

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS DE SOROCABA**

**EDUARDO LEAL RODRIGUES**

**ANÁLISES ESTRUTURAIS E EVOLUTIVAS DE UMA  
REGIÃO DO GENE COI DO DNAm<sup>t</sup> DE ESPÉCIES DE  
MOSCAS SAPRÓFAGAS DA FAMÍLIA SARCOPHAGIDAE E  
PERSPECTIVAS PARA A IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA**

**SOROCABA**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS DE SOROCABA**

**EDUARDO LEAL RODRIGUES**

**ANÁLISES ESTRUTURAIS E EVOLUTIVAS DE UMA  
REGIÃO DO GENE COI DO DNAm<sup>t</sup> DE ESPÉCIES DE  
MOSCAS SAPRÓFAGAS DA FAMÍLIA SARCOPHAGIDAE E  
PERSPECTIVAS PARA A IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Diversidade Biológica e  
Conservação para obtenção do título de  
mestre em Diversidade Biológica e  
Conservação**

**Orientação: Profa Dra Ana Cláudia  
Lessinger**

**SOROCABA**

**2011**

Rodrigues, Eduardo Leal  
R696a Análises estruturais e evolutivas de uma região do gene COI do DNAm  
de espécies de moscas saprófagas da família sarcophagidae e  
perspectivas para a identificação taxonômica / Eduardo Leal Rodrigues. --  
Sorocaba, 2011.  
50 f. ; il. (color.) ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, *Campus*  
Sorocaba, 2011  
Orientador: Ana Cláudia Lessinger  
Banca examinadora: Mariana Lúcio Lyra, Maria Elena Infante Malachias  
Bibliografia

1. Genética molecular. 2. DNA mitocondrial. 3. Sarcophagidae -  
classificação. I. Título. II. Sorocaba - Universidade Federal de São Carlos.

CDD 595.77

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do *Campus* de Sorocaba.

**EDUARDO LEAL RODRIGUES**

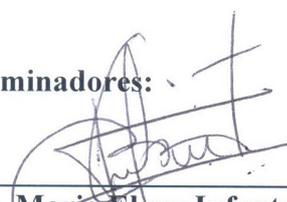
**ANÁLISES ESTRUTURAIS E EVOLUTIVAS DE UMA  
REGIÃO DO GENE COI DO DNAmT DE ESPÉCIES DE  
MOSCAS SAPRÓFAGAS DA FAMÍLIA SARCOPHAGIDAE E  
PERSPECTIVAS PARA IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação para obtenção do título de  
mestre em Diversidade Biológica e Conservação.  
Universidade Federal de São Carlos.  
Sorocaba, 12 de dezembro de 2011.**

**Orientadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ana Cláudia Lessinger**  
Universidade Federal de São Carlos – *Campus Sorocaba*

**Examinadores:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Maria Elena Infante-Malachias**  
Universidade de São Paulo – *USP campus EACH*

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Mariana Lucio Lyra**  
Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – *UNESP – Rio Claro*

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho à São Jorge da Capadócia, a meus pais Jorge e Vera, a minha namorada Érika e as minhas orientadoras, Dra Ana Cláudia Lessinger e Dra Cátia Antunes de Mello Patiu pelo apoio incondicional em todos os momentos da execução deste trabalho, pois sem este apoio, tal obra não poderia ser concretizada*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à São Jorge da Capadócia, por me proteger e por me dar forças para vencer todas as batalhas por mim enfrentadas, além de me permitir tirar proveito das derrotas e nunca esmoecer perante as dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Jorge Luiz Lima Rodrigues e era Lúcia Leal Rodrigues, pelo apoio incondicional, tanto psicológico quanto financeiro em alguns momentos.

Agradeço à minha namorada, Érika Machado de Salles, por ser carinhosa e paciente comigo (pois às vezes sou chato e relapso, como ela costuma dizer), além de me apoiar sempre de diversas maneiras.

Agradeço à minha orientadora, Dra Ana Cláudia Lessinger, pela orientação e por todas as lições ensinadas. Tais ensinamentos me proporcionaram crescimento e amadurecimento tanto profissional como pessoal.

Ao amigo Renato Kenji Kimura pela amizade e pela ideias outrora ofertadas na tentativa de solucionar alguns problemas e também pelas diversas caronas para São Paulo. Apenas para lembrá-lo, há um parágrafo só para você.

Aos amigos, Paulo Roberto, Paulo Vinícius, Crisley, Mari, Danilo, Fabrícia, Isabela, Ana Cláudia, Manolo e todos os outros que por ventura não tenha citado pela amizade e momentos engraçados

Aos amigos e técnicos Marco Maria, Almir Calazans, Matheus, Sérgio, Fernando, Ellen, Heidi, Mônica pela amizade da mesma maneira que agradei aos amigos supracitados.

Agradeço à Dra Eliana Akie Simabukuro e toda a equipe vinculada com o programa de mestrado pela competência e empenho em sempre proporcionar melhorias para a pós-graduação.

Agradeço ao Dr Enrique Medina-Acosta, meu orientador durante a graduação, pelos ensinamentos e conhecimentos técnico-científicos repassados, pois estes permitiram a lapidação de uma pedra anteriormente dita como bruta.

Agradeço à Filipe Brum Machado, doutorando da USP Ribeirão Preto, pela amizade, mesmo que a distância e por ser um exemplo de jovem pesquisador.

À todos os professores credenciados no programa de pós, cujo trabalho é devotado para o melhoramento deste.

Agradeço à CAPES pelas bolsas ofertadas ao programa de pós, sendo que minha pessoa fora agraciada com uma destas.

## RESUMO

O sistema de classificação taxonômica dos seres vivos tem sido tradicionalmente baseado na comparação de uma ampla gama de estruturas morfológicas. Nas últimas décadas, o potencial taxonômico de características fisiológicas, celulares e moleculares tem sido reconhecido, além de aspectos filogenéticos e biogeográficos. Este estudo focou a caracterização estrutural e evolutiva da região 3' do gene COI do DNAm de espécies de sarcófagídeos e analisou a contribuição desta informação para fins de identificação taxonômica, ampliando o conhecimento sobre esta família na região neotropical. A família Sarcophagidae contém aproximadamente 2.600 espécies e suas relações filogenéticas não estão bem estabelecidas entre gêneros e sub-gêneros. Neste cenário, a caracterização de sequências nucleotídicas para identificação de espécies de Sarcophagidae é uma abordagem estratégica que também poderá contribuir na investigação de relações filogenéticas. Neste trabalho, foi seqüenciada e caracterizada estrutural e evolutivamente uma região de 470 pb do gene COI de cinco espécies de sarcófagídeos: *Peckia anguilla*, *Peckia collusor*, *Peckia ingens*, *Oxysarcodexia admixta* e *Oxysarcodexia paulistanensis*. Para as análises comparativas foram incluídas sequências ortólogas de outras 3 espécies de Sarcophagidae (*P. intermutans*, *O. ventricosa* e *S. carnaria*) e das espécies *C. hominivorax* (Calliphoridae) e *Haematobia irritans* (Muscidae) disponíveis no GenBank. A variação intraespecífica apresentou valores entre 0 e 0,01 e variação interespecífica variou entre 0,07 - 0,151. Similarmente a outras famílias de Diptera, a composição de nucleotídeos desta região apresentou uma maior abundância de A e T (em média: A = 30.2%; T = 38.7%; C = 17.3% e G = 13.8%). A composição de aminoácidos apresentou maior abundância de Leucina, Fenilalanina e Treonina. Foram identificadas apenas oito posições de aminoácidos divergentes nas análises comparativas entre as espécies de sarcófagídeos analisadas, além de 3 divergências (inserções) com relação ao modelo estrutural da proteína COI de insetos. A análise de Neighbor-joining utilizando Kimura-2P, procedimento utilizado em análises de "DNA Barcodes", distribuíram as espécies em clados monofiléticos, entretanto a validação desta abordagem para auxiliar na resolução de conflitos taxonômicos requer a análise de uma amostragem maior de indivíduos de cada espécie - incluindo maior distribuição geográfica - para caracterizar a amplitude da variação intraespecífica nestas espécies.

**Palavras-chave:** Identificação molecular, DNAm, Sarcophagidae, COI

## ABSTRACT

The taxonomic classification system of all organisms has been traditionally based in the comparative analysis of a wide range of morphological structures. In the last decades, the potential of physiological, cellular and molecular characteristics have been recognized in taxonomy, including phylogenetic and biogeographic aspects. This study focuses on the structural and evolutionary characterization of a region encompassing the 3' end of the mtDNA gene COI from sarcophagids and analyzed the contribution of this information for species identification, increasing the knowledge related to this family in the neotropical region. The Sarcophagidae family has approximately 2,600 species and their phylogenetic relationships are not well established for most genera and sub-genera. In this scenario, the characterization of nucleotide sequences for species identification in Sarcophagidae is a strategic approach that contributes for inferring phylogenetic relationships in this family. In this study, a 470 bp region from the COI gene was sequenced and characterized by structural and evolutionary analyses for five species: *Peckia anguilla*, *Peckia collusor*, *Peckia ingens*, *Oxysarcodexia admixta* e *Oxysarcodexia paulistanensis*. For comparative analyses we included ortholog sequences from three other sarcophagid species (*P. intermutans*, *O. ventricosa* e *S. carnaria*) and from the species *C. hominivorax* (Calliphoridae) e *Haematobia irritans* (Muscidae) available in GenBank. The intraspecific variation showed values between 0 e 0,01 and the interspecific variation varied from 0,07 - 0,151. Similarly to other Diptera families, the nucleotide composition of this region showed a high content of A and T (on average: A = 30.2%; T = 38.7%; C = 17.3% and G = 13.8%). The aminoacid composition presents higher abundance of Leucine, Phenylalanine and Tyrosine. Only eight divergent aminoacid positions were identified in comparative analysis of sarcophagid species, in addition to 3 positions that diverges from the insect COI protein structural model. Neighbor-joining analysis using Kimura-2P, an usual procedure in DNA barcodes analysis, distributed all species in monophyletic clusters, however the utility of this approach for resolving taxonomical conflicts requires additional sampling of specimens/species – including a wide geographical coverage – in order to provide a better characterization of intraspecific variation in these species.

**Key words:** Molecular Identification, mtDNA, Sarcophagidae, COI

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Configuração bi-dimensional da subunidade I da enzima citocromo oxidase	12
Figura 2 – Distribuição da variação nas sequências de aminoácidos dos diferentes domínios da proteína COI em insetos	13
Figura 3 - Intervalo de classes de valores de variabilidade intraespecífica e interespecífica para Diptera	16
Figura 4 - Imagens digitais dos edeagos das espécies de Sarcophagidae coletadas neste estudo	21
Figura 5 - Gráfico representativo da frequência relativa da amostragem de diferentes espécies de sarcófagídeos coletadas neste estudo	25
Figura 6 - Amplificação de ~850 pb região COI de nove espécies de sarcófagídeos visualizada em eletroforese em gel de agarose (1%)	26
Figura 7 - Alinhamento das sequências de DNAm <sup>t</sup> homólogas ao “primer” TY-J-1460 de quatro diferentes espécies de dípteros	27
Figura 8 - Composição média dos aminoácidos da região COI das espécies analisadas	28
Figura 9 - Análises estruturais e comparativas da seq. de aminoácidos da região COI	30
Figura 10 - Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas da região COI de espécies de Sarcophagidae evidenciando as posições divergentes	31
Figura 11 - Topologia obtida para as espécies de sarcófagídeos com base na análise de 470pb do gene COI (método de Neighbor-Joining e distância Kimura2P)	34
Figura 12 - Topologia obtida para as espécies de sarcófagídeos com base na análise de 470pb do gene COI (método de Máxima Verossimilhança)	35
Figura 13 - Topologia obtida para as espécies de sarcófagídeos com base na análise de 156 aa da região carboxi-terminal da proteína prevista para o gene COI	36
Figura 14 - Intervalos de valores de variação intra e interespecífica obtidas para a região 3' do gene COI para as espécies analisadas neste estudo	37

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Descrição das sequências dos “primers” inicialmente utilizados para a amplificação da região-alvo	22
TABELA 2 – Composição nucleotídica da região-alvo	28
TABELA 3 – Estimativa de divergência nucleotídica entre as sequências (Kimura 2P)	33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
1.1 A FAMÍLIA SARCOPHAGIDAE	10
1.2 MARCADORES MOLECULARES E “DNA BARCODES”	11
1.3 CONCEITO DE ESPÉCIES	16
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	20
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	20
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA	21
2.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO COI	21
2.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE “PRIMERS” UNIVERSAIS E SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS	22
2.5 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR	23
2.6 SEQUENCIAMENTO DE DNA	24
2.7 ANÁLISE DOS DADOS	24
<b>3. RESULTADOS</b>	25
3.1 ESPÉCIES COLETADAS	25
3.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO COI	26
3.3 ANÁLISE DOS “PRIMERS” TAXON-ESPECÍFICOS	26
3.4 ANÁLISES ESTRUTURAIS E EVOLUTIVAS DA REGIÃO 3’ DO GENE COI	27
3.5 ANÁLISE DE SIMILARIDADE	32
3.6 ANÁLISES FILOGENÉTICA E TAXONÔMICA	34
<b>4. DISCUSSÃO</b>	38
4.1 AMPLIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>Blaesoxipha (Acanthodotthea) aix</i>	38
4.2 ANÁLISES ESTRUTURAIS E COMPARATIVAS	38
4.3 ANÁLISE DA VARIABILIDADE INTRA E INTERESPECÍFICA NA ABORDAGEM TAXONÔMICA	38
4.4 PERSPECTIVAS FILOGENÉTICAS	40
<b>5. CONCLUSÕES</b>	41
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	42

## 1- Introdução:

### 1.1 – A família Sarcophagidae

A descrição e identificação das espécies estão entre as práticas mais fundamentais na biologia, sendo necessário nomear os organismos de acordo com pressupostos da taxonomia para então proceder a publicação dos dados relativos a espécies válidas (WILSON, 2003). A taxonomia descritiva surgiu em meados do Século XVIII e até o momento, aproximadamente 1,8 milhões de espécies já foram descritas, estimando-se que cerca de 5 a 100 milhões de espécies ainda aguardam por identificação e/ou descrição. Estima-se que aproximadamente 125.000 espécies de Diptera tenham sido descritas, estimando-se que o total de espécies existentes seja de aproximadamente 1,6 milhões (HAMMOND, 1992). As espécies desta ordem têm sido classificadas em aproximadamente 10.000 gêneros, 150 famílias, 22-31 superfamílias, 8-10 infraordens e 3 subordens (YEATES; WIEGMANN, 1999; EVENHUIS *et al.*, 2009).

A família Sarcophagidae possui cerca de 2.600 espécies descritas em todo o mundo com 622 espécies descritas para a região neotropical (PAPE, 1996). Embora o nome da família indique um hábito de colonização de carcaças, existem outros hábitos adotados por membros desta família, que incluem uma ampla gama de especialistas, como habitantes de plantas carnívoras (DAHLEN; NACZI, 2006) a coprófagos de morcegos, além de inquilinos de ninhos de vespas e parasitóides. O traço típico da biologia da família é a ovariviparidade, que foi observada e documentada por Reaumur em 1738 e por De Geer em 1776 (PAPE, 1996).

Os Sarcophagidae são distribuídos em três subfamílias: Sarcophaginae, Miltogramminae e Paracronychiinae (PAPE, 1996). A maioria dos Miltogramminae são cleptoparasitas de abelhas e vespas solitárias – possivelmente uma característica do plano básico do clado. Os Paramacronychiinae possuem gêneros cujas espécies são predadores ou parasitóides de lepidópteros. O gênero *Brachycoma* contém espécies predadoras de imaturos de abelhas, *Sarcophila* contém espécies necrófagas e predadores de insetos e *Wohlfarthia* inclui espécies que produzem miíases em mamíferos (PAPE, 1996). Os Sarcophaginae possuem espécies biologicamente mais diversificadas. Os gêneros *Oxysarcodexia* e *Ravinia* estão associados com fezes e material orgânico em decomposição, sendo a maioria das espécies coprófagas, mas algumas espécies podem ser predadoras. Outras espécies produzem miíases em vertebrados, como *Cistudinomyia cistudinis* em tartarugas,

*Lepidodexia (Notochaeta) blakeae* em lagartos e *Lepidodexia (Notochaeta) bufonivora* em sapos (MELLO-PATIU; LUNA-DIAS, 2010).

A subfamília Sarcophaginae é reconhecida como um grupo monofilético claramente definido que abrange cerca de 1800 espécies em todo o mundo, dividido em 52 gêneros (PAPE, 1996). Embora as moscas desta subfamília apresentem variedade no tamanho, elas convergem morfológicamente, exceto com relação às genitálias masculinas, em particular a estrutura denominada acrofalo, que apresenta-se de formas distintas ao nível de espécie e tem sido o caráter diagnóstico para a identificação taxonômica neste grupo (LEANDRO; D'ALMEIDA, 2005; BARROS *et al.*, 2008; GIROUX *et al.*, 2010). Ressalta-se que a identificação de espécies de Sarcophagidae em seus estágios larvais é limitada devido à escassez de caracteres morfológicos diagnósticos nesta fase do ciclo de vida da mosca (HARVEY *et al.*, 2003). Neste caso, a identificação taxonômica requer técnicas de dissecação e um vasto conhecimento sobre as características morfológicas do esqueleto cefalofaríngeal (HARVEY *et al.*, 2003; WELLS *et al.*, 2007), sendo mais comum optar pela estratégia de criação da larva até a fase adulta, o que incorpora mais uma etapa ao processo de identificação da espécie.

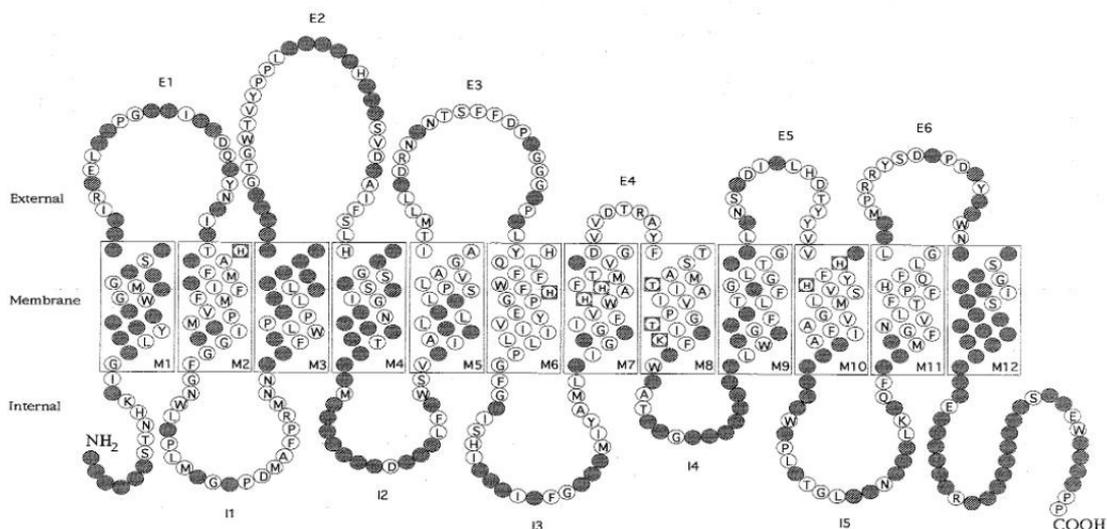
Em relação à diversidade biológica da família, um levantamento da ocorrência e abundância de espécies de Diptera das famílias Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae em coletas realizadas em ambiente de Mata Atlântica, indicou que a família Sarcophagidae foi a que apresentou a maior diversidade de espécies (22 espécies, segundo LEANDRO; D'ALMEIDA, 2005). BROWN (2005) avaliou a taxa de descrição de novas espécies em 22 famílias da ordem Diptera na região neotropical, registrando uma média de 3,9 espécies descritas por ano na família Sarcophagidae, uma taxa considerada baixa em relação à biodiversidade estimada desta família para a região neotropical..

## **1.2 – Marcadores moleculares e “DNA barcodes”**

O DNAm<sup>t</sup> é um excelente marcador para estudos filogenéticos, filogeográficos, de dinâmica populacional e evolução molecular devido a sua herança predominantemente matrilinear e presença de polimorfismos. O genoma mitocondrial, em geral, é uma molécula pequena (15-20 Kb) comparado ao genoma nuclear, organizado como uma dupla-fita circular. Este genoma possui 37 genes, sendo 22 codificadores de RNAs transportadores (tRNAs), 13 de proteínas envolvidas no metabolismo da mitocôndria e 2 codificadores de RNAs ribossômicos (rRNAs) (BOORE, 1999). Em Diptera caliptrados, e insetos em geral, este genoma possui uma região controle não codificadora de

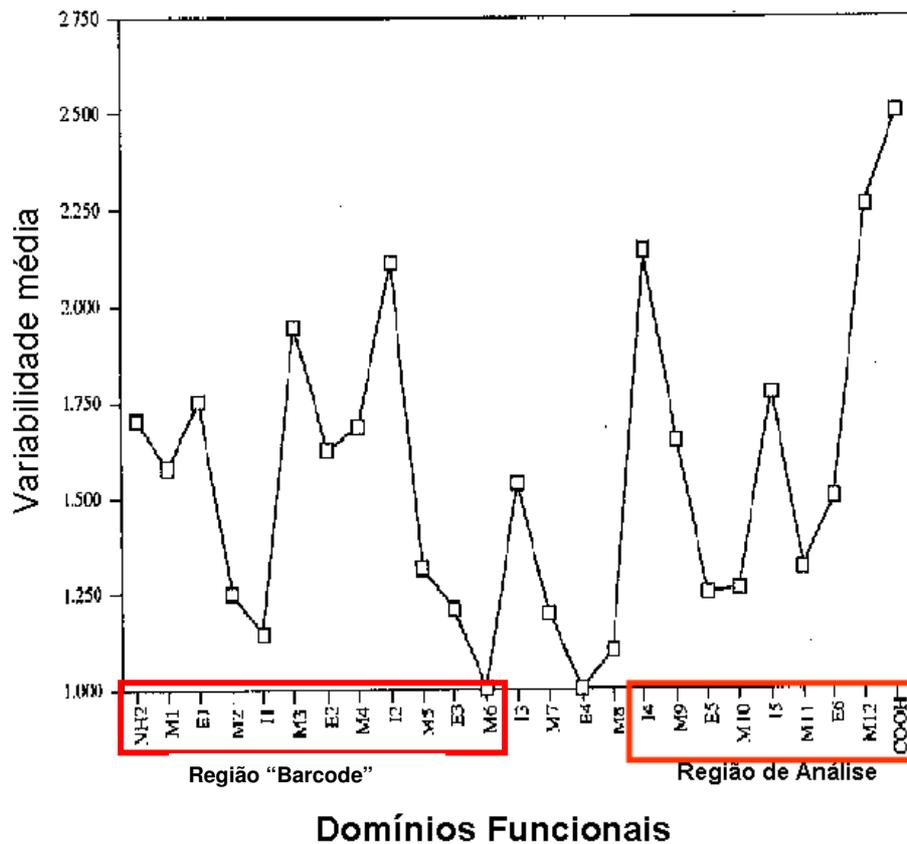
aproximadamente 1000 pares de bases que normalmente contem a origem de replicação de uma das fitas, sendo denominada região rica em A+T (denominação comum em insetos) pelo elevado conteúdo de Adeninas e Timinas (WOLSTENHOLME, 1992; LESSINGER; AZEREDO-ESPIN, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Marcadores moleculares utilizados para identificação de espécies se caracterizam como sequências nucleotídicas bem conservados e que apresentem variação intraespecífica relativamente baixa. Dentre os genes do genoma mitocondrial, o gene COI apresenta-se como o mais conservado em insetos (WELLS; SPERLING, 2001; NELSON *et al.*, 2007; ROE; SPERLING, 2007; WELLS; STEVENS, 2008). A subunidade I da citocromo oxidase é o catalisador terminal da cadeia respiratória mitocondrial. Esta apresenta diversos tipos de domínios funcionais, tais como  $\alpha$ -Hélices Transmembranas, alças Hidrofílicas, canais de prótons (LUNT *et al.*, 1996 – Figura 1).



**Figura 1:** Configuração bi-dimensional da subunidade I da enzima citocromo oxidase. As vinte e cinco regiões estruturais da molécula estão apresentadas. Os aminoácidos representados pelas estruturas preenchidas consistem em posições variáveis entre espécies de insetos, aminoácidos em branco são posições conservadas. Fonte: Adaptado de Lunt *et al.*, 1996. NH<sub>2</sub> – Região amino-terminal, E1-E6 – alças hidrofílicas externas, I1-I5 - alças hidrofílicas internas, M1-M12 – hélices transmembranas e COOH – região carboxi-terminal.

Análises comparativas entre sequências de aminoácidos da proteína COI em insetos foram realizadas por (LUNT *et al.*, 1996) e resultaram no gráfico com a distribuição da variação encontrada de acordo com os diferentes domínios estruturais da proteína Figura 2, onde observa-se que a região carboxi-terminal apresenta maior variação.



**Figura 2:** Distribuição da variação nas sequências de aminoácidos dos diferentes domínios da proteína COI em insetos. A variabilidade é expressa como o número médio de aminoácidos observados por sítio em uma dada região. A região circundada em vermelho indica o trecho analisado neste estudo. Adaptado de Lunt *et al.*, 1996.

Um das vantagens de empregar o gene COI como marcador táxon-específico deriva deste gene codificar uma subunidade protéica e não apresentar íntrons, o que permite o alinhamento das sequências nucleotídicas tendo como base os códons codificadores de aminoácidos (MEIER; ZHANG, 2009). Além disso, a disponibilidade de oligonucleotídeos iniciadores “universais” favorece o acesso a sequências do gene COI considerando-se uma ampla variedade de táxons e análises genéticas mais extensas, com maior número de espécies de diferentes grupos taxonômicos (FOLMER *et al.*, 1994, HEBERT *et al.*, 2003a, GIBSON *et al.*, 2011). Com relação à composição nucleotídica, Min & Hickey (2005) verificaram que o trecho do gene COI denominado região “barcode” é suficientemente informativo para amostrar a composição nucleotídica do genoma mitocondrial.

Dados oriundos da análise comparativa de sequências de DNA têm sido empregados para otimizar a identificação de espécies e sua descrição taxonômica (TAUTZ *et al.*, 2002, TAUTZ *et al.*, 2003, HEBERT *et al.*, 2003a, HEBERT *et al.*, 2003b). Apesar do

conceito de identidade taxonômica via estratégias moleculares denominadas “DNA-based id” não ser uma novidade (SPERLING *et al.*, 1994), Hebert *et al.* (2003a) propuseram o termo “DNA Barcodes” para denominar uma abordagem que utiliza os valores de divergência nucleotídica entre duas sequências para estimar identidade taxonômica de acordo com os intervalos de variação intra e interespecíficos característicos do grupo. Esta abordagem baseia-se na análise de um trecho de aproximadamente 650 pb da região 5’ do gene COI (responsável por codificar a subunidade 1 do complexo Citocromo Oxidase c) do DNA mitocondrial (DNAMt) que apresenta divergência nucleotídica suficiente para separar diferentes espécies em unidades taxonômicas distintas, segundo Hebert *et al.* (2003 a, b). Uma das vantagens do emprego de uma metodologia baseada na análise de DNA está na possibilidade de otimizar o processo de identificação taxonômica para a dimensão em larga-escala, a partir de plataformas operacionais de sequenciamento e bioinformática (HAJIBABAEI *et al.*, 2005).

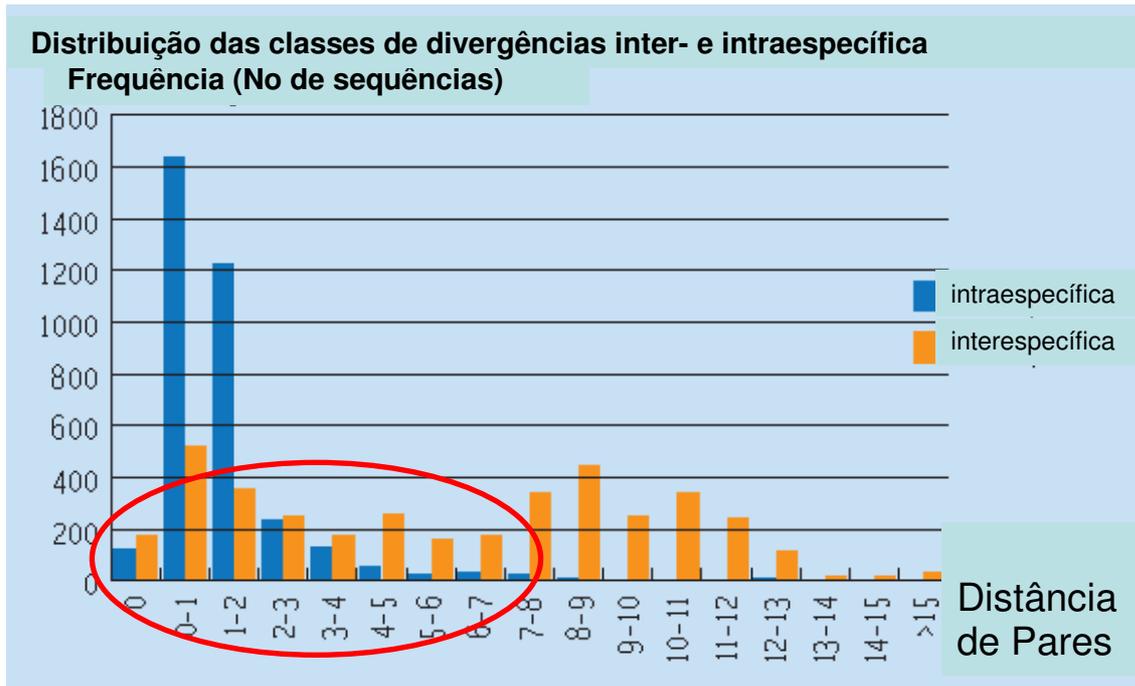
A análise de “DNA Barcode” em animais está focada principalmente na análise de genes do DNAMt devido à abundância desta organela na célula e por apresentar variabilidade genética adequada para realizar análises comparativas em diferentes níveis taxonômicos (HEBERT *et al.*, 2003a). Esta abordagem pressupõe que as sequências oriundas de indivíduos de uma mesma espécie sejam mais similares entre si do que com sequências homólogas de indivíduos de outras espécies, de modo que os valores máximos de divergência nucleotídica obtidos nas comparações intraespecíficas não sejam sobrepostos aos menores valores encontrados nas comparações interespecíficas. Quando as curvas de distribuição dos valores de variação intra e interespecíficos estão claramente definidas, identifica-se um intervalo entre elas denominado “barcoding-gap”. No caso do valor da divergência entre um par de sequências “cair” no intervalo de variação intraespecífica, considera-se que as amostras analisadas pertencem a uma mesma espécie, caso essa divergência extrapole este intervalo, suspeita-se que as amostras sejam de espécies diferentes.

A identificação de espécies em Diptera tem sido realizada com base na análise da região “barcode” propriamente dita, indicada na Figura 2 (WELLS *et al.*, 2001; HARVEY *et al.*, 2003; ZEHNER *et al.*, 2004; SAIGUSA *et al.*, 2005; DESMYTER; GOSSELIN, 2009; MEIKLEJOHN *et al.*, 2009), mas outras regiões também têm sido analisadas para este propósito. Segundo Luo *et al.* (2011), além do gene COI, outras regiões codificadoras de proteínas podem servir como “DNA barcodes” alternativos. A análise da região COI/COII (genes das subunidades I e II da enzima citocromo oxidase c), e dos genes ND5 e rDNA 16S tem contribuído para avaliar o potencial informativo destes marcadores moleculares para

identificação de espécies da família Sarcophagidae (SPERLING *et al.*, 1994, WELLS; SPERLING, 2001; WELLS *et al.*, 2001; ZEHNER *et al.*, 2004; NELSON *et al.*, 2007; WELLS *et al.*, 2007; YING *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2010, GUO *et al.*, 2011). A região 3' do gene COI (também indicada na Figura 2 como “Região de Análise”) caracteriza-se por domínios funcionais que apresentam variação na sequência primária dos aminoácidos em insetos, especialmente nas regiões da alça hidrofílica 4, da  $\alpha$ -hélice transmembrana 12 e da região Carboxi-terminal (LUNT *et al.*, 1996), representando uma região potencialmente informativa para estudos evolutivos, tanto com relação à evolução estrutural quanto ao diagnóstico taxonômico. Ainda segundo Roe & Sperling (2007), a região estritamente denominada de “barcode” não é mais informativa do que qualquer outra região localizada entre os genes COI e COII.

Ainda em relação aos sarcófagídeos, embora caracteres moleculares estejam sendo cada vez mais usados para testar hipóteses filogenéticas (HALL *et al.*, 2009; BAJPAI; TEWARI., 2010; TAN *et al.*, 2010), há estudos utilizando uma nova gama de caracteres morfológicos (GIROUX; WHELLER, 2009; GIROUX *et al.*, 2010), evidenciando que a análise morfológica como fonte de informação taxonômica ainda representa uma estratégia válida e informativa para estudos filogenéticos nesta família.

Limitações do “DNA Barcode” também têm sido apontadas uma vez que deficiências de amostragem influenciam direta e significativamente a correta identificação taxonômica da amostra (MEYER; PAULAY, 2005). Segundo Nirmala *et al.* (2001), a dinâmica de radiação dos caliptrados ocorreu em um período de tempo relativamente curto, restringindo a diferenciação genética e diminuindo o potencial informativo de um único gene como marcador filogenético para reconstrução das relações no nível entre famílias em Calyptratae. Recentemente, Meier; Zhang (2009) analisaram a frequência de intervalos de distância genética (“pairwise distance”) considerando um amplo conjunto de dados comparativos proveniente de 4261 sequências de COI de 1001 espécies de Diptera, e constataram que há uma sobreposição significativa entre os valores de variabilidade intraespecífica e interespecífica (Figura 3). Esta ambiguidade é problemática para identificar espécies com base apenas nas sequências de COI, pois uma distância de aproximadamente 1% a 7% observada entre a sequência de DNA de uma amostra não identificada e a sequência de uma espécie-referência (identificada e registrada no banco de dados) poderia ser tanto devido à variação inter quanto intraespecífica, indicando que o espécime não pode ser definido como pertencente a uma determinada espécie neste caso.



**Figura 3:** Intervalo de classes entre os valores de variabilidade intraespecífica e interespecífica para Diptera. A sobreposição das classes varia de 0,1%-7,6%. Aproximadamente 25% de todas as distâncias observadas se inserem nesta região de sobreposição (Fonte: Adaptado de Meier; Zhang, 2009).

Por outro lado, segundo Meier; Zhang (2009) os dados analisados sugerem que mesmo sem a evidência de um intervalo que separe a variação inter e intraespecífica (“barcoding gap”), a identificação de espécies por este método pode ser bem sucedido, pois as distâncias absolutas não são decisivas, mas sim, a similaridade entre as sequências no alinhamento. Além disso, estudos tem corroborado a utilidade da análise de sequências de DNA na identificação de espécies de Diptera em contextos de entomologia forense (WELLS *et al.*, 2001; HARVEY *et al.*, 2003; ZEHNER *et al.*, 2004; SAIGUSA *et al.*, 2005).

### 1.3 - Conceito de Espécies

A discussão sobre conceito de espécie é uma das temáticas mais fundamentais das Ciências Biológicas, uma vez que a espécie, segundo Wheeler (1999), é a unidade elementar da filogenia, dos ecossistemas e da classificação sistemática, essencial para a biologia comparativa, ocupando uma posição ímpar na fronteira entre os cenários de micro e macroevolução. Por aproximadamente meio século, a questão relativa à delimitação de espécies tem sido confundida com problemas envolvendo o conceito de espécie (MAYDEN, 1997), como determinar o limite e o número de espécies a partir de dados empíricos (BALAKRISHNAN, 2005; de QUEIROZA, 2005; de QUEIROZ, 2005c).

Tradicionalmente, dados morfológicos têm sido usados para tal finalidade (conceito tipológico de espécie), porém, dados oriundos da análise de marcadores moleculares (predominantemente sequências de DNAm) tem sido usados há algumas décadas para auxiliar a investigação taxonômica e a sistemática filogenética (Wheeler, 2005), e mais recentemente tem contribuído em estudos de caracterização de espécies em larga-escala (intenção questionada por alguns, como Wheeler, 2005), a fim de testar e corroborar a identificação obtida pela análise morfológica e evidenciar conflitos (PUORTO *et al.*, 2001; SERB *et al.*, 2001; QI-LI *et al.*, 2011). Há grupos animais em que a identificação morfológica não consegue superar conflitos envolvendo complexos de espécies e espécies crípticas, e outras análises são necessárias para tentar elucidar identificações ambíguas, tanto moleculares quanto filogeográficas quando uma análise da variabilidade genética de populações poder ser realizada. A delimitação das espécies com bases em sequências de DNA, orientada por um limiar fixo como 2-3% de divergência nucleotídica (HEBERT *et al.*, 2003a) não é uma estratégia informativa. Uma análise preliminar do nível de variação intraespecífica do gene COI no grupo focal tem sido sugerida para identificação desse limiar (WILL; RUBINOFF, 2004; COGNATO, 2006; MEIER; ZHANG, 2009).

É questionável propor que exista uma porcentagem de divergência genética que seja informativa para identificar ou reconhecer novas espécies (WILL & RUBINOFF, 2004). Devido à base fenética das análises de similaridade entre pares de sequências nucleotídicas, os modelos de variação intra e interespecífica não são considerados hipóteses filogenéticas, portanto não promoveriam o reconhecimento entre caracteres homoplásticos e homólogos (COGNATO, 2006). No entanto, outros estudos demonstram que a análise de marcadores moleculares contribui com as análises filogenéticas promovendo topologias bem sustentadas que recuperam grupamentos monofiléticos (HARVEY *et al.*, 2003; ZEHNER *et al.*, 2004; WELLS *et al.*, 2004; SAIGUSA *et al.*, 2005; HARVEY *et al.*, 2008; DESMYTER & GOSSELIN, 2009; MEIKLEJOHN *et al.*, 2009). Regiões específicas do gene COI têm se mostrado eficientes na diferenciação genética entre muitas espécies de insetos e vários trechos têm sido informativos para este fim, desde regiões curtas com 278 pb até trechos que incluem toda a extensão do gene (WELLS *et al.*, 2004; HARVEY *et al.*, 2008; DESMYTER & GOSSELIN, 2009; MEIKLEJOHN *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2011).

Apesar das diferenças óbvias entre os conceitos de espécies, eles exibem uma unidade conceitual subjacente, que as espécies são linhagens metapopulacionais evoluindo separadamente, o qual provê a base para um conceito de espécie unificado. Um dos benefícios

mais significantes de um conceito de espécie unificado é que ele permite aos biólogos abordar o problema da delimitação de espécies de forma mais direta e objetiva (de QUEIROZ, 1998).

Devido ao fato da construção das relações entre as espécies basear-se na porcentagem de similaridade entre pares de sequências nucleotídicas alinhadas, medida pela identidade ou não-identidade nucleotídica em cada posição do alinhamento da região-alvo, alguns autores argumentam que os modelos de distância genética normalmente utilizados nestas análises (“DNA barcodes”, por exemplo) não constituem hipóteses filogenéticas, (COGNATO, 2006; WHEELER, 2005). Em uma revisão acerca da porcentagem de divergência no gene COI entre insetos, Cognato (2006), revelou que tais limiares foram falhos em 45% das vezes quando utilizados para diagnóstico de espécies com base na análise das variações intra e interespecífica.

**Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi caracterizar estrutural e evolutivamente a região 3' do gene COI de cinco espécies da família Sarcophagidae e verificar a utilidade destas sequências para a identificação taxonômica destas espécies.

**Objetivos Específicos**

Obter material biológico para as análises de variabilidade intra- e interespecífica com a correta identificação morfológica;

Padronizar o procedimento de extração de DNA para as espécies da família Sarcophagidae;

Padronizar o processo de amplificação por PCR de regiões gênicas do DNAm (gene COI);

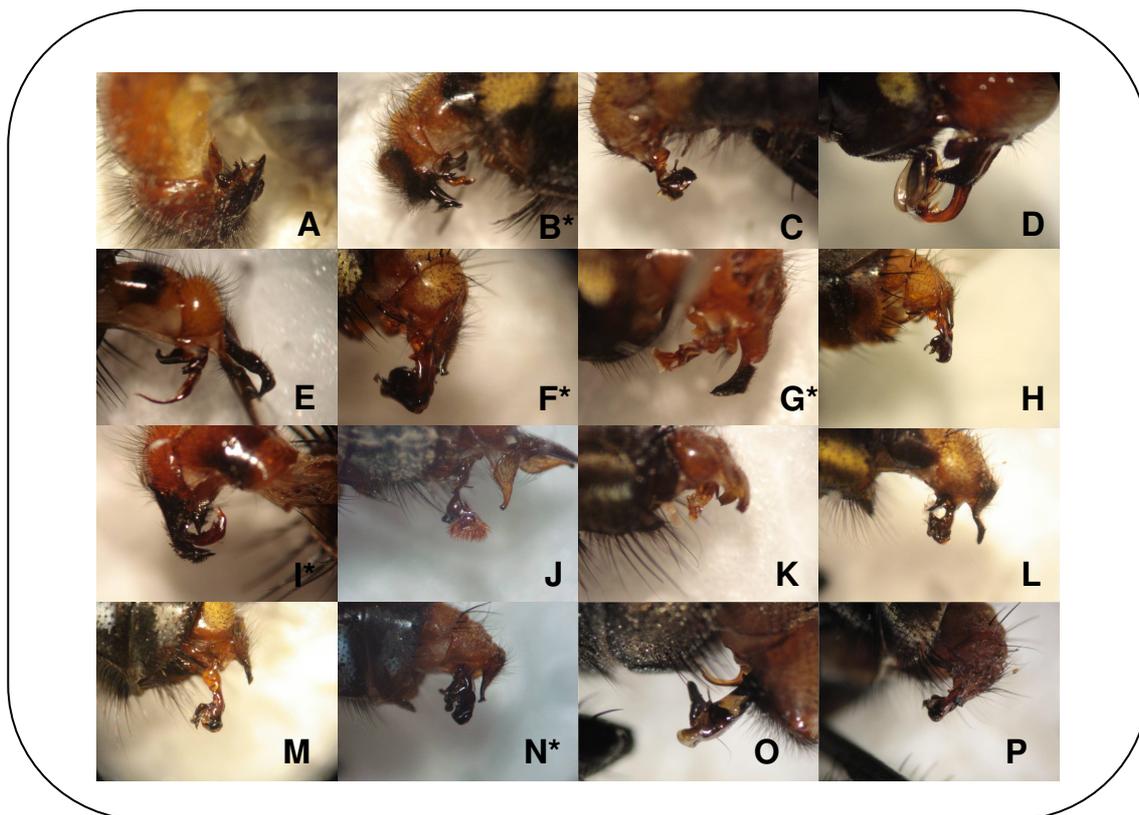
Proceder as análises estruturais e comparativas das sequências obtidas para cada espécie;

Mensurar a variação genética intraespecífica e interespecífica através das análises das divergências nucleotídicas par-a-par.

## **2 - Materiais e Métodos**

### **2.1 - Material Biológico**

Os espécimes analisados foram coletados em fragmentos florestais do *campus* da UFSCar – Sorocaba, em ambiente urbano de Sorocaba e na gleba de cerrado “Pé-de-Gigante”, no Parque Estadual do Vassununga (21°36’ S a 21°44’ S e 47°34’ W a 47°41’ W em Santa Rita do Passa-Quatro, SP), utilizando-se como isca material em decomposição (peixe). Foram feitas coletas durante o período de outubro de 2009 a janeiro de 2011. Após a coleta, os espécimes machos foram analisados em estereomicroscópio para obter o registro fotográfico da terminália exposta, conforme exemplos ilustrados na Figura 4. As imagens digitalizadas foram enviadas para a Profa Dra Cátia Antunes de Mello Patiu (MNRJ/UFRJ) para identificação taxonômica. As terminálias foram armazenadas em etanol glicerinado (9:1) compondo o acervo de material testemunho (*voucher*) no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba e o tórax foi acondicionado em etanol absoluto a –20°C ou em via seca a –80°C para análise posterior em procedimentos de biologia molecular.



**Figura 4:** Imagens dos edeagos de espécies de Sarcophagidae coletadas neste estudo. A análise da morfologia destas estruturas permite a identificação taxonômica da espécie. A- *Peckia (Peckia) pexata*; B- *Peckia (Euboettcheria) collusor*; C- *Oxysarcodexia thornax*; D- *Peckia (Pattonella) intermutans*; E- *Peckia (Euboettcheria) australis*; F- *Oxysarcodexia admixta*; G- *Peckia (Squamatodes) ingens*; H- *Oxysarcodexia fluminensis*; I- *Peckia (Euboettcheria) anguilla*; J- *Titanogrypa (Sarconeiva) fimbriata*; K- *Sarcodexia lambens*; L- *Oxysarcodexia culmiforceps*; M- *Oxysarcodexia parva*; N- *Oxysarcodexia paulistanensis*; O- *Ravinia belforti*; P- *Oxysarcodexia diana*. \* Espécies para as quais foram analisadas as sequências nucleotídicas. Nem todas as espécies identificadas estão ilustradas.

## 2.2 - Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o tórax dos indivíduos identificados. Para este procedimento o método de extração utilizado foi o descrito nos protocolo de isolamento de DNA do kit Invisorb® Spin Tissue Mini (Invitex).

## 2.3 - Amplificação da Região COI

Neste projeto, uma região de 850 pb do gene COI do DNAm foi amplificada via PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) descritos na Tabela 1, TL2-N-3014 e C1-J-2195.

Visando otimizar a reação de PCR, foram testados diferentes parâmetros, como temperatura de hibridação dos “primers” e concentração dos reagentes, principalmente “primers” e Cloreto de Magnésio. Inicialmente as condições da reação de amplificação foram 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de “primers”, 1,25 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas) e 2 µL de DNA eluído do processo de extração, de modo que as condições ideais alcançadas pelo estudo foram: 0,05 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de “primers”, 1,25 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas) e 2 µL de DNA eluído do processo de extração.

Em relação aos ciclos de temperatura do termociclador, o programa inicial apresentou uma temperatura de hibridação pouco estridente, a fim de favorecer ligação dos “primers”, tendo o programa uma etapa inicial de desnaturação de 94° C por 5 minutos, sucedido de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, hibridação de “primers” a 42° C por 1 minuto e extensão a 60° C por 2 minutos, além de uma etapa final de extensão a 60° C por 10 minutos. Após, testar as temperaturas de hibridação, o programa final diferiu das condições iniciais apenas pela temperatura de hibridação de “primers” (= 54°C).

Os produtos amplificados foram corados com GelRed (Biotium) e submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%) para visualização em transiluminador de U.V. Os géis foram fotografados e digitalizados em equipamento fotográfico EDAS.

**Tabela 1:** Descrição das sequências dos “primers” inicialmente utilizados para a amplificação da região-alvo

Região	“primers”	Sequência 5' -> 3'	Referência
COI	C1-J-2195	TTGATTTTTTGGTCACCCTGAAGT	Simon <i>et al.</i> , 1994
	TL2-N-3014	TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA	Simon <i>et al.</i> , 1994

#### 2.4 - Análise comparativa entre “primers universais” e sequências homólogas

Foram realizadas análises comparativas entre sequências nucleotídicas homólogas às regiões de hibridação de “primers universais” frequentemente utilizados em estudos envolvendo os genes COI e COII em insetos. Apesar desta análise incluir “primers” que não foram utilizados na amplificação da região-alvo que seguiu para o sequenciamento, consideramos importante manter a descrição deste processo. As análises comparativas incluíram o alinhamento de trechos específicos (homólogos aos “primers”) das sequências completas do genoma mitocondrial de espécies da família Calliphoridae (*Cochliomyia*

*hominivorax*, *Chrysomya putoria* e *Lucilia sericata*), pertencentes à seção Calyptratae, da qual faz parte a família Sarcophagidae, além da sequência de *Drosophila yakuba* (família Drosophilidae), cujo genoma foi usado como referência para a descrição de “primers” universais associados ao genoma mitocondrial de insetos em Simon *et al.*, 1994. O alinhamentos foram realizados com auxílio do programa Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1997; LARKIN *et al.*, 2007) e as sequências foram selecionadas do banco de dados GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## 2.5 - Purificação do Produto de PCR:

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se duas abordagens diferentes: purificação por Exonuclease I/ Shrimp Alkaline Phosphatase – ExoSap (GE Health Care) e purificação por colunas utilizando o Invisorb® Fragment CleanUp PCR Purification (INVITEK).

A enzima ExoSap-IT® (GE Health Care) foi diluída na proporção de 1:4, e foram aplicados 2 µL da enzima em 20 µL de reação de PCR. A programação do termociclador para purificação foi de 37°C por 40 minutos, seguida de uma etapa de 80°C por 15 minutos.

Os procedimentos realizados para purificação em coluna foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante para purificar tanto os produtos de PCR diretamente da reação quanto a partir de remoção de bandas com produto amplificado do gel de agarose. O primeiro passo para a purificação a partir da reação de PCR consistia em adicionar 250 µL de tampão de ligação a reação de PCR e misturar por agitação. Em seguida, transferir a amostra para a coluna e centrifugar por 3 minutos a 12000 rpm e, em seguida, inserir a coluna com DNA em um microtubo e adicionar 10 µL de tampão de eluição, incubar por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a 10000 rpm. Para amostras purificadas a partir de bandas retiradas do gel de agarose, o procedimento baseou-se no recorte da banda referente ao fragmento de interesse do gel de agarose e a adição de 500 µL de solução de solubilização. Em seguida, incubou-se a solução em 50°C por 10 minutos até o gel de agarose estar completamente dissolvido e foram adicionados 250 µL de “Binding Enhancer”. Cerca de 800 µL da solução foram aplicados na coluna para aderência do DNA. Após centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem e centrifugados por 30 segundos a 10000 rpm. O etanol residual do tampão de lavagem foi removido por uma centrifugação extra a velocidade máxima por 4 minutos. A coluna foi transferida para um outro tubo e o DNA foi eluído da coluna adicionando-se 20 µL de tampão de eluição e

incubando-se a solução a temperatura ambiente por 5 minutos. Por fim, a solução foi centrifugada por 1 minutos a 12000 rpm para coleta do DNA em solução.

## **2.6 - Sequenciamento de DNA:**

Os produtos de PCR purificados foram quantificados em gel de agarose por meio da comparação com marcador de tamanho molecular Low DNA Mass (Invitrogen). Aproximadamente 25 ng de produto de DNA purificado foram enviados para o Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp (CBMEG) e para Empresa Helixxa Genomic Service Provider (Campinas, SP) para seqüenciamento automático.

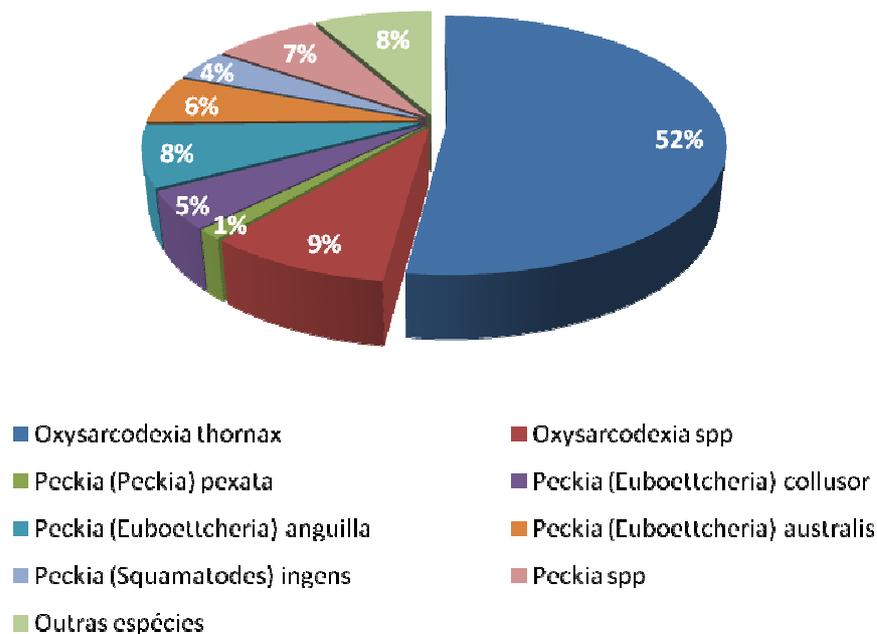
## **2.7 - Análises dos dados:**

Os eletroferogramas referentes às seqüências nucleotídicas de cada amostra foram analisados com o programa BIOEDIT (HALL, 1999) e ChromasPro (Technelysium), para edição e confirmação das seqüências obtidas e estas foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW2 (THOMPSON *et al.*, 1997; LARKIN *et al.*, 2007). Cada seqüência foi submetida ao Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA; disponível on-line em [www.ncbi.nlm.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.gov/blast/)) para verificar a similaridade com as seqüências do banco de dados. As seqüências da região COI do genoma mitocondrial foram traduzidas utilizando-se aplicativos do programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Análises de diversidade intra e interespecíficas e similaridade das seqüências foram realizadas utilizando aplicativos do programa MEGA (Tamura *et al.*, 2011). Para as análises filogenéticas foram inferidas topologias (árvores consenso após análise de bootstrap – 5000 replicações) obtidas utilizando diferentes métodos: 1) o método de Neighbor-Joining a partir do modelo de distância genética baseada no algoritmo Kimura 2P, conforme prática adotada nas análises de “DNA barcodes”; 2) o método de Máxima Verossimilhança a partir do modelo de substituição nucleotídica GTR + G, indicado como melhor modelo para descrever o padrão de distribuição calculado a partir da análise dos dados para esta abordagem e 3) o método de Máxima Verossimilhança utilizando a análise das seqüências de aminoácidos a partir do modelo GRM. Todas estas análises foram realizadas utilizando-se os aplicativos do programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Análises dos níveis de variabilidade genética intra e interespecíficos também foram realizados pelos aplicativos inserido no pacote MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

### 3 - Resultados

#### 3.1 - Espécies Coletadas

Durante este estudo foram coletados 234 indivíduos, abrangendo 22 espécies da família Sarcophagidae, distribuídos em oito gêneros. Desta amostragem, a espécie *Oxysarcodexia thornax* foi a mais abundante (aproximadamente 52%), sendo o restante distribuído entre as espécies *Bercae africa*, *Blaesoxipha (Acanthodotheca) aix*, *Oxysarcodexia admixta*, *O. culmiforceps*, *O. diana*, *O. parva*, *O. fluminensis*, *O. paulistanensis*, *Peckia chrysosotoma*, *Peckia (Peckia) pexata*, *Peckia (Euboettcheria) australis*, *P. (E.) anguilla*, *P. (E.) collusor*, *P. (Pattonella) intermutans*, *P. (P.) resona*, *P. (Squamatodes) ingens*, *Sarcodexia lambens*, *Ravinia advena*, *Ravinia belforti*, *Sarcophaga (Lipoptilocnema) crispula* e *Titanogrypa (Sarconeiva) fimbriata*. (Figura 5).

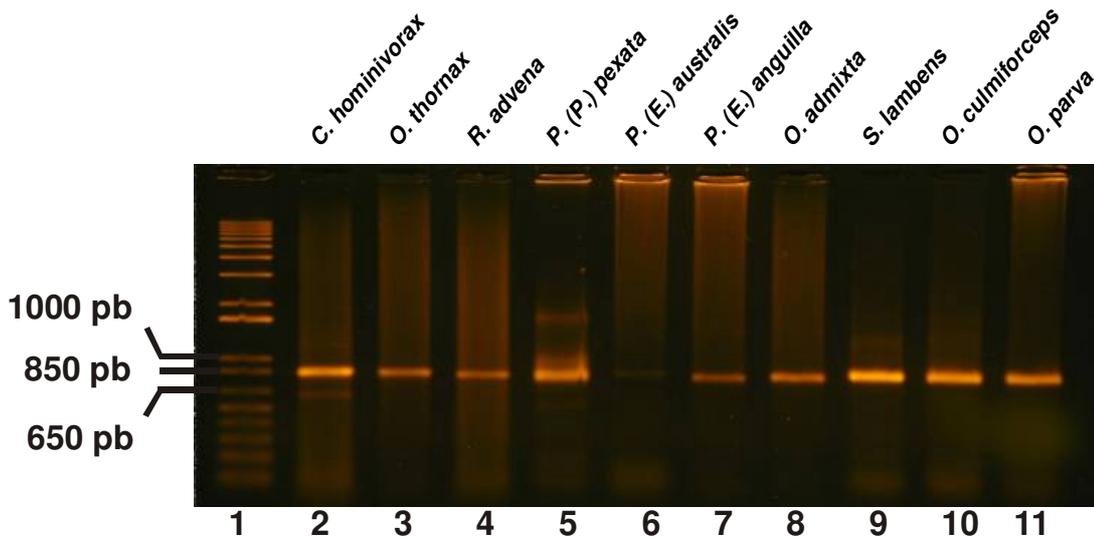


**Figura 5:** Gráfico representativo da frequência relativa da amostragem de diferentes espécies de sarcófagos coletadas neste estudo. As espécies com frequência de 1 a 2% foram incluídas na classe “outras espécies” (8%).

### 3.2 – Amplificação da Região COI

Os resultados da amplificação de uma região de 850 pb do gene COI utilizando-se os “primers” L2-N-3014 e C1-J-2195 estão apresentados na Figura 6.

A região COI foi amplificada com sucesso para as espécies apresentadas na Figura 6, e também para outras espécies não incluídas na figura, *Blaesoxipha (Acanthodotheca) aix*, *Oxysarcodexia fluminensis*, *O. paulistanensis*, *P. (Squamatodes) ingens* e *Titanogrypa (Sarconeiva) fimbriata*.



**Figura 6:** Amplificação de ~850 pb região COI de nove espécies de sarcophagídeos visualizada em eletroforese em gel de agarose (1%). A coluna 1 indica o marcador de tamanho molecular 1kb DNA Ladder plus. A coluna 2 refere-se a uma amostra de *Cochliomyia hominivorax* (Calliphoridae) utilizada como controle positivo da reação.

### 3.3 - Análises de “primers” táxon-específicos

Com base nas análises comparativas envolvendo sítios de hibridação de “primers”, diversas sequências foram analisadas e em apenas uma região (sítio do primer TY-J-1460) foram identificadas divergências que poderiam sugerir um “novo primer” táxon-específico (Figura 7) Este novo “primer” traz uma modificação com relação ao “primer” original, referente a uma substituição de A para G na 5<sup>a</sup> posição e de C para T na 11<sup>a</sup> posição considerando-se a orientação 5’-> 3’ das sequências indicadas na figura. Este primer táxon-específico não foi utilizado no seqüenciamento direto de produtos de PCR (região 3’) por referir-se à região 5’ do gene COI, mas esta análise fica aqui apresentada como referência para estudos futuros.

Primer Original*: 5' - TACAATCTATCGCCTAAACTTCAGCC - 3'	
<i>Drosophila yakuba</i>	TACAATCTATCGCCTAAACTTCAGCC
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	TACAGTCTAT <sup>T</sup> GCCTAAACTTCAGCC
<i>Chrysomya putoria</i>	TACAGTCTAT <sup>T</sup> GCCTAAACTTCAGCC
<i>Lucilia sericata</i>	TACAGTCTAT <sup>T</sup> GCCTAAACTTCAGCC
<b>Novo primer</b> (TY-J-1460C)	TACAGTCTAT <sup>T</sup> GCCTAAACTTCAGCC

**Figura 7:** Alinhamento das sequências de DNAm<sup>t</sup> homólogas ao “primer” TY-J-1460 de quatro diferentes espécies de dípteros, cuja sequência está descrita em Simon *et al*, 1994 com base no genoma de *Drosophila yakuba*. Os nucleotídeos em vermelho representam as alterações realizadas na sequência do novo “primer” testado neste trabalho.

### 3.4 - Análises estruturais e evolutivas da região 3' do gene COI

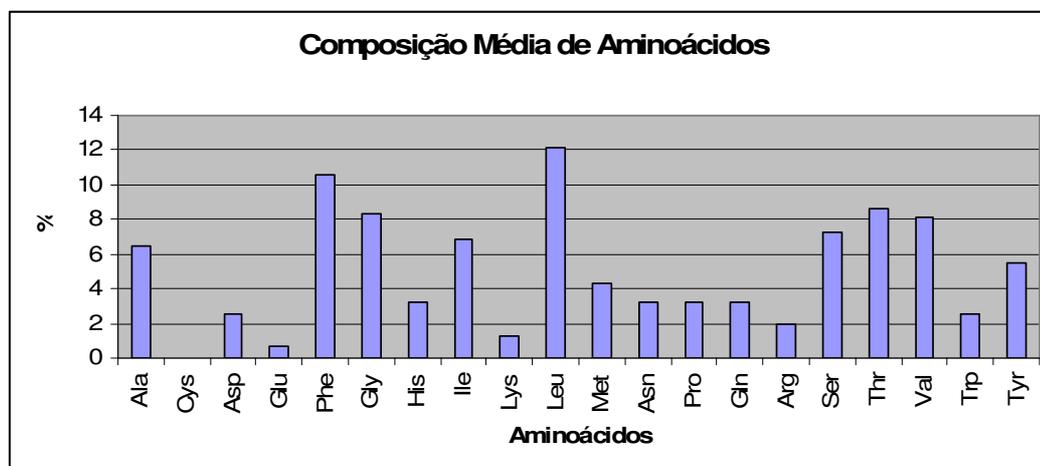
Neste projeto, 850 pb da região 3' do gene COI do DNAm<sup>t</sup> foi eficientemente amplificada para 16 espécies de Sarcófagídeos. Apesar deste cenário inicial, este estudo conduziu a análise de uma região de 470pb de 5 diferentes espécies, devido a dificuldades no processo de sequenciamento direto dos produtos de PCR a partir de um dos “primers” utilizados e dificuldades na padronização da reação de PCR para algumas amostras (principal responsável pelos artefatos presentes no sequenciamento direto). As espécies que tiveram a região-alvo (470 pb) do gene COI sequenciadas foram: *Oxysarcodexia admixta*, *O. paulistanensis*, *P. (Euboettcheria) collusor*, *P. (Euboettcheria) anguilla* e *P. (Squamatodes) ingens*. Além destas espécies foram utilizadas sequências oriundas do GenBank das espécies *Peckia (Pattonella) intermutans* (GQ 409345), *Oxysarcodexia ventricosa* (GQ 223321), *Sarcophaga carnaria* (GQ 223342) e como grupo externo as espécies *Haematobia irritans* (NC\_007102) e *Cochliomyia hominivorax* (NC\_002660).

Análises comparativas da região de 470 pb foram conduzidas para 8 espécies de Sarcophagidae, incluindo duas espécies como grupo externo, *Haematobia irritans* (família Muscidae) e *Cochliomyia hominivorax* (família Calliphoridae). As análises incluíram a comparação da composição nucleotídica e de aminoácidos (Figura 8) e variações das sequências nucleotídicas e de aminoácidos (Figuras 9 e 10). Conforme descrito para o DNAm<sup>t</sup> de insetos, a composição de nucleotídeos mostrou um elevado conteúdo de As e Ts (Tabela 2). Nenhum evento do tipo “indel” foi observado no alinhamento (Figura 10).

**Tabela 2:** Composição nucleotídica da região-alvo (em %)

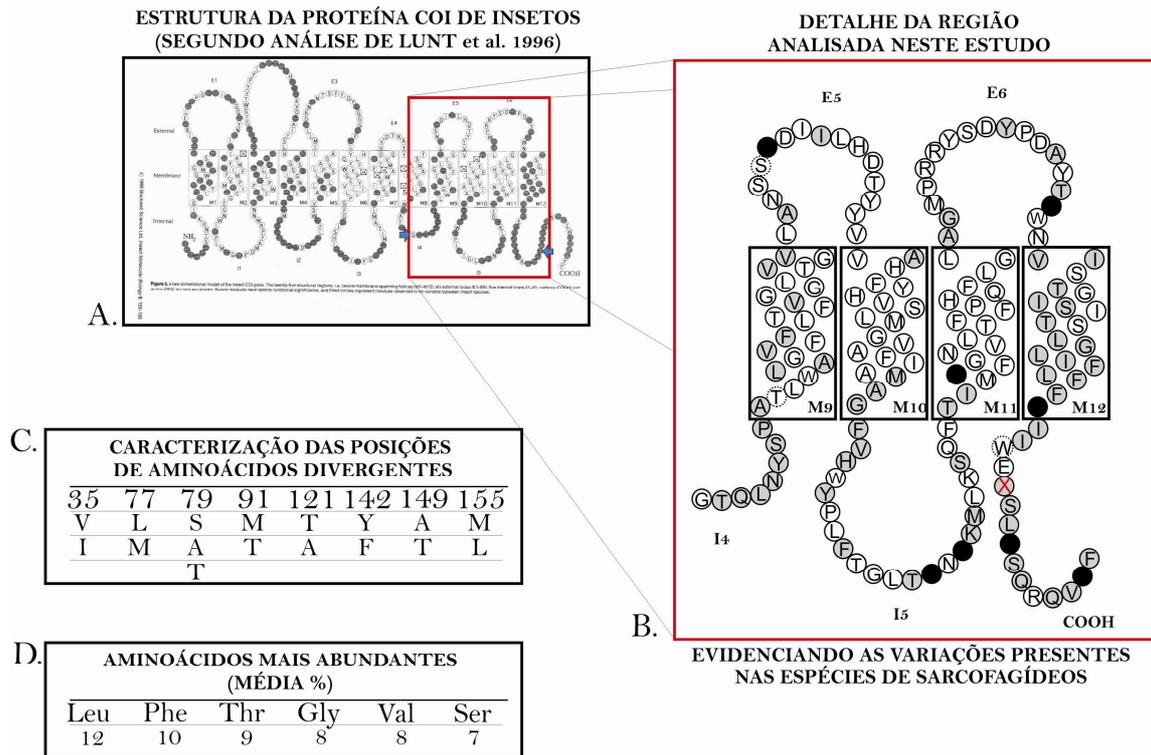
Espécies	T	C	A	G	Total (PB)
<i>O admixta 89</i>	39.1	17.2	29.4	14.3	470.0
<i>O admixta 239</i>	39.1	17.2	29.4	14.3	470.0
<i>O admixta 236</i>	38.9	17.4	29.4	14.3	470.0
<i>O admixta 253</i>	38.7	17.7	29.6	14.0	470.0
<i>O paulistanensis 176</i>	38.1	18.3	29.6	14.0	470.0
<i>O paulistanensis 261</i>	38.3	18.3	29.8	13.6	470.0
<i>O ventricosa</i>	39.6	17.2	29.4	13.8	470.0
<i>P intermutans</i>	39.6	16.4	30.4	13.6	470.0
<i>P ingens 209</i>	38.9	17.9	29.4	13.8	470.0
<i>P anguilla 224</i>	38.3	16.8	31.5	13.4	470.0
<i>P anguilla 94</i>	38.5	16.8	30.9	13.8	470.0
<i>S carnaria</i>	38.7	16.8	30.6	13.8	470.0
<i>P collusor 134</i>	36.2	18.9	31.3	13.6	470.0
<i>P collusor 133</i>	36.4	18.7	31.3	13.6	470.0
<i>P collusor 132</i>	36.2	18.7	31.5	13.6	470.0
<i>H irritans</i>	41.9	14.0	30.2	13.8	470.0
<i>C hominivorax</i>	40.9	15.7	29.4	14.0	470.0
<b>Média (%)</b>	<b>38.7</b>	<b>17.3</b>	<b>30.2</b>	<b>13.8</b>	<b>470.0</b>

A análise das sequências de aminoácidos previstas para esta região não revelaram nenhum códon de terminação. As sequências de aminoácidos totalizaram 156 posições (Figura 8).



**Figura 8:** Composição média dos aminoácidos das sequências da região COI das espécies analisadas. Os valores têm como base um total de 156 aminoácidos.

A partir destes dados foram realizadas análises estruturais e comparativas das sequências de aminoácidos da região COI (Figura 9) a fim identificar os sítios conservados e variáveis dentre as sequências dos sarcófagídeos e comparar esse padrão com o descrito para insetos por Lunt *et al*, 1996. Dentre os 156 sítios analisados, apenas oito variaram entre os sarcófagídeos (decorrentes de substituições não-sinônimas nas sequências nucleotídicas codificadoras). Os aminoácidos envolvidos neste tipo de variação estão apresentados na Figura 9 C. Comparando com o modelo descrito por Lunt *et al*, 1996, foram observadas 3 inserções e 1 deleção nas sequências dos sarcófagídeos associadas com as estruturas M9, E5 e terminal carboxil (as inserções de T, S e W, respectivamente). A deleção está indicada com um X na figura. Os seis aminoácidos mais abundantes neste trecho da proteína estão indicados em 9 D.



**Figura 9:** Análises estruturais e comparativas da sequência de aminoácidos da região COI. A. Modelo apresentado por Lunt *et al.*, 1996 sobre a estrutura da proteína COI com a identificação de posições conservadas (fundo branco) e variáveis (fundo escuro) em insetos. B. Detalhe do modelo apresentado em A evidenciando os dados das espécies de sarcófagídeos: os círculos brancos representam as posições conservadas das sequências de aminoácidos de insetos, incluindo Sarcophagidae; círculos em cinza representam posições variáveis nas sequências de aminoácidos em insetos, mas conservadas nas espécies de sarcófagídeos; círculos em preto representam posições variáveis nas sequências de COI de sarcófagídeos e insetos em geral. Os círculos pontilhados representam posições presentes nas sequências dos sarcófagídeos, mas ausentes do modelo. A posição indicada com X indica a presença de um aminoácido a menos nas sequências das espécies de Sarcophagidae em comparação com o modelo. As alças internas (I4, I5) e externas (E5, E6), os trechos intermembrana (M9 à M12) e a extremidade carboxila (COOH) estão indicados conforme modelo da estrutura da proteína de Lunt *et al.*, 1996. C. Identificação das divergências encontradas nas sequências de aminoácidos das espécies de sarcófagídeos analisadas. D. Identificação dos aminoácidos mais abundantes da região analisada em Sarcophagidae.

```

1111 1111111111 1111111111 1122222222 2222222222 2222223333 3333333333 3333333333 3344444444 4444444444 4
11223334 4455666677 7888990000 1122223444 5556678889 9900111122 2333344456 7789990000 0111123334 4555667788 9900011222 2234444566 6
3605140190 2814036935 8478092358 5703692147 0692570392 5817016938 9456703424 0281470367 9235813692 8147132817 0602327035 6921257023 8
O_admixta TCTTTATTTT ATATCAAATG AACTATTGAT CTTTTTTTCC CTTTATCTAA TTTTACCGTA TTAGAAATTC TTATCCACTT AGCTCAATTT TTTTATTAAT TTCTCTCTCA TTCCTGTAA C
O_admixta .....GC.....T.....A.....C.....
O_admixta .....C.....C.....T.....A.....C.....
O_paulista .T.CC...C. ....T...A T.T..A...C .....C.TT TC..G.TCT. CCCCC..A.. .....T .C.C...TC. .ATAGT.CA. ...C..... C..CT.... ..TT..C... T
O_paulista .T.CC...C. ....T...A T.T..A...C .....C.TT TC..G.TCT. CCCCC..A.. .....T .C.C...TC. .ATATT.CA. ...C..... C..CT.... ..TT.AC... T
O_ventrico .A...C... ..CTTT..A T.T.....T. ....C..T. T..A.CT..T CA.C.TTA.. .CTC...C.T ..T.TT..C. .A.ATG.C.C ..C..... A..AT.T... CCTT..C.G. .
P_intermut AA...A..C T.....CA TT...AAAT. .A..A...T. TA...T... .C..TTTT.T ..GCTG...T ..TC.T.TC. .ATAA...A. A..CG.A... A..A...C.T ..TT.A..TC.
P_ingens ....CTA..C T.....T..A TTT..AAATC .A...C.... .AA...T... ..CCCTTT... ..C.GGCCT ..TC.T..C. .T..A.T... A..CGAAT.A A.TAT..CTT ..T.....T.
P_anguilla AT..C.A..C GCC...T..A ..ACGAAAT. .A.CA..CTT TA...T... .A.CTTTT.. A..C.....T ..TC.A.TC. .A..A.... AC.C.A... A...T.TCTT ..TT.A...C.
P_anguilla AT..C.A..C TCC...T..A ..ACGAAAT. .A.CA..CTT TA...T... .A.CTTTT.. A..C.....T ..TC.A.TC. .A..A.... AC.C.A... A...T.TCTT ..TT.A...C.
S_carnaria ATC....C.. .C.....A TTT..A.ATC TA..A...TT T.AA..T... .A..CTTT.. A..C.....T .CTC.GGTCC CA..A..C... ..CG.A..A A.TATCTCTT ..TT..ACCT.
P_collusor AA..ATC.CC TC.....A ..T..AAATC .AC.A...TT .....T... CA.CT..AC. A..C.....T C.TCTT..CC TA..T..CGC ....GAA.T. ACTA..TC.T .CTAC.C...
P_collusor AA..ATC.CC TC.....A ..T..AAAT. .AC.A...TT .....T... CA.CT..AC. A..C.....T C.TCTT..CC TA..T..CGC ....GAA.T. ACTA..TC.T .CTAC.C...
P_collusor AA..ATC.CC .C.....A ..T..AAAT. .AC.A...TT .....T... CA.CT..AC. A..C.....T C.TCTT..CC TA..T..CGC ....GAA.T. ACTA..TC.T .CTAC.C...

```

**Figura 10:** Alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas da região COI de espécies de Sarcophagidae evidenciando as posições divergentes neste grupo. As posições nucleotídicas estão indicadas em orientação de leitura vertical acima do alinhamento. Os nomes de algumas espécies estão abreviados.

### **3.5 - Análise de Similaridade**

A análise de similaridade com base no número de substituições nucleotídicas por sítio das sequências é mostrada na tabela 4. A divergência interespecífica variou de 0,006 – 0,151 e a intraespecífica de 0 – 0,01. As sequências analisadas apresentaram 325 sítios conservados (69,1%). A razão referente à taxa de transição (substituição nucleotídica do tipo pirimidina por pirimidina ou purina por purina) em relação à transversão (substituição nucleotídica do tipo purina por pirimidina, ou vice-versa) foi de 1.54. Com relação às divergências nucleotídicas identificadas, 74.8% referiam-se a substituições relacionadas à terceira posição do códon.

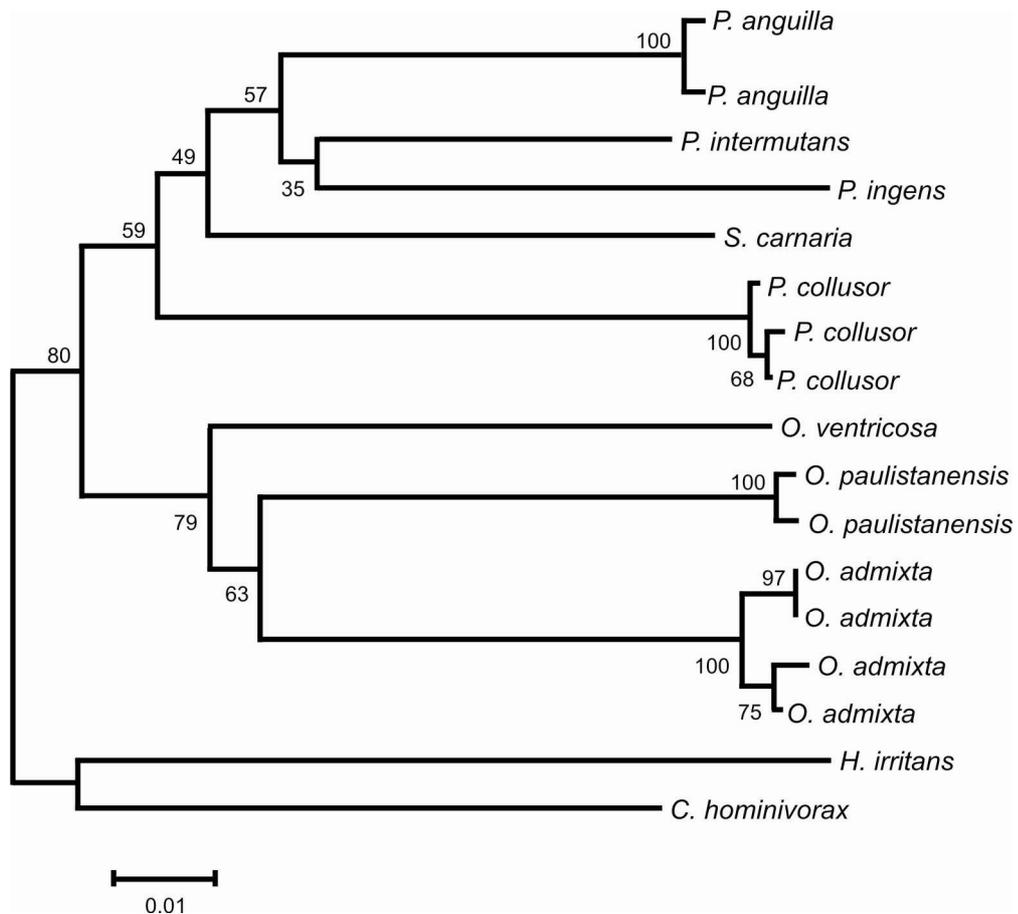
**Tabela 3:** Estimativa de divergência nucleotídica entre as sequências (Kimura 2P).

<b>Espécies</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
(1) <i>O. admixta 1</i>																	
(2) <i>O. admixta 2</i>	0																
(3) <i>O. admixta 3</i>	0.01	0.01															
(4) <i>O. admixta 4</i>	0.01	0.01	0.004														
(5) <i>O. paulistanensis 1</i>	0.091	0.091	0.093	0.089													
(6) <i>O. paulistanensis 2</i>	0.093	0.093	0.095	0.091	0.004												
(7) <i>O. ventricosa</i>	0.101	0.101	0.099	0.094	0.104	0.103											
(8) <i>P. intermutans</i>	0.113	0.113	0.111	0.111	0.117	0.115	0.119										
(9) <i>P. ingens</i>	0.118	0.118	0.122	0.118	0.134	0.136	0.127	0.078									
(10) <i>P. anguilla 1</i>	0.119	0.119	0.121	0.117	0.124	0.122	0.126	0.072	0.091								
(11) <i>P. anguilla 2</i>	0.126	0.126	0.129	0.124	0.131	0.129	0.134	0.072	0.091	0.006							
(12) <i>S. carnaria</i>	0.131	0.131	0.133	0.133	0.119	0.122	0.123	0.091	0.098	0.089	0.091						
(13) <i>P. collusor 1</i>	0.128	0.128	0.125	0.121	0.128	0.128	0.114	0.106	0.112	0.1	0.102	0.102					
(14) <i>P. collusor 2</i>	0.125	0.125	0.123	0.119	0.13	0.13	0.112	0.104	0.114	0.097	0.1	0.104	0.002				
(15) <i>P. collusor 3</i>	0.123	0.123	0.121	0.116	0.128	0.128	0.109	0.107	0.116	0.1	0.102	0.101	0.004	0.002			
(16) <i>H. irritans</i>	0.145	0.145	0.148	0.148	0.145	0.144	0.142	0.147	0.151	0.136	0.144	0.133	0.147	0.145	0.142		
(17) <i>C. hominivorax</i>	0.143	0.143	0.145	0.145	0.123	0.123	0.124	0.098	0.124	0.132	0.14	0.124	0.141	0.138	0.136	0.124	

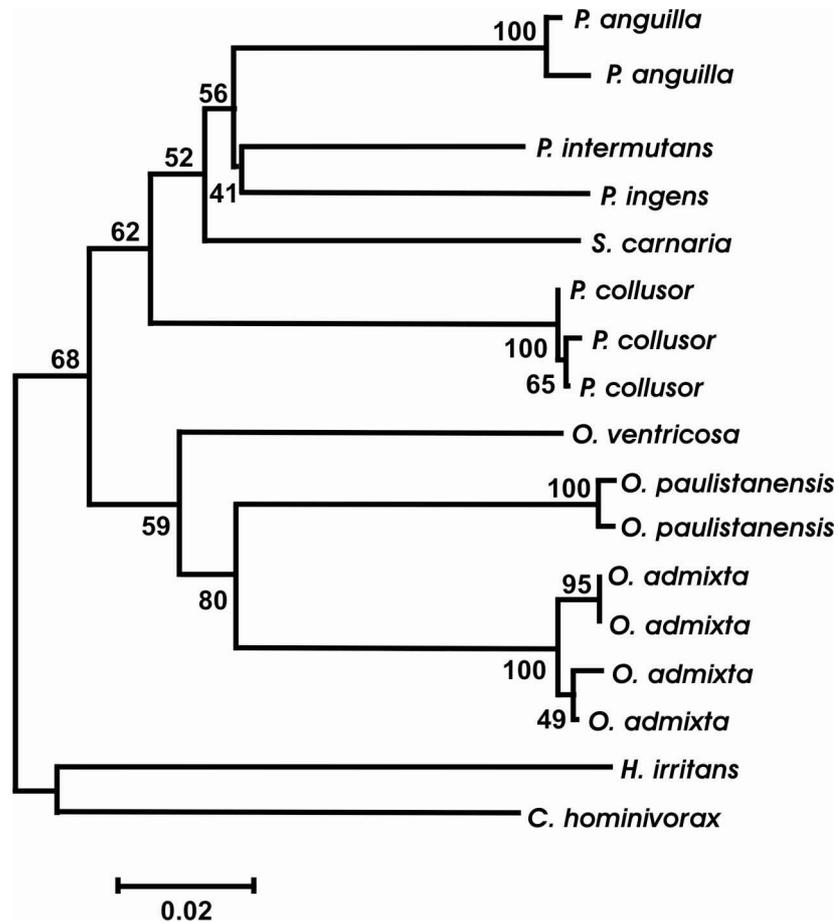
As análises foram conduzidas envolvendo 17 sequências com um total de 470 nucleotídeos. Os números entre parênteses na coluna das espécies correspondem à respectiva numeração descrita na tabela.

### 3.6 Análises Filogenética e Taxonômica

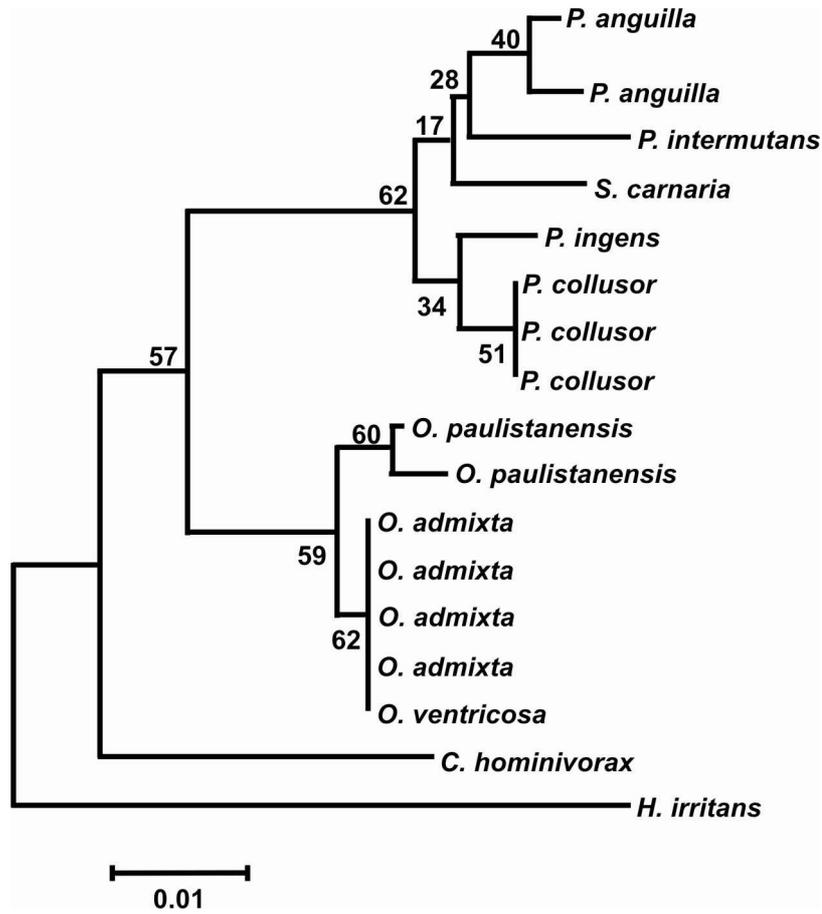
As topologias geradas com os diferentes métodos de inferência filogenética apresentam a distribuição das espécies e dos gêneros em agrupamentos monofiléticos (Figuras 11, 12 e 13), exceto com relação ao gênero *Sarcophaga* que foi incluída no agrupamento das espécies do gênero *Peckia*.



**Figura 11:** Topologia obtida para as espécies de sarcófagídeos com base na análise de 470pb do gene COI. A topologia fora inferida utilizando-se o método de Neighbor-Joining e a distância genética com base no algoritmo Kimura – 2P. Foram realizadas 5000 replicações para análise de Bootstrap (valores apresentados próximo aos nós). Os tamanhos dos ramos refletem a distância genética.

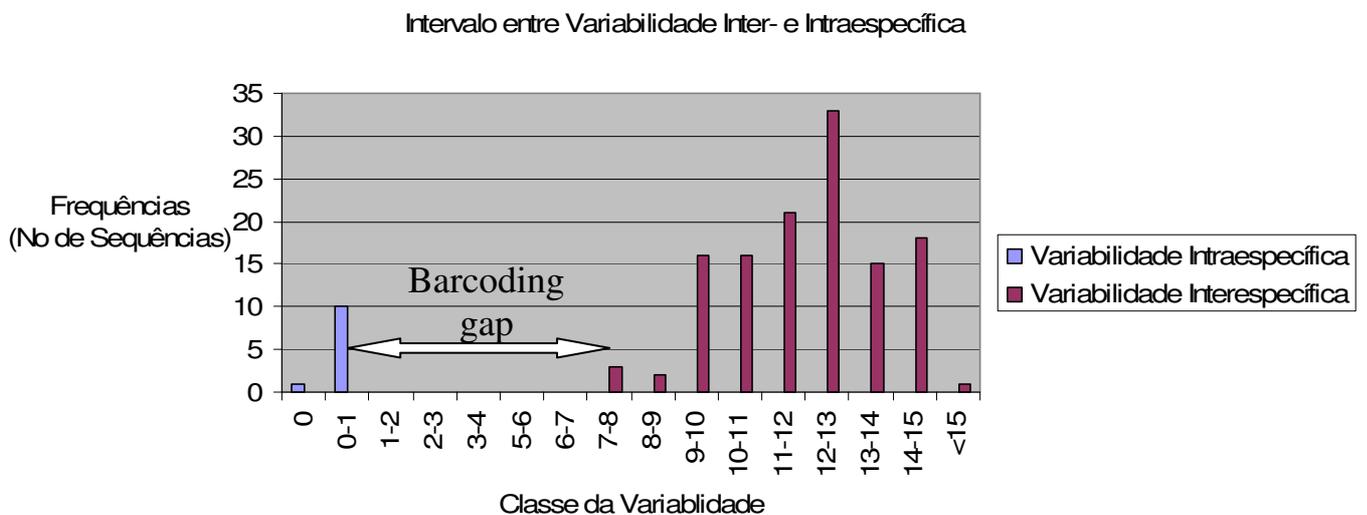


**Figura 12:** Topologia obtida para as espécies de sarcófagídeos com base na análise de 470pb do gene COI. A topologia fora inferida utilizando-se o método de Máxima Verossimilhança (ML – Maximum Likelihood) e a distância genética com base em modelo específico intrínseco aos dados. A porcentagem de árvores onde os taxa agruparam está indicada próximo aos ramos. Os tamanhos dos ramos indicam o número de substituições/sítio.



**Figura 13:** Topologia obtida para as espécies de sarcófagídeos com base na análise de 156 aa da região carboxi-terminal da proteína prevista para o gene COI. A topologia foi inferida utilizando-se o método de Máxima Verossimilhança (ML – Maximum Likelihood) e a distância genética com base no modelo de substituição nucleotídica GRM. A porcentagem de árvores onde os taxa agruparam está indicada próximo aos ramos. Os tamanhos dos ramos indicam o número de substituições/sítio

Em relação ao poder de discriminação das espécies, foram analisados os intervalos entre os valores de variabilidade intraespecífica e interespecífica, sendo representados no histograma abaixo (Figura 14). O intervalo entre o maior valor de variação de intraespecífica e o menor valor de variação interespecífica (comumente denominado de “Barcoding Gap”) esteve entre as classes de 0-1% (variação intraespecífica) e 7-8% (variação interespecífica). Em análises iniciais uma amostra identificada como *P. australis* apresentou um valor de divergência muito baixo (0,006) quando sua sequência foi comparada às sequências de *P. anguilla*, gerando uma sobreposição entre valores de variação intra e interespecífica. A partir da constatação deste conflito, os “vouchers” correspondentes a estas duas espécies foram revistos para confirmação da identidade taxonômica das amostras, confirmando a identidade das amostras como sendo *P. anguilla* (provavelmente uma amostra de DNA de *P. anguilla* foi erroneamente selecionada do acervo em lugar de uma amostra de *P. australis*, prosseguindo-se os procedimentos experimentais com a identidade trocada).



**Figura 14:** Intervalos de valores de variação intra e interespecífica obtidas para a região 3' do gene COI para as espécies analisadas neste estudo.

## 4 - Discussão

### 4.1 – Ampliação de distribuição geográfica de *Blaesoxipha (Acanthodotheca) aix*

A ocorrência de um espécime de *B. (Acanthodotheca) aix* foi registrada pela primeira vez no Estado de São Paulo (área de cerrado, município de Santa Rita do Passo Quatro) neste estudo. No catálogo de Sarcophagidae (PAPE, 1996), *B. aix* possui registros apenas para o Estado do Espírito Santo e para o Distrito Federal, dessa forma, este estudo pode contribuir para ampliar a caracterização da distribuição desta espécie.

### 4.2 - Análises Estruturais e Comparativas

A análise das sequências de aminoácidos previstas para esta região não revelaram nenhum códon de terminação que interrompesse o quadro de leitura do gene, minimizando a possibilidade destas sequências estarem associadas a cópias do gene COI transferidas para o genoma nuclear ou a pseudogenes, condições que foram descritas em diversas espécies (BENSASSON *et al.* 2001) e que poderiam comprometer a identificação taxonômica (CALVIGNAC *et al.* 2011).

Com relação ao conteúdo de aminoácidos desta região, os aminoácidos Fenilalanina, Leucina (ambos mais abundantes) e Valina são classificados como hidrofóbicos, condição associada à inserção da proteína nas regiões lipídicas da membrana interna da mitocôndria. Os aminoácidos Glicina, Serina e Treonina também estão entre os mais abundantes, são polares de carga neutra e classificados como hidrofílicos. Não foi possível identificar nenhum padrão associado à análise dos tipos de substituição de aminoácidos, pois estes eventos não envolveram necessariamente trocas entre aminoácidos com as mesmas propriedades químicas. Apenas três substituições (vide posições 35, 77 e 155, Figura 9) envolveram trocas entre aminoácidos hidrofóbicos; as demais posições variaram entre aminoácidos polares e apolares, incluindo 2 posições nas alças intra-membrana.

### 4.3 – Análise de variabilidade intra e interespecífica na abordagem taxonômica

O uso de sequências de DNA para inferir a identidade taxonômica de um grupo de espécies depende de uma ampla amostragem das sequências de vários espécimes/espécies, incluindo a distribuição geográfica destes organismos, para identificação de polimorfismos moleculares e análise das medidas de variação intraespecífica e interespecífica com o objetivo de verificar o grau de sobreposição entre estes valores e a ocorrência de possíveis conflitos de identificação. Neste estudo a caracterização dos intervalos de variação intraespecífica e

interespecífica resultou em distribuições distintas, sugerindo que a identificação taxonômica poderia basear-se nas análises deste marcador molecular, auxiliando a resolução de conflitos taxonômicos onde a informação morfológica não seja suficiente ou apresente-se ambígua. Entretanto, a validação desta estratégia como uma ferramenta inequívoca de auxílio à identificação taxonômica ainda requer a ampliação da análise deste marcador para um número maior de indivíduos de diferentes regiões geográficas, para obter uma caracterização melhor do intervalo de variação intraespecífica. Além disso, a ampliação destas análises para um número maior de espécies de sarcofagídeos representaria uma estratégia promissora para incorporar informação genética à rotina dos esforços de inventariar a biodiversidade deste grupo no Brasil. Considerando-se a escassez de estudos de marcadores moleculares para estas espécies, este trabalho representa um esforço pioneiro no sentido de ampliar o banco de dados de sequências nucleotídicas potencialmente informativas para auxiliar análises de identificação taxonômica nestas espécies.

A análise de uma situação envolvendo a sobreposição entre um valor de variação interespecífica (0.6% entre *Peckia (Euboettcheria) anguilla* e *Peckia (Euboettcheria) australis*) e o intervalo de distribuição dos valores de variação intraespecífica corroborou a prerrogativa acerca da análise de sequências de DNA fornecer uma ferramenta que contribui na resolução de conflitos de identificação taxonômica. Uma análise sobre esta situação conduziu a três possibilidades: dificuldade no reconhecimento dos caracteres diagnósticos pela análise morfológica (espécies crípticas), retenção de polimorfismo ancestral e baixa divergência nas sequências deste marcador molecular nestas linhagens, representando um cenário evolutivo eventualmente descrito em análises desta natureza (MEIER; ZHANG, 2009) ou erro técnico-operacional durante a manipulação das amostras biológicas. A primeira alternativa foi descartada, pois as diferenças morfológicas entre o acrofalo destas espécies são evidentes (figura 4E e 4I), estas espécies não são crípticas nem pertencem a complexos em especiação; a segunda alternativa não poderia ser descartada prontamente, pois depende de uma caracterização melhor da variação interespecífica entre *P. anguilla* e *P. australis* que comprove que os valores são realmente baixos, confundindo-se nos intervalos de valores intraespecíficos; entretanto uma revisão dos “vouchers” correspondentes aos espécimes investigados confirmou a terceira alternativa (erro ao nomear uma amostra já identificada de *P. anguilla*, substituindo o registro por *P. australis*), embora a condução de uma rotina operacional envolvendo manutenção de “voucher” (material testemunho) exija maior atenção com a manipulação e o registro das amostras processadas em laboratório. A resolução desta questão eliminou a sobreposição dos intervalos de variação intra e interespecíficos e

confirmou o potencial da análise das sequências de DNA acusar conflitos de identificação taxonômica.

#### 4.4 - Perspectivas Filogenéticas

As espécies *Peckia (Pattonella) intermutans* e *Peckia (Squamatodes) ingens* se agruparam na topologia apresentada na Figura 12. Em uma revisão do gênero *Peckia*, Ruiz (2009) verificou que a análise de caracteres da genitália e externos fornecia evidências para a definição do monofiletismo entre o subgênero *Squamatodes* e *Pattonella*, corroborando o posicionamento destas duas espécies na árvore filogenética de máxima verossimilhança. Entretanto, nas análises apresentadas nas figuras 11 e 13, estas espécies não se distribuem com um grupamento monofilético, particularmente na Figura 11 observa-se que *P. ingens* posiciona-se como grupo irmão de *P. collusor*, entretanto deve-se ressaltar que o modelo de substituição nucleotídica utilizado nesta análise (Kimura 2P) talvez não seja o que melhor represente o conjunto de dados utilizado, diferentemente da análise executada na Figura 12, mais indicada como representativa da reconstrução filogenética do grupo. As análises com método de NJ e medida de distância K-2P correspondem às práticas comumente utilizadas nas análises de “DNA barcodes” para identificação taxonômica, mas não representam necessariamente a melhor proposta para inferência das relações filogenéticas.

A espécie *Sarcophaga carnaria*, cuja sequência foi selecionada do GenBank se distribuiu entre as espécies do gênero *Peckia* em todas as propostas de topologia apresentadas. A literatura descreve similaridades apresentadas por Roback (1954), em que Lopes (1969) se baseou para propor uma classificação da família, indicando que a subfamília Sarcophaginae era dividida em seis tribos, sendo composta de vários gêneros, tais como, *Euboettcheria*, *Peckia*, *Paraphrissopoda*, *Pattonella*, *Squamatodes*, *Adiscochaeta* e *Sarcophaga*. Verves (1989) introduziu um novo sistema para Sarcophagidae, posicionando *Peckia* em uma nova tribo, Sarcodexiini.

Com relação ao posicionamento na topologia, *Oxysarcodexia ventricosa* também variou nas árvores apresentadas, posicionando-se na base da distribuição das espécies do gênero *Oxysarcodexia*, que separam em clados monofiléticos os espécimes de *O. paulistanensis* e *O. admixa* nas análises das figuras 11 e 12, entretanto em outra análise esta espécie agrupa-se com os espécimes de *O. admixa* formando uma politomia (figura 13), o que poderia representar um artefato devido ao baixo nível de variação encontrado nesta análise (apenas oito posições em 156 sítios). Em todas as análises as espécies utilizadas como grupos externos foram posicionadas na base da distribuição do conjunto de espécies estudado.

## 5. Conclusões

As análises estruturais e comparativas da sequência de COI com o modelo de Lunt *et al.*, 1996 identificaram 84 sítios variáveis, porém, conservados entre os sarcófagídeos analisados. A composição nucleotídica desta região mostrou uma maior porcentagem de A e T (A = 30.2%; T (U) = 38.7%; C = 17.3% e G = 13.8%), como tem sido frequentemente descrito em outros insetos. Não foi verificada nenhuma evidência que sugerisse contaminação dos resultados com sequências de pseudogenes.

A caracterização dos intervalos de variação intraespecífica e interespecífica resultou em distribuições distintas, sugerindo a análise deste marcador mostrou potencial para auxiliar na resolução de conflitos taxonômicos em Sarcophagidae, apesar de ser necessário ampliar esta caracterização para um maior número de espécies e para validar o intervalo de variação intraespecífica.

As relações filogenéticas utilizando a região 3' do gene COI como marcador molecular foram recuperadas de acordo com as hipóteses filogenéticas mais recentes e aceitas utilizando análises morfológicas (Giroux *et al.*, 2010).

## 6 - REFERÊNCIAS:

Balakrishnan, R. Species concept, species boundaries and species identification: a view from the Tropics. *Systematic Biology* 54: 689-692, 2005.

Barros, R.M; Mello-Patiu, C.A; Pujol-Luz, J.R. Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira Entomologia* 52: 606-609, 2008.

Bajpai, N; Tewari, R.R. Mitochondrial DNA sequence-based phylogenetic relationship among flesh flies of the genus *Sarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). *Journal of Genetics* 89:51-54, 2010.

Bensasson, D.; Zhang, D.-X.; Hartl, D.L.; Hewitt, D.M. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witness. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (6): 314 – 321, 2001.

Boore, J.L. Animal Mitochondrial Genomes. *Nucleic Acids Research* 27: 1767-1780, 1999.

Brown, B.V. Malaise Trap Catches and the crisis in Neotropical Dipterology. *American Entomologist* 51: 129-132, 2005.

Calvignac, S.; Konecny, L.; Malard, F.; Douady, C. J. Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogs (*numts*). *Mitochondrion* 11: 246 – 254, 2011.

Carvalho, C.J.B; Mello-Patiu, C.A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia* 52: 390-406, 2008.

Cognato, A.I. Standard percent DNA sequences differences for insects does not predicts species boundaries. *Jouranal of Economic Entomology* 99: 1037-1045, 2006.

Dahlen, G. A. & Naczi, R. F. C. Flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) associated with North American pitcher plants (Sarraceniaceae), with descriptions of three new species. *Annals of the Entomological Society of America* 99 : 218-240, 2006.

de Queiroz, K. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102:6600–6607, 2005<sup>a</sup>.

de Queiroz, K. Different species problems and their resolution. *Bioessays* 27: 1263-1269, 2005b.

Desmyter, S; Gosselin, M. COI sequence variability between Chrysomyinae of forensic interest. *Forensic Science International: Genetics* 3: 89–95, 2009.

Evenhuis, N.L; Pape, T; Pont, A.C; Thompson, F.C (eds). *Biosystematics Database of World Diptera*, version 10.5. [HTTP://www.diptera.org/biosys.htm](http://www.diptera.org/biosys.htm). acessado em 01 de agosto de 2009.

Folmer, O; Black, M; Hoeh, W; Lutz, R; Vrijenhoek R. DNA “primers” for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294 – 297, 1994.

Gennis, R.B. Site-directed mutagenesis studies on subunit-1 of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. *Biochimica Biophysica ACTA* 1101: 184-187, 1992.

Gibson, A; Gowri-Shankar, V; Higgs, P.G; Rattray, M. A Comprehensive Analysis of Mammalian Mitochondrial Genome Base Composition and Improved Phylogenetic Methods. *Molecular Biology and Evolution* 22: 251–264, 2005.

Giroux, M; Pape, T; Wheeler, T. Towards a phylogeny of the flesh flies (Diptera: Sarcophagidae): morphology and phylogenetic implications of the acrophallus in the subfamily Sarcophaginae. *Zoological Journal of the Linnean Society* 158: 740–778, 2010.

Giroux, M; Wheeler, T. Systematics and Phylogeny of the Subgenus *Sarcophaga* (*Neobellieria*) (Diptera:Sarcophagidae). *Annual Entomological Society of America* 102: 567-587, 2009.

Gregory, R. "DNA Barcodes" does not compete with taxonomy. *Nature*, 434: 1067, 2005.

Guo, Y; Cai, J; Chang Y; Li, X; Liu, Q; Wang, X; Wang,X; Zhong, M; Wen, J; Wang, J. Identification of Forensically Important Sarcophagid Flies (Diptera:Sarcophagidae) in China, Based on COI and 16S rDNA Gene Sequences. *Journal of Forensic Science* 56: 1534-1540, 2011.

Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N., Hickey, D.A. "DNA Barcodes": how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23, 167–172, 2007.

Hall, T.A. BioEdit: a user-frindly biological sequences alignment editor and analysis program for windons 95/98/NT. *Nucleic Acids, Simposium Series*. 41: 95-98, 1999.

Hall MJ, Adams ZJ, Wyatt NP, Testa JM, Edge W, Nikolausz M, Farkas R, Ready PD. Morphological and mitochondrial DNA characters for identification and phylogenetic analysis of the myiasis-causing flesh fly *Wohlfahrtia magnifica* and its relatives, with a description of *Wohlfahrtia monegrosensis* sp. n. Wyatt & Hall. *Medical and Veterinary Entomology* 1:59-71, 2009.

Hammond, P.M. Uncharted realms of species richness, pp. 26-39. *In* B. Groombridge [Ed.]. *Global Biodiversity: status of the Earth's living resources*. World Conservation Monitoring Centre, Chapman and Hall, London, 1992.

Harvey, M.L; Mansell, M.W; Villet, M.H; Dadour, I.R. Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 363-369, 2003.

Hebert, P.D.N; Cywinska, A; Ball, S.L; de Waar, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society of London. B* 270: 313–321, 2003a.

Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceeding of the Royal Society of London B* 3: 1–4, 2003b.

Herre, E.A. Barcodes Helps Biodiversity Fly. *Proceeding of the National Academy of Science* 103: 3949-3950, 2006.

Kutty, S.N; Pape, T; Wiegmann, B.M; Meier, R. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Systematic Entomology* 35 (4), 614-635, 2010.

Larkin MA; Blackshields G; Brown NP; Chenna R; McGettigan PA; McWilliam H; Valentin F; Wallace IM; Wilm A; Lopez R; Thompson JD; Gibson TJ; Higgins DG. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948, 2007.

Leandro, M.J.F; D'Almeida J.M. Levantamento de Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae em um fragmento de mata na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.*, 95:377-381, 2005.

Lessinger, A.C.; Azeredo-Espin, A.M.L. Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 71-80, 2000.

Lessinger, A.C.; Martins Junqueira, A.C; Lemos, T.A; Kemper, E.L; da Silva, F.R; Vettore, A.L; Arruda, P; Azeredo-Espin, A.M. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Molecular Biology* 9 (5), 521-529, 2000.

Lopes, H. S. Family Sarcophagidae. In: Papavero, N. (ed.), *A catalogue of the Diptera of the Americas south of the United States* 103: 1-88. São Paulo; Departamento de Zoologia, Secretaria da Agricultura, 1969.

Lunt, D.H; Zhang, D.X; Szymura, J.M; Hewitt, G.M. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionay patterns and conserved “primers” for the phylogenetics studies. *Insect Molecular Biology* 5: 153-195, 1996.

Luo, A.; Zhang, A.; Ho, S.Y.W.; Xu, W.; Zhang, H.; Shi, W.; Cameron, S.L.; Zhu, C. Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. *BMC Genomics* 12: 84, 2011.

Mayden, R. L. "A hierarchy of species concepts: the denoument in the saga of the species problem", in M. F. Claridge, H. A. Dawah and M. R. Wilson (eds.), *Species: The units of diversity*, London: Chapman and Hall, 381-423, 1997.

Meier, R. DNA sequences in taxonomy: opportunities and challenges. In Wheeler QD. *The new taxonomy*. CRC Press – Taylor and Francis Group, 2008.

Meier, R; Zhang, G. “DNA Barcodes” and DNA taxonomy in Diptera: an assessment based on 4261 sequences for 1001 species. In Pape T; Bickel D and Meier R. *Diptera diversity: status, challenges and tools*. Brill Academic Publishers, 2009.

Meiklejohn, K.A., Wallman, J.F.; Dowton M.. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *International Journal of Legal Medicine*, 125(1): 27-32, 2011.

Mello-Patiu, C.A.; de Luna-Dias, C. Myiasis in the neotropical amphibian *Hypsiboas beckeri* (Anura: Hylidae) by a new species of *Lepidodexia* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Parasitology*. 4: 685-688, 2010.

Meyer, C.P.; Paulay G. “DNA Barcodes”: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3: 2230-2240, 2005.

Min, X.J.; Hickey, D.A. DNA barcodes provide a quick preview of mitochondrial genomes composition. *PLoS ONE* 2(3): e325, 2007.

Nelson, L.A; Wallman, J.F; Dowton, M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology* 21, 44–52, 2007.

Nirmala, X; Hypsa, V; Zurivec, M. Molecular Phylogeny of Calyptratae (Diptera: Brachycera): the evolution 18S and 16S ribosomal rDNAs in higher dipterans and their use in phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology* 10: 475-485, 2001.

Oliveira, M.T; Azeredo-Espin, A.M.L; Lessinger, A.C. The mitochondrial DNA control region of Muscidae flies: evolution and structural conservation in a dipteran context. *Journal of Molecular Evolution* 64: 519–527, 2007.

Oliveira, M. T; Barau, J; Junqueira, A.C.M. ; Feijao, P; Rosa, A.C.; Abreu, C. F.; Azeredo-Espin, A.M.L.; Lessinger, A.C. Structure and evolution of the mitochondrial genomes of *Haematobia irritans* and *Stomoxys calcitrans*: the muscidae (Diptera: Calyptratae) perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 850-857, 2008.

Otranto, D; Stevens, J.R. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *International Journal for Parasitology* 32: 1345-1360, 2002.

Padial, J.M; La Riva, I. Integrative taxonomists should use and produce DNA barcodes. *Zootaxa* 1586: 67–68, 2007.

Pape, T. Catalogue of the Sarcophagidae of the world (Insecta: Diptera). *Memoirs of Entomology International* 8: 558 pp, 1996.

Puerto, G.; Salomão, M.G.; Theakston, R.G.D.; Thorpe, R. S.; Warrell, D. A.; Wuster, W. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: Phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Journal of Evolutionary Biology* 14:527–538, 2001.

Qi-Li, Cj, Kong, L, Yu H. How DNA Barcodes Complement Taxonomy and Explore Species Diversity: The Case Study of a Poorly Understood Marine Fauna. *PLoS ONE* 6(6): e21326, 2011.

Roback, S. The evolution and taxonomy of the Sarcophaginae (Diptera: Sarcophagidae). Illinois Biological Monograph 23(3/4): i-v, 1-181, 1954.

Roe, A.D; Sperling, F.A.H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for “DNA Barcodes”. Molecular Phylogenetics and Evolution 44: 325–345, 2007.

Rubinoff, D; Cameron, S; Will, K. A Genomic Perspective on the Shortcomings of Mitochondrial DNA for “Barcoding” Identification. Journal of Heredity 97: 581–594, 2006.

Ruiz, I.E.B. Revisión del genero *PECKIA* ROBINEAU-DESVOIDY, 1830 (DIPTERA: SARCOPHAGIDAE) y análisis Filogenético de sus subgêneros. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências. Universidade Nacional de Colômbia. Bogotá, Colômbia, 2009.

Saconne, C; De Giorgi, C; Gissi, C; Pesole, G; Reyes, A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. Gene 238: 195–209, 1999.

Saigusa, K; Takamiya, M; Aoki, Y. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. Legal Medicine 7: 175–178, 2005.

Serb, J. M.; Phillips, C. A.; Iverson, J. B. Molecular phylogeny and biogeography of *Kinosternon flavescens* based on complete mitochondrial control region sequences. Molecular and Phylogenetic Evolution 18:149–162, 2001.

Sperling, F.A.H; Anderson, G.S; Hickey, D.A. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. J. Forensic Science 39: 418–427, 1994.

Stevens, J.R; Wallman, J.F. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part I): phylogenetic analyses. Trends in Parasitology 22: 129-136, 2006.

Tan, S.H; Rizman-Idid, M; Mohd-Aris, E; Kuharashi, H; Mohamed Z. DNA-based characterisation and classification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) in Malaysia. *Forensic Science International* 199: 43-49, 2010.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP. DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature* 418: 479, 2002.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 70–74, 2003.

Thyssen, P.J; Lessinger, A.C; Azeredo-Espin, A.M.L; Linhares, A.X. The Value of PCR-RFLP Molecular Markers for the Differentiation of Immature Stages of Two Necrophagous Flies (Diptera: Calliphoridae) of Potential Forensic Importance. *Neotropical Entomology* 34: 777-783, 2005.

Verves, Y. Prof. Hugo de Souza Lopes and the modern system of Sarcophagidae (Diptera). *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 84: 529-545, 1989.

Wells, J.D; Pape, T; Sperling, F.A.H. DNA-Based Identification and Molecular Systematics of Forensically Important Sarcophagidae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences* 46: 1098–1102, 2001.

Wells, J.D; Sperling, F.A.H. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International* 120: 110-115, 2001.

Wells, J.D; Stevens, J.R. Application of DNA-Based Methods in Forensic Entomology. *Annual Review of Entomology* 53:103–20, 2008.

Wells, J.D; Wall, R; Stevens, J.R. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *International Journal of Legal Medicine* 121: 229-233, 2007.

Wheeler, Q.D. Why the phylogenetic species concept? Elementary. *Journal of Nematology* 31, 134–141, 1999.

Wheeler, Q.D. 2005. Losing the plot: DNA “barcodes” and taxonomy. *Cladistics*, 21: 405 – 407, 2005.

Wiens, J.J., Penkrot, T.A. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* 51: 69-91, 2002.

Will, K.W; Rubinoff, D. Myth of the molecule: DNA barcodes for Species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*.20: 47–55, 2004.

Wilson, E.O. Taxonomy as a fundamental discipline. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B* 359: 739, 2003.

Wolstenholme, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review in Cytology* 141:173- 216, 1992.

Yeates, D.K; Wiegmann, M.B. Congruence and Controversy: Toward a Higher-Level Phylogeny of Diptera. *Annual Review of Entomology* 1999. 44: 397–428, 1999.

Ying, B.W; Liu, T.T; Fan, H; Wei, D; Wen, F.Q; Bai, P; Huang, J; Hou, Y.P. The Application of Mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase II Gene for the Identification of Forensically Important Blowflies in Western China. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 28: 308–313, 2007.

Zehner, R; Amendt, J; Schütt, S; Sauer, J; Krettek, R; Polvony D. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Legal Medicine* 118: 245-247, 2004.