

## Primer relevamiento genético de la "mosca de los cuernos" *Haematobia irritans* (L.) (DIPTERA: Muscidae) en el Uruguay

Alicia Basso<sup>1</sup>, Federico Raffaelli<sup>2</sup>, Carmen Bolatto<sup>3</sup>, Martín Breijo<sup>4</sup>

<sup>1-2</sup>Cátedra de Genética, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires

<sup>3</sup>Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, UdelaR

<sup>4</sup>Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UdelaR

### Resumen

La mosca de los cuernos (*H. irritans irritans*) es un parásito hematófago de distribución mundial que afecta mayormente al ganado bovino. A pesar de ser un patógeno de relevancia, se conoce poco sobre su genética debido a las dificultades asociadas a no poder reproducirla en condiciones de laboratorio. El objetivo del presente estudio es caracterizar la diversidad genética de la población de moscas del Uruguay. Esta información es de vital importancia a la hora del diseño de estrategias de control basado en el uso de vacunas. Moscas adultas capturadas en el Campo Experimental del Instituto de Higiene, fueron colocadas sobre preparado con heces bovinas para la puesta de huevos y las larvas emergidas fueron cultivadas en el laboratorio. A partir del ganglio cerebral de las larvas de tercer estadio fueron realizadas preparaciones histológicas. Nosotros determinamos que el óptimo nivel de desarrollo para observar meiosis es el adulto farado. La preparación de cromosomas fue teñida con orceína, Giemsa C y Hoechst 33258. Resultados de bandeos C y Q demostraron que a diferencia de lo esperado existe variabilidad genética a nivel de cromosomas y molecular. El cariotipo más frecuente fue  $2n=2x=10$  el que está presente en el 50% de los especímenes analizados. Mutaciones que afectan el número de cromosomas (por ej:  $2n=2x=11$ ) y especímenes mosaico con núcleos diploides y poliploides fueron también observados.

### Introducción

En el marco de un proyecto INIA-FPTA para identificación y evaluación de antígenos de la saliva de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans irritans*) como blancos de vacunas, se encaró el estudio de la diversidad genética en una población de moscas del Uruguay. La mosca de los cuernos en condiciones de altas cargas parasitarias, causa importantes pérdidas económicas, dadas por caídas en la producción de carne y leche, y por su capacidad de actuar como vector de enfermedades virales y bacterianas (Webster *et al*; 1992). Actualmente, el control de *H. irritans*

depende de la utilización de insecticidas sobre el animal o sobre sus heces, práctica que no solo es peligrosa para el medio ambiente sino que determina que los insectos rápidamente desarrollen resistencia a nuevos productos. Aunque la mosca de los cuernos es una seria plaga del ganado, el conocimiento sobre sus cromosomas y su genética es muy escaso. Esto es debido principalmente a las dificultades para reproducir artificialmente su complicado ciclo de vida. El objetivo de este trabajo es comenzar a caracterizar la diversidad genética de una población de *H. irritans* del Uruguay. Contar con información sobre la variación genética intra-especie, es esencial a la hora de evaluar la eficiencia de una estrategia de inmuno control, ya que diferentes genotipos dentro de una población o diferentes poblaciones podrían expresar diferentes moléculas de modo tal que condicionen la capacidad de futuras vacunas. Actualmente existe en la literatura disponible dos trabajos – separados 30 años uno del otro y realizados sobre la misma colonia de laboratorio de USA- que describen un cariotipo único para esta mosca (La Chance, 1964; Avancini & Wienzierl, 1994). La descripción genética se está llevando a cabo a través del análisis de marcadores cromosómicos moleculares que permiten identificar variantes y sus frecuencias dentro de la población.

### Materiales y Métodos

Se capturaron moscas adultas en el campo del Instituto de Higiene (localidad de Pando, Uruguay) de la Facultad de Medicina UdelaR y se dejó que realizaran la oviposición en la bosta. Los huevos eclosionaron a las 24 horas y las larvas se desarrollaron bajo condiciones controladas de laboratorio, en estufa de cultivo 25-29 °C de temperatura y 70% de humedad relativa. Se realizaron dos muestreos citológicos. El primero, de 10 individuos, en mayo de 2007 y el segundo, de 30 individuos, entre el 27 de noviembre y el 6 de diciembre de 2007. Las preparaciones se obtuvieron de neuroblastos de ganglio cerebral correspondientes a larvas del tercer estadio. Se determinó que las larvas de entre 80 y 100 horas, se encuentran en el momento óptimo para el análisis de cariotipo (Fig 1). Para analizar meiosis,

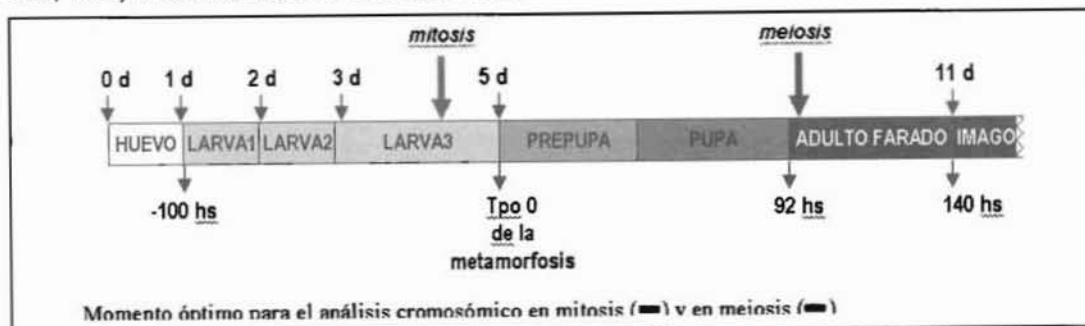


Fig 1- Barra de desarrollo de *H. irritans* en condiciones de laboratorio



se determinó que el momento óptimo del desarrollo para diseccionar gónadas es el de adulto farado (Fig 1).

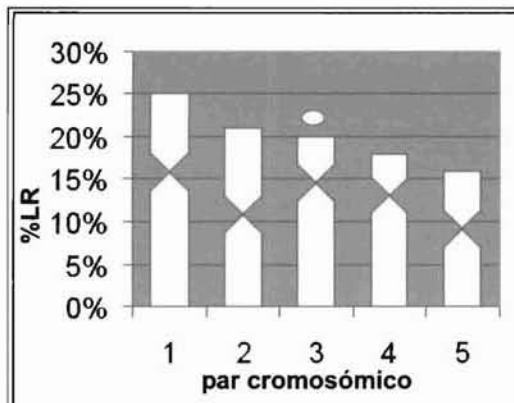


Fig 2- Idiograma: Juego haploide del cariotipo más frecuente frecuente

La tinción de gónadas se realizó con orceína lactoacética. Los marcadores cromosómicos de variabilidad se obtuvieron con técnicas de bandeo convencional Giemsa-C para perfiles de heterocromatina constitutiva y con técnicas moleculares usando Hoechst 33258, un fluorocromo que se une a secuencias del ADN ricas en A-T, generando perfiles de bandas-Q.

### Resultados y discusión

El estudio muestra que existe variabilidad a nivel cromosómico y a nivel molecular. Se observó un cariotipo más frecuente que presenta un complemento cromosómico  $2n = 2x = 10$ , formado por 2 pares metacéntricos y 3 pares submetacéntricos uno de los cuales posee un satélite (Fig 2). No se distingue par sexual. El reconocimiento de los pares autosómicos se realizó a través de las metafases meióticas. Se detectaron mutaciones que afectan el número de cromosomas generando individuos complemento cromosómico  $2n = 2x = 11$ . La existencia de variabilidad está demostrada también por una mutación cuya expresión citológica es la aparición de núcleos poliploides por no disyunción de las cromátidas, generando individuos mosaico compuestos por núcleos diploides normales ( $2n = 2x = 10$ ) y núcleos poliploides ( $2n = 4x = 20$ ). Los pares parcialmente apareados son una expresión de los reordenamientos cromosómicos y por ende de la presencia de variantes cromosómicas. Las proporciones de estas variantes se modificaron entre el primer muestreo y el segundo debido al mayor número de individuos analizados. El cariotipo más frecuente está presente en el 50% de los individuos. El bandeo-C permitió ubicar inequívocamente la constricción secundaria a la vez que obtuvimos excelentes marcadores cromosómicos. Como en todos los dípteros, se puede observar el apareamiento somático (en mitosis) tal como si se tratara de la meiosis. Las marcas oscuras son heterocromatina C. Sirven justamente como marcadores cromosómicos; un par metacéntrico porta la constricción secundaria que es la organizadora del nucléolo. El bandeo-Q permitió identificar regiones heterocromáticas ricas en adenina y timina (A-T). Determinamos que existen 3 pares de cromosomas con una región altamente rica en

A-T. En prometafase es posible ver un perlado diferencial a lo largo de diferentes cromosomas debido a que en este estadio los cromosomas están menos condensados. Se obtuvieron los patrones diferenciales de bandeo C y de bandeo Q para variantes del par 2, del par 3 y del cromosoma 6 del complemento de 11 cromosomas.

### Conclusiones

En la población estudiada existe variabilidad genética a nivel cromosómico y a nivel molecular. Los cambios cromosómicos son comunes, pero su significado es desconocido. La meta será hacer reproducibles estos patrones, en la medida en que sea exitosa la cría de la mosca en condiciones artificiales, para controlar o reducir las diferencias genéticas intrapoblacionales fijando alelos (en la cría por efecto de muestreo y deriva genética), a la hora de probar vacunas.

### Summary

The horn fly *Haematobia irritans irritans* is a world wide distributed blood feeding parasite, mostly affecting cattle production. Although it is a serious pest, little is known about its genetics because its life cycle is difficult to reproduce under laboratory conditions. The aim of the present study is to characterize the genetic diversity of a horn fly population from Uruguay. The information on intraspecific genetic variation is essential when testing the efficiency of a non contaminant control strategy such as an immuno-control one. Adult flies from the Instituto de Higiene (Pando, Uruguay), School of Medicine, UdelaR, were allowed to oviposit on manure. Larvae developed under controlled laboratory conditions. Cytological preparations were obtained from cerebral ganglia neuroblasts of third instar larvae. We determined that the optimum developmental stage to study meiosis is the pharate adult. Chromosome preparations were stained with orcein, Giemsa-C and Hoechst 33258. Results of C- and Q- banding showed that contrary to what was previously described, there exists genetic variability at the chromosomal and molecular level. A most frequent karyotype  $2n = 2x = 10$  is present in 50% of the specimens analyzed but mutations affecting the chromosome number, such as flies carrying a  $2n = 2x = 11$ , as well as mosaic specimens displaying diploid and polyploid nuclei were also present.

### Referencias bibliográficas

- Avancini, R.M.P. & R.A. Weinzierl. 1994. Karyotype of the Horn Fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae). *Cytologia*, 59:269-272.
- LaChance, L.E. 1964. Chromosome Studies in Three Species of Diptera (Muscidae and Hypodermatidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 57:69-73
- Webster, K.A., M. Rankin, N. Goddard, D.W. Tarry, G.C. Coles. 1992. Immunological and feeding studies on antigens derived from the biting fly, *Stomoxys calcitrans*. *Vet. Parasitol.*, 44:143-150.