

PUBLIC HEALTH

Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPDCASSIA HIRAGI¹, KENYA SIMÕES¹, ERICA MARTINS², PAULO QUEIROZ², LUZIA LIMA², ROSE MONNERAT²¹Univ. de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Genética e Morfologia, Lab. de Genética, Asa Norte, 70910-900, Brasília, DF; cassiahir@unb.br; kenyacarla@gmail.com²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Av W5 Norte (Final), 70770-900, Brasília, DF; erica@cenargen.embrapa.br; queiroz@cenargen.embrapa.br; luzia@cenargen.embrapa.br; rose@cenargen.embrapa.br

Edited by Neusa Hamada – INPA

Neotropical Entomology 38(4):542-547 (2009)Genetic Variability in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Populations Using RAPD Markers

ABSTRACT - *Aedes aegypti* (L.) is an important vector of diseases such as the yellow fever and dengue, present in tropical and subtropical regions. The objective of this study was to analyze the genetic variability of different *A. aegypti* populations using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers as a basic study to support the use of biocontrol strategies. DNA of ten collected larvae from three different populations were analyzed using ten RAPD primers. The results indicated the existence of genetic variability inter and intrapopulation. This was confirmed by a dendrogram that grouped the populations in two main clusters with a genetic similarity of 24%. In one of these clusters, it was possible to distinguish two populations that showed 50% similarity. The molecular variance analysis indicated that the interpopulation genetic diversity (55,01%) was higher than the intrapopulation genetic diversity (44,99%). A high genetic polymorphism ($H_i = 0.2656$) and high levels of genetic differentiation between populations ($G_{st} = 0.3689$) were found. The adopted DNA extraction protocol proved to be efficient regardless the insect development stage used, avoiding the addition of reagents or additional stages of processing. Future experiments can be performed to confirm if the detected variability is related to the resistance characteristics of each population to a determined pesticide.

KEY WORDS: Dengue vector, population genetic, resistance

RESUMO - *Aedes aegypti* (L.) é vetor de importantes doenças como a febre amarela e a dengue, presentes em regiões tropicais e subtropicais. Para o sucesso no seu controle biológico é importante conhecer a estrutura genética e os mecanismos que resultaram na diversidade das populações. O objetivo deste estudo foi analisar a variabilidade genética de diferentes populações de *A. aegypti* utilizando marcadores de RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso). DNA de dez larvas coletadas a partir de três populações de diferentes localidades foi analisado usando dez iniciadores de RAPD. Os resultados indicaram a existência de variabilidade genética inter e intrapopulacional. Isso foi confirmado por um dendrograma que agrupou as populações em dois blocos principais com similaridade genética de 24%. Em um desses agrupamentos foi possível distinguir duas populações que apresentaram grau de similaridade de 50%. A diversidade genética entre as populações (55,01%) foi mais elevada que a diversidade genética dentro das populações (44,99%) aplicando-se análise por AMOVA. Altos níveis de polimorfismo genético ($H_i = 0.2656$) e de diferenciação genética entre as populações ($G_{st} = 0.3689$) foram observados. Além disso, o protocolo de extração de DNA adotado mostrou-se eficiente para a análise do inseto independente do seu estágio de desenvolvimento, evitando-se o acréscimo de reagentes ou etapas adicionais de processamento. Futuros experimentos poderão ser realizados para confirmar se a variabilidade observada pode estar ligada às características de resistência de cada população a um determinado pesticida.

PALAVRAS-CHAVE: Vetor da dengue, genética de populações, resistência

Aedes aegypti (L.) é um mosquito doméstico com atividade hematofágica diurna que utiliza, preferencialmente, depósitos artificiais de água limpa para colocar seus ovos (Tauil 2002). Originário provavelmente da Etiópia, adquiriu grande capacidade de adaptação ao domicílio humano, acompanhando os povos em suas migrações pela terra (Gadelha & Toda 1985). Desse modo, a espécie desenvolveu um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico em sua trajetória evolutiva, sendo reconhecido entre os culicídeos como a espécie mais associada ao homem. A fêmea alimenta-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, especialmente quando perturbada antes de estar totalmente ingurgitada, aumentando a possibilidade da ingestão e transmissão de vírus (Barata *et al* 2001), destacando-se a dengue.

A dengue é uma importante arbovirose que acomete o homem e constitui grave problema de saúde pública no Brasil e na maioria dos países tropicais, cujas condições climáticas favorecem sua proliferação. *Aedes aegypti* é uma das espécies de maior distribuição no país, estando presente em 3.970 municípios (SVS/MS 2008). Tem grande importância epidemiológica por estar envolvida na transmissão do vírus da febre amarela e de quatro sorotipos da dengue, incluindo a versão hemorrágica que acomete indivíduos nas áreas tropicais e subtropicais (Ayres *et al* 2002).

Em 2008, foram registrados 230.829 casos notificados de dengue, sendo 1.069 casos confirmados de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e 77 óbitos por FHD. Na Região Centro-Oeste, foram notificados 20.936 casos de dengue, com redução de 71,72% quando comparado ao mesmo período de 2007. Foram confirmados 38 casos de FHD, com três óbitos e oito casos de dengue com complicação, com cinco óbitos. Goiás e o Distrito Federal apresentaram aumento no número de notificações de 40,79% e 15,36% respectivamente, e reduções foram observadas no Mato Grosso do Sul (96,10%) e Mato Grosso (57,70%) (SVS/MS 2008).

A habilidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética. A informação da variação genética dentro e entre as populações é importante para compreender a história evolutiva de populações de mosquitos e da epidemiologia da doença (Yan *et al* 1998). O estudo da estrutura genética da população é essencial para o entendimento da dinâmica das populações do *A. aegypti* e para a análise de fatores responsáveis pela resistência e adaptação ecológica. Vários estudos têm investigado a variabilidade genética de populações de culicídeos, utilizando marcadores moleculares tais como isoenzimas (Laranja *et al* 2003, Souza-Polezzi & Bicudo 2004), DNA mitocondrial (Bosio *et al* 2005), RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (Paduan *et al* 2006) e microssatélites (Chambers *et al* 2007).

A técnica de RAPD tem como base a PCR (Polymerase Chain Reaction) que permite a detecção de polimorfismos entre indivíduos de uma mesma população. É uma técnica interessante para estudos de genética de populações, e aumenta as chances de análises mais global de genomas (Williams *et al* 1990, Apostol *et al* 1996). A desvantagem vem de essa técnica estar restrita à análise de marcadores que apresentem comportamento genético dominante. Entretanto, a amplificação do DNA é gerada de forma simples e a

baixo custo, sem necessidade de conhecimento prévio de sequências do genoma, sendo a mesma utilizada com sucesso na identificação e diferenciação de populações de *A. aegypti* baseada na variação genética (Ayres *et al* 2003, Ocampo & Wesson 2004).

Utilizando marcadores RAPD, foi observado que a estrutura genética de populações do culicídeo, de onze localidades pertencentes a seis estados brasileiros, apresenta alta variabilidade e altos níveis de diferenciação entre as populações (Paduan *et al* 2006). Ainda é possível detectar modelos locais de fluxo gênico e isolamento por distância de populações de *A. aegypti* (Gorochotegui-Escalante *et al* 2002) e estimar níveis de polimorfismo intraespecífico e relações genéticas entre populações do inseto (De Sousa *et al* 2001).

O presente trabalho teve por objetivos obter perfis eletroforéticos de RAPD específicos para populações resistentes a inseticidas e determinar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de três populações de *A. aegypti* submetidas a três diferentes condições ambientais.

Material e Métodos

Foram analisadas três populações de *A. aegypti*: Bthek, Resistente e Roc. A população denominada Bthek foi originária da criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brasil, 1°43'48.74"S e 47°54'76"W), mantida há cinco anos e revigorada anualmente com introdução de indivíduos de campo coletados nas cidades satélites do Distrito Federal. Essa população nunca foi submetida a tratamentos químicos ou biológicos em campo. A população Resistente foi originária de Planaltina (DF) e mantida no Instituto de Saúde (Brasília, DF, Brasil, 15°46'50.38"S e 47°52'21.55"W) há quatro anos. Foi detectada nessa população resistência ao temefós em campo, confirmada por bioensaios em 2001 (Carvalho *et al* 2004). A população Roc, originária da Flórida, também mantida no Instituto de Saúde (Brasília, DF, Brasil 15°46'50.38"S e 47°52'21.55"W) há mais de dez anos, é considerada internacionalmente como suscetível a inseticidas, inclusive ao temefós.

Para a obtenção do DNA, utilizou-se o procedimento descrito por Ayres *et al* (2002). Foram utilizadas 10 larvas de parentais diferentes de cada uma das três populações de *A. aegypti*, para obtenção de perfis eletroforéticos de 10 loci RAPD (OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11, OPA-12, OPA-13, OPA-15 ou OPA-20 da Operon Technologies Inc., CA, USA).

Para testar a viabilidade da técnica utilizada para extração de DNA descrita por Ayres *et al* (2002) aos diferentes estágios do ciclo de vida desse culicídeo, foram coletados, aleatoriamente, dez indivíduos de cada fase de desenvolvimento (larva, pupa e adulto) de uma colônia mantida no laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Para estudos de caracterização molecular e viabilidade do DNA nos diferentes estágios de vida do inseto, o DNA foi diluído 5x (100 ng/μl) em TE (Tris-EDTA) 0,1x. Cada reação de amplificação foi realizada no volume total de 30 μl, contendo DNA (100 ng/μl), tampão 1x (10 mM Tris-

HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, dNTPs (10 mM), iniciadores (10 µM) e enzima *Taq* DNA polimerase (GE Healthcare) (2,5 U).

As ampliações foram efetuadas em termociclador PTC 100 (MJ Research) programado para 45 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94°C. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1 min a 93°C, anelamento por 1 min a 35°C e extensão por 2 min a 72°C. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 5 min a 72°C.

Os produtos de amplificação originários das reações de RAPD foram separados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 3h a 160 V. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30 min em solução contendo brometo de etídio (5 µg/ml), descorados por 30 min em água destilada e fotografado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 300 nm. A documentação fotográfica foi feita utilizando-se do sistema EagleEye II still video system™ (Stratagene). Em todos os géis, marcadores de massa molecular (100 bp Ladder - INVITROGEN) foram usados para a determinação da massa molecular dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD.

A matriz de similaridade foi obtida por meio do coeficiente de Jaccard (Sneath & Sokal 1973), que foi submetida a análise por UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Analysis), para produção de dendrograma, utilizando-se do programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 2.02 pc (Rohlf 1993). Os dados obtidos foram utilizados na análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação estatística das possíveis origens das variabilidades encontradas nas populações pela aplicação de algoritmos específicos do programa Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al* 2000). O programa PopGene (Yeh & Boyle 1997) foi usado para determinar a heterozigosidade, o número de loci polimórficos e os índices de *Gst* e *Nm*.

Resultados

Os dez iniciadores utilizados geraram 127 produtos de amplificação, sendo 60 (48%) polimórficos. Cada um desses

iniciadores produziu a média de 14 fragmentos de DNA. A faixa de tamanho dos fragmentos de DNA variou de 200 pb a 1800 pb na população Bthek, de 300 pb a 2000 pb na população Resistente e de 250 pb a 2000 pb na população Roc.

Para o iniciador OPA11, os indivíduos da população Bthek apresentaram fragmentos característicos de 500 pb, 1400 pb e 2500 pb. Na população resistente ao inseticida temefôs, observaram-se bandas em comum com a população anterior e a presença de um fragmento exclusivo de 2000 pb, sendo na população Rock observado um fragmento exclusivo de 1800 pb (Fig 1).

Foram detectados dois fragmentos monomórficos, ou seja, presentes em todos os indivíduos das três populações analisadas. Um fragmento de 450 pb (resultado de amplificação pelo iniciador OPA 12) e outro de 500 pb (resultado de amplificação pelo iniciador OPA 13).

Usando-se o programa NTSYS foi possível o agrupamento das populações em dois blocos principais, com base nos perfis eletroforéticos de RAPD (Fig 2). O agrupamento A foi constituído apenas pela população Bthek, mantida na criação em Brasília, DF. Essa população apresentou 24% de similaridade genética com as populações que formaram o agrupamento B (Resistente e a Rock). As duas populações apresentaram entre si 50% de similaridade genética. Além disso, houve separação das populações, sem que ocorresse agrupamento de indivíduos de populações diferentes.

As análises de variância molecular (AMOVA) indicaram que 44,99% da variação observada resultou de variações dentro das populações e que 55,01% da variação observada originou-se de variações entre as populações (Tabela 1). A heterozigosidade média (H_j) foi de 0.2656. A diferenciação genética total entre as populações de *A. aegypti* estudadas foi alta ($G_{st} = 0.3689$; $N_m = 0.8554$).

Discussão

A técnica de RAPD tem sido aplicada em estudos de caracterização molecular e variabilidade genética. Estudos populacionais de insetos também têm utilizado essa técnica para examinar a estrutura de cruzamento (Su *et al* 2003),

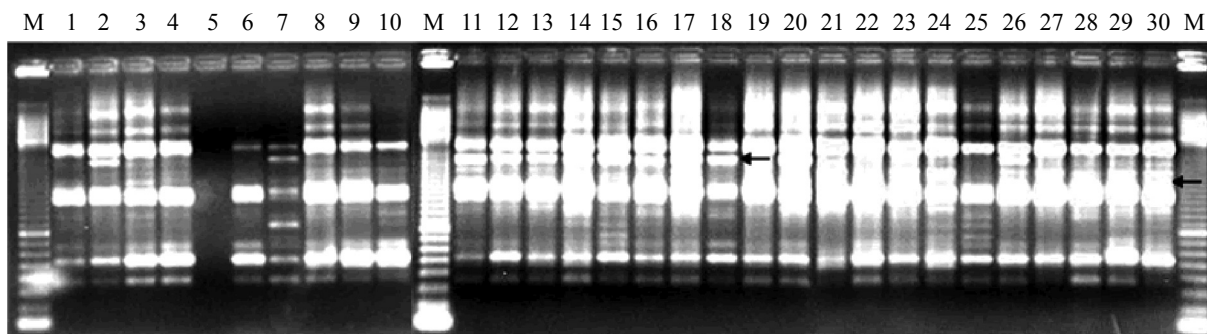


Fig 1 Perfil de produtos da amplificação de DNA por PCR-RAPD (iniciador OPA11) de indivíduos de três populações de *Aedes aegypti* em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. M - marcador de massa molecular 100 pb (INVITROGEN); 1 a 10 - indivíduos da população Bthek; 11 a 20 - indivíduos da população Resistente; 21 a 30 - indivíduos da população Rock. Setas: Fragmento de 2000 pb e 1800 pb da esquerda para direita.

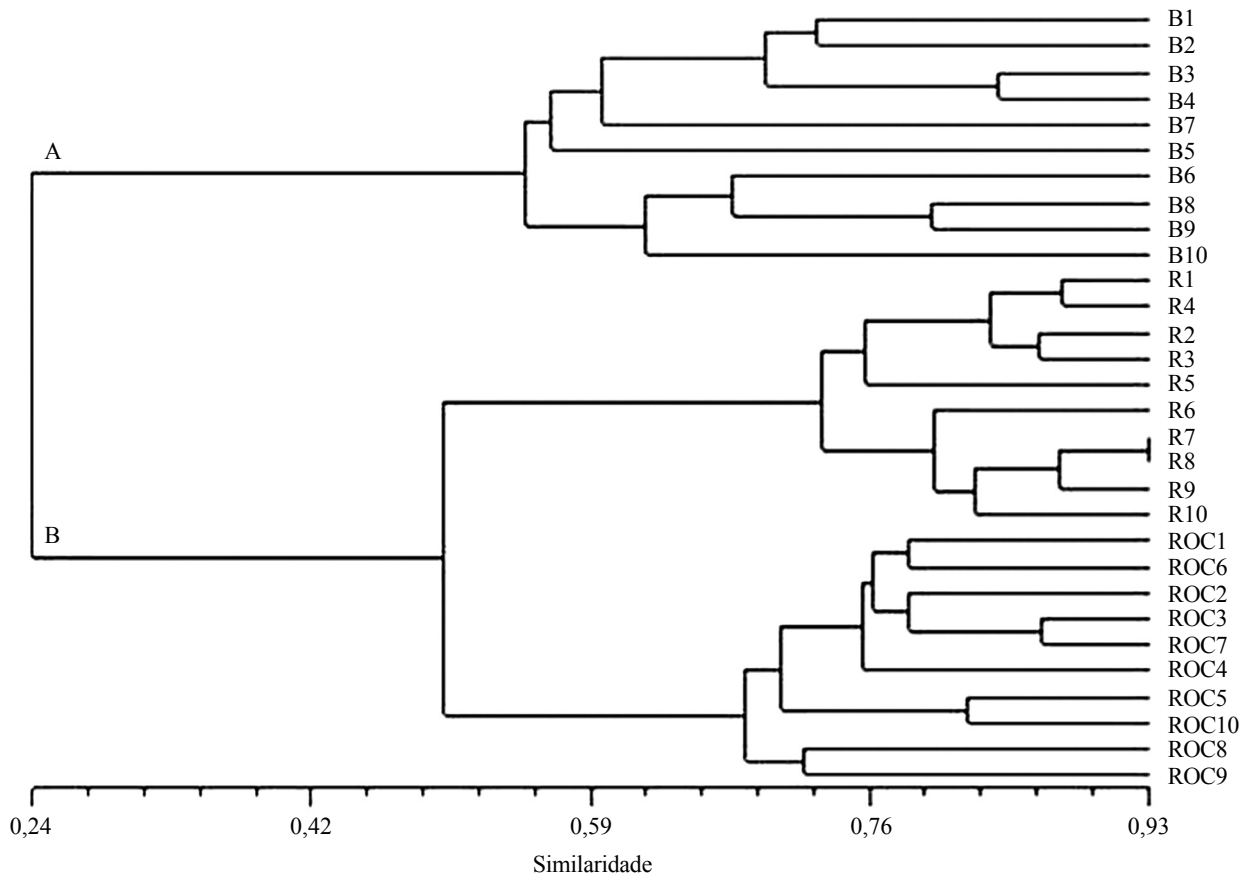


Fig 2 Dendrograma construído a partir dos perfis de 10 locos RAPD analisados em três populações de *Aedes aegypti*. B - população originária da criação Bthek em Brasília, DF; R - população resistente ao inseticida Temefós coletada em uma localidade de Planaltina, DF e; ROC - população padrão de comparação originária Gainesville, Flórida, USA, mantida em Brasília. Os números indicam os indivíduos analisados em cada população.

construção eficiente de mapas de ligação em populações de *A. aegypti* ou estudos taxonômicos de insetos, principalmente em nível intra-específico (Antolin *et al* 1996) e fluxo gênico (Garcia-Franco *et al* 2002).

Pelas análises dos marcadores, as populações Roc e Resistente apresentam maior similaridade genética (50%) do que em relação aos indivíduos originários da criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, denominada de Bthek, usada como perfil de comparação (24%) (Fig 2).

Tabela 1 Análise de variância molecular (AMOVA) em três populações de *Aedes aegypti* do Distrito Federal - Brasil.

Tipo de variação	GL	SQ	CV	Varição total	P
Entre populações	2	294,967	14,02	55,01	< 0,001
Dentro das populações	27	195,600	7,24	44,99	< 0,001
Total	29	490,567	21,26	100	

CV: Componentes da variância; SQ: Soma do quadrado dos desvios; GL: Graus de liberdade

Vale ressaltar que tanto a população Roc como a Resistente são mantidas no mesmo local (Instituto de Saúde DF) e é comum fuga de alguns insetos durante a manutenção das gaiolas, permitindo troca de indivíduos de populações diferentes.

Os resultados assemelham-se aos dados de um estudo feito com populações desse culicídeo coletadas em diferentes regiões geográficas do estado de São Paulo e populações de laboratório. De acordo com os padrões de RAPD, as populações foram separadas em dois grupos principais, um grupo com mosquitos da Região Oeste do estado de São Paulo e outro grupo com mosquitos de uma cepa de laboratório, juntamente com mosquitos de cidade litorânea onde se localiza o maior porto da América Latina (Santos *et al* 2003).

A variabilidade genética entre as populações analisadas (55,01%) foi maior do que a observada dentro das populações (Tabela 1). Isso também foi observado em duas amostras de *A. aegypti* coletadas durante a epidemia de 1997 em Santiago de Cuba, e que foram analisadas pela técnica de RAPD-PCR (Bisset *et al* 2005). A partir da análise de 18 loci isoenzimáticos também foi constatado, em populações desse culicídeo de quatro vizinhanças da cidade de Manaus, AM, que apesar de elas serem semelhantes geneticamente ($D = 0.003$ a 0.016), a diferenciação de 4,88% entre as populações foi significativa (Fraga *et al* 2003).

A heterozigosidade média entre os 10 loci de RAPD ($H_t = 0,2636$) foi menor do que em análises de populações brasileiras com 21 ($H_t = 0,388$) (Paduan *et al* 2006) e 27 loci de RAPD ($H_t = 0,390$) (Ayres *et al* 2003) e de populações de Porto Rico, com 57 loci de RAPD ($H_t = 0,354$) (Apostol *et al* 1996). A diferenciação genética entre as populações de *A. aegypti* deste estudo foi significativa, indicando que essas populações são altamente diferenciadas ($G_{st} = 0,3689$; $N_m = 0,8554$). Os valores foram semelhantes aos descritos para outras populações dessa espécie no Brasil ($G_{st} = 0,317$; $N_m = 0,54$ - Ayres *et al* 2003, ($G_{st} = 0,430$; $N_m = 0,65$ - Paduan *et al* 2006) e Argentina ($G_{st} = 0,249$; $N_m = 0,75$ - De Souza *et al* 2001).

Populações estruturadas geralmente mostram equilíbrio dinâmico entre fatores que favorecem a diferenciação (mutação, deriva e seleção natural direcional ou disruptiva, diferente em cada área) e fatores homogeneizadores (migração e seleção natural balanceada ou diferencial, uniforme em cada área) (Solé-Cava 2001). No presente estudo, as análises mostram a presença de dois agrupamentos, sugerindo que essas populações podem estar sob processo de diferenciação genética direcionada por fatores ecológicos, evolucionários e históricos.

Os marcadores de RAPD utilizados foram eficientes na diferenciação genética preliminar entre populações do Distrito Federal parcialmente isoladas, e também na detecção de fragmentos interessantes para estudos de resistência e suscetibilidade.

A exclusividade do fragmento de 2000 pb para o locus OPA-11 na população de Planaltina (Resistente) indica uma possível exploração do mesmo como marcador molecular na identificação de populações resistentes no campo ao inseticida temefôs. No entanto, estudos adicionais com marcadores moleculares mais específicos são necessários para confirmar esse potencial.

Caso confirmado, isso é particularmente interessante em termos de manejo integrado, uma vez que poderá ser empregado na identificação de populações resistentes a produtos químicos. Havendo resultado molecular positivo para a resistência a um dado produto químico, poderão ser adotadas outras estratégias, tais como, o emprego de outros inseticidas ou o emprego do controle biológico pela utilização de estirpes de *Bacillus thuringiensis*. Possivelmente, o uso de produtos químicos está selecionando populações com perfis de marcadores moleculares específicos. O entendimento dessa dinâmica molecular poderá auxiliar no planejamento de estratégias de controle biológico para populações específicas de *A. aegypti*.

Referências

- Antolin M F, Bosio C F, Cotton J, Sweeney W, Strand M R, Black W C (1996) Intensive linkage mapping in a wasp (*Bracon hebetor*) and a mosquito (*Aedes aegypti*) with single-strand conformation polymorphism analysis of random amplified polymorphic DNA markers. *Genetics* 143: 1727-1738.
- Apostol B L, Black W C, Reiter P, Miller B R (1996) Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325-334.
- Ayres C F J, Melo-Santos M A V, Solé-Cava A M, Furtado A F (2003) Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *J Med Entomol* 40: 430-435.
- Ayres C F J, Romão T P A, Melo-Santos M A V, Furtado A F (2002) Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 871-875.
- Barata E A M F, Costa A I P, Chiaravalloti F N, Glasser C M, Barata J M S, Nata D (2001) *Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil. *Rev Saúde Pública* 35: 237-242.
- Bisset J A, Rodriguez M, De Armas Y (2005) Comparación de 2 poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba con diferente conducta de reposo. *Rev Cuba Med Trop* 57: 143-150.
- Bosio C F, Harrington L C, Jones J W, Sithiprasasna R, Norris D E, Scott T W (2005) Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. *Am J Trop Med Hyg* 72: 434-442.
- Carvalho M S L, Caldas E D, Degallier N, Vilarinhos P T R, Souza L C K R, Yoshizawa M A C, Konox M B, Oliveira C (2004) Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. *Rev Saúde Pública* 38: 623-629.
- Chambers E W, Meece J K, McGowan J A, Lovin D D, Hemme R R, Chadee D D, Mcabee K, Brown S E, Knudson D L, Severson D L, David W (2007) Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Heredity* 98: 202-210.
- De Sousa G B, Blanco A, Gardenal C N (2001) Genetic relationships among *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Argentina using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction markers. *J Med Entomol* 38: 371-375.
- Fraga E C, Santos J M M, Maia J F (2003) Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Manaus-AM. *Brazil Genet Mol Biol* 26: 181-187.
- Gadelha D P, Toda A T (1985) Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 37: 29-36.
- Garcia-Franco F, Muñoz M L, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas I, Garcia-Rejon J, Beaty B J, Black W C (2002) Large genetic distances among *Aedes aegypti* populations along the south pacific coast of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 6: 594-598.
- Laranja A T, Manzatto A J, Bicudo H E M C (2003) Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genet Mol Biol* 26: 419-429.
- Ocampo C B, Wesson D M (2004) Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 71: 506-513.
- Paduan K S, Araújo J P, Ribolla P E M (2006) Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* in Brazil elucidated by molecular markers. *Genet Mol Biol* 29: 391-395.

- Rholf F J (1993) NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0 Exeter Software Setauket, New York, 31p.
- Santos V M, Macoris M L G, Andrighetti M T M, Avila P E, Kirchgatter K (2003) Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo state, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 45: 99-101.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin ver. 2000: a software for population data analysis. Switzerland, University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory.
- Secretaria de Vigilância em Saúde (2008) Nota técnica / situação epidemiológica da dengue 05/2008. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_maio2008.pdf. (Acesso em outubro de 2008).
- Sneath P A, Sokal R R (1973) Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, 573p.
- Solé-Cava A M (2001) Biodiversidade molecular e genética da conservação, p.172-192. In Matioli S R (ed) Biologia molecular e evolução. Holos, Ribeirão Preto, 202p.
- Souza-Polezzi R C, Bicudo H E M C (2004) Effect of phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Genet Mol Biol 27: 275-283.
- Su C, Chang Y, Hsu E L, Yin C M, Ho C M (2003) Genetic relationships among populations of *Aedes aegypti* in Taiwan by using phenotypic and random amplified DNA-polymerase chain reaction markers. J Am Mosq Control Assoc 19: 329-338.
- Tauil P L (2002) Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Cad Saúde Pública 18: 867-871.
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18: 6531-6535.
- Yan G, Chadee D D, Severson D W (1998) Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Genetics 148: 793-800.
- Yeh F C, Boyle T J B (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belg J Bot 129: 157.

Received 13/II/08. Accepted 11/III/09.
