua	1992/1993	10,73	-85,10	Taylor & Peterson II, 1994
20		Guanacaste	CR14	1993	11,03	-85,52	http://data.gbif.org/
21		Guanacaste	CR11	1991/1988	10,99	-85,43	http://data.gbif.org/
22		Guanacaste	CR12	1991	10,98	-85,54	http://data.gbif.org/
23		Guanacaste	CR8	1995	10,88	-85,41	http://data.gbif.org/
24		Guanacaste	CR7	1995	10,80	-85,68	http://data.gbif.org/
25	Costa Rica	Guanacaste	CR9	1996	10,76	-85,31	http://data.gbif.org/
26		Guanacaste	CR6	1993	10,58	-85,02	http://data.gbif.org/
27		Guanacaste	Cañas	1989	10,43	-85,10	Taylor <i>et al.</i> , 1996
28		Guanacaste	CR13	1997	10,01	-84,51	http://data.gbif.org/
29		Guanacaste	La Emilia	1992	10,42	-85,20	Taylor & Peterson II, 1995
30		Puntarenas	CR5	1997	9,75	-83,78	http://data.gbif.org/
31		Puntarenas	Montezuma	1992	9,65	-85,07	Taylor & Peterson II, 1996
32		Puntarenas	CR4	1992	9,39	-84,13	http://data.gbif.org/
33		Puntarenas	CR3	1998	8,92	-82,80	http://data.gbif.org/
34		Puntarenas	CR2	1998	8,53	-83,43	http://data.gbif.org/

35	Cuba	Pinar del Río	Pinar del Río	2007	22,42	-83,70	LGEA
36		Isla de la Juventud	Ciro Redondo	2007	21,88	-82,90	LGEA
37		Ciego de Ávila	Ciego de Avila	2007	21,84	-78,76	LGEA
38	Cuba	Las Tunas	Las Tunas	2005	20,96	-76,95	McDonagh <i>et al.</i> , 2009/ LGEA
39		Santiago de Cuba	Santiago de Cuba	2007	20,02	-75,82	LGEA
40		Guantanamo	Bahía de Guantanamo	1993	20,00	-75,13	Taylor <i>et al.</i> , 1996
41	Rep. Dom.	Santo Domingo	Santo Domingo	2006	18,47	-69,90	LGEA
42	Jamaica	Kingston	Kingston	2005	18,00	-76,79	LGEA
43	Trinidad &		Puerto España	2005	10,65	-61,52	LGEA
44	Tobago		Noreste	2005	10,53	-61,09	LGEA
45			San Fernando	2005	10,28	-61,47	LGEA
46		Falcón	Punto Fijo	2003	11,71	-70,20	LGEA
47		Distrito Federal	La Guaira	2003	10,60	-66,89	LGEA
48		Aroa	Experimento 1	2006	10,44	-68,88	Coronado & Kowalski, 2009
49	Venezuela	Lara	Carora	2003	10,18	-70,07	LGEA
50		Monagas	Caripe	2003	10,17	-63,50	LGEA
51		Lara	Sarare	2003	9,78	-69,17	LGEA
52		Encontrados	Experimento 2	2006	9,07	-72,24	Coronado & Kowalski, 2009
53		Merida	El Vígia	2003	8,62	-71,65	LGEA
54		Los Llanos	Experimento 3	2006	8,49	-69,83	Coronado & Kowalski, 2009
55	Colombia	Antioquia	Chigorodo	2007	7,68	-76,69	McDonagh <i>et al.</i> , 2009
56		Choco	Choco	2007	6,00	-77,00	McDonagh <i>et al.</i> , 2009
57		Esmeraldas	Atacames	2007	0,85	-79,84	LGEA
58		Manabí	Chone	2007	-0,70	-80,09	LGEA
59	Ecuador	Napo	Archidona	2007	-0,91	-77,80	LGEA
60		Cotopaxi	Pangua	2007	-1,18	-79,05	LGEA
61		Guayas	Colimes	2007	-1,55	-80,01	LGEA
62		Guayas	Rio Verde	2007	-2,32	-80,72	LGEA
63		Junin	Junín	2007	-12,07	-75,23	Baumgartner & Greenberg, 1983
64	Peru	Pasco	Pasco	2007	-10,68	-76,27	Baumgartner & Greenberg, 1983
65		Lambayeque	Chiclayo	2007	-6,77	-79,84	McDonagh <i>et al.</i> , 2009
66		Amazonas	Manaus	1991–1993	-3,10	-60,03	LGEA
67		Rio Grande do Norte	Touros	2008	-5,20	-35,46	LGEA
68		Pernambuco	Recife	1999–2002	-8,05	-34,88	Nascimento <i>et al.</i> , 2005
69		Pará	Sta M ^a das Barreiras	2005-2006	-8,87	-49,71	LGEA
70		Bahia	Irecê	2005	-11,30	-41,86	Almeida <i>et al.</i> , 2008
71	Brasil	Bahia	Morro do Chapéu	1991–1993	-11,55	-41,16	LGEA
72		Mato Grosso	Cocalinho	2005	-14,37	-51,00	LGEA

73		Mato Grosso	Poconé	1991–1993	-16,26	-56,62	LGEA
74		Gias	Goianira	2003	-16,50	-49,43	LGEA
75		Gias	Goiânia	2001-2002	-16,68	-49,25	LGEA
76		Gias	Caiapônia	2004-2006	-16,96	-51,81	LGEA
77		Mato Grosso do Sul	Costa Rica	2002	-18,54	-53,13	LGEA
78		Mato Grosso do Sul	Faz.Barra Mansa	2004	-19,59	-56,09	LGEA
79		Mato Grosso do Sul	Campo Grande	2004	-20,44	-54,65	LGEA
80	Brasil	Mato Grosso do Sul	Campo Grande	1986–1989	-20,45	-54,62	Gomes <i>et al.</i> 1998, EMBRAPA
81		Minas Gerais	S. Seb. do Paraíso	2004	-20,92	-46,99	LGEA
82		Minas Gerais	Estiva	2006	-22,46	-46,02	LGEA
83		Rio de Janeiro	Seropédica- UFRRJ	1994	-22,74	-43,71	Taylor <i>et al.</i> , 1996
84		São Paulo	Amparo	1992–1993	-22,70	-46,76	LGEA
85		São Paulo	Adamantina	1991–1993	-21,69	-51,07	LGEA
86		São Paulo	Pirassununga	1997	-22,00	-47,43	LGEA
87		São Paulo	Botucatu	1993–1993	-22,89	-48,45	LGEA
88		São Paulo	Valinhos	1992	-22,97	-47,00	LGEA
89		São Paulo	Caraguatatuba	1994–1993	-23,62	-45,41	LGEA
90		Paraná	Carambeí	2005	-24,92	-50,10	LGEA
91		Rio Grande do Sul	Sto. Ant. das Missões	2004	-28,51	-55,23	LGEA
92		Rio Grande do Sul	Fagundes Varela	2005	-28,88	-51,70	LGEA
93		Rio Grande do Sul	Porto Alegre	1981–1984	-30,03	-51,23	Oliveira CMB, 1986
94		Rio Grande do Sul	Pinheiro Machado	2005	-31,58	-53,38	LGEA
95		Rio Grande do Sul	Capão do Leão	1983–1986	-31,78	-52,42	Wiegand <i>et al.</i> , 1991
96	Paraguai	San Pedro	Santa Rosa	2005	-23,87	-56,57	LGEA
97		Paraguari	Ybitymí	2005	-25,77	-56,78	LGEA
98		Artigas	Est. "Bella Vista"	2008	-30,43	-56,75	LGEA
99		Paysandú	Dayman	2003-2009	-31,55	-57,95	LGEA
100		Tacuarembó	Valle Eden	2006	-31,83	-56,15	LGEA
101		Cerro Largo	Cañas	2008	-32,35	-53,78	LGEA
102		Cerro Largo	Tres Islas	2006-2009	-32,48	-54,65	LGEA
103	Uruguai	Rio Negro	Nuevo Berlin	2005	-32,98	-58,05	LGEA
104		Rocha	Chuy	2008	-33,68	-53,45	LGEA
105		Florida	Cerro Colorado	2003-2009	-33,87	-55,55	LGEA
106		Colonia	Carmelo	2005	-33,99	-58,29	LGEA
107		Colonia	La Estanzuela	2003-2009	-34,33	-57,72	LGEA
108		Canelones	Joaquín Suarez	2003-2009	-34,73	-56,04	LGEA
109		Jujuy	La Mendieta	2000-2002	-24,32	-64,97	Mariluis & Mulieri, 2003
110		Misiones	Pto. Iguazú	2000-2002	-25,60	-54,57	Mariluis & Mulieri, 2003

111	Chaco	Colonia Benítez	1991–1993	-27,32	-58,93	Cardona López <i>et al.</i> , 1994	
112	Chaco	Villa Angela	2000-2002	-27,58	-60,72	Mariluis & Mulieri, 2003	
113	Corrientes	Bella Vista	2000-2002	-28,50	-58,83	Mariluis & Mulieri, 2003	
114	Argentina	Cordoba	Capilla del Monte	2000-2002	-30,85	-64,52	Mariluis & Mulieri, 2003
115		Cordoba	La Para	2000-2002	-30,87	-62,98	Mariluis & Mulieri, 2003
116		Santa Fe	Rafela	200-2002/1997	-31,27	-61,48	Mariluis & Mulieri, 2003 / LGEA
117		Buenos Aires	San Isidro	2000-2002	-34,50	-58,58	Mariluis & Mulieri, 2003
118		Buenos Aires	Villa Elisa	2000-2002	-34,84	-58,10	Mariluis & Mulieri, 2003
119		Buenos Aires	Estación Lezama	2004	-35,87	-57,88	LGEA
120		La Pampa	INTA-Anguil	1994-1996/1999-2000	-36,52	-64,02	Suarez, 2002
121		Buenos Aires	Bahía Blanca	2000-2002	-38,72	-62,28	Mariluis & Mulieri, 2003

Artigo 3

Análise da variabilidade mitocondrial e de microssatélites em uma localidade da distribuição sul de *C. hominivorax*.

Pablo Fresia, Mariana L. Lyra, Rosangela Rodrigues, Ana Maria L. de Azeredo-Espin.

Resumo

Cochliomyia hominivorax é uma espécie praga da pecuária, endêmica das Américas. Esta espécie habita na borda de florestas e as fêmeas buscam feridas em animais nas áreas de pastagens onde ovipor, pelo que se dispersam por distâncias que variam entre um e aproximadamente 20 km. Este representa o primeiro trabalho em que se analisa a variabilidade genética e a estrutura populacional numa escala microgeográfica. O objetivo foi buscar a menor escala em que a diferenciação pudesse ocorrer. Usando oito *loci* de microssatélites e seqüências da região controle (CR) e COII do DNA mt , foi investigada a variabilidade genética e a diferenciação entre 25 sítios de coleta em uma localidade da fronteira entre Brasil e Uruguai. Não foram identificados sinais de estruturação genética nesta escala para os marcadores mitocondriais ou nucleares, porém índices de variabilidade significativos foram observados. As análises realizadas sugerem que os 25 sítios de coleta pertencem a uma única população, mas há evidências de que estas amostras não estão em equilíbrio. Dessa forma, a interpretação de ausência de estruturação baseada nas estimativas tradicionais de estruturação deve ser feita com cuidado.

Palavras-chave: *Cochliomyia hominivorax*, DNA mitocondrial, microssatélites, escala populacional local.

Introdução

A identificação de subdivisão de uma espécie em populações geneticamente distintas é um problema comum em biologia evolutiva (Avice 2000, 2004). Quando medida através de marcadores moleculares neutros, a estrutura genética das populações é o resultado de interações históricas entre o efeito de homogeneização da migração e a diferenciação devido à deriva genética (Tatarenkov *et al.* 2010). A migração determina o nível de fluxo gênico entre as populações, afetando o tamanho das populações genéticas locais (Wright 1943), além dos processos de adaptação local e especiação (Endler 1977, Dieckmann *et al.* 1999). Também incide na dinâmica e persistência das populações, podendo ser vital na manutenção de populações viáveis, já que possibilita a re-colonização de áreas em que foram localmente extintas (Hanski 1998). Portanto, estabelecer a menor escala em que a diferenciação genética ocorre é importante para entender estas interações.

O manejo eficiente de uma praga requer o controle de todas as populações numa área geográfica delimitada, sendo esta área de um tamanho mínimo suficientemente grande para que a dispersão natural só ocorra dentro da mesma (Klassen 2005). Knipling (1972) tem mostrado que a sobrevivência de uma pequena fração da população (1% da população original) é suficiente para que em poucas gerações (aproximadamente quatro), a praga recupere uma densidade capaz de causar danos econômicos. Desta forma, a estrutura populacional e o conhecimento dos padrões de fluxo gênico (i.e. taxas de dispersão) são necessários para desenvolver estratégias efetivas de controle de uma praga (Tabachnick & Black 1995).

Cochliomyia hominivorax (Diptera: Calliphoridae) é um ectoparasito endêmico das Américas, que por ter ciclo de vida em que a fase de larva se alimenta obrigatoriamente de tecido vivo de vertebrados de sangue quente, causa severos prejuízos econômicos à pecuária na América do Sul e o Caribe (Guimarães *et al.* 1983, Guimarães & Papavero 1999). Esta espécie habita o ecótono entre as florestas e pastagens (Phillips *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2007), e pelo fato das fêmeas terem que buscar feridas de hospedeiros para ovipositarem, a dispersão é um componente importante da história de vida da espécie (Krasfur *et al.* 1979, Thomas & Mangan 1989).

Como estes sítios de oviposição não têm uma localidade geográfica definida e previsível, as fêmeas são o sexo com maior capacidade de dispersão. Mayer & Aztemi (1993), analisando dados de liberação e recaptura, mostraram que *C. hominivorax* se dispersa por distâncias relativamente curtas em ambientes favoráveis (fêmeas: 2,85 km, machos: 1,25 km, em média), aumentando aproximadamente oito vezes em ambientes menos favoráveis (fêmeas: 22,07 km, machos: 9,64 km, em média). Estes autores concluíram que as distâncias de dispersão são dependentes das condições do habitat local.

Os trabalhos prévios, em que se analisou a variabilidade genética da espécie no Uruguai, não identificaram estruturação genética das populações com PCR-RFLP (Lyra *et al.* 2005) ou encontraram diferenciação baixa, porém significativa, com microssatélites (Torres *et al.* 2007). A proposta deste trabalho foi investigar, pela primeira vez, a estrutura genética de *C. hominivorax* em uma pequena escala geográfica (área de 90 por 60 Km) usando como marcadores seqüências do DNAm^t e microssatélites.

Material e Métodos

Amostragem

Um total de 201 larvas de *C. hominivorax* foi coletado no mês de Fevereiro de 2009 em feridas de ovinos e bovinos em 25 sítios, distribuídos numa área de 90 por 60 Km na fronteira entre Brasil e Uruguai, próximo às cidades de Artigas e Quaraí. Na **Figura 1** está indicada a localização geográfica dos sítios de coleta.

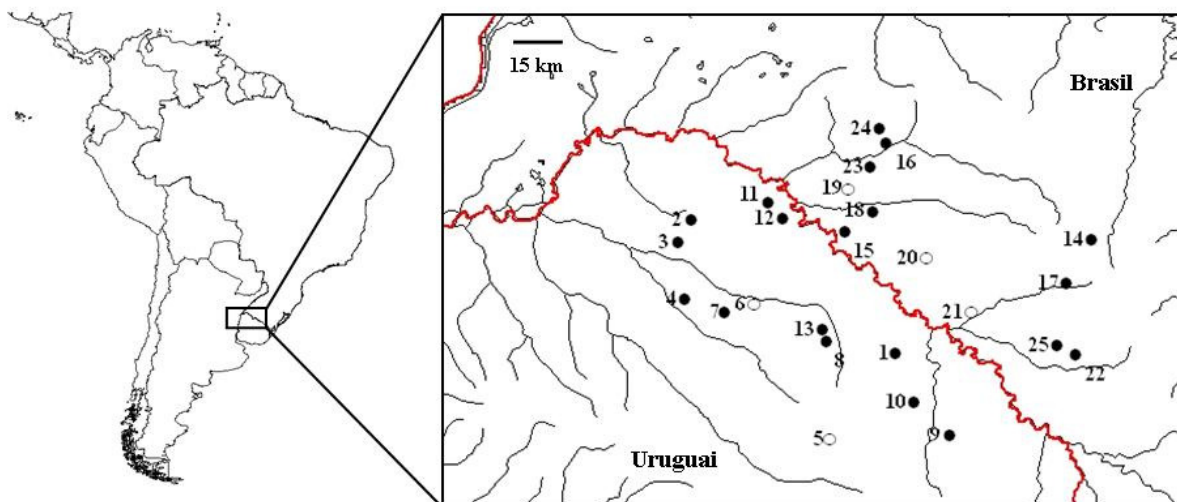


Figura 1. Sítios de coleta de *C. hominivorax* na fronteira entre Brasil e Uruguai. Os círculos pretos indicam os sítios de coleta com amostras analisadas para ambos os marcadores (seqüências mitocondriais e microsatélites) e os círculos em branco indicam os pontos analisados unicamente com seqüências mitocondriais.

Extração de DNA e obtenção dos dados

A extração do DNA total foi realizada com o método fenol/clorofórmio adaptado para tubos eppendorff (Lyra *et al.* 2009). O DNA foi extraído de apenas uma larva por ferida e armazenado a -20°C.

Os fragmentos mitocondriais da região controle (CR – 444pb) e da subunidade II do gene da Citocromo oxidase c (COII – 493pb) foram amplificados e seqüenciados seguindo os procedimentos descritos em Fresia *et al.* (no prelo).

Oito locos polimórficos de microssatélites foram escolhidos para caracterizar a variabilidade genética nuclear destas amostras (Torres *et al.* 2004, 2005 – CH01, CH05, CH09, CH12, CH14, CH15, CH24 e CH26). Cada loco foi amplificado por PCR de forma independente usando 3 μ l de DNA, 10x de tampão de PCR, 1,0 mM de $MgCl_2$, 10 μ g de BSA, 0,25 de cada dNTP, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo e 0,5U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Internacional Inc., Canadá) num volume final de 10 μ l. Os ciclos das PCR consistiram em um ciclo inicial de desnaturação a 94°C durante 3 min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min., 54-58°C por 1 min. e 72°C por 1 min., mais um passo final de extensão a 72°C por 20 min. Os produtos das reações foram verificados em géis desnaturantes de poliacrilamida 6% e os alelos foram visualizados por coloração com nitrato de prata.

Análise dos dados mitocondriais

As seqüências de CR e COII foram alinhadas, independentemente, usando o algoritmo de alinhamento automático de múltiplas seqüências no programa ClustalX (Thompson 1997). Para o fragmento CR, cada polimorfismo foi verificado manualmente no cromatograma, e cada inserção/deleção (*indel*) foi considerada como um único passo mutacional e recodificada como posições únicas no alinhamento final. Para COII, cada polimorfismo foi verificado manualmente no cromatograma e a tradução para proteína foi realizada no programa Mega versão 4.0 (Tamura *et al.* 2007) para confirmação do quadro de leitura. As seqüências de CR e COII foram comparadas com as seqüências obtidas em trabalhos anteriores (artigo 1 - Fresia *et al.* no prelo; artigo 2 - em preparação) para identificação dos haplótipos. A distância genética p , não corrigida entre os haplótipos, foi estimada no programa Mega versão 4.0 (Tamura *et al.* 2007), as estimativas de diversidade haplotípica (\hat{H}) e nucleotídica (π) foram feitas usando o programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). As relações filogenéticas para as seqüências dos dados combinados (CR-COII) foram estabelecidas através de redes de haplótipos construídas no programa TCS versão 1.21 (Clement *et al.* 2000).

A diferenciação genética mitocondrial entre as populações foi determinada usando os valores de F_{ST} entre pares de localidades (Reynolds *et al.* 1983, Slatkin 1995), e

a significância estatística avaliada através de 10.000 permutações. A estrutura geográfica foi analisada usando Samova versão 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002) utilizando os parâmetros pré-definidos pelo programa e com valores de k variando entre 2 e 10, sendo k o número de grupos de populações dado *a priori*. O programa Samova define grupos de populações geograficamente homogêneos, levando em consideração a variação genética e localização geográfica, que maximizam a proporção da variância genética total devido a diferenças entre grupos de populações. O grau de estruturação entre os sítios amostrados foi interpretado através dos índices F associados aos diferentes níveis hierárquicos em que se distribui a variação (F_{CT} = diferenciação entre grupos, F_{SC} = diferenciação entre sítios dentro dos grupos e F_{ST} = diferenciação entre sítios entre grupos).

Finalmente, a história demográfica foi interpretada utilizando-se diferentes abordagens. A distribuição das diferenças pareadas entre as seqüências (*mismatch distribution analysis*) foi analisada, sendo que em geral dados com distribuições unimodais indicam uma expansão recente, e multimodais, estabilidade demográfica (Excoffier *et al.* 1992; Rogers & Harpending 1992; Rogers *et al.* 1996; Schneider & Excoffier 1999). Uma distribuição multimodal também pode indicar que a população está influenciada por migração, é subdividida e/ou atravessou uma contração histórica (Marjoram & Donnelly 1994, Bertorelle & Slatkin 1995, Ray *et al.* 2003). O ajuste a um modelo de expansão populacional foi calculado a partir da soma dos desvios quadrados (SSD) e o índice *Raggedness* (rg), com a significância avaliada por 10.000 permutações. Como outras estimativas das mudanças do tamanho efetivo das populações (N_{ef} - tamanho efetivo das fêmeas para dados mitocondriais), o D de Tajima (Tajima 1989) e o F_s de Fu (Fu 1997) foram calculados. Para ambos os testes, se esperam valores próximos a zero se os tamanhos das populações têm se mantido estáveis, valores negativos significativos se as populações atravessaram uma expansão populacional recente e valores positivos significativos se as populações experimentaram gargalos (Tajima 1989, Fu 1997). Os testes de neutralidade, as distribuições pareadas e a significância estatística, avaliada por 10.000 permutações, foram estimados no programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

Finalmente, examinamos a dinâmica da variação populacional ao longo do tempo através de um gráfico bayesiano (*Bayesian Skyline Plot*) gerado no programa Beast

versão 1.6 (Drummond *et al.* 2005, Drummond & Rambaut 2007). Para tanto, três cadeias foram corridas independentemente por 15 milhões de gerações e os parâmetros foram amostrados a cada 1500 passos. Os primeiros 10% foram descartados como aquecimento de cadeias e as corridas independentes foram somadas e comparadas no programa Tracer (Rambaut & Drummond 2007, Tracer v1.5, disponível no endereço eletrônico <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). Utilizamos o modelo de evolução nucleotídica HKY + G para o fragmento de CR e HKY + I para COII, conforme selecionado pelo programa jModeltest (Guindon & Gascuel 2003, Posada 2008). A taxa de evolução utilizada foi de 2,5% estimada para o gene COII no programa Beast versão 1.6 (Drummond *et al.* 2005, Drummond & Rambaut 2007), usando como referência as seqüências do gene COI obtidas em Fresia *et al.* (no prelo) e a taxa de evolução de 2% por milhão de ano.

Análises dos dados de microssatélites

A variabilidade genética dos oito *loci* de microssatélites foi avaliada através da heterozigosidade observada e esperada, assim como através do número médio de alelos para cada *locus*. A riqueza alélica (*allelic richness*, R_A) de cada população foi calculada no programa Fstat versão 2.9.3.2 (Goudet 1995) de acordo com Goudet *et al.* (1996), uma vez que dessa forma é possível comparar a variabilidade entre as diferentes localidades independente do tamanho da amostra. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados para cada *locus* usando o programa Genepop versão 4.0 (Rousset 2008). Uma estimativa não enviesada da probabilidade exata foi obtida usando o modelo de cadeia de Markov de Guo e Thompson (1992), com base nos seguintes parâmetros: 100 séries de 10.000 iterações com 10.000 passos de “desmemorização”. O desequilíbrio de ligação entre pares de *loci* dentro de cada população foi investigado usando o programa Genepop versão 4.0 (Rousset 2008). O *P*-valor foi estimado como a proporção das estatísticas obtidas sobre um conjunto de dados gerados aleatoriamente que é maior ou igual à observada nos dados originais. A significância estatística para testes simultâneos foi corrigida usando o procedimento seqüencial de Bonferroni (Rice 1989).

A frequência de alelos nulos, devidos à amplificação preferencial de alelos menores e possíveis erros de genotipagem pela presença de bandas fantasmas, foram verificados no programa Microchecker (Van Oosterhout *et al.* 2003).

A distribuição da variabilidade genética foi analisada através de uma estimativa não enviesada de F_{ST} global, θ (Weir & Cockerham 1984) calculada no programa Fstat (Goudet 1995). A diferenciação entre pares de populações também foi estimada a partir da variância nas frequências alélicas segundo Weir & Cockerham (1984). A significância estatística das estimativas de F_{ST} global e as pareadas foram testadas permutando genótipos entre as localidades (Goudet *et al.* 1996). A estrutura populacional foi também investigada usando a análise de agrupamento bayesiana implementada no programa Structure versão 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000).

Reduções recentes no tamanho efetivo das populações foram testadas no programa Bottleneck versão 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996, Piry *et al.* 1999) calculando estatísticas para os três modelos de mutação (SMM – *Stepwise Mutation Model*, TPM – *Two-phase Model* e IAM – *Infinite Allele Model*). A hipótese de que a diferença entre as diversidades gênicas esperadas e observadas para cada população não é significativamente diferente de zero foi testada através do teste *Wilcoxon signed-rank*.

Resultados e Discussão

Dentre os 201 indivíduos analisados, foram identificados 69 haplótipos para as seqüências de CR, sendo que 42 são novos em comparação com os haplótipos identificados anteriormente em *C. hominivorax* (artigo 1 - Fresia *et al.*, no prelo e artigo 2). Para as seqüências de COII, foram identificados 30 haplótipos, sendo que 21 são novos. Essa comparação entre haplótipos foi realizada considerando apenas as seqüências CR e COII dos trabalhos anteriores. A combinação das seqüências de CR e COII resultou em 89 haplótipos mitocondriais, sendo que 62 são haplótipos novos (**Tabela 1**). A distância genética média (p não corrigida) entre os haplótipos combinados variou de 0 a 0,0165. Na **Tabela 1** se mostra a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade haplotípica (\hat{H}) dos dados combinados para cada sítio de coleta e para todos os indivíduos agrupados. A diversidade nucleotídica por sítio de coleta foi baixa, variando entre 0,05% a 0,9%, com um valor de

0,06% para todos os indivíduos agrupados. A diversidade haplotípica (\hat{H}) foi alta variando de 0,5 a 1, sendo que \hat{H} foi maior que 0,8 em 22 dos 23 sítios de coleta onde este índice foi calculado e $\hat{H} = 0,9$ para todos os indivíduos agrupados. O valor de $\hat{H} = 0,5$ foi obtido no sítio de coleta 18 (BrS) onde quatro indivíduos foram analisados, mas três apresentaram um único haplótipo (140, o mais freqüente na amostra). Estes valores são característicos de populações que experimentaram um evento de expansão recente a partir de um tamanho efetivo populacional pequeno (Avise 2000).

Entre os 89 haplótipos identificados, para as seqüências combinadas, 65 são únicos e 24 apareceram em mais de um indivíduo. Os haplótipos 140 (22%) e 78 (12%) foram os mais freqüentes e estiveram presentes em todos os sítios, exceto os sítios 19 (BrFSRdJ), 20 (BrB), 21 (BrFNQ) e 22 (BrSI). Estes haplótipos são os mais freqüentes entre as populações de *C. hominivorax* distribuídas ao sul da região Amazônica, dentro do grupo denominado SAG em Fresia *et al.* (no prelo).

Tabela 1. Variabilidade genética de *C. hominivorax* nos sítios amostrados, investigada através das seqüências do DNAm. N_h , número de haplótipos por localidade, \hat{H} (s.d.), diversidade haplotípica (desvio padrão) e π (s.d.) diversidade nucleotídica (desvio padrão).

Sítios	ID do sítio	N	Haplótipos (inds)	N_h	\hat{H} (s.d.)	π (s.d.)
1	UyRdC	11	78(2), 99, 140(2), 252, 253, 254, 255, 256, 257	9	0,9636 (0,0510)	0,006774 (0,003933)
2	UyOH	3	51, 140, 258	3	1,0000 (0,2722)	0,007270 (0,005886)
3	UyMC	18	43(2), 50, 51, 78, 111(2), 119(2), 140(4), 187, 237, 259, 260, 261	12	0,9412 (0,0388)	0,006165 (0,003468)
4	UyAU	4	50, 140, 187, 262	4	1,0000 (0,1768)	0,005271 (0,003876)
5	UyO	1	140	1	--	--
6	UySLM	7	78, 140(2), 263, 264, 265	5	0,8571 (0,1371)	0,007374 (0,004533)
7	UyRJS	16	51, 78(2), 111, 119, 121, 140(5), 232, 235, 238, 266, 267	11	0,9083 (0,0633)	0,004898 (0,002851)
8	UyRLM	10	2(2), 14, 140(2), 162, 187, 238, 268, 269	8	0,9556 (0,0594)	0,006495 (0,003828)
9	UyMM	12	51, 78(2), 140(3), 235, 270, 271	8	0,9091 (0,0649)	0,005320 (0,003140)
10	UyGR	4	78(2), 140, 179	3	0,8333 (0,2224)	0,006180 (0,004473)
11	UyACN	7	19, 78, 140, 232(2), 272, 273	6	0,9524 (0,0955)	0,006439 (0,004008)
12	UyAdS	17	19(2), 78, 89, 99, 118, 121, 140(4), 179, 274, 275, 276, 277, 278	13	0,9485 (0,0435)	0,005501 (0,003145)
13	UyFJS	16	78(2), 140(2), 144(2), 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291	14	0,9833 (0,0278)	0,006334 (0,003581)
14	BrFSMA	14	57, 78(6), 140(4), 184, 233, 239	6	0,7692 (0,0895)	0,005387 (0,003131)
15	BrFSV	9	51, 78, 187, 240, 241, 242, 243, 244, 245	9	1,0000 (0,0524)	0,006089 (0,003662)
16	BrFST	9	43, 50, 136, 140(2), 159, 187, 193, 246	8	0,9722 (0,0640)	0,005543 (0,003367)
17	BrAC	5	3, 50, 140(3)	3	0,7000 (0,2184)	0,004144 (0,002925)
18	BrS	4	140(3), 223	2	0,5000 (0,2652)	0,000545 (0,000676)
19	BrFSRdJ	2	111, 223	2	1,0000 (0,5000)	0,008724 (0,009253)
20	BrB	1	234	1	--	--
21	BrFNQ	3	43, 235, 236	3	1,0000 (0,2722)	0,009078 (0,007237)
22	BrSI	2	51, 187	2	1,0000 (0,5000)	0,007634 (0,008161)
23	BrFCdJ	14	43, 50, 78(2), 140(2), 184, 231(2), 233, 236(2), 237, 248	10	0,9560 (0,0377)	0,005656 (0,003270)
24	BrFdQ	8	43, 78, 182, 231, 234, 249, 250, 251	8	1,0000 (0,0625)	0,008529 (0,005063)
25	BrSMdS	4	69, 140, 175, 247	4	1,0000 (0,1768)	0,007270 (0,005188)
	TOTAL	201		89	0,9327 (0,0126)	0,005887 (0,003152)

Na **Tabela 2** estão descritos os índices de diversidade genética dos marcadores nucleares (microssatélites) para cada sítio de coleta. O número total de alelos por *locus* variou entre sete e 16, com uma média de 10,9 alelos. Dentro de cada sítio de coleta o número médio de alelos por *locus* variou entre 3,3 e 7,1, com os valores mínimos (3,3-3,6) ocorrendo nos sítios 4 (UyAU), 18 (BrS), 21 (BrFNQ) e 25 (BrSMdS). O índice riqueza de alelos (R_A) variou entre 2,9 e 3,8, e não se detectou diferenças significativas entre os sítios de coleta nos testes de permutação realizados no Fstat. A heterozigosidade média esperada (H_E) foi alta e similar na maioria dos sítios de coleta (0,63-0,79).

Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada *locus* e sítio de coleta na direção de deficiência de heterozigotos foram observados em 34 casos (**Tabela 2**), sendo que 13 permaneceram significativos depois da correção seqüencial de Bonferroni ($\alpha = 0,05$). A maioria dos desvios (28 dos 34) envolveu os *loci* CH01, CH09, CH14 e CH15. O teste de HWE global considerando os oito *loci* foi significativo em 18 das 20 localidades, mesmo após a correção de Bonferroni.

Poucos indícios de desequilíbrio de ligação genotípica entre qualquer par de *loci* foram encontrados. Entre as 403 comparações pareadas, excluindo os casos em que não foi possível realizar comparações, 12 foram significativas ao nível de $P < 0,05$. Depois da correção de Bonferroni para múltiplos testes, cinco comparações continuaram sendo significativas. Esses casos significativos apresentaram uma distribuição ao acaso entre os sítios de coleta e os pares de *loci*.

Tabela 2. Variabilidade genética de *C. hominivorax* nos sítios de coleta, investigada através de microssatélites. *A*, número médio de alelos por *locus*; R_A riqueza de alelos; H_E e H_O , heterozigosidade esperada e observada, respectivamente; F_{IS} , coeficiente de endogamia para todos os *loci* e para cada *locus* individual. Os desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg estão indicados com asteriscos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) e os valores em negrito representam os que permaneceram significativos após a correção de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

Sítio	ID do sítio	N	A	R_A	H_E	H_O	F_{IS}								
							8 locos	CH01	CH05	CH09	CH12	CH14	CH15	CH24	CH25
1	UyRdC	10	5,38	3,31	0,67	0,50	0,26 ***	0,05	-0,15	0,54	0,15	-0,08	0,75 ***	0,32	0,33**
3	UyMC	20	7,13	3,50	0,65	0,44	0,33 ***	0,17	0,10	0,61 **	0,40	0,64 ***	0,47 ***	0,43*	0,00
4	UyAU	4	3,38	3,13	0,71	0,69	0,04	-0,06	-0,50	0,33	0,45	-0,41	0,43	-0,20	-0,14
6	UySLM	7	4,75	3,61	0,67	0,52	0,24 ***	0,23	-0,09	0,81 **	0,35	-0,02	0,14	0,52	-0,11
7	UyRJS	20	7,00	3,31	0,67	0,53	0,22 ***	0,51 ***	-0,15	0,42	0,18*	0,49 ***	0,31 ***	0,19	-0,06
8	UyRLM	13	5,63	3,48	0,65	0,44	0,25 ***	0,55**	-0,02	0,56**	0,12	0,33	0,63 ***	-0,13	-0,15
9	UyMM	9	5,13	3,21	0,64	0,47	0,28 ***	0,47	-0,06	-0,07	0,12	0,29*	0,83 ***	0,47	0,12
10	UyGR	4	4,38	3,75	0,79	0,63	0,15*	0,73	-0,14	-0,50	0,10	0,45	0,37	0,00	-0,14
11	UyACN	6	4,25	3,27	0,65	0,54	0,18*	0,00	0,39	-0,11	0,06	1,00**	-0,16	-0,29	0,22
12	UyAdS	18	6,00	3,19	0,61	0,47	0,24 ***	0,25	-0,11	0,39	0,20	0,03	0,67 ***	0,49**	0,15*
13	UyFJS	14	6,00	3,41	0,69	0,62	0,11*	0,13	-0,08	0,53**	-0,12	0,13	0,24	0,14	-0,05
14	BrFSMA	15	6,63	3,32	0,68	0,53	0,24 ***	0,21**	0,131	0,41**	0,09	0,51**	0,59	0,23	-0,08
15	BrFSV	10	5,50	3,46	0,67	0,54	0,21 ***	0,49**	0,23	0,31*	0,11	0,46*	0,20	-0,03	0,03
16	BrFST	8	5,38	3,50	0,70	0,64	0,09	0,08	0,05	0,19	-0,03	0,63	0,17	0,13	-0,12
17	BrAC	5	4,00	3,40	0,75	0,53	0,33 ***	0,56*	-0,33	1,00*	0,03	0,14	1,00**	-0,03	0,03
18	BrS	4	3,63	3,13	0,66	0,47	0,32**	0,63	0,37	-0,29	0,20	0,67	0,50	0,63	-0,04
21	BrFNQ	4	3,25	2,91	0,63	0,50	0,24*	0,70*	-0,5	-0,09	0,40	-0,20	1,00	0,10	0,14
23	BrFCdJ	14	6,38	3,40	0,69	0,49	0,29 ***	0,46 *	-0,12	0,25	0,12	0,59 ***	0,78	0,07*	0,16
24	BrFdQ	9	5,00	3,24	0,68	0,54	0,21*	0,34	0,04	-0,07	0,18	0,37	0,66**	0,14	-0,02
25	BrSMdS	4	3,50	3,13	0,65	0,50	0,27**	-0,29	0,45	-0,20	0,33	1,00	0,60	0,00	0,18
	TOTAL	198					0,24 ***	0,30 ***	-0,01	0,39 ***	0,17 ***	0,40 ***	0,51 ***	0,22**	0,03**

A estimativa do F_{ST} global para *C. hominivorax* nos 25 sítios de coleta, calculada com as seqüências CR e COII combinadas, foi baixa ($F_{ST} = 0,10$) e não significativa ($P > 0,05$). Os F_{ST} pareados estimados variaram entre 0 - 0,38 (**Figura 2**), sendo significativos em seis dos 300 testes pareados. As estimativas entre 18 (BrS) - 15 (BrFSV) ($F_{ST} = 0,38$), 18 (BrS) - 21 (BrFNQ) ($F_{ST} = 0,34$), 18 (BrS) - 14 (BrFSMA) ($F_{ST} = 0,29$) e 18 (BrS) - 24 (BrFdQ) ($F_{ST} = 0,28$) foram os maiores valores observados. Apesar destas comparações pareadas serem significativas, todas incluem a localidades BrS onde foram amostrados unicamente quatro indivíduos e dois haplótipos.

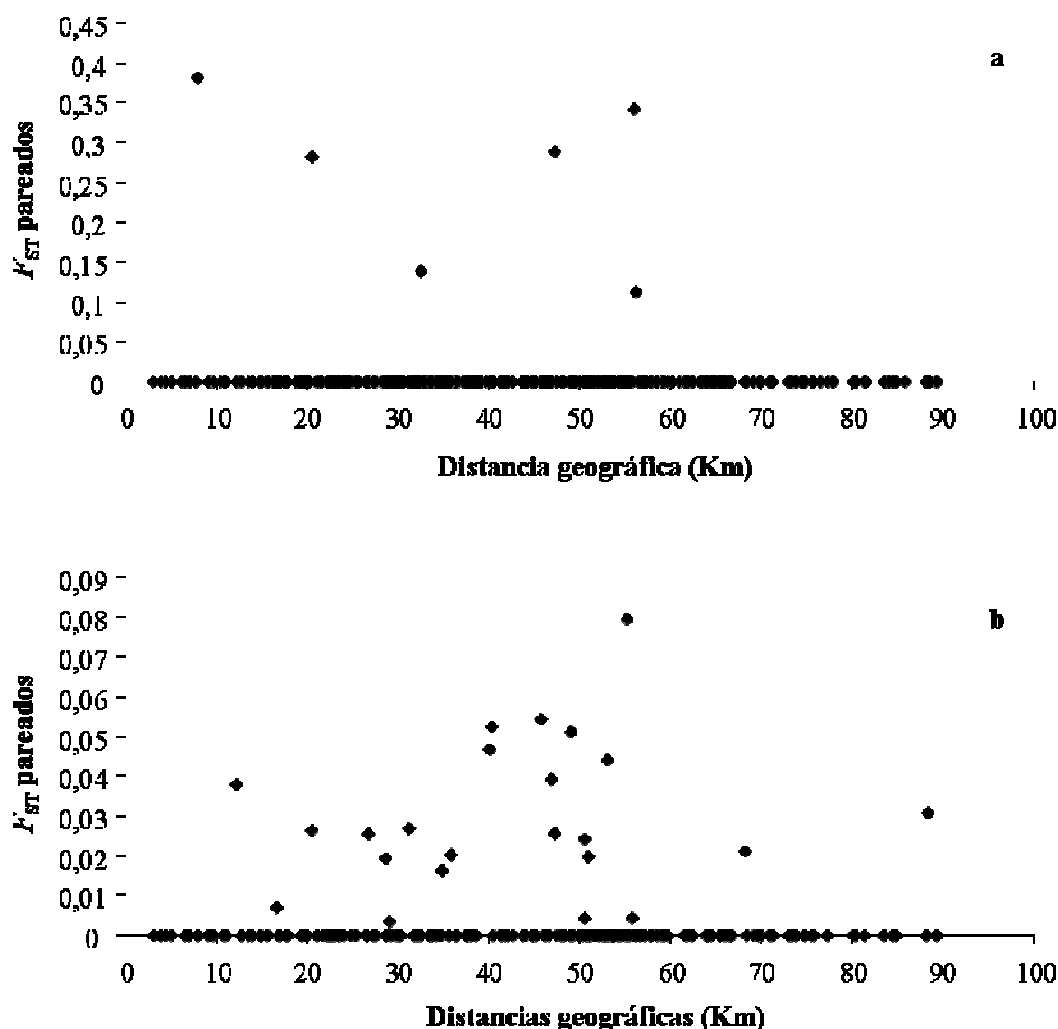


Figura 2. Estimativas de F_{ST} versus a distância geográfica entre sítios de coleta. **a)** dados mitocondriais concatenados (CR-COII); **b)** dados de microssatélites.

A exploração da estrutura geográfica realizada através do Samova não mostrou nenhum agrupamento estatisticamente significativo dos 25 sítios de coleta (**Figura 3**). Esta análise força a formação de grupos geográfica e geneticamente homogêneos e testa a significância dos mesmos através de uma análise molecular da variância (AMOVA). Apesar de significativo, no agrupamento de $k = 2$ um dos grupos está conformado pela localidade 20 (BrB) que só tem um indivíduo amostrado. Para $k = 3$, aos dois grupos anteriores se soma um terceiro que inclui os sítios 5 (UyO) e 18 (BrS), o que parece ocorrer devido a um efeito da amostragem e não à estruturação genética dos sítios de coleta.

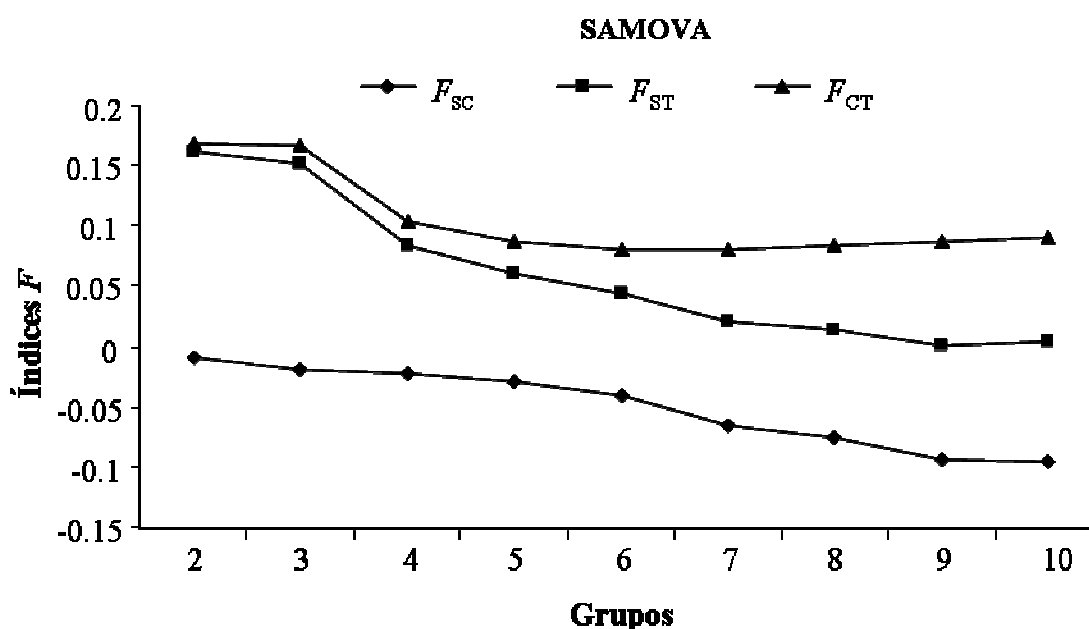


Figura 3 Valores dos índices de fixação obtidos no Samova para as seqüências do DNA mt como função do número de grupos de sítios de coleta k . F_{CT} , diferenciação entre grupos; F_{SC} , diferenciação entre sítios de coleta dentro dos grupos; F_{ST} , diferenciação entre sítios de coleta entre grupos.

A **Figura 4** mostra a rede que liga todos os haplótipos mitocondriais. A topologia geral da rede mostra estruturas em forma de estrela, onde os haplótipos mais freqüentes (140 e 78) estão posicionados no interior e os haplótipos locais na periferia. Este tipo de disposição é típico de espécies que atravessaram uma expansão populacional recente, no qual é mais provável que os haplótipos interiores sejam ancestrais e os

periféricos derivados (Crandall & Templeton 1993; Castelloe & Templeton 1994). Porém, a topologia geral da rede apresenta quatro estrelas, duas maiores e duas menores, o que não apóia a idéia de que *C. hominivorax* é um migrante vindo de lugares mais quentes que coloniza a região a cada estação (i.e. expansão espacial). Nesse caso, se esperaria uma rede com uma estrutura menos complexa, provavelmente sendo incluída uma estrela gerada pela expansão espacial de uma linhagem freqüente. Nas amostras analisadas aqui, a expansão detectada é demográfica, sendo factível que a espécie sobreviva ao inverno em “refúgios climáticos” locais expandindo-se a cada primavera-verão. *C. hominivorax* não sobrevive em regiões com temperatura média inferior a 9°C durante três meses seguidos ou a 12°C durante cinco meses seguidos (FAO 1992), sendo que a -6,7°C não sobrevive 99% da população (Parman 1945). Temperaturas médias abaixo das mencionadas por períodos tão longos não têm sido observadas no Uruguai entre 1917 e 2003 (DNM 2010), assim como temperaturas mínimas entre -6°C e -7°C são pouco freqüentes. Essas condições climáticas e as características da vegetação predominante no sul do Brasil e o Uruguai, principalmente composta de florestas ribeirinhas, podem brindar as possibilidades para que *C. hominivorax* sobreviva ao inverno na região. Também alguns estudos de dinâmica populacional indicam que *C. hominivorax* é uma espécie colonizadora que apresenta rápidos aumentos das populações locais (Southwood *et al.* 1974), com sobreposição contínua de gerações. Matlock *et al.* (2009), baseados em dados de marcação, liberação e recaptura, estimaram um tempo de duplicação populacional de 139 dias num ambiente tropical.

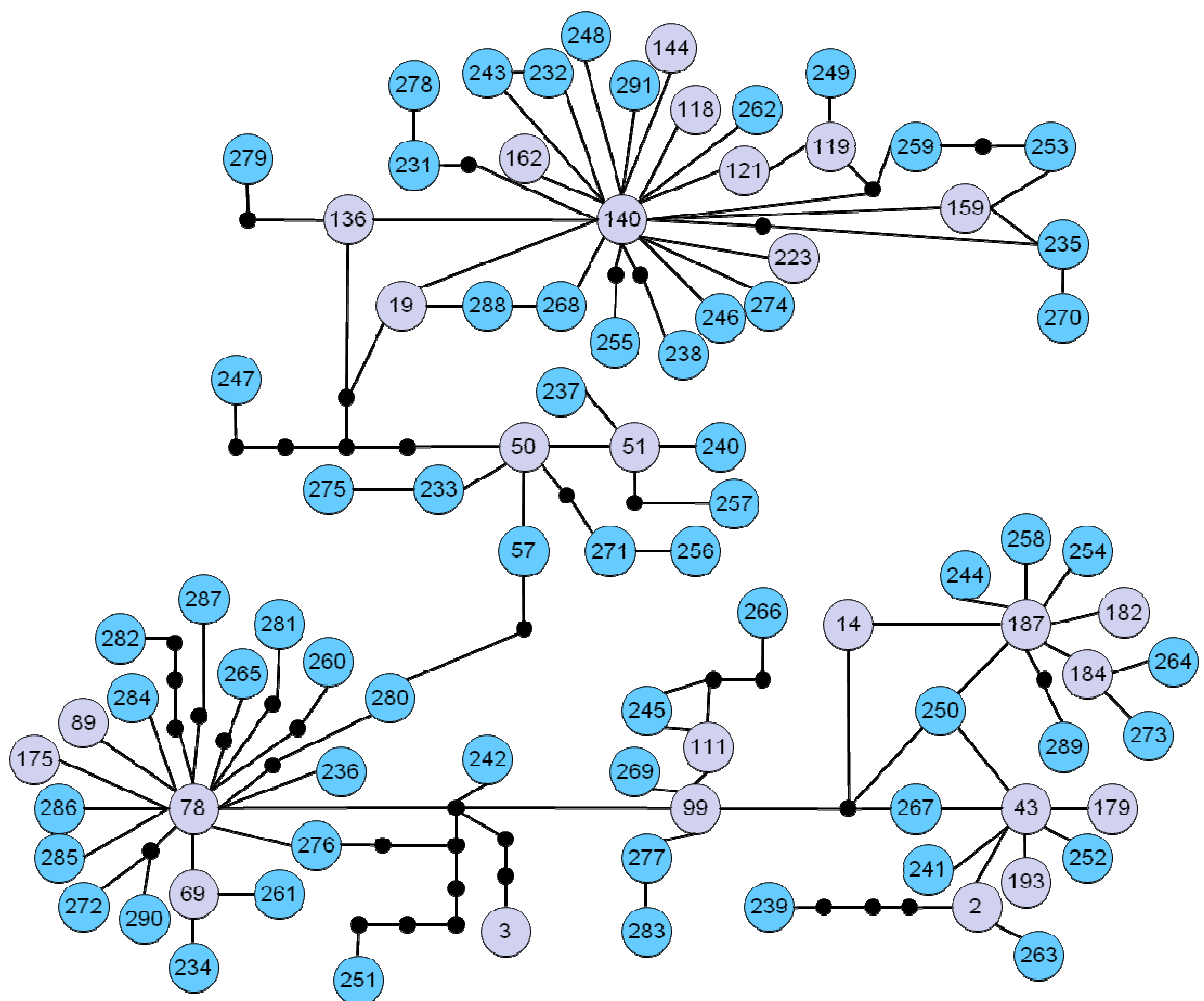


Figura 4. Rede de haplótipos dos dados de seqüências do DNAm concatenadas (CR-COII). Em azul estão representados os haplótipos novos identificados nesta escala microgeográfica, e em cinza os haplótipos identificados anteriormente em Fresia *et al.* (no prelo). As linhas representam uma mutação entre os haplótipos, e os pontos representam haplótipos intermediários que não foram observados.

A distribuição das diferenças pareadas entre as seqüências mitocondriais é unimodal, indicando que estas amostras de *C. hominivorax* atravessaram um processo de expansão (**Figura 5**). Estes resultados, assim como os testes de neutralidade, que foram negativos e significativos, e as estrelas na rede de haplótipos foram concordantes e apóiam o processo de expansão populacional. A análise da variação no tamanho efetivo

populacional no tempo através do *Bayesian Skyline Plot* indica um processo de expansão similar ao detectado nos artigos 1 e 2, que começou no último máximo glacial. Este resultado se deve à história que carregam as distintas linhagens mitocondriais e seus haplótipos derivados e não aos processos locais (ex. sazonalidade), que são difíceis de detectar por estes métodos.

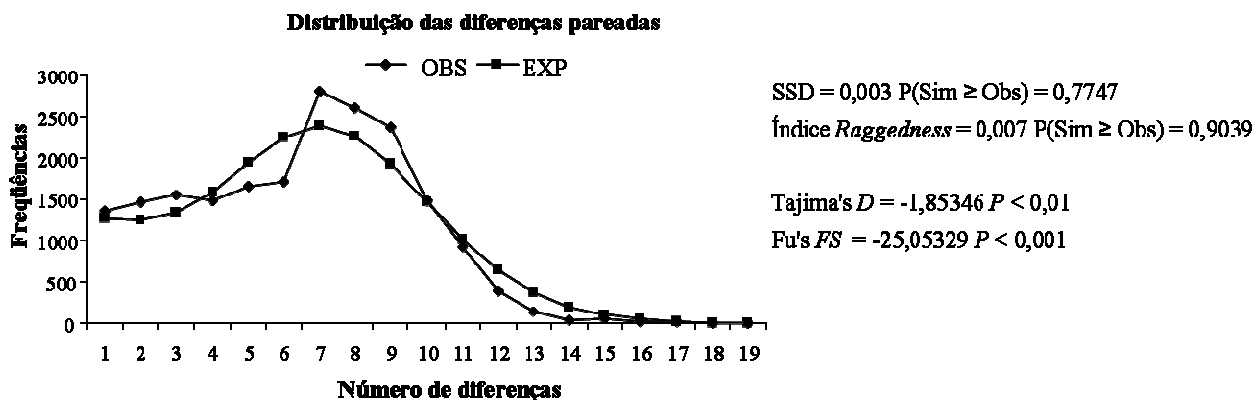


Figura 5. Distribuição das diferenças entre pares de seqüências do DNAm_t de *C. hominivorax* e testes de neutralidade de Tajima (*D*) e Fu (*F_s*).

A divergência genética global entre os 20 sítios de coleta analisados para microssatélites, estimada com base no θ (Weir & Cockerham 1984), foi significativa, porém muito baixa ($\theta = 0,006$). As estimativas pareadas de diferenciação genética entre os sítios de coleta (F_{ST}) para os marcadores microssatélites variaram de 0 a 0,08 (**Figura 2**), sendo significativos em 21 dos 190 testes pareados. A maior diferenciação genética ($F_{ST} = 0,08$) foi observada entre os sítios 17 (BrAC) e 24 (BrFdQ) separados por aproximadamente 55 km. Estes resultados mostram a ausência de estrutura entre estes sítios de coleta, indicando que todos pertencem a uma mesma população. Em concordância com os estatísticos *F*, a análise de agrupamento bayesiana não revelou diferenças entre as localidades (**Figura 6**).

Estudos prévios que analisaram a estrutura populacional de sete localidades de *C. hominivorax* distribuídas em todo Uruguai não detectaram divergência através de marcadores PCR-RFLP do DNAm_t (Lyra *et al.* 2005), mas sim através de marcadores

microsatélites (Torres *et al.* 2007). Apesar de baixa, a estruturação detectada com microsatélites foi significativa, além de detectar variação temporal significativa entre amostras de dois anos diferentes com estes marcadores (Torres 2006).

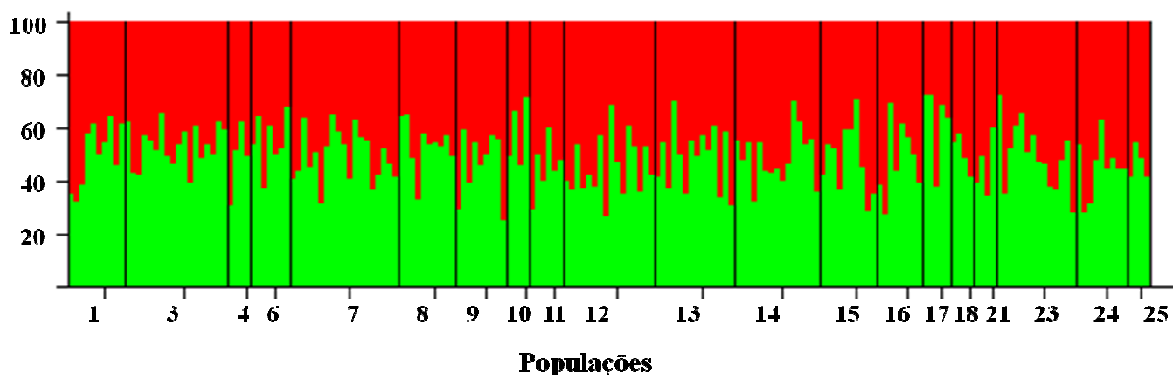


Figura 6. Análise de agrupamento bayesiano dos indivíduos de *C. hominivorax* realizado no programa Structure. $K = 2$ grupos, as cores (verde e vermelho) representam a proporção em que cada indivíduo pertence a um dos grupos. Os números (1-25) representam os sítios de coleta, aparecendo na ordem da **Tabela 2**.

Não se detectou gargalo populacional em nenhum dos sítios de coleta para os modelos de mutação testados (SMM – *Stepwise Mutation Model*, TPM – *Two-phase Model* e IAM – *Infinite Allele Model*), assim como para todos os indivíduos agrupados, o que é esperado para uma espécie que provavelmente sobrevive ao inverno em distintos “refúgios climáticos” da região.

Finalmente, nossas análises indicam que os 25 sítios de coleta na localidade de Artigas-Quaraí na fronteira entre Brasil e Uruguai pertencem a uma única população. Porém, estas amostras pertencem a uma população que não está em equilíbrio e estes resultados devem ser interpretados com cuidado. Meyer & Aztemi (1993) indicaram que em um ambiente favorável, como a região analisada, formada por pastagens naturais e rios com florestas ribeirinhas junto a uma das maiores concentrações de ovinos do continente (GliPHA 2010), as fêmeas de *C. hominivorax* se dispersam por distâncias médias de 2,85 km e os machos 1,25 km. O fato de que esta espécie tem uma dinâmica populacional com

ciclos de expansão e gargalos sazonais na região estudada, onde as populações começam a se expandir em Setembro-Outubro alcançando o máximo populacional em Fevereiro-Março, pode explicar a ausência de estrutura geográfica. Recentemente, Shpak *et al.* (2010) testaram um modelo populacional para espécies com uma dinâmica sazonal, como *C. hominivorax*, mostrando que no início da expansão, a espécie está constituída por pequenas populações que sobreviveram as condições adversas. Este sistema de populações pode apresentar uma estruturação genética no início da estação favorável. Porém, quando as populações se expandem, aumenta o fluxo gênico e o sistema tende à homogeneização. Este representa um cenário factível dado que as amostras de *C. hominivorax* analisadas foram obtidas em Janeiro-Fevereiro. Os autores também sugerem uma amostragem seriada no tempo, amostrando indivíduos no começo, no meio e no final da estação, para estudar espécies com estas características.

Referências bibliográficas

- Avise, J.C. 2000.** Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge.
- Avise, J.C. 2004.** Molecular markers, natural history, and evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Bertorelle, G. & M. Slatkin. 1995.** The number of segregating sites in expanding human populations, with implications for estimates of demographic parameters. *Mol. Biol. Evol.* 12: 887-892.
- Castelloe, J. & A.R. Templeton. 1994.** Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Mol. Phyl. Evol.* 3: 102-113.
- Clement, M., Posada D. & K.A. Crandall. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9(10): 1657-1660.
- Cornuet J.M. & G . Luikart. 1996.** Description and power analysis of two tests for inferring recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics.* 144: 2001-2014.
- Crandall, K.A. & A.R. Templeton. 1993.** Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics.* 134: 959-969.
- DNM – Dirección Nacional de Meteorología. 2010.** <http://www.meteorologia.gub.uy/>, Uruguay. Acessado em Janeiro de 2010.
- Dupanloup, I., Schneider, S. & L. Excoffier. 2002.** A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11: 2571-81.
- Endler, J.A. 1977.** *Geographic variation, speciation, and clines.* Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & J.M. Quattro. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 131: 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G. & S. Schneider. 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 1: 47-50.
- FAO – Food and Agriculture United Nations Association. 1992.** Manual para el control de la mosca del gusano barrenador del ganado *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). Rome, Italy.
- Fresia, P., Lyra, M.L., Coronado, A. & A.M.L. Azeredo-Espin.** Genetic structure and demographic history of the New World Screwworm fly across its current geographic range. **no prelo.**
- Fu, Y.X. 1997.** Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* 147: 915-925.
- Garcia, R., Mendez, L., Serrano, E., Gil Morales, T. & M.J.B. Vreysen. 2007.** Insecticidal Wound Treatment of Livestock on Isla de la Juventud, Cuba: an efficient suppression method of New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* prior to the release of Sterile Insect, pp 393-403. In M. J. B. Vreysen, A. S. Robinson and J. Hendrichs (eds.), Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

- GLiPHA-Global Livestock Production and Health Atlas. 2010.**
<http://kids.fao.org/glipha/> Acessado em Março de 2010.
- Goudet, J. 1995.** FSTAT version 1.2: a computer program to calculate *F*-statistics. *J. Hered.* 86(6): 485–486. <http://www.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>
- Goudet, J., Raymond, M., deMeeus T. & F. Rousset. 1996.** Testing differentiation in diploid populations. *Genetics.* 144(4): 1933–1940.
- Guimarães, J.H., Papavero, N. & A.P. do Prado. 1983.** As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1: 239-416.
- Guimarães, J.H. & N. Papavero. 1999.** Myiasis in man and animals in the Neotropical region. Plêiade/FAPESP. 308pp.
- Guindon, S. & O. Gascuel. 2003.** A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.
- Guo, S.W. & E.A. Thompson. 1992.** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 48: 361-372.
- Hanski, I. 1998.** Connecting the parameters of local extinction and metapopulation dynamics. *Oikos.* 83: 390-396.
- Klassen, W. 2005.** Area-Wide Integrated Pest Management and the Sterile Insect Technique. In V. A. Dyck, J. Hendrichs, and A. S. Robinson (eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management.* Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Knipling, E.F. 1972.** Entomology and the management of man's environment. *J. Entomol. Australian Soc.* 11: 153-167.
- Marjoram, P. & P. Donnelly. 1994.** Pairwise comparisons of mitochondrial-DNA sequences in subdivided populations and implications for early human-evolution. *Genetics.* 136: 673-683.
- Matlock, Jr. R.B. & S.R. Skoda. 2009.** Mark-recapture estimates of recruitment, survivorship and population growth rate for the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med. Vet. Entomol.* 23 (1): 111-125.
- Mayer, D.G. & M.G. Atzeni. 1993.** Estimation of dispersal distances for *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Environ. Entomol.* 22: 368-374.
- Parman, D.C. 1945.** Effect of weather on *Cochliomyia americana* and a review of methods and economic applications of the study. *J. Econ. Entomol.* 38: 66-76.
- Phillips, P.L., Welch, J.B. & M. Kramer. 2004.** Seasonal and Spatial and Distributions of Adult Screwworms (Diptera: Calliphoridae) in the Panama Canal Area, Republic of Panama. *J. Med. Entomol.* 41: 121-129.
- Piry, S., Luikart, G. & J.J. Corneut. 1999.** BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90 (4): 502-503.
- Posada, D. 2008.** jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25(7): 1253-1256.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & P. Donnelly. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155: 945-959.
- Reynolds, J., Weir, B.S. & C.C. Cockerham. 1983.** Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics.* 105: 767-779.

- Rogers, A.R. & H. Harpending. 1992.** Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569.
- Rogers, A.R., Fraley, A.E., Bamshad, M.J., Watkins, W.S. & L.B. Jorde. 1996.** Mitochondrial mismatch analysis is insensitive to the mutational process. *Mol. Biol. Evol.* 13: 895-902.
- Schneider, S. & L. Excoffier. 1999.** Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics.* 152(3): 1079-1089.
- Shpak, M., Wakeley, J., Garrigan, D. & R.C. Lewontin. 2010.** A structured coalescent process for seasonally fluctuating populations. *Evolution.* 64, 5:1395-1409.
- Southwood, T.R.E., May, R.M., Hassell, M.P. & G.R. Conway. 1974.** Ecological strategies and population parameters. *Am. Nat.* 108: 791-804.
- Tabachnick, W.J. & W.C. Black. 1995.** Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. *Parasit. Today.* 11: 27-30.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 123: 585-595.
- Tamura, K., J. Dudley, Nei, M. & S. Kumar. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tatarenkov, A., Healey, C.I.M. & J.C. Avise. 2010.** Microgeographic population structure of green swordtail fish: differentiation despite abundant migration. *Mol. Ecol.* 19: 257-268.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D.G. Higgins. 1997.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Ac. Res.* 24: 4876-4882.
- Torres, T.T. & A.M.L Azeredo-Espin. 2005.** Development of new polymorphic microsatellite markers for the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Mol. Ecol. Notes.* 5: 815-817.
- Torres, T.T., Brondani, R.P.V., Garcia, J.E. & A.M.L. Azeredo-Espin. 2004.** Isolation and characterization of microsatellite markers in the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Mol. Ecol. Notes.* 4: 182-184.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, B.; Wills, D. & P. Shipley. 2003.** MICROCHECKER, microsatellite data checking software. <http://www.microchecker.hull.ac.uk/>
- Weir, B.S. & C.C. Cockerham. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1943.** Isolation by distance. *Genetics.* 28: 114-138.

PARTE III

Discussão Geral

1. Diversidade Genética e estrutura de populações da mosca-da-bicheira: escala continental.

O trabalho aqui apresentado buscou descrever e explicar a estrutura filogeográfica de *C. hominivorax* ao longo de sua atual distribuição (escala macrogeográfica). Este estudo, em conjunto com o trabalho realizado por Lyra *et al.* (2009), é o mais amplo sobre variabilidade genética e distribuição da diversidade em populações naturais de *C. hominivorax*. Além disso, é o primeiro que estuda a demografia histórica da espécie.

Altos níveis de variabilidade expressados em termos de diversidade de haplótipos (H) foram revelados para as seqüências de DNA mitocondrial (fragmentos CR, COI e COII). Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Lyra *et al.* (2009), para marcadores PCR-RFLP do DNAm_t, nos quais se encontraram altos níveis de variabilidade em 34 localidades de *C. hominivorax*, coletadas entre o Caribe e Uruguai. Porém a diversidade nucleotídica (π) estimada nesse trabalho foi baixa, o que não corrobora os resultados obtidos com PCR-RFLP, mostrando que o método de estimativa usado para dados de restrição (método de Nei & Li, 1979), superestimou a diversidade nucleotídica.

Em escala continental, foram identificados quatro grupos regionais de distribuição da variabilidade genética: um grupo correspondente às localidades de Cuba (CG), um de República Dominicana (DRG), um ao Norte da região Amazônica (NAG) e um ao Sul da região Amazônica (SAG).

Na região do Caribe (CG e DRG), foi observada a maior divergência entre as localidades, o que também foi observado para os marcadores PCR-RFLP do DNAm_t e para microssatélites (Lyra *et al.* 2009, Torres & Azeredo-Espin, 2009). Os dados obtidos para a região apóiam a hipótese de que o Mar do Caribe atua como uma barreira capaz de limitar o fluxo gênico entre as ilhas e o continente. Os três trabalhos indicam que as populações de *C. hominivorax* das ilhas analisadas (Cuba, Jamaica, República Dominicana e Trinidad & Tobago) constituem unidades evolutivas independentes conectadas por reduzido fluxo gênico. Isso sugere que cada ilha pode ser considerada uma unidade de manejo em um programa de controle.

Os dados de seqüências mitocondriais de *C. hominivorax* apresentados no artigo 1 corroboram que as ilhas do Caribe foram colonizadas a partir do continente. No entanto, Cuba parece ter uma história de colonização diferente, como sugerido por dados de PCR-RFLP (Lyra 2008). A colonização de Jamaica, República Dominicana e Trinidad & Tobago foi provavelmente a partir de populações da América do Sul, uma vez que foram identificados haplótipos compartilhados ou uma pequena divergência entre os haplótipos continentais e dessas ilhas. A possível origem sul-americana das populações de Jamaica também foi sugerida por Roehrdanz & Johnson (1988). Neste trabalho, também sugerimos que Cuba foi colonizada a partir da América do Norte ou Central continental.

Embora essa hipótese de colonização de Cuba seja difícil de ser testada uma vez que esta praga foi erradicada de América do Norte e Central continental, no artigo 2 foi possível obter amostras dessas regiões que foram mantidas na Biofábrica do USDA (Ministério de Agricultura e Pecuária dos Estados Unidos). Estas amostras da Biofábrica foram coletadas antes da erradicação e representam amostras dos Estados Unidos, México, Belize e Costa Rica. As comparações destas amostras com as seqüências do Caribe e América do Sul indicam uma maior proximidade com as amostras de Cuba que com as outras localidades. Taylor *et al.* (1996), analisando amostras de Cuba, América Central e alguns indivíduos da América do Sul, também demonstraram que Cuba apresenta uma maior similaridade com amostras de *C. hominivorax* da América Central. A **Figura 1** representa esquematicamente essa relação e os resultados apóiam a hipótese de que as populações de Cuba são originárias da América do Norte ou Central continental.

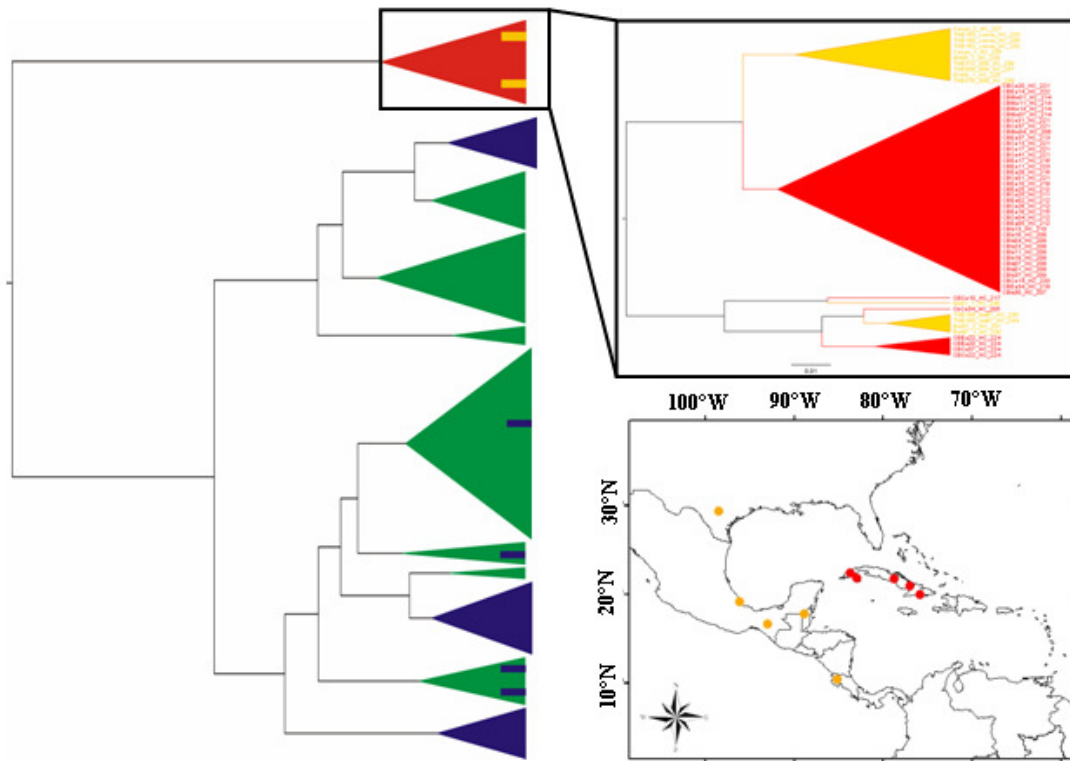


Figura 1. Genealogia bayesiana das seqüências do DNAmI (CR-COI-COII) incluindo os indivíduos de Cuba e da Biofábrica. A cor azul indica os agrupamentos de indivíduos do norte da Amazônia (NAG), a cor verde os do sul da Amazônia (SAG), a cor vermelha os de Cuba e a cor laranja os de América Central e do Norte (indivíduos da Biofabrica do USDA, Fargo). No detalhe o clado formado pelos indivíduos de Cuba e de América Central e do Norte. O mapa indica as localidades de coleta de *C. hominivorax* de Cuba (vermelho) e das amostras da Biofábrica do USDA Fargo (laranja).

Se por um lado as populações de *C. hominivorax* do Caribe estão estruturadas geograficamente, os estudos realizados na América Sul numa escala continental (Torres 2006, Lyra 2008, Lyra *et al.* 2009) não têm detectado um padrão de diferenciação genética entre as populações correlacionado com a geografia. Com os dados de seqüências do genoma mitocondrial aqui apresentados, foi possível caracterizar a diferenciação entre as populações do norte e do sul da região Amazônica. Alguns autores (Roehrdanz & Johnson 1988, Roehrdanz 1989 e Taylor *et al.* 1996) já tinham reportado certo grau de diferenciação

entre América do Norte e Central em relação à América do Sul, porém a estruturação das populações de *C. hominivorax* da América do Sul é descrita pela primeira vez.

A quebra filogeográfica entre América Central e do Sul é um padrão bem caracterizado para distintos taxa, tanto animais (Brower 1994, Slade & Moritz 1998, Hoffmann & Baker 2003 e Mirabello & Conn 2006) quanto vegetais (Dick *et al.* 2003, Lemes *et al.* 2010). Porém, os tempos de divergência diferem entre as distintas espécies. Na região Amazônica, o padrão de divergência intra-específica tem sido principalmente investigado em espécies que habitam a floresta, e poucos estudos têm abordado o efeito do aumento e retração da floresta devido às oscilações climáticas do Pleistoceno em espécies que habitam fora da mesma (Wüster *et al.* 2005).

Os adultos de *C. hominivorax* habitam o ecótono entre florestas e áreas de pastagens (Thomas 1993, Phillips *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2007). Sendo assim, o aumento da floresta Amazônica nos períodos favoráveis do Pleistoceno pode ter representado uma barreira capaz de isolar as populações do norte (NAG) e do sul (SAG). As simulações de coalescência usadas para testar dois modelos de divergência populacional e investigar os tempos de divergência, não rejeitaram uma única hipótese, a separação simultânea dos grupos da América do Norte e Central, do norte (NAG) e do sul (SAG) da Amazônia há ~240.000 anos. A análise filogenética e as estimativas do tempo de divergência realizadas no artigo 2, mostram um clado monofilético que agrupa as amostras da América do Norte e Central que se separou da América do Sul aproximadamente nesta data (~240.000 anos atrás) de acordo com as simulações de coalescência. Porém, a proximidade genética (descrita no artigo 1) e a topologia da filogenia (descrita no artigo 2), em que não foi possível identificar clados monofiléticos com concordância geográfica na América do Sul, mostram a divergência recente entre NAG e SAG. Também, estes resultados evidenciam possíveis contatos posteriores à divergência apoiada pelas simulações de coalescência. Provavelmente, as oscilações climáticas de Pleistoceno que promoveram retrações e aumentos da floresta Amazônica propiciaram este cenário onde NAG e SAG estiveram em contato durante os períodos de glaciação e separados nos períodos de aumento da temperatura.

As modelagens ecológicas (Maxent – artigo 2) realizadas para o presente, o último máximo glacial (~20.000 anos atrás, modelos CCSM e MIROC) e o último máximo quente (~120.000-140.000 anos atrás, modelo LIG) identificaram a região Amazônica como uma área de baixa probabilidade, ou ausência, de *C. hominivorax* nos períodos quentes (**Figura 3 e 5** – artigo 2). Os dois modelos do último máximo glacial mostram áreas de média a alta probabilidade no oeste da região Amazônica, o que aumentou o contato entre as regiões norte e sul do continente, possibilitando a migração de *C. hominivorax* através de áreas ocupadas por florestas nos períodos quentes. Este cenário com vários momentos de contato e separação, que promove uma evolução reticulada dos grupos, não foi testado até o momento. Mas existem evidências, genéticas e de modelagem ecológica, que mostram este cenário como provável e sendo assim a relação entre NAG e SAG é histórica, não havendo fluxo gênico atual entre esses grupos. Porém, a migração mediada pelo homem não pode ser descartada, e nos dados apresentados só parece ter acontecido ocasionalmente. Nesse contexto, podemos sugerir que na atualidade os dois grupos podem ser considerados de forma independente para o controle desta espécie praga da pecuária.

A baixa diferenciação entre as populações de *C. hominivorax* do grupo SAG sem um padrão geográfico, apesar da grande área estudada, se deve provavelmente mais ao processo de expansão populacional observado do que ao fluxo gênico atual entre demes. O padrão de variabilidade genética observado nas populações de *C. hominivorax*, com elevados valores de \hat{H} e baixos de π , assim como os distintos clados em forma de estrela nas redes de haplótipos são características de uma espécie que atravessou um processo de expansão populacional. A investigação da variação do tamanho efetivo populacional (N_e) no tempo (*Bayesian Skyline Plot* – BSP) mostrou que o processo de expansão começou ~20.000-25.000 anos atrás e continuou até o presente. Interessantemente, apesar de a espécie ser dependente de hospedeiros de sangue quente, a extinção de muitos taxa de mamíferos no período posterior ao último máximo glacial (~12.000 anos atrás, revisado em Barnosky *et al.* 2004, Vivo & Carmignotto 2004) parece não ter afetado negativamente as populações de *C. hominivorax*. De forma contrária, a espécie começou um processo de expansão populacional desde antes desse período, o que sugere que a demografia de *C.*

hominivorax pode estar associada com a expansão humana no continente (Fagundes *et al.* 2009). Também está provavelmente associada com a domesticação de animais, o que contribui para o aumento da disponibilidade de recursos, mesmo que a riqueza de espécies tenha diminuído. A associação entre demografia de um organismo e os seres humanos já foi demonstrada anteriormente (ex. *Anopheles*, Donnelly *et al.* 2001). Além disso, Mes (2003) sugeriu que a demografia de algumas espécies de nematóides endoparasitos do gado está correlacionada com a demografia dos humanos.

A diferenciação detectada dentro de NAG principalmente se deve às comparações pareadas entre as localidades de Jamaica, Trinidad & Tobago e Equador (localidade situada na margem oeste da Cordilheira do Andes). Embora seja difícil observar um padrão geográfico nas populações continentais deste grupo, isto provavelmente também seja devido ao processo de expansão populacional histórico detectado em *C. hominivorax* e não ao fluxo gênico atual, pelo menos através dos Andes. Nesta região, tem se demonstrado que os Andes atuam como uma barreira para o mosquito *Anopheles albimanus* (Gutierrez *et al.* 2009), tendo sido identificados grupos de populações distribuídos no litoral do Caribe e no litoral Pacífico.

2. Diversidade genética e estrutura da mosca-da-bicheira: escala local.

Caracterizar a estrutura genética espacial, entender como as distintas populações locais estão conectadas e entender a dinâmica local podem ajudar no desenho de um programa de controle para a mosca-da-bicheira. Como discutido acima, na América do Sul foram identificados dois grandes grupos de populações e embora não tenha sido detectada uma diferenciação significativa das amostras continentais dentro dos grupos, isto foi atribuído a eventos históricos e não ao fluxo gênico atual. Desta forma, a identificação de populações geográficas locais dentro destes grupos é ainda um desafio.

Trabalhos realizados numa escala geográfica menor, que compararam sete localidades de Uruguai, através de PCR-RFLP do DNAm_t (Lyra *et al.* 2005) e microsatélites (Torres *et al.* 2007), revelaram alta diversidade genética e sugeriram que as populações de *C. hominivorax* são muito similares no extremo sul da distribuição da espécie. Os dados mitocondriais não identificaram variação entre as populações, mas os

marcadores microssatélites revelaram uma variação pequena, porém significativa. A diferença entre os resultados obtidos foi interpretada de duas maneiras: 1- os resultados refletem a contribuição diferencial dos sexos em mediar fluxo gênico; ou 2- diferenças no modo de herança e taxas de mutação dos marcadores (Torres *et al.* 2007). Por outro lado, a observação de populações localmente diferenciadas quanto ao DNAm_t e pouco diferenciadas para marcadores microssatélites leva a interpretações diferentes com respeito à dinâmica das populações analisadas. Nesse caso, as diferenças poderiam ser explicadas, por exemplo, por flutuações no tamanho efetivo da população (populações demograficamente instáveis). Eventos de drástica redução no tamanho da população seguidos de uma rápida expansão podem levar à recuperação da variabilidade nuclear (que pode mascarar um efeito gargalo) e a não recuperação da variabilidade mitocondrial (Nei *et al.*, 1975), já que o tamanho efetivo mitocondrial é menor e o efeito gargalo deve ser mais drástico para esse marcador.

A análise de amostras de *C. hominivorax* provenientes de 25 sítios de coleta, numa área de 90 por 60 km nas localidades de Artigas e Quaraí na fronteira entre Uruguai e Brasil, mostrou altos valores de diversidade haplotípica (H) e baixos de diversidade nucleotídica (π) para o DNAm_t, assim como valores baixos de variabilidade em oito *loci* de microssatélites. As estimativas de divergência populacional foram não significativas, indicando que nesta escala todos os sítios podem ser considerados como integrantes da mesma população. Esta população também mostra sinais de expansão populacional para os dados mitocondriais, porém a variabilidade genética observada indica que se trata de uma população capaz de sobreviver ao inverno no local, sendo as flutuações populacionais relacionadas à dinâmica sazonal do clima na região estudada.

A expansão dos programas de controle de *C. hominivorax* para novas regiões encontra-se sob discussão. Por exemplo, na região de Artigas-Quaraí analisada no artigo 3, foi realizado um plano piloto de liberação de insetos estéreis entre janeiro e abril de 2009 (MGAP 2009). A delimitação das unidades de manejo para um programa de controle requer a identificação das populações geográficas, assim como entender os processos demográficos históricos que moldaram a distribuição da variabilidade genética observada e distingui-los do fluxo gênico atual. Esta informação é importante na escolha da região e da

escala geográfica em que o controle será realizado, permitindo estabelecer os custos econômicos e a logística envolvida no programa, assim como avaliar os riscos de re-invasão após sua finalização.

Conclusões

- *Cochliomyia hominivorax* apresenta estrutura populacional e alta diversidade mitocondrial ao longo da atual distribuição geográfica.
- A diversidade genética detectada está distribuída em quatro grupos regionais, grupo de Cuba (CG), de República Dominicana (DRG), do norte (NAG) e do sul (SAG) da região Amazônica.
- Os eventos históricos (i.e. colonização, vicariância, expansão populacional) foram mais importantes em moldar a distribuição da diversidade observada que o fluxo gênico atual (i.e. dispersão natural e/ou mediada pelo homem).
- As populações que habitam as ilhas do Caribe são derivadas de populações continentais.
- Cuba foi colonizada a partir de populações de América do Norte e ou Central, e República Dominicana, Trinidad & Tobago e Jamaica a partir de populações de América do Sul.
- Os dois grupos da América do Sul (NAG e SAG) não compartilham haplótipos, mas são geneticamente próximos.
- Embora não detectado nas simulações de coalescência, os dados sugerem uma separação recente destes grupos.
- As oscilações climáticas do Pleistoceno parecem ter gerado ciclos de separação e mistura das populações de NAG e SAG, o pode ajudar a confundir o padrão de divergência.
- Não há evidências de um fluxo gênico atual importante entre NAG e SAG.
- No nível local, a estrutura genética das populações de *C. hominivorax* está fortemente influenciada pelas flutuações demográficas sazonais.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC. 2010.** Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. <http://www.abiec.com.br/>
- Azeredo-Espin, A.M.L. 1987.** Análise cariotípica, Morfométrica e de Compatibilidade Sexual em linhagens brasileiras de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.
- Azeredo-Espin, A.M.L. 1993.** Mitochondrial DNA variability in geographic populations of screwworm fly from Brazil. International Atomic Energy Agency (IAEA-SM-327/17), Vienna, Austria, 327(17): 161-165.
- Barnosky, A.D.; Koch, P.L.; Feranec, R.S.; Wing S.L. & A.B. Shabel. 2004.** Assessing the causes of late Pleistocene extinctions on the continents. *Science*. 306: 70-7559.
- Barrett, W.L.Jr. 1937.** Natural dispersion of *Cochliomyia americana*. *J. Econ. Entomol.* 30: 873-876.
- Baumhover, A.H. 1963.** Susceptibility of screwworm larvae and prepupae to desiccation. *J. Econ. Entomol.* 56: 645-649.
- Brower, A.V.Z. 1994.** Phylogeny of Heliconius butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae) *Mol. Phylogenet. Evol.* 3: 159-174.
- Bush, G.L. & R.W. Neck, .1976.** Ecological genetics of screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera-Calliphoridae) and its bearing on quality-control of mass-reared insects. *Environ. Entomol.* 5(5): 821-826.
- Carballo, M.; Heinzen, T.; Colombo, A. & M. Rodríguez. 1991.** Datos obtenidos a partir de una encuesta relativo a la incidencia de miasis cutáneas en diferentes zonas del Uruguay. *Veterinaria*, 28: 5-15.
- Carvalho, R.A.; Torres, T.T.; Paniago, M.G. & A.M.L. Azeredo-Espin. 2009.** Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *Med. Vet. Entomol.* 23: 86-91.
- Cassida, J.E. & B.Q. Gary. 1998.** Golden age of insecticide research: past, present and future. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 1-16.
- Cheneau, Y.; El Idrissi A.H. & D. Ward. 2004.** Current veterinary systems in the developing world. In Veterinary institutions in the developing world: current status and future needs (C. de Haan, ed.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 23(1): 351-359.
- Coronado, A. & Kowalski, A. 2009.** Current status of the New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* in Venezuela. *Med. Vet. Entomol.* 23(1): 106-110.
- Crystal, M.M. 1967.** Reproductive behavior of laboratory reared screwworm flies (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 4: 443-450.
- Cushing, E.C. & W.S. Patton. 1933.** Studies on the higher Diptera of medical and veterinary importance, *Cochliomyia hominivorax*, sp. nov., the screwworm fly of the New World. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 27(4): 539-551.
- Dick, C.W., K. Abdul-Salim, & E. Bermingham. 2003.** Molecular systematics reveals cryptic Tertiary diversification of a widespread tropical rainforest tree. *Am. Nat.* 162: 691-703.

- Delgado, C., Rosegrant, M., Steinfeld, H., Ehui, S. & C. Courbois. 1999.** Livestock to 2020: The next food revolution. Food, Agriculture and the Environment Discussion Paper 28. Washington, DC, IFPRI/FAO/ILRI (International Food Policy Research Institute / Food and Agriculture Organization / International Livestock Research Institute).
- Donnelly, M.J., Licht, M.C. & T. Lehmann. 2001.** Evidence for Recent Population Expansion in the Evolutionary History of the Malaria Vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1353-1364.
- Fagundes, N.J.R.; Kanitz, R.; Eckert, R.; Valls, A.C.S.; Bogo, M.R.; Salzano, F.M.; Smith, D.G.; Silva, W.A.; Zago, M.A.; Ribeiro-dos-Santos, A.K.; Santos, S.E.B.; Petzl-Erler, M.L.; Bonatto, S.L. 2008.** Mitochondrial Population Genomics Supports a Single Pre-Clovis Origin with a Coastal Route for the Peopling of the Americas. *Am. J. Hum. Genet.* 82(3): 583-592.
- FAO – Food and Agriculture Organization, United Nations. 1992.** Manual para el control de la mosca del gusano barrenador del ganado *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). Roma, Italia.
- García, R., Méndez, L., Serrano, E., Gil Morales, T. & M.J.B. Vreysen. 2007.** Insecticidal Wound Treatment of Livestock on Isla de la Juventud, Cuba: an efficient suppression method of New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* prior to the release of Sterile Insect, pp 393-403. In M. J. B. Vreysen, A. S. Robinson and J. Hendrichs (eds.), Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Goodenough, J.L., Brown, H.E., Wendel, L.E. & F.H. Tannahill. 1983.** Screwworm eradication program: a review of recent mass-rearing technology. *Southwest. Entomol.* 8(1): 16-31.
- Grisi, L., Massard, C.L., Moya Borja, G.E. & J.B. Pereira. 2002.** Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *À hora veterinária.* 125: 8-10.
- Guimarães, J.H., Papavero, N. & Prado, A.P. 1983.** As míases na região Neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1: 239-416.
- Guimarães, J.H. & Papavero, N. 1999.** Myiasis in man and animals in the neotropical region. Plêiade/FAPESP. 308 pp.
- Gutiérrez, L.A., Naranjo, N.J., Cienfuegos, A.V., Muskus, C.E., Luckhart, S., Conn, J.E. & M.M. Correa. 2009.** Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colômbia. *Malar. J.* 8: 259.
- Hall, M., & Wall R. 1995.** Myiasis of human and domestic animals. *Adv. Parasitol.* 35: 256-333.
- Hall, D.G. 1948.** The Blowflies of North America. Thomas Say Foundation, Baltimore. 477pp.
- Hall, M.J.R. 1991.** Screwworm flies as agents of wound myiasis. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, FAO. Número especial de la revista mundial de zootecnia. El gusano barrenador del ganado respuesta a una emergencia. Accesible en internet: <http://www.fao.org/ag/Aga/AGAP/FRG/FEEDback/War/u4220b/u4220b00.htm#Contents>

- Hemingway, J. & H. Ranson. 2000.** Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 371-391.
- Hightower, B.G. & D.A. Alley. 1963.** Local Distribution of Released Laboratory-reared Screw-worm Flies in Relation to Water Sources. *J. Econ. Entomol.* 56(6): 798-802.
- Hightower, B.G. 1969.** Population Dynamics of the Screwworm Fly, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), with Respect to Control by the Sterile-male Technique. In *Insect Ecology and the Sterile-Male Technique*. IAEA-International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Hightower, B.G.; Davis, R.B.; Baumhover, A.H. & O.H. Graham. 1966.** Seasonal Abundance of the Screw-worm in Northern Mexico. *J. Econ. Entomol.* 59(2): 416-420.
- Hoffmann, F. G., and R. J. Baker. 2003.** Comparative phylogeography of short-tailed bats (Carollia: Phyllostomidae). *Mol. Ecol.* 12: 3403-3414.
- Infante-Vargas, M.E. & Azeredo-Espin, A.M.L. 1995.** Genetic Variability in Mitochondrial DNA of Screwworm. *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochem. Genet.* 33: 737-756.
- Infante-Malachias, M.E. 1999.** Estrutura genética de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) da região sudeste do Brasil: análise através de três tipos de marcadores genéticos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.
- Infante-Malachias, M.E., Yotoko, K.S.C. & Azeredo-Espin, A.M.L. 1999.** Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from southeastern Brazil and northern Argentina. *Genome.* 42: 772-779.
- Klassen, W. & Curtis, C.F. 2005.** History of the sterile insect technique. pp 3-36. In Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson, A.S. Eds. (2005) *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Klassen, W. 2005.** Area-Wide Integrated Pest Management and the Sterile Insect Technique. In V. A. Dyck, J. Hendrichs, and A. S. Robinson (eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Kongan, M. 1998.** Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 243-270.
- Krafsur, E.S. 2005.** Role of population genetics in the sterile insect technique, pp. 389-406. In V. A. Dyck, J. Hendrichs and A. S. Robinson (eds.), *Sterile insect technique: Principles and Practice in area-wide integrated pest management*, Springer, Netherlands.
- Krafsur, E.S. 1985.** Screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, Eradication in Texas: Effects of Climate and Strains of Sterile Flies. *Entomol. Experiment. Applic.* 37(3): 297-305.
- Krafsur, E.S. 1987.** Climatological Correlates of Screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) Abundance in Texas, USA. *Med. Vet. Entomol.* 1(1): 71-80.
- Krafsur, E.S. & Lindquist, D.A. 1996.** Did the sterile insect technique or weather eradicate screwworms (Diptera: Calliphoridae) from Libya? *J. Med. Entomol.* 33: 877-887.

- Krafsur, E.S. & Whitten, C.J. 1993.** Breeding structure of screwworm fly populations (Diptera-Calliphoridae) in Colima, Mexico. *J. Med. Entomol.* 30(2): 477-480.
- Laake, E.W. 1950.** Screw-worm Survey in Western United States, 1949. *J. Econ. Entomol.* 43(3): 387-389.
- Laake, E.W., Cushing, E.C. & H.E. Parish. 1936.** Biology of the primary screwworm fly, *Cochliomyia americana*, and a comparison of its stages with those of *C. macellaria*. USDA Tech. Bull. No. 500. 24 pp.
- LaChance, L.E. & C.J. Whitten. 1986.** Cytogenetic studies of screwworm (Diptera: Calliphoridae) populations from southern Mexico and Jamaica. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 792-798.
- LaChance, L.E., Bartlett, A.C., Bram, R.A., Gagne, R.J., Graham, O.H., McInnis, D.O., Whitten, C.J. & J.A. Seawright. 1982.** Mating types in screwworm populations? *Science.* 218: 1142-1145.
- Lemes, M.R., Dick, C.W., Navarro, C., Lowe, A.J., Cavers, S. & R. Gribel. 2010.** Chloroplast DNA microsatellites reveal contrasting phylogeographic structure in mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) from Amazonia and Central America. *Trop. Plant Biol.* 3(1): 40-49.
- Lyra, M.L. 2008.** Variabilidade mitocondrial e morfológica em populações naturais da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.
- Lyra, M.L., Klaczko, L.B. & A.M.L. Azeredo-Espin. 2009.** Complex pattern of genetic distribution in populations of the New World screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Med. Vet. Entomol.* 23: 32-42.
- Lyra, M.L., Fresia, P., Gama, S., Cristina, J., Klaczko, L.B. & Azeredo-Espin, A.M.L. 2005.** Analysis of Mitochondrial DNA Variability and Genetic Structure in Populations of New World Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *J. Med. Entomol.* 42(4): 589-595.
- Mangan, R.L. & D.B. Thomas. 1989.** Habitat preferences and dispersal patterns in native screwworm fly (Diptera:Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 332-339.
- McInnis, DO. 1981.** Cytogenetics of a local population of *Cochliomyia hominivorax*, from northeastern Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 628.
- McInnis, D.O., Whitten, C.J., Mackley, J.W., Peterson II, R.D. & J.P. Spencer. 1983.** Cytogenetic studies of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Chiapas, Mexico. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 628-640.
- Mes, T.H.M. 2003.** Demographic expansion of parasitic nematode of livestock based on mitochondrial DNA regions that conflict with the infinite-sites model. *Mol. Ecol.* 12(6): 1555-1566.
- MGAP – Ministerio de Ganaderia Agricultura y Pesca. 2009.** <http://www.mgap.gub.uy/>, Uruguay.
- Mirabello, L. & J.E. Conn. 2006.** Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in central and South America. *Heredity.* 96: 311-321.
- Nei, M., Maruyama, T. & R. Chakraborty. 1975.** The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution.* 29: 1-10.

- Nei, M. & W.H. Li. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS*. 76(10): 5269-5273.
- Nolan, J. & H.J. Schnitzerling. 1986.** Drug resistance in arthropod parasites. In W.C. Campbell & R.S. Rew, eds. *Chemotherapy of Parasitic Diseases*, pp. 603–620. New York, Plenum Press.
- OIE - World Organization for Animal Health. 2008.**
http://www.oie.int/Eng/Edito/en_edito_sept08.htm
- ONU - United Nations. 2004.** World Population to 2030. Economic and Social Affairs.
- Parker, F.D., Welch, J.B. & R.B. Matlock, Jr. 1993.** Influence of habitat, season and attractant on adult behavior of the screwworm (Diptera: Calliphoridae) inatropical dry zone in Costa Rica. *J. Econ. Entomol.* 86: 1359-1375.
- Parman, D.C. 1945.** Effect of weather on *Cochliomyia americana* and a review of methods and economic applications of the study. *J. Econ. Entomol.* 38: 66-76.
- Phillips, P.L., Welch, J.B. & M. Kramer. 2004.** Seasonal and Spatial and Distributions of Adult Screwworms (Diptera: Calliphoridae) in the Panama Canal Area, Republic of Panama. 490 *J. Med. Entomol.* 41: 121-129.
- Pica-Ciamarra, U. & J. Otte. 2009.** The ‘Livestock Revolution’: Rhetoric and Reality. PPLPI Research Report, Nr. 09-05, November, FAO - Rome.
- Piedrafita, D.; Raadsma, H.W.; Gonzalez, J. & E. Meeusen. 2010.** Increased production through parasite control: can ancient breeds of sheep teach us new lessons? *T. Parasitol.* 26(12): 568-573.
- Porretta, D.; Canestrelli, D.; Bellini, R.; Celli, G. & S. Urbanelli. 2007.** Improving insect pest management through population genetic data: a case study of the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Pallas). *J. App. Ecol.* 44: 682-691.
- Rahn, J.J. & G.L. Barger. 1973.** Weather Conditions and Screwworm Activity. *Agr. Meteor.* 11: 197-211.
- Readshaw, J.L. 1986.** Screwworm Eradication: A Grand Delusion? *Nature*. 320: 407-410.
- Readshaw, J.L. 1989.** The Influence of Seasonal Temperatures on the Natural Regulation of the Screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, in the Southern USA. *Med. Vet. Entomol.* 3(2): 159-168.
- Robinson, A.S.; Vreysen, M.J.B.; Hendrichs J. & U. Feldmann. 2009.** Enabling technologies to improve area-wide integrated pest management programmes for the control of screwworms. *Med. Vet. Entomol.* 23:1-7.
- Roehrdanz, R.L. 1989.** Intraspecific Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm Fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochem. Genet.* 27(9-10), 551-569.
- Roehrdanz, R.L. & D.A. Johnson. 1988.** Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax*. *J. Med. Entomol.* 25: 136-141.
- Silva, N.M. & A.M.L. Azeredo-Espin. 2009.** Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genet. Mol. Res.* 8: 1067-1078.
- Slade, R. & C. Moritz. 1998.** Phylogeography of *Bufo marinus* from its natural and introduced range. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 265: 769-777.
- Steinfeld, H. 2004.** The livestock revolution a global veterinary mission. *Vet. Parasitol.* 125, 19-41.

- Steinfeld, H.; Gerber, P.; Wassenaar, T.; Castel, V. & M. Rosales. 2006.** Livestock's long shadow: environmental issues and options, Animal Production and Health Division, FAO, Rome, Italy.
- Suárez, V.H. 2002.** Prevalencia y costo de las miasis en el ganado ovino y bovino de la región semiárida pampeana. INTA. *Boletín* 73, Cap. 28.
- Tabachnick, W.J. & W.C. Black. 1995.** Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. *Parasit. Today*. 11: 27-30.
- Taylor, D.B. & R.D. Peterson II. 1994.** Populations genetics and gene variation in primary and secondary screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 626-633.
- Taylor, D.B., Szalanski, A.L. & R.D. Peterson II. 1996.** Mitochondrial DNA variation in screwworm. *Med. Vet. Entomol.* 10: 161-169.
- Thomas, D.B. & R.L. Mangan. 1989.** Oviposition and wound visiting behavior of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 526-534.
- Thomas, D.B.Jr. 1986.** Age Dependent Susceptibility to Drowning in Pharate Screwworms, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). *Southwest. Entomol.* 11(3): 161-164.
- Thomas, D.B. Jr. 1989.** Survival of the Pupal Stage of the Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae) in Subtropical Mexico. *J. Entomol. Sci.* 24(3): 321-328.
- Thomas, D.B. 1991.** Time-activity budget of adult screwworm behavior (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 28: 372-377.
- Thomas, D. B. 1993.** Behavioral aspects of screwworm ecology. *J. Kansas Entomol. Soc.* 66: 13-30.
- Torres, T.T. & A.M.L. Azeredo-Espin. 2009.** Population structuring in New World Screw-worm populations from the Caribbean: insights from microsatellite data. *Med. Vet. Entomol.* 23(1): 23-31.
- Torres, T.T. 2006.** Variabilidade Genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): uma nova prespectiva através de marcadores microssatélites. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.
- Torres, T.T., Lyra, M.L., Fresia, P. & Azeredo-Espin. A.M.L. 2007.** Assessing Genetic Variation in the New World Screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, populations from Uruguay, *In* Vreysen, M.J.B., A.S. Robinson, and J. Hendrichs (Eds.), Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Vargas-Terán, M.; Hofmann, H.C. & N.E. Tweddle. 2005.** Impact of Screwworm eradication programmes using insect sterile technique. pp. 629-650. *In* Dyck, V.A., Hendrichs, J., and Robinson A.S. (Eds) Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated pest management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Vivo, M. & A.P. Carmignoto. 2004.** Holocene vegetation change and the mammal faunas of South America and Africa. *J. Biogeogr.* 31: 943-957.

- Whitten, C.J. 1980.** Use of the enzyme technique to asses the quality of mass-reared sterile screwworm flies. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 73: 7-10.
- Wüster, W., Ferguson, J.E., Quijada-Mascareñas, A., Pook, C.E., Salomao, M.daG. & R.S. Thorpe. 2005.** Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Mol. Ecol.* 14: 1095-1108.
- Zijun, L. 2006.** Rapid growth of China's cities challenges urban planners, migrant families. Worldwatch Institute, Washington, DC. www.worldwatch.org/node/4148, Accesado em Outubro de 2010.
- Zumpt, F. 1965.** Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworths, London, UK.