

BÁRBARA GUIMARÃES CSORDAS

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRÁFICAS EM *Rhipicephalus microplus*
A PARTIR DE SEQUÊNCIAS COX-1 E ITS2 EM DIFERENTES REGIÕES DO
BRASIL**

**CAMPO GRANDE
2015**

BÁRBARA GUIMARÃES CSORDAS

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRÁFICAS EM *Rhipicephalus microplus*
A PARTIR DE SEQUÊNCIAS COX-1 E ITS2 EM DIFERENTES REGIÕES DO
BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Renato Andreotti.

**CAMPO GRANDE
2015**

BÁRBARA GUIMARÃES CSORDAS

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRÁFICAS EM *Rhipicephalus microplus*
A PARTIR DE SEQUÊNCIAS COX-1 E ITS2 EM DIFERENTES REGIÕES DO
BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Renato Andreotti.

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito_____.

Campo Grande, de de 2015.

BANCA EXAMINADORA

NOTA/
CONCEITO

Dr. Renato Andreotti e Silva-Faculdade de Medicina -UFMS

Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos-Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia-UFMS

Dra. Sonia Maria Oliveira de Andrade -Faculdade de Medicina -UFMS

Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro - Faculdade de Medicina -
UFMS

*Dedico esta dissertação a minha
mãe Nilza, ao meu pai José Carlos
(in memoriam) e ao meu tio
Nelson. Vocês são meus pilares.*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Nilza Guimarães e ao meu tio Nelson Guimarães, pelo carinho, pelas orações, ajuda e incentivo.

Ao meu querido orientador Dr. Renato Andreotti pela confiança, ensinamentos e amizade em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório André Aguire, Francisco Barradas Pina, Jaqueline Matias, chefinha Jacqueline Barros, Leandra Oshiro, Leandro Higa, Marlon Cominetti e Paulo Mira. Em especial e com muito carinho aos doutores Rodrigo Cunha, Marcos Valério, Wilson Koller, futura doutora Izabella Blecha, futuro mestre Thalles Policarpo por estarem sempre ao meu lado, incentivando-me e ajudando imensamente da melhor forma possível.

Aos doutores Francisco Lobo e Poliana Giachetto da Embrapa de Campinas pelo suporte nas correções deste trabalho. Em especial a Doutora Bárbara Lago do Instituto Oswaldo Cruz-RJ, por passar um pouco do seu conhecimento com tanto carinho.

Aos funcionários do Programa de Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Néia e Terenilce. Aos professores, em especial a Dra. Sônia Andrade por participar da banca de qualificação e sua valiosa correção deste trabalho, Dra. Alda Maria e Dra. Ana Rita que juntas me fizeram amar cada vez mais a biologia molecular e Dra. Inês Tozetti por cuidar com tanto carinho da coordenação da pós graduação.

Aos amigos que fiz no mestrado, em especial aos futuros mestres Juliana Rochi, Júlio Menta, Thiago Prata e Marco Puga por compartilharem dos esforços nas madrugadas e finais de semana de estudos.

Ao meu companheiro Cauan Cabral pelo carinho, amor, paciência nos momentos de maiores esforços, pelas madrugadas que passou ao meu lado ajudando neste trabalho, sempre apoiando em absoluto qualquer decisão que eu tomasse. Assim como toda sua família pelo carinho dedicados ao longo dessa minha jornada incrível.

As minhas adoradas amigas de infância Talita, Tatiana Machado e família por estarem em todos os momentos da minha vida me apoiando e sempre acreditando em dar o meu melhor.

A todos os meus amigos e familiares por participarem da trajetória de minha vida em especial Fabiane Ianczyk e Watson Façanha por serem grandes amigos.

Meus agradecimentos finais ao Conselho Nacional de Pesquisa pelo suporte financeiro e a Empresa Embrapa Gado de Corte pelo apoio à pesquisa.

*Não sobrevive a espécie mais
forte, mas a que se adapta à
mudança.
Charles Darwin.*

RESUMO

A grande diversidade genética e estruturação populacional em *Rhipicephalus microplus*, necessitam de mais estudos que relacionam mutações genéticas, que podem acontecer devido à pressão do ambiente natural. Estes ectoparasitas desenvolvem variabilidade genética que pode influenciar na resistência dos carrapatos aos acaricidas. O objetivo deste trabalho foi proceder a inferência nas relações filogenéticas e filogeográficas em carrapatos de diferentes regiões do Brasil, que foram identificados por meio de análise molecular como *Rhipicephalus microplus* usando o marcador molecular mitocondrial, gene citocromo-oxidase subunidade-1 (COX-1) e o marcador molecular de DNA ribossomal, gene espaçador interno transcrito 2 (ITS2). Os fragmentos obtidos foram (643 pb) para COX-1 e (580 pb) para ITS2 em amostras de DNA provenientes de 22 estados brasileiros nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Esses resultados mostram a complexo críptico nas populações de *R. microplus* das regiões brasileiras. O valor de F_{ST} (0,03405) sugere baixos sinais de estruturação. No entanto, o valor de alta diversidade haplotípica e baixa diversidade de nucleotídeos dado pelos genes COX-1 e ITS2, foi compartilhada por cinco regiões brasileiras analisadas. Estes valores são característicos de uma população que estava em processo de expansão, corroborado com os valores negativos dos testes de neutralidade e dos haplótipos apresentados nos diagramas em rede. É possível concluir que as árvores filogenéticas de COX-1 tem forte suporte para formação do grupo monofilético do complexo brasileiro *R. microplus* e são distintas de outras populações de todo o mundo. Conclui-se que a variabilidade genética apresentada pelos marcadores pode influenciar na resistência dos carrapatos aos acaricidas e na tentativa de desenvolver novas vacinas contra este parasita, contribuir para a transmissão de novos agentes patogênicos.

Palavras-chave: *Rhipicephalus microplus*; Filogenia; Variação Genética, Marcadores Genéticos; Análise de Sequência.

ABSTRACT

The tick's large genetic diversity and populational structure need further studies that can relate the genetic mutations that may happen due to the natural environmental pressure, leading ticks to develop a genetic variability that may influence tick resistance to acaricides. The objective of this work was to perform phylogenetic and phylogeographic relations inference on ticks from different Brazilian regions, which have been identified by molecular analysis as *Rhipicephalus microplus*, using the mitochondrial molecular marker cytochrome oxidase, subunit 1 gene (COX-1) and molecular ribosomal DNA marker, internal transcript spacer 2 gene (ITS2). Fragments with (643 bp) for COX-1 and (580 bp) for ITS2 from DNA samples sourced from 22 Brazilian States in the North, Northeast, Midwest, Southeast and Southern regions were obtained. It was concluded that phylogenetic trees of COX-1 showed strong support 99% to 100% for Maximum Likelihood (data not shown) and Posterior Probability Bayesian (P.P = 1) representing a monophyletic group cryptic Brazilian complex *R. microplus* and are distinct from the other populations of several countries. The use of COX-1 marker showed the divergence F_{ST} value of 0.03405, suggesting a low structure in populations of *R. microplus* sampled in this study reflected the unique haplotype and genotypic frequencies (50% and 33%) for COX-1 and ITS2, respectively. It was concluded that these results suggest that genetic variability represented by phylogenetic trees using mtDNA COX-1 marker, has influence on the strength of those acaricides group. The attempt to generate new vaccines may have different effect on the expected efficacy against this parasite because of genetic variability of cryptic complex formed in Brazilian populations of *R. microplus*, contributing to the transmission of new pathogens in their hosts.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*; Phylogeny; Genetic Variation; Genetic Marker; Sequence Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Arranjo de genes nos genomas mitocondriais já sequenciados	18
Figura 2 - Diagrama que ilustra a organização dos cistrons ribossômicos nucleares (caixa cinza) de uma célula eucarionte.....	20
Figura 3. Estados, municípios, coordenadas geográficas da amostras coletadas, marcadores moleculares utilizados em cada amostra, unidades de larvas e teleóginas	27
Figura 4 - Municípios de coleta de carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i> , Brasil, 2013-2014.....	28
Figura 5 - Diagrama de rede, do gene citocromo oxidase subunidade 1 (COX-I), com 14 haplótipos para <i>R. microplus</i>	29
Figura 6 - Cladograma com análise Bayesiana de 643 nucleotídeos, gene citocromo oxidase subunidade 1 (COX-I).....	30
Figura 7 - Assinatura molecular das amostras de <i>R. microplus</i> identificada neste estudo. (A) Alinhamento das sequências de COX-1 mtDNA. (B) Alinhamento da sequência de aminoácidos.....	31
Figura 8 - Diagrama em rede, do gene espaçador interno transcrito 2 (ITS2), com 8 genótipos para <i>R. microplus</i>	32
Figura 9 - Cladograma com análise Bayesiana de 580 nucleotídeos, gene espaçador interno transcrito 2 (ITS2).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMOVA — Análise molecular de variância
- COX-1 — Citocromo Oxidase subunidade 1
- DNAm_t — Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- DNAr — Ácido desoxirribonucleico ribossomal
- FST — Índice de fixação para alelos por locos
- ITS2 — Espaçador interno transcrito 2
- PB — Pares de base
- P.P — Probabilidade a posteriori

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Biologia do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> : ciclo de vida e transmissão de patógenos	14
2.2 Marcadores moleculares utilizados em estudos com carrapatos	16
2.3 DNA mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (COX-1).....	17
2.4 Espaçador interno transcrito 2 (ITS2)	20
3 OBJETIVO	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Coleta de carrapatos.....	23
4.2 Extração de DNA e amplificação por PCR	23
4.3 Análise genética.....	24
4.4 Alinhamento de sequências, análises filogenéticas e de rede.....	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Marcador mitocondrial, gene citocromo oxidase subunidade-1 (COX-1).....	26
5.2 Marcador nuclear, gene espaçador interno transcrito 2 (ITS2)	31
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO A – Artigo científico submetido a revista experimental and applied acarology, n. APPA-D-15-00005, como exigência para a obtenção do título de mestre.	45

1 INTRODUÇÃO

O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* encontra-se distribuído em regiões tropicais e subtropicais do mundo (ESTRADA-PEÑA *et al.*,2006). Além disso, este parasita pode transmitir patógenos que causam a babesiose (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e anaplasmose (*Anaplasma marginale*) (PETER *et al.*,2005; DE LA FUENTE *et al.*,2008).

O controle para este carrapato na maioria dos países pecuaristas é dispendioso e essa prática atualmente está relacionada com uso de acaricidas. No entanto, as populações de *R. microplus* resistentes a acaricidas tornaram-se um grande problema na maioria dos países produtores em todo o mundo e estudos da ecologia molecular e novas tecnologias de controle de carrapato são necessários para manter a eficiência na produção de gado (RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*,2007; ANDREOTTI *et al.*,2011; GUERRERO *et al.*,2014).

Dentre os novos estudos, a aplicação de marcadores moleculares em pesquisas com carrapatos tem produzido novos conhecimentos dentro de estrutura de populações e relações taxonômicas podendo desta forma, inferir nas relações individuais, populacionais e de espécies (Burger, *et al.*,2014).

Estudos com marcadores moleculares, realizados por Hoogstraal (1986), auxiliaram a traçar as distribuições geográficas de *R. microplus*, *R. annulatus* e *R. australis* e estes marcadores foram capazes de determinar que a disseminação destas espécies está vinculada ao tráfego de gado. Embora a disseminação de *R. microplus* não seja bem documentada, supõe-se ter originado na Índia (HOOGSTRAAL, 1986), de onde se espalhou para Madagascar e África Austral. Há pouca evidência de como ou quando *R. microplus* se espalhou para as Américas (LABRUNA *et al.*,2009), porém há indícios de que tenha ocorrido com o gado proveniente da Índia ou da África nos séculos 16 e 17 (BARRÉ; UILENBERG, 2010).

A maior parte da diversidade genética e estrutura populacional de carrapatos por ser muito abundante, necessita de mais estudos que relacionem mutações que possam ocorrer devido a pressão natural do ambiente, levando estes carrapatos a desenvolverem variabilidade genética que pode influenciar na resistência do carrapato aos acaricidas (SONG *et al.*,2011), na tentativa de novas vacinas contra este parasita e possibilidade de transmissão de novos patógenos (DE LA FUENTE; MERINO, 2013).

Estudos com marcadores de genomas mitocondriais e nucleares são cada vez mais utilizados para tratar as relações filogenéticas controversas e demonstram se ocorre evolução entre populações de diferentes espécies (KANDUMA *et al.*,2012).

O DNA *barcode* ou DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido proposto como uma ferramenta universal para identificação da diversidade biológica, sendo utilizado como um marcador molecular. Este método de identificação foi baseado em um conjunto de informações de um fragmento de cerca de 688 pares de base de sequências de DNAm do gene citocromo oxidase I (COX-I) de diferentes espécies. Diversos estudos mostraram que o DNA *barcode* tem a função de identificação universal e muito eficaz para diversos organismos (HEBERT *et al.*, 2003, 2004; BARRETT; HEBERT, 2005).

Além do DNA *barcode*, o DNA ribossômico (DNAr) também é utilizado como marcador molecular nuclear. O espaçador interno, transcrito 2 (*internal transcribed spacer 2*, ITS-2), é um espaçador que situa-se entre as subunidades ribossomais 5.8S e 28S de rDNA (CRUICKSHANK, 2002). Estes genes estão arranjados em unidades repetidas, denominadas de cístron ribossomais, possuem cópias repetidas e desta forma, são alvos eficazes para análises em sistemática molecular, como estudos para relações filogenéticas (CAMPBELL *et al.*, 1993; SONG *et al.*, 2011; BURGER *et al.*, 2014).

Os marcadores moleculares podem contribuir significativamente para o conhecimento na ecologia intra e inter específica das populações de *R. microplus*, para a obtenção de espécies que não tenham resistência aos acaricidas e ainda não possuam resistência as tecnologias de vacinas contra este ectoparasita (FERREIRA; GRATAPAGGLIA, 1998; SONG *et al.* 2011, DE LA FUENTE; MERINO, 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ciclo de vida e transmissão de patógenos

Rhipicephalus microplus ou carrapato do boi, é um ectoparasita hematófago e monoxeno, ou seja, depende somente de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, ingerindo linfa, substratos teciduais e sangue (MURREL; BARKER, 2003).

Pertence ao filo Artropoda, classe Arachnida, família Ixodidae, e uma das características morfológicas desta família é o corpo duro. Uma das hipóteses é que este carrapato tenha se originado da Ásia, está presente em regiões tropicais e subtropicais onde o calor e a umidade propiciam condições favoráveis à sobrevivência e manutenção de sua espécie (BARLOW; POWELL, 1981).

A vida de *R. microplus*, está dividida em dois ciclos, (1) fase de vida livre, o carrapato encontra-se no ambiente e (2) fase de vida parasitária, o carrapato encontra-se em seu hospedeiro. A fase de vida livre tem início com o período de pré-postura da fêmea, quando a teleógina ingurgitada se desprende de seu hospedeiro e cai no ambiente, entre dois a três dias inicia a fase de postura dos ovos (GONZALES, 1984).

Depois desta fase, começa a eclosão dos ovos, são necessários aproximadamente cinco a dez dias podendo perdurar aproximadamente 300 dias até a total eclosão dos ovos isso ocorre porque este é um estágio imóvel no ciclo de vida do carrapato e esta relacionada com o micro habitat (WILKINSON, 1970).

Após a eclosão das neolarvas são necessários de quatro a 20 dias para que se tornem larvas infestantes podendo ficar mais de seis meses sem se alimentarem. Sendo assim, a fase de vida livre depende da sazonalidade, umidade e temperatura do ambiente (BENNET, 1974; OBA *et al.*, 1976)

O ciclo de vida de fase parasitária de *R. microplus* começa quando a larva infestante sobe no hospedeiro. Quando está no hospedeiro, a larva passa a ser considerada parasita e transforma-se em metalarva, em média são necessários cinco dias para essa transformação, sucede-se então transformações de larva para ninfa, ninfa para adulto seguido do ingurgitamento da teleógina (REIK, 1965).

Quando o carrapato está na fase de larva, o principal alimento é o plasma até que ocorra a primeira muda que dá origem a ninfa. Então, sofrem muda e transformam-se em adultos, originando carrapatos machos ou fêmeas. Quando adultos, estes carrapatos se acasalam e as fêmeas fecundadas continuam o processo de hematofagia. O sangue torna-se o

principal constituinte alimentar até o ingurgitamento das ninfas e principalmente das fêmeas (TATCHELL *et al.*, 1972).

Geralmente o período de acasalamento acontece a partir do 17º dia da infestação (3º dia da fase adulta). Após a cópula ocorre um rápido ingurgitamento das fêmeas, aumentando seu peso em até 200 vezes e ocorre a queda da fêmea no ambiente. A fêmea chega a produzir um total de 2.000 a 3.000 ovos. Os machos permanecem mais tempo sobre o bovino, podendo então se acasalarem com outras fêmeas (LONDT; ARTUR, 1975; MOORHOUSE; TATCHELL, 1966).

Esses artrópodes são ectoparasitas de todos os vertebrados terrestres e existem 896 espécies descritas de carrapatos em três famílias. Dessas espécies, 82 são validadas como pertencentes do gênero *Rhipicephalus* (Kock, 1844). Porém, uma nova espécie foi encontrada no Kenia, *Rhipicephalus walkerae*, parasitando girafas (GUGLIELMONE *et al.*, 2010; HORAK, *et al.*; 2013).

Os carrapatos também atuam como vetores de agentes infecciosos muitos dos quais são responsáveis por zoonoses. Animais selvagens podem manter e restabelecer os carrapatos e agentes patogênicos que são transmitidas para outros animais e seres humanos por meio de hospedeiros alternativos (PAROLA; RAOULT, 2001; RUIZ-FONS; GILBERT, 2010).

Nos últimos anos, muitos fatores mudaram as interações entre os seres humanos, animais e meio ambiente e isso fez com que ocorresse a emergência e reemergência de muitas doenças. Populações humanas estão crescendo e se expandindo para novas áreas geográficas. Como resultado, mais pessoas vivem mais próximas de animais selvagens, propiciando maiores oportunidades para doenças serem transmitidas entre animais e pessoas (DASZAK *et al.*, 2001).

Além disso, a Terra passou por mudanças no clima e uso da terra, como o desmatamento e práticas de agricultura intensiva. Então, ocorreram perturbações das condições ambientais e *habitats* oferecem novas oportunidades de animais adquirirem doenças e, estas por sua vez, serem transmitidas para outros animais e seres humanos (BRAKS *et al.*, 2014; NAVA *et al.*, 2013).

Estudos são cada vez mais abordados com relação à doenças infecciosas emergentes e apontam alterações da cobertura vegetal e uso da terra, incluindo o desmatamento e a fragmentação da floresta, juntamente com a urbanização e intensificação da agricultura, como os principais contribuintes. A maioria das doenças infecciosas emergentes é originária de animais selvagens, em vez de animais domésticos (SMITH *et al.*, 2009).

Muitas doenças relacionadas com a picada de carrapato em humanos, como a febre maculosa, babesiose, doença de Lyme e riquetsioses vieram de animais selvagens para o homem devido ao aumento da interação de humanos e florestas (JONES *et al.*,2008).

O impacto do comportamento humano sobre o meio ambiente, em conjunto com mudanças climáticas afetam a disseminação nas relações patógenos/vetores/hospedeiros (GRAY, 2007; ESTRADA-PEÑA, 2009).

Neste contexto, o carrapato *R. microplus*, pode participar da relação patógeno/vetor/hospedeiro, mantendo a circulação de agentes infecciosos em humanos. *R. microplus* é um carrapato monoxeno porém, pode alimentar-se em animais selvagens e domésticos, eventualmente, compartilhando o mesmo hospedeiro com *Amblyomma* spp. que é um carrapato heteroxeno e transmissor de riquetsioses (LABRUNA *et al.*,2005).

Muitos agentes bacterianos foram detectados em *R. microplus*, incluindo *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia* spp., *Coxiella burnetti* e *Borrelia theileri*, o agente causador da borreliose em bovino (YPARRAGUIRRE *et al.*,2007).

Uma vez que, carrapatos, patógenos e seus hospedeiros estão ligados, as informações sobre a diversidade e distribuição da fauna de carrapatos passa a ser muito importante compreender (PETNEY *et al.*,2011; GUILLEMI *et al.*,2015).

Para que isso seja possível, estudos de genética de populações utilizando marcadores moleculares para analisar se há diferenças dentro ou entre populações da mesma espécie são necessários (SONG *et al.*,2011).

2.2 Marcadores moleculares utilizados em estudos com carrapatos

Existem diversos genes e marcadores moleculares caracterizados. Estes podem ser agrupados em duas categorias principais: (1) genes mitocondriais, DNAm, como o 12S, 16S e COX-1, utilizados para elucidar divergências filogenéticas e marcadores ribossomais, DNAr, entre eles os principais utilizados como marcadores são: 18S, 28S e ITS2, que da mesma forma são utilizados em estudos de filogenia e diversidade genética, (2) genes relacionados com os processos hematofágico e parasitário como genes codificadores de proteases (BURGER *et al.*,2012; TIRLONI *et al.*,2014).

Klompen *et al.*,(2000) por meio dos marcadores moleculares 18S, 28S e 16S de DNA nuclear ribossomal, propuseram que as linhagens endêmicas de carrapatos australianos,

incluindo a família Ixodidae, foram originadas no período do Cretáceo tardio, sendo assim, são muito mais recentes do que o indicado por outros estudos.

Utilizando gene de DNAm, Crosbie *et al.*,(1998) puderam constatar que onze amostras de *Dermacentor hunteri* apresentaram pouca variação genética, apenas em um único par de base distinto entre cada um dos cinco haplótipos estudados e puderam concluir que este grupo representa um táxon monofilético. Entretanto *D. albipictus* apresentou alta variação intra-específica em que necessita de investigação mais aprofundada.

Estudos com DNAr realizados por Beati e Keirans (2001) utilizaram sequências mitocondriais 12S de DNAr e conseguiram diferenciar mais 63 caracteres morfológicos de 36 espécies de carrapatos que pertencem a sete gêneros, determinando relações filogenéticas entre espécies do gênero *Rhipicephalus* e entre os gêneros *Rhipicephalus* e *Boophilus*.

Os ramos das árvores filogenéticas obtidas possuíam melhor resolução, quando os dados eram combinados em conjunto do que aqueles de árvores com dados combinados separadamente. Desta forma, foi possível diferenciar que o gênero *Boophilus* é um grupo monofilético e surgiu dentro de *Rhipicephalus* sp. (BEATI; KEIRANS, 2001).

Também é possível verificar diferenças entre populações de *R. microplus* e observar a existência de espécies chamadas de crípticas, ou seja, morfologicamente similares, mas geneticamente distintas (BURGER *et al.*,2014).

Sendo assim, para aumentar resoluções de árvores e verificar divergências entre populações os marcadores DNAm e DNAr são utilizados separadamente, porém, de forma complementar (NAVAJAS; FENTON, 2000).

2.3 DNA mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (COX-1)

A fosforilação oxidativa mitocondrial representa mais de 90% da produção de adenosina trifosfatada (ATP) em condições fisiológicas normais na maioria das células e tecidos. As mitocôndrias são também envolvidas na manutenção da homeostase de Ca^{2+} , além de realizar os passos de reações essenciais como metabolizar hormônio esteroide, síntese de pirimidina, eliminação da amônia através do ciclo da ureia e a morte celular programada. Além disso, as mitocôndrias são as principais fontes celulares de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*-ROS) (JEZEK, HLAVATA, 2005).

Quase todas as funções das mitocôndrias são direta ou indiretamente ligadas ao funcionamento da via metabólica de fosforilação oxidativa e energia de acoplamento. A maior

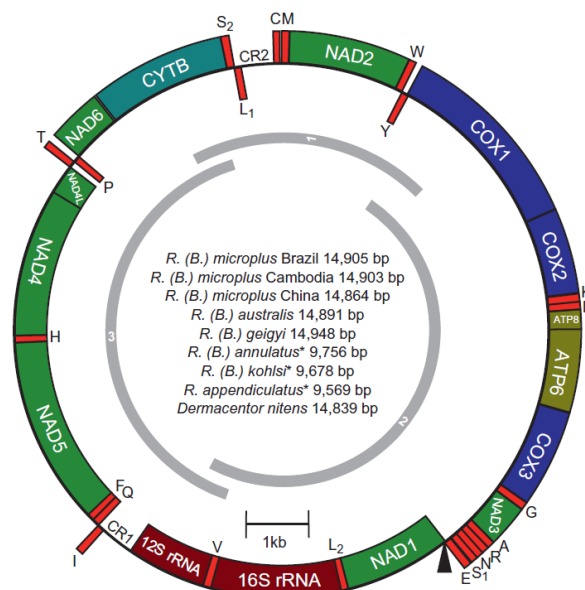
parte desse mecanismo está no interior da membrana mitocondrial e compreendem quatro complexos para a cadeia de transferência de prótons e elétrons (complexos I, II, III, e IV), síntese de ATP (complexo V), ubiquinona e Citocromo C como transportadores de elétrons. Complexo IV ou CO é a enzima terminal da cadeia de transporte e catalisa o último passo da transferência dos elétrons e redução do citocromo em oxigênio para fazer H₂O (SRINIVASON, AVADHANI, 2012).

A subunidade 1 da Citocromo Oxidase (COX-1) do DNA mitocondrial faz parte deste complexo gênico codante de proteínas transmembranas, esta subunidade está envolvida no transporte elétrico e catálise da cadeia respiratória de organismos eucariotos. Este gene vem sendo alvo de estudos populacionais de variabilidade genética pela sua universalidade e importância evolutiva (HEBERT *et al.*, 2003).

A biologia molecular e os padrões evolutivos do DNAmT de animais são bem compreendidos, Burger *et al.* (2014), sequenciaram o genoma mitocondrial da espécie brasileira *R. microplus* e tem 14,905 pb como apresentados na Figura 1.

O DNAmT permitiu verificar que as diversas populações de *R. microplus* do sul da China e do Norte da Índia são mais estreitamente relacionados a *R. annulatus* que outros espécimes de *R. microplus* *scrito sensu* da Ásia, América do Sul e África, sendo esta divergência provavelmente devido a polimorfismos em regiões do DNAmT, COX-1.

Figura 1- Arranjo de genes nos genomas mitocondriais já sequenciados



Fonte: BURGER; SHAO; BARKER (2014, p.243).

Uma vez que os polimorfismos em diferentes populações podem denotar resistência à vacina, como no caso do antígeno Bm86 de *R. microplus*, a variabilidade genética pode influenciar na tentativa de novas vacinas contra este parasita e possibilidade de transmissão de novos patógenos (DE LA FUENTE *ET AL.*, 1999; DE LA FUENTE, MERINO, 2013).

A divergência entre populações em países vizinhos também pode ocorrer, como por exemplo, as pesquisas realizadas por Szabó et al. (2005), que ao compararem o DNAm de duas populações de *R. sanguineus* dentro da América do Sul descobriram divergência entre as populações destes carrapatos, em um município no Brasil e outro na Argentina.

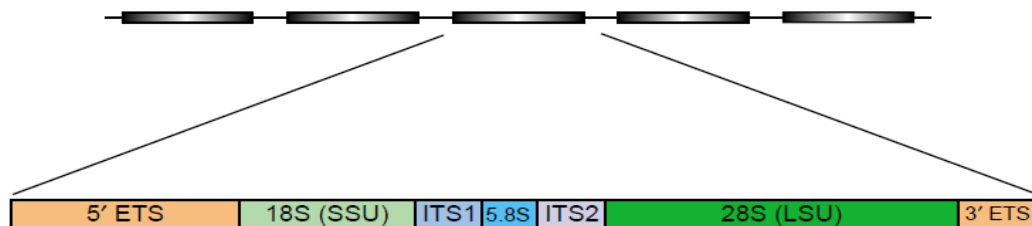
Devido aos trabalhos realizados como os de Hebert et al. (2003), podem ser conduzidos estudos de filogenia molecular utilizando DNAm gene COX-1. Este gene auxilia na resolução de divergências sobre a diversidade animal, devido a sua taxa de mutação ser frequentemente rápida para distinguir espécies estreitamente relacionadas e por causa de sua sequência ser conservada entre os membros da mesma espécie, desta forma este gene funciona como uma importante chave para análise do sistema taxonômico.

2.4 Espaçador interno transcrito 2 (ITS2)

O DNA ribossômico nuclear de eucariontes é composto por uma grande família gênica de sequências repetitivas (tandem), em torno de 100 cópias por genoma haplóide, organizados em arranjo tandem (COLEMAN, 2003).

O DNAr é caracterizado por sofrer um processo evolutivo não independente das sequências repetitivas, resultando em uma grande similaridade entre as unidades que o compõem, exibindo padrões de evolução combinado. Cada unidade repetitiva é composta pelos genes codificadores ribossomais 18S, 5.8S e 28S, intercalados por dois espaçadores internos (ITS1,2) e dois espaçadores externos (ETS) (Fig 2) (YOUNG, COLEMAN, 2004).

Figura 2 - Diagrama que ilustra a organização dos cistrons ribossômicos nucleares (caixa cinza) de uma célula eucarionte.



Fonte: COLEMAN (2003, ADAPTADO).

Em ixodídeos, o primeiro e segundo espaçador interno transcrito do DNAr são utilizados como marcadores moleculares em diversas situações. Podem ser úteis para avaliar a existência de espécies crípticas da mesma forma que o marcador molecular mitocondrial (SONG *et al.*, 2011).

Estes são utilizados para avaliar a diversidade molecular interespecífica, além de contribuir para a identificação de diversas espécies, devido à baixa variabilidade intraespecífica, constituindo-se em uma ferramenta molecular para estudos de populações (GASSER *et al.*, 1998; BLAXTER, 2000).

A sequência do gene 5.8S, que fica localizada antes do gene ITS no genoma, é altamente conservada, sendo útil para verificar a identidade de uma sequência. A metodologia também facilita a eliminação de contaminação de sequências de outras espécies (YLI-MATTILA *et al.*, 2000).

Nos genes ribossomais conservados, os *primers* de PCR podem ser definidos para trabalho em uma gama muito vasta de espécies, auxiliando em estudos de filogenia,

agrupando espécies em árvores para analisar divergências filogenéticas (KALISZEWSKI *et al.*,1992).

Estudos realizados por de la Fuente *et al.*,(2005) demonstraram que utilizando marcador molecular ITS2 foi possível verificar variações genéticas extensivas entre carrapatos de morfologias diferentes pertencentes à espécie *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae).

As vantagens mais interessantes em se trabalhar com o marcador molecular ITS2 são a universalidade intragenômica e a variabilidade intergenômica (ÁLVAREZ; WENDEL, 2003).

A universalidade intragenômica em que famílias multigênicas podem estar sujeitas a processos de coevolução, se torna vantajosa por eliminar variações das sequências dentro do genoma permitindo apenas mudanças em clados específicos, formando a árvore filogenética. A variabilidade intergenômica consiste no nível de variação da região ITS, considerado adequado para as inferências filogenéticas em espécies, gêneros e estendendo-se para a família (ÁLVAREZ; WENDEL, 2003).

3 OBJETIVO

Proceder a inferência entre as relações filogenéticas e filogeográficas em carrapatos *Rhipicephalus microplus*, a partir de sequências gênicas de DNA mitocondrial COX-1 e DNA nuclear ITS2 a partir de amostras obtidas em diferentes regiões do Brasil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de carrapatos

Os carrapatos estudados foram obtidos a partir de 22 localidades ao longo da sua distribuição geográfica nas regiões do Brasil entre os anos de 2013-2014 (Fig. 3 e 4). Larvas e teleóginas de carrapatos foram coletadas do ambiente e preservadas em álcool isopropílico 70%. Duas pernas dianteiras de cada amostra foram retiradas com bisturi e pinça esterilizados. O restante da amostra foi armazenado em ultrafreezer a -80°C para futuras análises.

4.2 Extração de DNA e amplificação por PCR

Os carrapatos foram submetidos à extração de DNA utilizando-se o reagente DNAzol[®] Reagent (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro GeneQuant pro RNA/DNA (The Pharmacia, Biochrom Cambridge CB4 0FJ, England) ou NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), e uma relação A260nm/A280nm acima de 1,6 foi estabelecida como aceitável. A concentração das amostras foi corrigida para $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e, posteriormente, o DNA foi submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das regiões COX-1 e ITS2, gerando produtos de 681pb e 749pb, respectivamente. O fragmento do gene COX-1 foi amplificado utilizando o par de iniciadores COX-1.2 F (5'-CTTCAGCCATTTTACCGCGA-3') e COX-1.2R (5'-CTCCGCCTGAAGGGTCAAA -3'). O fragmento de ITS2 foi amplificado com os primers ITS-2F (5'-TCGGATCACATATCAAGAGAG-3') e ITS-2R (5'-CCCAACTGGAGTGGCCCAGTTT-3').

A PCR foi padronizada para um volume final de 25 μl , contendo Tampão 1X, 1,5 mM de MgCl, 8 mM de dNTPs, 10 μM de cada primer (F e R), 0,5U de *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen by Life TechnologiesTM, North America, USA), 1 μL de DNA a 50 ng/ μL e água suficiente para o volume final. As condições de PCR foram otimizadas para cada reação, com a temperatura de anelamento ajustadas de acordo com os oligonucleotídeos utilizados. As condições gerais de PCR foram: 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min., seguido por 40 ciclos de 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min., 56 $^{\circ}\text{C}$ / 60 $^{\circ}\text{C}$ (COX-1 / ITS2, respectivamente) durante 30 s., 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min. 30 s. e extensão final de 72 $^{\circ}\text{C}$ por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados

em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Os produtos amplificados pela PCR foram purificados utilizando-se o kit Purelink™ Kit (Invitrogen by Life Technologies™, North America, USA) e em seguida, clonados em vetor de clonagem *pGemT-Easy*® (Promega, Madison, WI-USA), segundo manual do fabricante e posteriormente sequenciados.

4.3 Análise genética

O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado utilizando-se o método de Sanger, sequenciador ABI 3730 DNA Analyser, Applied Biosystems. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o primer universal para sequenciamento T7 Transcription Start (5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3') (TROWER, ELGAR, 1994) e o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As corridas foram realizadas em capilares de 36cm utilizando-se o polímero POP7 e as sequências geradas foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1, por meio do programa Base Caller KB Phred (EWING-GREEN 1998; EWING et al. 1998).

As sequências do plasmídeo foram identificadas e removidas, utilizando-se ferramenta do NCBI (VecScreen) (ALTSCHUL, *et al.*, 1997) em que um algoritmo de busca *hash* foi utilizado para remover as sequências de contaminantes. Foram geradas duas sequências consenso e alinhadas com os dados do GenBank por meio da plataforma *online* BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997), para encontrar regiões de similaridade local entre as sequências.

Haplótipos COX-1 em 17 amostras que representam 17 estados da federação brasileira e genótipos ITS2 de 16 amostras, representando 16 estados da federação brasileira, foram identificados utilizando-se a ferramenta DnaSP v 4.10 (ROZAS; SANCHEZ-DEL BARRIO, 2003).

Os testes de neutralidade, D de Tajima (TAJIMA, 1989) e F_s de Fu (FU, 1997), foram gerados através de 1.000 simulações, a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados, porque estas análises podem revelar sinais de expansão populacional. Variações dentro e entre as populações foram resumidas usando padrões estatísticos: número de haplótipos únicos (A), número de sítios segregados (S), diversidade haplotípica (h), diversidade de nucleotídeos (π) e análise de variância molecular (AMOVA), calculados usando o programa ARLEQUIN, versão 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Matrizes de pares não corrigidas e distância de p , foram obtidas utilizando-se o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2007).

4.4 Alinhamento de sequências, análises filogenéticas e diagrama de rede

As sequências de COX-1 e ITS2 foram alinhadas separadamente, utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999), o programa GUIDANCE (PENN *et al.*, 2010) foi utilizado para verificar a ocorrência de sequências ambíguas, corrigí-las e novamente alinhá-las utilizando o programa MAFFT versão 7.1.8.2 (STANDLEY, 2013), para maior credibilidade nos alinhamentos. Os parâmetros e os modelos de melhor ajuste na análise filogenética foram estimados para COX-1 e ITS2 separadamente, usando o programa Jmodel test versão 2 (DARRIBA *et al.*, 2012).

Os diagramas de rede foram construídos utilizando-se o programa Network versão 4.6.1.2 (BANDELT *et al.*, 1999). Árvores filogenéticas foram inferidas com análise de máxima verossimilhança (MV), utilizando o programa RAxML v8.1.X (STAMATAKIS, 2014), máxima parcimônia (MP) e métodos de Neighbor-Joining (NJ), utilizando o programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). Testes bootstrap (1.000 ciclos) foram executados nas árvores MV, NJ e o consenso MP, para avaliar a confiabilidade de cada clado.

Análises filogenéticas Bayesianas foram conduzidas utilizando-se MrBayes 3.1 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Todas as análises para COX-1 e ITS2 foram iniciadas com árvores e partidas aleatórias de 1×10^7 gerações e amostradas em 1.000 gerações.

Usando simulação de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC, *Markov chain Monte Carlo*), a pontuação log-verossimilhança dos pontos de amostragem foi plotada contra o tempo de geração. Os primeiros 25% dos dados foram descartados para cada conjunto gerado pelo programa Mr Bayes. As demais amostras foram mantidas para gerar árvores consenso. Cada amostra foi composta por uma topologia que incorpora comprimento dos ramos e os valores dos parâmetros do modelo de substituição. Estas topologias foram utilizadas para gerar um consenso maior que 50%. A espécie de carrapato *Dermacentor nitens* (COX-1: KC503258 / ITS2: KC503275) foi utilizada como grupo externo nas análises filogenéticas.

5 RESULTADOS

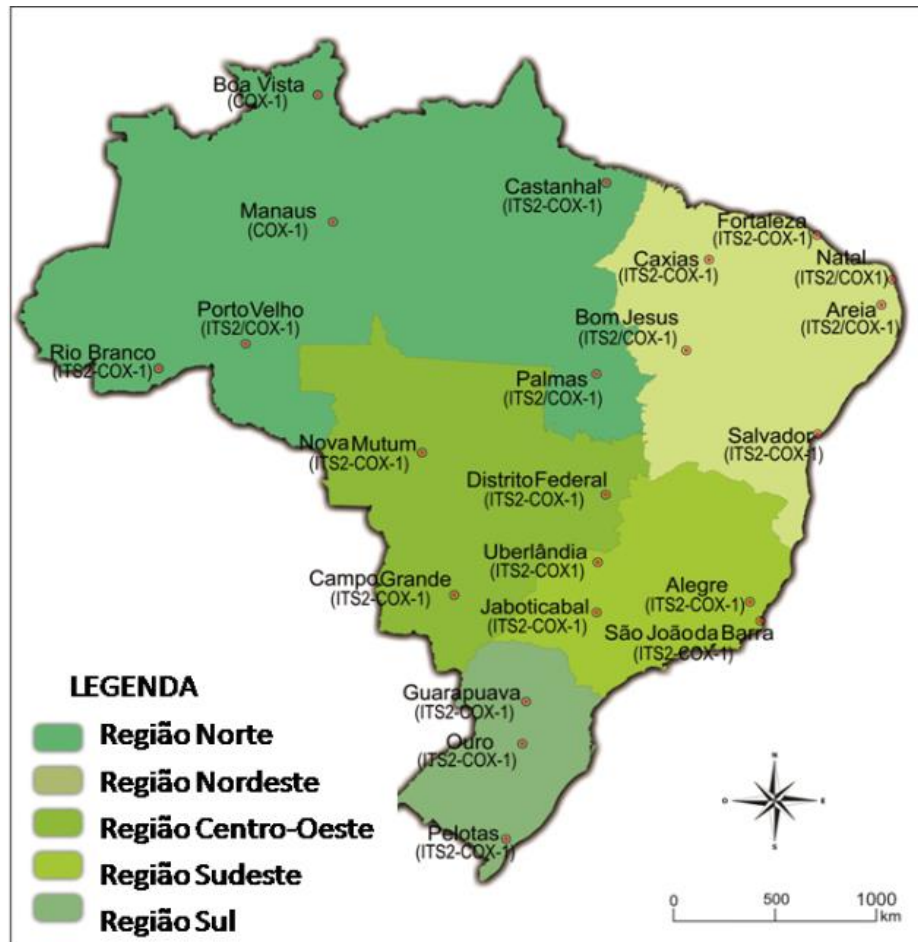
5.1 Marcador mitocondrial, gene citocromo oxidase subunidade-1 (COX-1).

Os oligonucleotídeos COX-1.2F/R amplificaram um fragmento de 643pb correspondente à sequência parcial do gene COX-1 para 22 amostras que possuíram identidade de 99% a 100% para *R. microplus* (Figura 3 e 4). O alinhamento das sequências COX-1 revelou 201 sítios segregados, 174 (86,57%) dos quais eram variáveis e 53 (26,37%) eram parcimônia informativo. Houve um desvio significativo da neutralidade total de (*D = -2,76; P < 0,001), (*F = 5,61; P < 0.02). Entre as 23 amostras analisadas para frequência haplotípica, 22 amostras deste estudo, amostra No. de acesso GenBank KC503261 e KC503258 foram observados 14 haplótipos, diversidade média de nucleotídeos (Pi= 0,06273) e diversidade haplotípica (Hd= 0,83), (No. de acesso GenBank: KP226158-KP226180).

Figura 3. Estados, municípios, coordenadas geográficas da amostras coletadas, marcadores moleculares utilizados em cada amostra, unidades de larvas e teleóginas

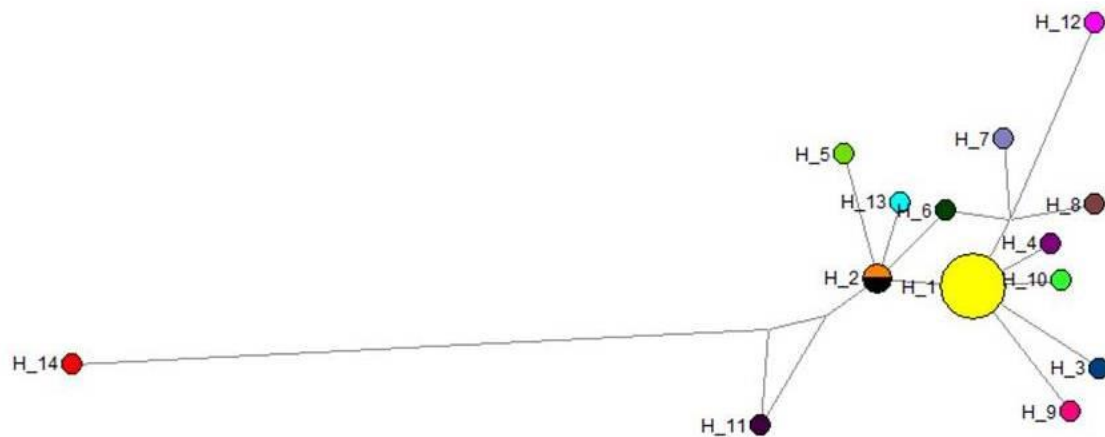
Região	Estado	Município	Coordenadas geográficas	Marcador molecular	Carrapatos (unidade)
Norte	Acre	Rio Branco	9° 59' 30" S/ 67° 48' 36" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Amazonas	Manaus	3° 6' 0" S/ 60° 1' 0" W	COX-1	Larva (400)
	Pará	Castanhal	1° 17' 49" S/47° 55' 19" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Rondônia	Porto Velho	8° 45' 43" S/ 63° 54' 14" W	ITS2/COX-1	Teleógina (12) Larva (400)
	Roraima	Boa Vista	2° 49' 10" N/ 60° 40' 17" W	COX-1	Larva (400)
	Tocantins	Palmas	10° 11' 4" S/ 48° 20' 1" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
Nordeste	Maranhão	Caxias	4° 51' 32" S, 43° 21' 21" W	ITS2/COX-1	Teleógina (10) Larva (400)
	Ceará	Fortaleza	3° 43' 6" S/38° 32' 34" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Rio Grande do Norte	Natal	5° 47' 42" S/ 35° 12' 32" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Paraíba	Areia	6° 57' 46" S/ 35° 41' 31" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Piauí	Bom Jesus	9° 4' 26" S/44° 21' 32" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Bahia	Salvador	12° 58' 16" S/ 38° 30' 39" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
Centro-Oeste	Mato Grosso	Nova Mutum	13° 49'44"S/ 56°04'56" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Goiás	Brasília-Distrito Federal	15° 47' 56"S/ 47° 52' 00"W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Mato Grosso do Sul	Campo Grande	20° 26' 34" S/ 54° 38' 45" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
Sudeste	Espírito Santo	Alegre	20° 45' 50" S/ 41° 31' 58" W	ITS2/COX-1	Teleógina (1) Larva (400)
	Minas Gerais	Uberlândia	18° 55' 8" S/ 48° 16' 37" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Rio de Janeiro	São João da Barra	21° 38' 24" S/ 41° 3' 3" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	São Paulo	Jaboticabal	21° 15' 18" S/ 48° 19' 19" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
Sul	Paraná	Guarapuava	25° 23' 42" S/ 51° 27' 28" W	ITS2/COX-1	Teleógina (1) Larva (400)
	Santa Catarina	Ouro	27° 20' 27" S/ 51° 37' 4" W	ITS2/COX-1	Larva (400)
	Rio Grande do Sul	Pelotas	31° 46' 19" S/ 52° 20' 34" W	ITS2/COX-1	Larva (400)

Figura 4 - Municípios de coleta de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, Brasil, 2013-2014.



O diagrama em rede demonstrou que alguns haplótipos estão em diferentes áreas geográficas (Fig. 5). Para cada amostra, um único tipo de haplótipo foi observado (24 amostras). O haplótipo 1 estava presente nas amostras dos seguintes estados: Acre, Roraima, Amazonas, Pará, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná, *R. microplus* KC503261 MS- Brasil, o haplótipo 2 estava presente nas amostras dos estados do Rio Grande do Sul e Ceará (Fig. 5).

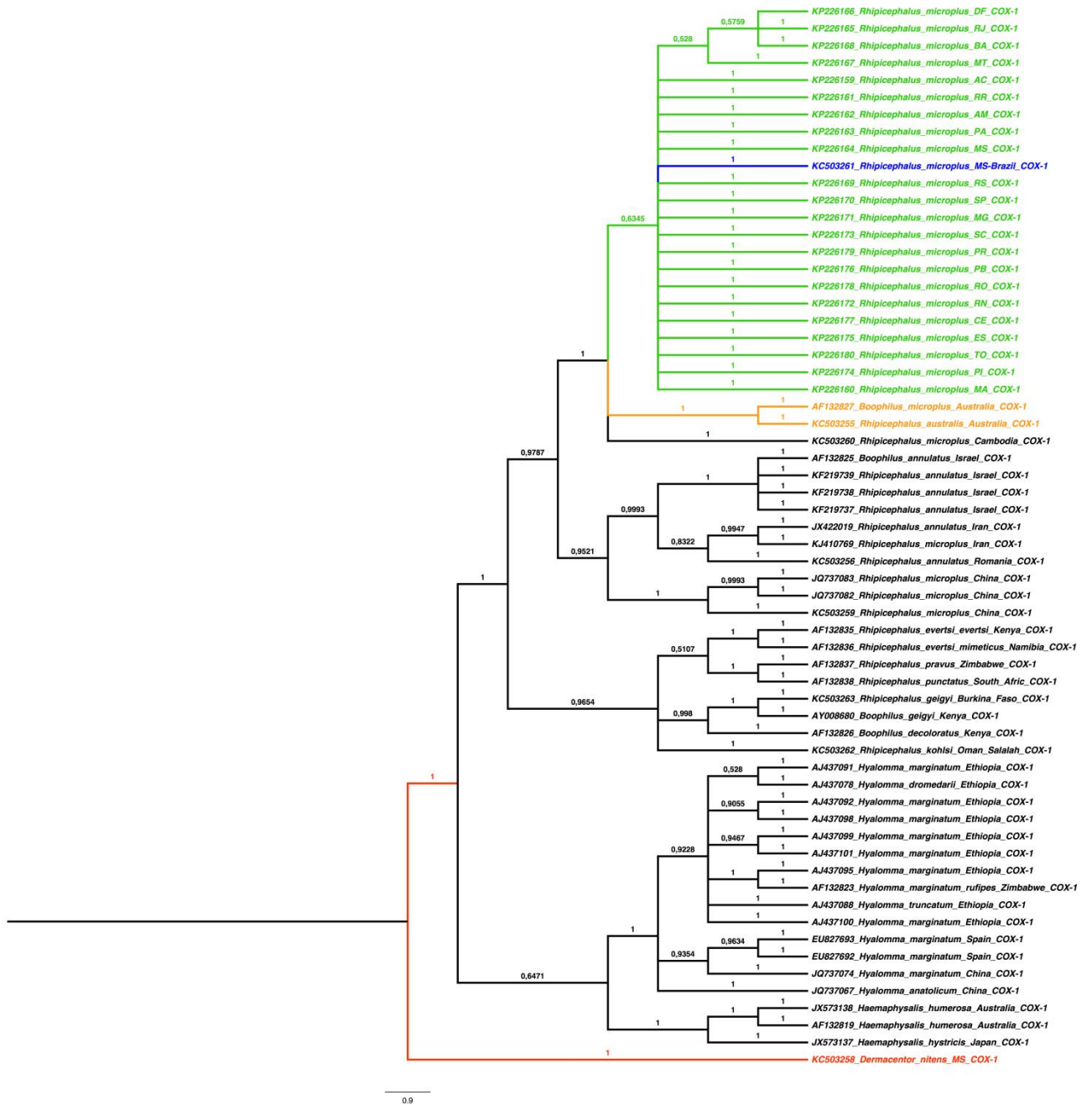
Figura 5 - Diagrama de rede, do gene citocromo oxidase subunidade 1 (COX-I), com 14 haplótipos para *R. microplus*.



Valores para a distância-p entre as populações foram observadas variando de 0,01% a 8,50% em amostras COX-1, incluindo *R. annulatus* KC503256, *R. australis* KC503255 e *D. nitens* KC503258 como grupo externo. Comparando a divergência dentro das populações, os valores de distância genética ficou entre 0% e 0,07%.

O melhor modelo de ajuste para o conjunto de dados foi o *General Time Reversible + Gamma* (GTR + G) (GATTO, *et al.*, 2006). O clado para o marcador molecular COX-1 foi formado por subespécie crípticas e representam um grupo complexo, constituído por carrapatos em 5 Estados brasileiros com suporte alto (99-100%) de *bootstrap* (dados não demonstrados) e com nós indicando probabilidade *à posteriori* Bayesiana (P.P = 1) (Fig.6).

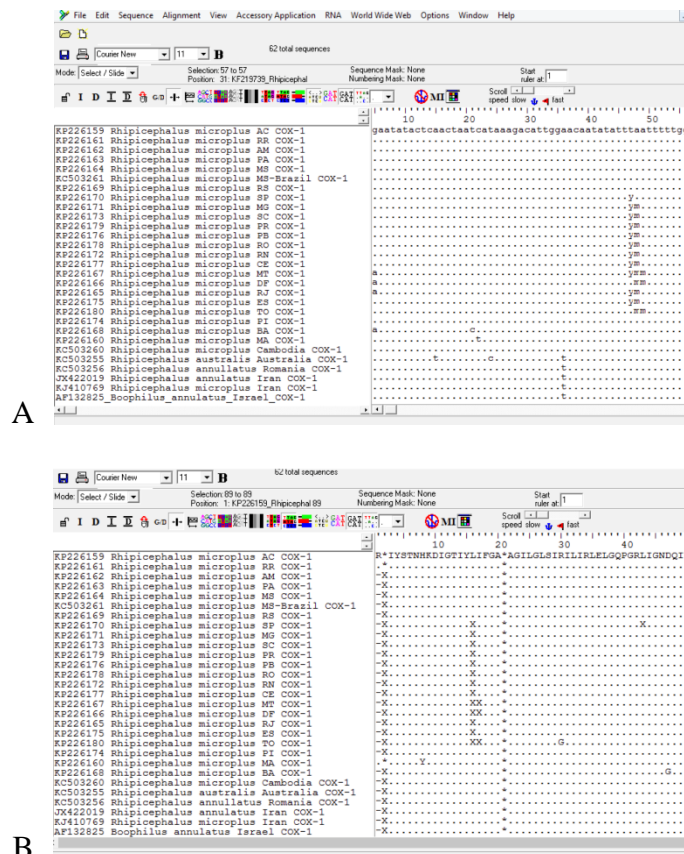
Figura 6 - Cladograma com análise Bayesiana de 643 nucleotídeos, gene citocromo oxidase subunidade 1 (COX-I).



Observou-se que, para o alinhamento do DNAm_t havia polimorfismos únicos que indicaram assinatura molecular, com a presença de três loci pertencentes apenas para as amostras de *R. microplus* neste estudo e que não ocorrem em outras populações de *R. microplus*, como apresentado na Figura 7, o alinhamento das sequências de COX-1 mtDNA, apresentou codon com três sítios (posições 43 a 45) para *Rhipicephalus microplus* deste estudo. As variações nucleotídicas foram: YMM, YMT YAA, YMA, TMM ao invés de TAA, presentes na maioria das amostras de *R. microplus* do Brasil, exceto *R. microplus* RS, MS, PI

e BA (Fig. 7A). O alinhamento da sequência de aminoácidos na posição 16 foi observado a letra (X) quando não se sabe ao certo o aminoácido gerado (Fig. 7B).

Figura 7 - Assinatura molecular das amostras de *R. microplus* identificada neste estudo. (A) Alinhamento das sequências de COX-1 mtDNA. (B) Alinhamento da sequência de aminoácidos.



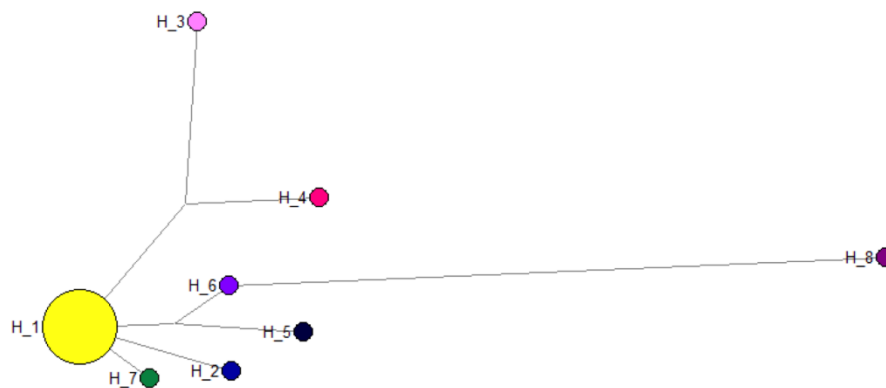
5.2 Marcador nuclear, gene espaçador interno transcrito 2 (ITS2)

Os oligonucleotídeos ITS2F/R amplificaram um fragmento de 580 pb correspondente a parte do gene ITS2 para 20 amostras (Figura 3 e 4), que possuíam identidade de 99% a 100% para *R. microplus*. Os alinhamentos das sequências ITS2, incluindo *D. nitens* KC503258 como grupo externo, foram composto de 580 sítios, 111 (19,13%) foram variáveis e 22 (3,8%) foram parcimônia informativo.

Foi observado diferença estatística no desvio de neutralidade (D de Tajima = -2,5736, $P < 0.001$; F_s de $F_u = 4,601$). Entre as 22 amostras analisadas para frequência genotípica, 20 amostras são deste estudo (GenBank No.: KP226139 a KP226158) e amostras *R. microplus*

MS-Brasil e *D. nitens* (GenBank No.: KC503273 e KC503275, respectivamente) foram observados total de oito genótipos, diversidade média de nucleotídeos ($P_i = 0,02943$), diversidade haplotípica ($H = 0,545$) e variância da diversidade ($VarH = 0,01629$) (No. de acesso GenBank: KP226158-KP226180). Foi observado somente um genótipo para cada área geográfica (Fig. 8).

Figura 8 - Diagrama em rede, do gene espaçador interno transcrito 2 (ITS2), com 8 genótipos para *R. microplus*.



Cada amostra apresentou apenas um genótipo (21 amostras incluindo *R. microplus* Brazil KC503273). O genótipo 1 foi o mais amplamente distribuídos nos Estados do Acre, Ceará, Pará, Paraíba, Rio Grande do Sul, Rondônia, Mato Grosso, *R. microplus* MS Brasil-KC503273, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Piauí e Tocantins (Fig. 8).

Filogenias foram inferidas a partir das 20 amostras utilizando o marcador molecular ITS2 identificados por sequenciamento e análise morfológica como *R. microplus*. Dentro das populações, os valores distância-p variaram de 0% a 0,11% para as amostras ITS2. Em comparação com a divergência inter-específica, o valor da distância genética mais baixa foi de 3,6%, incluindo *R. annulatus* KC503267, *R. australis* KC503268 e *D. nitens* KC503275 como grupo externo. O clado ITS2 formou um grupo em que não houve uma diferenciação entre todas as espécies analisadas neste estudo, incluindo as espécies com DNA depositados no banco de dados GeneBank, porém obtiveram suporte de 94% de bootstrap (dados não demonstrados) pela análise GTR+G e análise bayesiana (P.P = 1) (Fig. 9).

Tabela 1 - Análise molecular de variância

Fonte de variação	d.f	Soma dos quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem de variação
Entre populações	4	5.373	0.04112 _{va}	3.40
Dentro das populações	17	19.833	1.16666 _{vb}	96.60
Total	21	25.206	1.20778	
FST Index de Fixação	0,03405			

6 DISCUSSÃO

Foram inferidas as relações filogenéticas e filogeográficas de *R. microplus* a partir de sequências COX-1 (22 amostras) e ITS2 (20 amostras) utilizando 42 amostras de larvas e teleóginas obtidas nas cinco regiões do Brasil. Este é o único trabalho que possui a maior amostragem estudada de *R. microplus* no Brasil.

Carrapatos das diferentes regiões brasileiras foram identificados como *R. microplus* (CANESTRINI, 1888), por meio de sequenciamento, e as análises filogenéticas para COX-1 demonstraram que as populações de *R. microplus* no Brasil constituem populações distintas entre outras populações como observado nas populações de *R. microplus* (China-JQ737082) com 9,3% de divergência e análise Bayesiana com alta resolução (probabilidade *a posteriori* =1) para COX-1 (Fig. 6).

Burger et al. (2014) demonstraram a relação críptica que formam complexo entre *R. microplus* (COX-1:KC503261/ITS2:KC503273) e *R. australis* (COX-1:KC503255/ITS2:KC503268).

No entanto, o presente estudo apresentou dados com divergência 6,4% (COX-1) e 3% (ITS2) entre as espécies *R. microplus* e *R. australis*. A árvore filogenética COX-1 contém alto suporte, com análise bayesiana e probabilidade posterior (P.P = 1) para o grupo monofilético formado pelo complexo brasileiro *R. microplus*.

Apesar da divergência alta, a árvore com o marcador molecular COX-1 apresentou relações entre o clado do complexo brasileiro *R. microplus*, sendo irmã de *R. australis* e *R. microplus* (Camboja-KC503260), com 98% de suporte bootstrap (dados não mostrados) e análise Bayesiana com alto valor de suporte (P.P = 1) (Fig.6).

A população de *R. microplus* (KC503261) Cambodja, quando comparada com a população de *R. microplus* (MS-Brazil- KC503260) apresentou divergência (1,1%, 1,9%) para COX-1 e ITS2, respectivamente, o que é considerada baixa segundo estudos de Hebert *et al.*,2003.

Este resultado sugere uma relação estreita entre essas duas populações (Fig. 6). No entanto, uma baixa resolução na árvore filogenética com o marcador nuclear ITS2 foi observado pois não permitiu diferenciar as diversas populações de *R. microplus* com relação a outras espécies (Fig. 9).

Este marcador nuclear pode ser adequado para a identificação de espécies e inferência entre populações para outros estudos (BURGER *et al.*,2014). Apesar de ITS2 não apresentar

boa resolução, COX-1 apresentou potencial para resolver as relações filogenéticas entre os subtipos aparentes dentro do complexo *R. microplus* (Fig. 5 e 6).

Neste estudo foi demonstrado que o marcador molecular COX-1 possuiu a vantagem de apresentar taxas de mutações maiores que o marcador nuclear utilizado neste estudo. Estes resultados corroboram com o trabalho realizado por Provan, (2001) ao concluir que o marcador COX-1 não sofre recombinação em função do tempo de coalescência e são mais sensíveis a eventos demográficos.

Os teste de neutralidade apresentado neste trabalho indica expansão populacional, sem efeito de seleção e os valores observados indicam uma varredura em mutações ancestrais (*D = -2,77, P < 0,05), (*F = -4,9 P < 0,02). Portanto, estes valores observados no teste de neutralidade indicam que COX-1 é adequado para aprofundar estudos sobre divergência genética corroborando com estudos realizados por Song et al. (2011).

Observa-se que os carrapatos de diferentes áreas geográficas são geneticamente distintos e tal achado corrobora com a hipótese de Jackson (2000, 2002), em que aponta para a classe taxonômica nomeada pelos critérios morfológicos de Roberts, 1960 (Acari: Ixodoidea) pode não ser suficientes para identificar espécies. Portanto, marcadores moleculares surgem como uma nova coluna para sustentar a abordagem da “taxonomia integrativa” (PADIAL *et al.*, 2010)

A divergência F_{ST} 0,03405, observada na tabela 2 sugere baixa estruturação nas populações do complexo brasileiro *R. microplus*, estando de acordo com os critérios de Wright (1978), refletido pelos números de haplótipos exclusivos. Entretanto, populações apresentaram valores elevados de diversidade haplotípica (h) e baixos valores de diversidade de nucleotídeos (π). De acordo com Grant e Bowen (1998), uma combinação de $h > 0,5$ com $\pi < 0,01$ indica uma recente redução da população seguido de uma expansão populacional.

A diversidade haplotípica observada neste estudo foi de 60% (13/22), exclusiva para o marcador molecular COX-1, ou seja, um haplótipo por amostra constituindo um Estado Federativo Brasileiro e a diversidade genotípica para o marcador molecular ITS2 foi de 35% (7/20) (Fig. 8 e 9).

Estudos com amostragens semelhantes realizados por Song et al. (2011) detectaram seis genótipos ITS2 de 134 indivíduos para *Ixodes holocyclus* e *Ixodes cornuatus* em 3 regiões distintas. Portanto, a frequência genotípica observada neste estudo é maior que a observada por Song et al. (2011) mesmo que a quantidade de amostras tenha sido menor.

Embora, outros estudos que apontassem para que o marcador molecular COX-1 apresentasse desempenho limitado nas espécies, tornando as identificações ambíguas devido à

sobreposição entre a variabilidade intra e interespecífica (MEIER *et al.*, 2006), até o momento a região escolhida mostrou grande capacidade em discriminar espécies e em revelar diversidade críptica (WAUGH, 2007; FREZAL; LEBLOIS, 2008; BAKER *et al.*, 2009; BECKER *et al.*, 2011; BURGER, *et al.*, 2014).

A assinatura molecular descoberta neste estudo está caracterizada por ser um sítio único no locus 1.201-1.203 entre as sequências do genoma de *R. microplus* KC503261. Estes dados demonstram que o complexo de *R. microplus* deste estudo, possivelmente está relacionado a uma população de espécies crípticas para *R. microplus* (Fig. 7A e B).

Golovljova *et al.* (2008) identificaram uma assinatura molecular que possivelmente constitui evidências indiretas do envolvimento de processos funcionais por meio de análise dos aminoácidos encontrados.

7 CONCLUSÃO

Concluí-se que as amostras deste estudo possuem um grupo monofilético do complexo brasileiro *R. microplus* e são distintas de outras populações de *R. microplus*, porém possuem semelhanças com *R. australis*.

A assinatura molecular neste trabalho precisa de mais estudos para entender o processo funcional na formação da proteína COX-1.

A variabilidade genética apresentada pelo marcador DNAm COX-1 pode influenciar na resistência do carrapato aos acaricidas e na tentativa de desenvolver novas vacinas contra este parasita contribuindo então para a transmissão de novos patógenos.

A utilização de outros marcadores moleculares juntamente com maior número de amostras possibilitará maior capacidade para identificar subtipos do complexo brasileiro *R. microplus*, entre outras populações, permitindo melhor compreensão das relações filogenéticas e distribuições geográficas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.
- ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequence and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 3, p. 417-434, Dec. 2003.
- ANDREOTTI, R.; GUERRERO, F. D.; SOARES, M. A.; BARROS, J. C.; MILLER, R. J.; PEREZ, L., A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Brazilian State of Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 20, n. 2, p. 127-133, Apr./June 2011.
- BAKER, A. J.; TAVARES, E. S.; ELBOURNE, R. F. Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds. **Molecular Ecology Research**, v. 9, suppl.s1, p. 257-268, May. 2009.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, n. 1, p. 37-48, Jan. 1999.
- BARRÉ, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Revue Scientifique Technique (International Office of Epizootics)** v. 29, n. 1, p. 149-160, Apr. 2010.
- BARLOW, W.; POWELL, D. O. Ixodes as a source of conflict: Otis E. Hunt vs. J. Mason Warren. **Journal of History of Medicine and Allied Sciences**, v. 36, n. 2, p. 221-224, Apr. 1981.
- BARRETT, R. D. H.; HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, p. 481- 491, May. 2005.
- BEATI, L.; KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 32-48, Feb. 2001.
- BECKER, S.; HANNER, R.; STEINKE, D. Five years of FISH-BOL: brief status report. **Mitochondrial DNA**, v. 22, suppl. s1, p. 3-9, Oct. 2011.
- BENNET, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestini) Acarina: Ixodidea). II. Influence of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v. 16, n. 2, p. 250-257, Oct. 1974.
- BLAXTER, M. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 347-355, Apr. 2000.
- BRAKS, M.; VAN GINKEL, R.; WINT, W.; SEDDA, L.; SPRONG, H. Climate change and public health policy: translating the science. **International Journal Environmental Research Public Health**, v. 11, n. 1, p. 13-29, Jan. 2014.
- BURGER, T. D.; SHAO, R.; BARKER, S. C Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 76, p. 241-253, July 2014.
- CAMPBELL, B. C.; STEFFEN-CAMPBELL, J.D.; WERREN, J. H. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed

- spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. **Insect Molecular Biology**, v. 4, p. 225-37, May. 1993.
- COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **TRENDS in Genetics**, v. 19, n. 7, p. 370- 375, July 2003.
- CROSBIE, P. R.; BOYCE, W. M.; RODWELL, T. C. DNA sequence variation in *Dermacentor hunteri* and estimated phylogenies of *Dermacentor* spp. (Acari: Ixodidae) in the New World. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 277-288, May 1998.
- CRUICKSHANK, R. H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. **Systematic Applied Acarology**, v.7, p.3-14, 2002.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 8, p. 772, July 2012.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, v. 90, n. 7, p. 103–116, Feb. 2001.
- DE LA FUENTE, J.; MERINO, O. Vaccinomics, the new road to tick vaccines. **Vaccine**, Ciudad Real, v. 31, n. 50, p. 5923-5929, Dec. 2013.
- DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p. 6938-6946, May 2008.
- ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental and Applied Acarology**, v.38, n 2-3, p. 219-235, Sept. 2006.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-94, Mar.1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n.3, p. 175-185, Mar. 1998.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Research**, v.10, n. 3, p. 564-567, May 2010.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEM, 1998.
- FREZAL L, LEBLOIS R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection Genetetic and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727-736, Sept. 2008.
- Fu, Y. Z.; Li, W. H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**. v. 133, n. 3 p. 693-709, Mar.1993.
- GASSER, R. B.; MONTI, J. R. ; BAO-ZHEN, Q. et al. A mutation scanning approach for the identification of hookworm species and analysis of population variation. **Molecular Biochemistry and Parasitology**. v. 92, n. 2, p. 303-312, May1998.
- GOLOVLJOVA, I.; KATARGINA, O.; GELLER, J.; TALLO, T.; MITTŽENKO, V.; VENE, S.; NEMIROV, K.; KUTSENKO, A.; KILOSANIDZE, G.; VASILENKO, V.; PLYUSNIN,

A.; LUNDKVIST, A. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtypes. **International Journal Medicine Microbiology**, v. 298, Suppl. s1, p. 108-120, Sept. 2008.

GONZALES, J. C. **O carrapato do boi**: vida, resistência e controle. São Paulo: Mestre Jou, 1974. p.101.

GRANT, W. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of Heredity**, v. 89, n. 5, p. 415-426, May.1998.

GUERRERO, J. R. F.; PEREZ, D. E.; LEON, A. A. **Vaccination of animals to elicit a protective immune response against tick infestations and tick-borne pathogen transmission**. US. Pat. 8722063 B2, 13 may. 2014. 1p.

GUGLIELMONE, A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PENA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1-28, Jul. 2010.

GUILLEMI, E. C.; RUYBAL, P.; LIA, V.; GONZALEZ, S.; LEW, S.; ZIMMER, P.; ARIAS, L. L.; RODRIGUEZ, J. L.; RODRIGUEZ, S. Y.; FRUTOS, R.; WILKOWSKY, S. E.; FARBER, M. D. Development of a multilocus sequence typing scheme for the study of *Anaplasma marginale* population structure over space and time. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 30, n.1, p. 186-194, Mar. 2015.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p.95-98, 1999.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological Science**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, Feb. 2003.

HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. Identification of birds through DNA barcodes. **Plos Biology**, v. 2, n. 10, p. 1657-1663, Oct. 2004.

HILLIS, D. M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453, Dec. 1991.

HOOGSTRAAL, H. Theobald Smith: his scientific work and impact. **Bulletin of Entomology Society of America**, v. 32, n.1, p. 22-35, Mar.1986.

HORAK, I. G.; APANASKEVICH, D. A.; KARIUKI, E. K. A new species of Rhipicephalus (Acari: Ixodidae), a parasite of giraffes in Kenya. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 685-690 Jul. 2013.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754- 755, Mar. 2001.

JACKSON, J.; BEVERIDGE, I.; CHILTON, N. B.; ANDREWS, R. H.; DIXON, B. Morphological comparison of the adult and larval stages of the Australian ticks *Ixodes holocyclus* Neumann, 1899 and *I. cornuatus* Roberts, 1960 (Acari: Ixodoidea). **Systematic and Applied Acarology**, v.7, p. 91-108, Mar. 2002.

JACKSON, J.; CHILTON, N. B.; BEVERIDGE, I.; MORRIS, M.; ANDREWS, R. H. Genetic variation within the ticks *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatus* from South-eastern Australia. **International Journal for Parasitology**, v.30, n. 11, p. 1159–1166, Oct. 2000.

JEZEK, P.; HLAVATA, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 12, p. 2478-2503, Dec. 2005.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990-993, Dec. 2008.

KALISZEWSKI, M.J., TOBOLEWSKI, J., SEYOUM, S., CHOJNACKI, I., KALISZEWSKA, M.M., STANTON, D.J.; COLWELL, R.K. The polymerase chain reaction and sequencing of mite DNA. **International Journal of Acarology**, v. 18, n. 3, p. 231-239, Mar. 1992.

KANDUMA, E. G.; MWACHARO, J. M.; SUNTER, J. D.; NZUKI, I.; MWAURA, S.; KINYANJUI, P. W.; KIBE, M.; HEYNE, H.; HANOTTE, O.; SKILTON, R. A.; BISHOP, R. P. Micro- and minisatellite-expressed sequence tag (EST) markers discriminate between populations of *Rhipicephalus appendiculatus*. **Ticks and Tick Borne Disease**, v.3, n. 3, p. 128-136, June 2012.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, Apr. 2013.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A.; JÁCOMO, A. T. A. KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T. S. Jr.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. *et al.* Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.36, n 1-2, p.149-163, May, 2005.

LABRUNA, M. B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; JONGEJAN, F.; DE LA FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n.1, p. 46-57, Feb. 2009.

GATTO, L.; CATANZARO, D.; MILINKOVITCH, M. C. Assessing the applicability of the GTR nucleotide substitution model through simulations. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 2, n. 1, 2006

LONDT, J. G. H.; ARTUR, D. R.; The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrine, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **Journal of Entomological Society of South Africa**, v. 38, n. 1, p. 321-340, Oct. 1975.

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. Effect of deforestation and introduction of exotic grasses as livestock forage on the population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in northern Argentina. **Research in Veterinary Science**, v.95, n. 3, p.1046-1054, Dec. 2013.

NAVAJAS, M.; FENTON, B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. **Experimental and Applied Acarology**, v. 24, n.10-11, p.751-774, May 2000.

MEIER, R.; SHIYANG, K.; VAIDYA, G.; PETER, K. L. Ng. DNA barcoding and taxonomy in diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. **Systematic Biology**, Singapore, v. 5, p.715-728, apr. 2006.

- MOORHOUSE, D. E.; TATCHELL, R. J. The feeding process of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): a study in host-parasite relation. **Parasitology**, v.56, n. 4, p. 623-632, Nov. 1966.
- MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v.56, n.3, p.169-172, Nov. 2003.
- OBA, M. S. P.; CAMPOS PEREIRA, M. C.; ALMEIDA, M. A. C. Ensaios in vitro pelos critérios de Oba (1972) e Drummond (1973) de Chlorpyrifos sobre linhagens supostamente resistente de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) proveniente de Taubaté. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.13, n. 2, p.409-420, Jan. 1976.
- PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. Review: The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, v. 7, n. 1, p. 16-28, May, 2010.
- PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 897-928, Mar. 2001.
- PENN, O.; PRIVMAN, E.; LANDAN, G.; GRAUR, D.; PUPKO, T. An alignment confidence score capturing robustness to guide-tree uncertainty. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 8, p. 1759-1767, Aug. 2010.
- PETER, R. J.; BOSSCHE, P. V. D.; PENZHORN, B. L.; SHARP, B. Tick, fly, and mosquito control-Lessons from the past, solutions for the future. **Veterinary Parasitology**, v. 132, n. 3-4, p.205-215, Sept. 2005.
- PROVAN, J. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends Ecology and Evolution**, v.16, n. 3, p.142-147, Mar. 2001.
- RIEK, R. F. The cattle tick and tick fever. **Australian Veterinary Journal**, v. 41, n. 7, p. 211-215, July 1965.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; RIVAS, A. L.; CHOWELL, G.; FRAGOSO, S. H.; ROSARIO, C. R.; GARCÍA, Z.; SMITH, S. D.; WILLIAMS, J. J.; SCHWAGER, S. J. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 1-2, p. 158-169, May 2007.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**. v. 19, n. 12, p. 1572-1574, Aug. 2003.
- ROZAS, J.; SANCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, Dec. 2003.
- RUIZ-FONS, F.; GILBERT, L. The role of deer as vehicles to move ticks *Ixodes ricinus* between contrasting habitats. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 9, p. 1013-1020, Aug. 2010.
- SZABÓ, M. P.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, South Africa, v. 130, n. 1-2, p. 131-140, Jun. 2005.
- SONG, S.; SHAO, R.; ATWELL, R.; BARKER, S.; VANKAN, D. Phylogenetic and phylogeographic relationships in *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatus* (Acari: Ixodidae) inferred from COX-1 and ITS2 sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 8, p. 871-880, Jul. 2011.

- SMITH, G. J.; VIJAYKRISHNA, D.; BAHL, J.; LYCETT, S. J.; WOROBEY, M.; PYBUS, O. G.; MA, S. K.; CHEUNG, C. L.; RAGHWANI, J.; BHATT, S. PEIRIS, J. S.; GUAN, Y.; RAMBAUT, A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**, v. 459, n. 7250, p. 1122–1125, June 2009.
- SRINIVASAN, S.; NARAYAN, G. A. Cytochrome c oxidase dysfunction oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 6, p. 1252–1263, Sept. 2012.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, n. 30, n. 9, p. 1312-1313, May 2014.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, n. 3, p. 585-595, Nov. 1989.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, Dec. 2013.
- TATCHELL, R. J.; CARNELL, R.; KEMP, D. H.; Electrical studies on the feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 38, n. 1, p. 32-44, Dec. 1972.
- TIRLONI, L.; SEIXAS, A.; MULENGA, A. VAZ IDA, S. JR.; TERMIGNONI, C. A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Experimental Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 25-34, Feb. 2014.
- YLI-MATTILA, T.; PAAVANEN-HUHTALA, S.; FENTON, B.; TUOVINEN, T. Species and strain identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences. **Experimental Applied Acarology**, v. 24, n. 10-11, p. 863–880, Jan. 2000.
- YOUNG, I; COLEMAN, A. W. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v.30, n.1, p.236-42, Jan. 2004.
- YPARRAGUIRRE, L. A.; MACHADO-FERREIRA, E.; ULLMANN, A. J.; PIESMAN, J.; ZEIDNER, N. S.; SOARES, C. A. A hard tick relapsing fever group spirochete in a Brazilian *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 7, n. 4, p.717-721, Jan. 2007.
- WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **Bioessays**, v. 29, n. 2, p. 188-197, Feb. 2007.
- WILKINSON, P. R.; Factors affecting the distribution and abundance of the cattle tick in Australia: observations and hypothesis. **Acarologia**, v. 12, n. 3, p. 492-508, Jan. 1970.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 1, p. 97-159, Jan. 1978.

ANEXO A – Artigo científico submetido a revista experimental and applied acarology, n. APPA-D-15-00005, como exigência para a obtenção do título de mestre.

Phylogenetic and phylogeographical relations in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) from the COX-1 and ITS2 sequences in different Brazilian regions.

Bárbara Guimarães Csordas^a, Marcos Valério Garcia^b, Rodrigo Casquero Cunha^c, Poliana Fernanda Giachetto^d, Isabella Maiumi Zaidan Blecha^e, Renato Andreotti^b.

^aFaculdade de Medicina, Pós Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil.

^bLaboratório de Biologia Molecular do Carrapato, Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil.

^dLaboratório Multiusuário de Bioinformática Aplicada da Embrapa, Campinas, Brazil.

^eFaculdade de Medicina Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil.

*Corresponding author

Dr. Renato Andreotti

Departamento de Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Brazil

Av. Rádio Maia, 830

Tel.: +55 67 3368 2173; Fax: +55 67 3368.2150

renato.andreotti@embrapa.br

These authors contributed equally to the study

Abstract

The tick's large genetic diversity and expansion process need new studies that relate the genetic mutations. When ticks develop genetic variability due to mutations, this may influence tick resistance to acaricides and low efficacy new vaccines. The objective of this work was to perform phylogenetic and phylogeographic relations inference on ticks from five different Brazilian regions, which were identified molecular analysis as *Rhipicephalus microplus*, using molecular marker cytochrome oxidase gene, subunit 1 (COX-1) and internal

transcript spacer 2 gene, (ITS2). Fragments with (643 bp) for COX-1 and (580 bp) for ITS2 from DNA samples sourced from 22 sample corresponding the five Brazilian regions, were obtained. These results showed the cryptic complex in the *R. microplus* population from Brazilian regions. Value with F_{ST} (0.03405) suggests low signals of structuration. However, the common signal of high haplotypic diversity and low nucleotide diversity given by COX-1 and ITS2 genes was shared for five Brazilian regions analyzed. These values are characteristic of a population experiencing an expansion process which was corroborated with the negative values of the neutrality tests and the star structure of the haplotype networks. It is possible to conclude that samples from COX-1 tree has strong support for monophyly of the *R. microplus* Brazilian complex and are distinct from other populations all over the world. The genetic variability presented by the markers may influence tick resistance to acaricides and the attempt to develop new vaccines against this parasite, contributing to the transmission of new pathogens.

Keywords

Rhipicephalus microplus; phylogeny; genetic variation; genetic marker; sequence analysis.

1. Introduction

The bovine tick *Rhipicephalus microplus* may be found in different tropical and subtropical regions of the world (Estrada-Peña *et al.*, 2006), and herds infested by *R. microplus* may cause losses estimated in US\$ 3,24 billion year in Brazil (Grisi, *et al.*, 2014). In addition, this parasite may transmit pathogens that cause the babesiosis (*Babesia bovis* and *B. bigemina*) and anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) (Peter *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2008).

The control method for this tick is, in most cattle industry countries, costly and done by using acaricides. However, the acaricide resistant *R. microplus* populations became a worldwide problem, creating the need for molecular ecology studies and new tick control technology to maintain the efficiency in cattle production (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2007; Andreotti *et al.*, 2011; Guerrero *et al.*, 2014).

Among the new studies, the use of molecular markers for tick research has developed new knowledge about population structure and taxonomic relations, allowing a deeper understanding of the individual, populational and species relationships (Burger, *et al.*, 2014). Molecular marker studies, made by Hoogstraal (1986), helped to trace the geographical distributions of the *R. microplus*, *R. annulatus* and *R. australis*. These markers were capable

of determining that the dissemination of these species are linked to cattle traffic. Even though the dissemination of *R. microplus* is not well documented, it is supposed that its origins are from India (Hoogstraal, 1986), from where it spread to Madagascar and Southern Africa. There is little evidence of how or when the *R. microplus* spread to the Americas (Labruna *et al.*, 2009), but there is evidence that this has happened with cattle from India or Africa in the 16th and 17th centuries (Barré and Uilenberg, 2010).

The tick's genetic diversity and populational structure, for being abundant, need further studies that can relate the genetic mutations that may happen due to the natural environmental pressure, leading ticks to develop a genetic variability that may influence tick resistance to acaricides (Song *et al.*, 2011), with the goal of developing new vaccines against this parasite and the transmission possibility of new pathogens (de la Fuente, 2013).

Thus, studies mitochondrial and nuclear genome markers are being increasingly used to study controversial phylogenetic relations to demonstrate if evolution among different species populations occurs (Kanduma *et al.*, 2012).

The DNA barcode has been proposed as a universal tool to identify biological diversity, being used as a molecular marker. This identification method was based on an information set from a fragment with about 688 pairs of mitochondrial DNA base sequences (mtDNA) from the cytochrome oxidase I gene (COX-I) from different species. Different studies showed that the DNA barcode has the universal identification function and is very effective for different organisms (Hebert *et al.* 2003, 2004; Barrett and Hebert, 2005).

In addition to the DNA barcode, ribosomal DNAs (rDNAs) may also be used as nuclear molecular markers. The internal transcribed spacer 2 (ITS-2) is a spacer that is located between the ribosomal subunits 5.8S and 28S of rDNA (Cruickshank, 2002). These genes are arranged in repeated units, denominated ribosomal cistrons, which have repeated copies and, in this manner, are efficient targets for systemic molecular analysis as a means of study for phylogenetic relations (Campbell *et al.*, 1993; Song *et al.*, 2011; Burger *et al.*, 2014).

Therefore, the objective of this work was to infer the phylogenetic and phylogeographic relations in *R. microplus* ticks, from COX-1 mitochondrial DNA gene sequences and ITS2 nuclear DNA sampled from different Brazilian regions.

2. Materials and Methods

2.1 Tick Collection

The ticks in this study were obtained from 22 locations in different Brazilian regions (Table 1, Fig. 1). Larvae and engorged females were collected from the natural environment and preserved in isopropyl alcohol (70%). The two front legs of each tick were removed with a sterilized scalpel and forceps. The remainder of the sample was stored in an ultra freezer at -80°C for further analysis.

DNA extraction and PCR amplification

DNA extraction was performed using pool of larvae and individuals samples of engorged females and using DNAzol® Reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations. The DNA was quantified using Nano Drop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), and A260nm/A280nm relation above 1.6 was established as acceptable. The samples concentration was corrected to 50 ng μL^{-1} and, afterwards, the DNA was subject to a polymerase chain reaction (PCR) for COX-1 and ITS2 regions amplification, generating products of 643bp and 580bp, respectively. The COX-1 gene fragment was amplified using the COX-1.2 F (5'-CTTCAGCCATTTTACCGCGA-3') and COX-1.2R (5'-CTCCGCCTGAAGGGTCAAA -3') starter pairs. The ITS2 fragment was amplified with the ITS-2F (5'-CGGATCACATATCAAGAGAG-3') and ITS-2R (5'-CCCAACTGGAGTGGCCAGTTT-3') primers. The PCR was standardized for a final volume of 25 μL , with 1X buffer, 1,5 mM of MgCl₂, 25 mM of dNTPs, 10 μM of each primer, 0,5 Units of Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen by Life Technologies TM, North America, USA), 1 μL of DNA at 50 ng/ μL and sufficient water for final volume. PCR conditions were optimized for each reaction, with the annealing temperature adjusted to suite the primers used. General PCR conditions were: 95°C for 2 min., followed by 40 cycles of 95°C for 1 min., 56°C/60°C (COX-1/ITS2, respectively) for 30 s, 72°C for 1min. 30s, and a final extension of 72°C for 7 min. PCR products were examined on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The PCR amplified products were purified using the Purelink TM Kit (Invitrogen by Life Technologies TM, North America, USA), and after, cloned with pGemT-Easy® (Promega, Madison, WI-USA) cloning vector, according to the manufacturer's manual and sequenced posteriorly.

2.2 Genetic Analysis

Sanger sequencing was performed in 48-well plate format on robotic instrumentation using T7 Transcription Start (5'-CTAATACGACTCACTATAGGG -3') universal sequencing primer (Promega, Madison, WI-USA) and sequences were separated using an ABI 3730 DNA Analyser, Applied Biosystems equipment and conditions described in Song et al. (2011). The

sequencing reactions were made using the the Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. The runs were made on 36 cm capillaries using the POP7 polymer and the sequences generated by the software Sequencing Analysis 5.3.1, through the program Caller KB Phred (Ewing-Green; Ewing et al. 1998).

The plasmid sequences were identified and removed using a NCBI (VecScreen) tool (Altschul, *et al.*, 1997), where a hash search algorithm was used to remove the contaminant sequences. The consensus sequences were aligned with the GenBank data through the online BLASTn platform (Altschul, *et al.*, 1997), so it was possible to find regions with local similarity among the sequences.

COX-1 haplotypes in 22 samples that represent 22 Brazilian states and ITS2 genotypes of 20 samples, representing 20 Brazilian states, were identified using the DnaSP v 4.10 tool (Rozas and Sanchez-Del Barrio, 2003).

The neutrality test, D from Tajima (Tajima, 1989), F from Fu and Li's test (Fu and Li, 1993) Fs from Fu (Fu, 1997), were generated through 1.000 simulations, with the goal of increasing the reliability of the results, since these analyses can reveal signs of populational expansion. Variations within and among populations were summarized using statistical standards: number of segregated locations (s), haplotype diversity (h), nucleotide diversity (π). Tamura 2 parameters genetic distances were parameterized to calculate Fst values (0 = no population differentiation; 1= population differentiation). Significance levels of all the estimated values were calculated by 100 permutations. This software also allowed for assessing the presence of population structure by means of AMOVA which uncovers the existence of population differentiation at both intra and inter-population levels implemented in ARLEQUIN program, version 3.5.1.2 (Excoffier and Lischer, 2010). Non corrected pair matrixes and p-distances were obtained using the MEGA version 6.0 program (Tamura *et al.*, 2013). Species of the GenBank, *Dermacentor nitens* (GenBank accession no. COX-1: KC503258/ITS2: KC503275) were used as outgroup in genetic analysis.

2.3 Sequence alignment, phylogenetic and network analysis

The COX-1 and ITS2 sequences were separately aligned, using the Bio Edit program (Hall, 1999). The GUIDANCE program (Penn *et al.*, 2010) was used to verify the occurrence of ambiguous sequences and to correct them. They were aligned once more with the MAFFT program, version 7.1.8.2 (Kato and Standley, 2013), to obtain a higher alignment reliability level. The parameters and models for a best fit in the phylogenetic analysis were estimated for COX-1 and ITS2 separately, using the Jmodel test version 2 (Darriba *et al.*, 2012).

The network diagrams were built using the Network Version 4.6.1.2 program (Bandelt *et al.*, 1999). Phylogenetic trees were inferred with a maximum likelihood analysis (MV), using the RAxML v8.1.X program (Stamatakis, 2014), maximum parsimony analysis (MP), and Neighbor-Joining (NJ) methods, using the MEGA 6.0 program (Tamura *et al.*, 2013).

Bootstrap tests (1.000 cycles) were executed on the MV, NJ and the consensus MP trees, to evaluate the reliability of each clade.

Bayesian phylogenetic analysis were made using Mr. Bayes 3.1 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003). The analysis were initiated with random starting trees and were run for 1×10^6 generations, with trees being sampled every 10.000 generations. To determine the stationary of the Markov chain, the log-likelihood scores of sample points were plotted against generation time. The first 25% of samples was estimated as burn-in for each data set. The remaining samples were retained for generating consensus trees. Each sample included a tree topology that incorporates branch length and substitution model parameter values. These topologies were used to generate a 50% majority rule consensus tree, with the percentage of sample recovering any particular clade representing the posterior probability of a clade. Species of the GenBank, *Dermacentor nitens* (COX-1: KC503258/ITS2: KC503275) were used as outgroup in phylogenetic and network diagrams analyses.

3. Results

3.1 Mitochondrial marker cytochrome c oxidase subunit I (COX-1)

The oligonucleotides COX-1.2F/R amplified a fragment of 643bp, corresponding to the partial sequence of the COX-1 gene for 22 samples that had a 99% to 100% identity with the *R. microplus* (Table 1, Fig. 1). Alignment of the COX-1 sequences, contained 643 sites, 463 of which were variable (S) and 4 were parsimony informative. There was significant deviation from neutrality (*D = -2.76; P < 0.001), (*F = 5.61; P < 0.02). There were 14 haplotypes average nucleotide diversity (π): 0.06273, haplotype-gene diversity (Hd): 0.833 and variance of haplotype diversity: 0.00588, identified among the 24 individuals of Brazilian ticks of this study (Table 1, GenBank Accession NOs.: KP226159-KP226180), species of *R. microplus* MS- Brazil (GenBank accession no. KC503261) and *D. nitens* (GenBank accession no. KC503258) was used as outgroups.

A moderate numbers of the haplotypes are in different geographical areas (Fig. 2A). For each sample, a single type of haplotype was observed (24 samples). The haplotype 1 was present in the samples from the cities of Acre, Roraima, Amazonas, Pará, Mato Grosso do Sul, São

Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná, KC503261 *R. microplus* MS- Brazil and haplotype 2 was present in the samples from the cities of Rio Grande do Sul and Ceará (Fig. 2A).

Distance-p values among the populations were observed ranging from 0,01% to 8,50% in the COX-1 individuals, including *R. annulatus* (GenBank accession no. KC503256), *R. australis* (GenBank accession no.KC503255) and *D. nitens* (GenBank accession no.KC503258) as the outgroup. Comparing the divergence within the populations, the genetic distance values stayed among 0% to 0.07%.

The best fit model, GTR+G, with empirical nucleotide frequencies was selected with jModeltest 2.1 software (Darriba *et al.*,2012). The COX-1 clade formed a cryptic subspecies and represents one complex group, constituted by ticks from 5 Brazilian States and have strong support (99–100% bootstrap support, data not shown) and with nodes indicate Bayesian posterior probability (PP = 1) support values (Fig.3).

It was observed that for the mtDNA alignment there were unique polymorphisms that indicated a molecular signature with the presence of 3 loci belonging only to the *R. microplus* samples in this study and which do not occur in other *R. microplus* populations, as presented in Fig. 5.

3.2 Nuclear marker, gene Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

The oligonucleotides ITS2F/R amplified a fragment of 580 bp corresponding to part of the ITS2 gene for 20 samples (Table 1, Fig. 1), which had a 99% to 100% identity with *R. microplus*. The alignments of the fragment including *D. nitens* (GenBank accession no.KC503275) as the outgroup comprised 580 characters, with 110 that were variable (s) and 11 that were parsimony informative. Statistics showed significant deviation from neutrality (*D = -2.5726, P < 0.001; *Fu and Li's test=-4.06260, P < 0.02 and *Fs = 4.601).

ITS2 sequences represented eight genotypes, average nucleotide diversity (π): 0.02943, haplotype-gene diversity (Hd): 0.545 and variance of haplotype diversity: 0.01629, among 22 samples were identified. Most of the genotypes were observed in different geographical areas individuals (Fig. 2B) of Brazilian ticks of this study (Table 1, GenBank Accession NOs.: KP226139-KP226158), species of GenBank *R. microplus* MS- Brazil (GenBank accession no.KC503273) and *D. nitens* (GenBank accession no.KC503275) was used as outgroup. Each sample presented only one genotype (21 samples). The genotype 1 was the one most widely distributed in Acre, Ceará, Pará, Paraíba, Rio Grande do Sul, Rondônia, Mato Grosso,

R. microplus MS-Brazil KC503273, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Piauí and Tocantins (Figs. 2B).

Phylogenies were inferred from the 20 samples of ITS2 molecular marker identified by sequencing analysis as *R. microplus*. Within the populations, p-distance values varied from 0% to 0,11% for the ITS2 samples. Compared to the inter-population divergence, the lowest genetic distance value was of 3,6%, including *R. annulatus* (GenBank accession no.KC503267), *R. australis* (GenBank accession no.KC503268) and *D. nitens* (GenBank accession no.KC503275) as the outgroup.

The ITS2 clade formed a group in which there was no differentiation among the species analyzed in this study, including the DNA species deposited in the Gene Bank data base. However, they had nodes indicate Bayesian posterior probability (PP = 1) support values (Fig. 4).

4.Discussion

The phylogenetic and phylogeographic relations of the *R. microplus* were inferred from the COX-1 (22 samples) and ITS2 (20 samples) sequences using 42 larvae and engorged female samples obtained in the 5 Brazilian regions. This is the only study that has a representative sample of *R. microplus* from the 5 Brazilian regions.

Ticks from the different Brazilian regions could be morphologically identified as *R. microplus* (Canestrini, 1888), but the phylogenetic analyses for COX-1 showed that the *R. microplus* populations in Brazil constitute different populations from other countries such as the populations of *R. microplus* JQ737082 from China, with 9,3% divergence for COX-1. Burger et al. (2014) showed the relation of Brazilian *R. microplus* sample (GenBank accession no.COX-1:KC503261/ITS2:KC503273) with the *R. australis* (GenBank accession no.COX-1:KC503255/ITS2:KC503268). However, this study presented data showing divergence of the *R. microplus* species from different Brazilian regions, with 6,4% and 3% for COX-1 and ITS2, respectively, from the *R. australis* (data not shown) and The COX-1 tree has strong support, nodes indicate Bayesian posterior probability (P.P = 1) for monophyly of the *R. microplus* Brazilian complex. Nevertheless, this tree showed relationships between the clade *R. microplus* Brazilian complex is sister to *R. australis* and *R. microplus* Cambodia No. KC503260, with 98% bootstrap support (data not shown) and nodes indicate Bayesian (P.P=1) support values (Fig. 3).

The *R. microplus* (KC503261) Cambodia population, when compared to the *R. microplus* Brazil population, presented divergence with 1,1% and 1,9% for COX-1 and ITS2, respectively, what was considered low according to the Hebert *et al.*,2003 study. This result suggests a close relation of these two populations. Although a low ITS2 resolution for relationships has been observed and did not allow differentiating the diverse *R. microplus* populations (Fig.4).

This nuclear marker might be adequate for species identification and inference among populations for other studies (Burger *et al.*,2014). However, COX-1 showed the potential to solve phylogenetic relations between the apparent subtypes within the *R. microplus* complex (Fig. 2A and 3).

In this study it was shown that the COX-1 molecular marker had the advantage of presenting greater mutation rates than the nuclear marker used in this study. These results corroborate the study of Provan (2001) in concluding that the COX-1 marker does not suffer recombination due to coalescence time and is more susceptible to demographic events.

The neutrality test presented in this work indicates populational expansion, with no selection effects, and the observed values indicate a sweep in ancestral mutations (*D = - 2,77, P < 0.001; *F = -4,9, P < 0.02). Therefore, the values observed in the neutrality test indicate that COX-1 is appropriate for further studies in genetic divergence, confirming the studies of Song *et al.* (2011).

It is possible to observe that ticks from different geographical areas are genetically different, confirming the Jackson (2000, 2002) hypothesis, which predicts that the taxonomic classes created by the morphologic criteria of Roberts, 1960 (Acari: Ixodidae) might not sufficient for species identification. Therefore, molecular markers become a new pillar to sustain the “integrative taxonomy” approach (Padiál *et al.*,2010).

The AMOVA test (Table 2), showed that the variation within populations of the *R. microplus* species has a variance percentage of 93.6% and 3,40% among populations, therefore, the value between populations are higher than within populations. The low divergence value with F_{ST} of 0.03405, in accordance with the Wright (1978) criteria, suggests a low genetic differentiation of the *R. microplus* populations sampled in this study, reflected by the exclusive haplotype numbers. However, populations showed high levels of haplotype diversity (Hd) and low nucleotide diversity values (π). In accordance with Grant and Bowen (1998), a combination of Hd > 0.5 with π < 0.01 indicates a recent reduction in population followed by an expanding population.

The haplotype diversity observed in this study was of 60% (13/22) (Figs. 2A and 3), exclusive for the molecular marker COX-1, in other words, a haplotype for each sample constituting a Brazilian State, and the genotype diversity for the molecular marker ITS2 was of 35% (7/20) (Figs. 2B and 4).

Studies with similar samples made by Song et al. (2011) detected six ITS2 genotypes from 134 individuals for *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatus* in 3 different regions. Therefore, the genotype frequency observed in this study is greater than the one observed by Song et al. (2011), even though the sample quantity was smaller.

Although other studies showed that the molecular marker COX-1 presented limited performance on these tick species, creating ambiguity for the identifications due to the overlap between the intra and inter specific variability (Meier *et al.*, 2006), until this moment the chosen region showed great capacity to discriminate the species and reveal cryptic diversity (Waugh, 2007; Frezal and Leblois, 2008; Baker *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2011; Burger, *et al.*, 2014).

The molecular signature that was found in this study is characterized by being a unique location in the 1.201-1.203 loci of the *R. microplus* No KC503261, genome sequence. This data demonstrates that this study's *R. microplus* complex is possibly related to a cryptic species population of *R. microplus* (Fig. 5A and B). Golovljova et al. (2008) identified a molecular signature that possibly constitutes indirect evidence of the molecular signature involvement with functional processes through the analysis of the amino acids that were found.

It is possible to conclude that the samples in this study have monophyly of the *R. microplus* Brazilian complex and are different from other populations of *R. microplus*. The molecular signature in this study will need further studies of the COX-1 protein functional process. The genetic variability presented by the mtDNA COX-1 marker may influence tick resistance to acaricides, in the attempt to develop new vaccines against this parasite, or even contribute to the transmission of new pathogens.

The use of other molecular markers together with a higher number of samples will allow a greater capacity to identify subtypes of the *R. microplus* species complex, allowing for a better comprehension of the phylogenetic relations and geographical distributions.

Acknowledgments

We would like to thank the following researchers for helping us with tick collection: Alessandra Ascofrild, UFPA; Carlos Eduardo D'Alencar Mendonça, Embrapa Roraima; Fabrícia Satake, UFBP; Felipe Tonato, Embrapa Amazônia Ocidental; Francisco Aloísio Cavalcante, Embrapa Acre; Jamile Prado, UFPI; Karina Neob de Carvalho Castro, Embrapa Meio-Norte; Marcello Otake, UFT; Maria Marlene Martins, UFU; Meire Chistina Seki, UNICENTRO; Ramayana Menezes Braga, Embrapa Roraima; Tiago Miqueloto, from Santa Catarina. This study was supported by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), CAPES (the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education) and Embrapa Beef Cattle.

References

- Altschul, S.F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Andreotti, R., Guerrero, F. D., Soares, M. A., Barros, J. C., Miller, R. J., Perez, de Leon, A., 2011. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Brazilian State of Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Parasitol.* 20, 127-133. doi:10.1590/S1984-29612011000200007.
- Baker, A. J., Tavares, E. S. R. F., 2009. Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 257-68. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02650.x.
- Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37-48.
- Barré, N., Uilenberg, G., 2010. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 29, 149-160.
- Barrett, R. D. H., Hebert, P. D. N., 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *J Zool* 83:481-491.
- Becker, S., Hanner, R., Steinke, D., 2011. Five years of FISH-BOL: brief status report. *Mitochondrial DNA*, 22, 3-9. doi:10.3109/19401736.2010.535528.
- Burger, T. D., Shao, R., Barker, S. C., 2014. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 76, 241-253. doi:10.1016/j.ympev.2014.03.017.
- Campbell, B. C., Steffen-Campbell, J. D., Werren, J. H., 1993. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect. Mol. Biol.* 4, 225-37.
- Cruikshank, R. H., 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Syst. Appl. Acarol.* 7, 3-14.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 8, 772.
- de la Fuente, J., Merino, O., 2013. Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine* 31, 5923-5929. doi:10.1016/j.vaccine.2013.10.049.
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., Sonenshine, D. E., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* 13, 6938-6946.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L., Guglielmone, A., Horak, I., Jongejan, F., Latif, A., Pegram, R., Walker, A. R., 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick

- subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp. Appl. Acarol.* 38, 219-235.
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome. Res.* 3, 186-94.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome. Res.* 8, 175-185.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564-567, <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.
- Frezal, L., Leblois, R., 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.* 5, 727-36. doi:10.1016/j.meegid.2008.05.005.
- Fu, Y. Z., Li, W. H., 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics.* 133,693-709.
- Fu, Y. X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* 147, 915-25.
- Golovljova, I., Katargina, O., Geller, J., Tallo, T., Mittzenko, V., Vene, S., Nemirov, K., Kutsenko, A., Kilosanidze, G., Vasilenko, V., Plyusnin, A., Lundkvist, A., 2008. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtypes. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 108-120. doi:10.1016/j.ijmm.2007.12.004.
- Grant, W. S., Bowen, B. W., 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 89, 415-426. doi:10.1093/jhered/89.5.415.
- Grisi, L., Leite, R. C., Martins, J. R., Barros, A. T., Andreotti, R. Caçado, P. H., León, A. A., Pereira, J. B., Villela, H. S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 150-156. doi:10.1590/S1984-29612014042.
- Guerrero, JrF., Perez, de Leon, A. A., 2014. Vaccination of animals to elicit a protective immune response against tick infestations and tick-borne pathogen transmission. U. S. Patent Office Patent No. US8,722,063 B2 issued May 13, 2014.
- Hall, T. A., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., Dewaard, J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270, 313-321.
- Hebert, P. D.N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., Francis, C. M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *Plos. Biol.* 2, 1657-1663. doi:10.1371/journal.pbio.0020312.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T., 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Rev. Biol.* 66, 411-453.
- Hoogstraal, H., 1986. Theobald Smith: his scientific work and impact. *Bull. Entomol. Soc Am* 32, 22-35. doi:10.3201/eid1412.081188.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754-755. doi:http://mrbayes.csit.fsu.edu/index.php.
- Jackson, J., Beveridge, I., Chilton, N. B., Andrews, R. H., Dixon, B. 2002. Morphological comparison of the adult and larval stages of the Australian ticks *Ixodes holocyclus* Neumann, 1899 and *I. cornuatus* Roberts, 1960 (Acari: Ixodoidea). *Syst. Appl. Acar* 7, 91-108.
- Jackson, J., Chilton, N. B., Beveridge, I., Morris, M., Andrews, R. H., 2000. Genetic variation within the ticks *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatus* from South-eastern Australia. *Int. J. Parasitol.* 30, 1159-1166. doi:10.1016/S0020-7519(00)00103-X.
- Kanduma, E. G., Mwacharo, J. M., Sunter, J. D., Nzuki, I., Mwaura, S., Kinyanjui, P. W., Kibe, M., Heyne, H., Hanotte, O., Skilton, R. A., Bishop, R. P., 2012. Micro-and minisatellite-expressed sequence tag (EST) markers discriminate between populations of *Rhipicephalus appendiculatus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 3, 128-136. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.05.001.
- Katoh, K., Standley, D. M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7:improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772-80. doi:10.1093/molbev/mst010.
- Labruna, M. B., Naranjo, V., Mangold, A. J., Thompson, C., Estrada-Peña, A., Guglielmone, A. A., Jongejan, F., de la Fuente, J., 2009. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive

- divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. BMC Evol. Biol. 9, 46-57. doi:10.1186/1471-2148-9-46.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., Peter, K. L. Ng., 2006. DNA barcoding and taxonomy in diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. Syst. Biol 5, 715-728. doi:10.1080/10635150600969864.
- Padial, J. M., Miralles, A., de la Riva, I., Vences, M. 2010. Review The integrative future of taxonomy. Front. Zool. 7, 1-16.
- Penn, O., Privman, E., Landan, G., Graur, D., Pupko, T., 2010. An alignment confidence score capturing robustness to guide-tree uncertainty. Mol. Biol. Evol. 27, 1759-1767. doi:10.1093/molbev/msq066.
- Peter, R. J., Bossche, P. V. D., Penzhorn, B. L., Sharp, B., 2005. Tick, fly, and mosquito control- Lessons from the past, solutions for the future. Vet. Parasitol. 132, 205-215. doi:10.1016/j.vetpar.2005.07.004.
- Provan, J., 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. Trends Ecol. Evol. 16, 142-147.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Rivas, A. L., Chowell, G., Fragoso, S. H., Rosario, C. R., García, Z., Smith, S. D., Williams, J. J., Schwager, S. J., 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. Vet. Parasitol. 146, 158-169. doi:10.1016/j.vetpar.2007.01.016.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19, 1572–1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180.
- Rozas, J., Sanchez-Del, Barrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP: DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics. 19, 2496–2497. doi:10.1093/bioinformatics/btg359.
- Song, S., Shao, R., Atwell, R., Barker, S., Vankan, D., 2011. Phylogenetic and phylogeographic relationships in *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatus* (Acari: Ixodidae) inferred from COX-1 and ITS2 sequences. Int J Parasitol 41,871-880. doi:10.1016/j.ijpara.2011.03.008.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30, 1312-1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123, 585–595.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 12, 2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Waugh, J., 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. Bioessays 2,188-97. doi:10.1002/bies.20529.
- Wright, S., 1978. Evolution in Mendelian populations. Genetics 16, 97-159.

Legends

Figure 1. Geographic locations where *Rhipicephalus microplus* ticks were collected in Brazil.

Figure 2. Network diagram A. cytochrome oxidase subunit 1 (COX-I), showing 14 haplotypes for *Rhipicephalus microplus* H_1: Acre, Roraima, Amazonas, Para, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná, KC503261 *R. microplus* MS Brazil; H_2: Rio Grande do Sul, Ceará; H_3: Paraíba; H_4: Rondônia; H_5: Rio Grande do Norte; H_6: Mato Grosso; H_7: Distrito Federal; H_8: Rio de Janeiro; H_9: Espírito Santo; H_10: Tocantins, H_11: Piauí; H_12: Bhaia; H_13: Maranhão; H_14: *Dermacentor nitens* MS-Brazil (KC503258) as the outgroup. **B.** Internal transcript spacer 2 (ITS2) H_1: Acre, Ceará, Pará, Paraíba, Rio Grande do Sul, Rondônia, Mato Grosso, KC503273 *R. microplus* MS Brazil, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Piauí and Tocantins; H_2: Maranhão; H_3: Bhaia; H_4: São Paulo; H_5: Distrito Federal; H_6: Santa Catarina; H_7: Paraná; H_8: *Dermacentor nitens* (KC503275) as the outgroup. The area of each circle is proportional to the frequency of a haplotype in the sample.

Figure 3. Bayesian Cladogram recovered for cytochrome oxidase subunit 1 gene (COX-I) of 643 nucleotides, for 22 samples *Rhipicephalus microplus* from Brazilian regions.

Evidenced as the green clade branches, *R. microplus* has 100% resolution on the formation of the clade where the species of this study are. *Dermacentor nitens* KC503258 was used as the outgroup.

Figure 4. Bayesian Cladogram recovered for internal transcript spacer 2 (ITS2) of 580 nucleotides, for 20 sample *Rhipicephalus microplus* from Brazilian regions. Evidenced as the green clade branches, *R. microplus* has 100% resolution on the formation of the clade where the species of this study are. *Dermacentor nitens* KC503275 was used as the outgroup.

Figure 5. Molecular signature of *Rhipicephalus microplus* samples identified in this study. **A:** COX-1 mtDNA sequence alignment, exhibiting a codon with 3 locations (positions 43 to 45) for the *Rhipicephalus microplus* of this study. The nucleotide variations were: YMM, YMT, YAA, YMA, TMM, instead of TAA, available in most of the *R. microplus* samples from Brazil, except the *R. microplus* from RS, MS, PI and BA. **B:** Amino acids sequence alignment, showing in position 15 the X codon region for samples that do not have the molecular signature.

