



FILOGENIA MOLECULAR DE *Paralucilia* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)

TAÍS MADEIRA OTT¹; PATRÍCIA J. THYSSEN²; MARCO A. T. MARINHO³;
JULIANA CORDEIRO⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – madeira.t@outlook.com

² Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – thyssenpj@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – marco.marinho@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – juliana.cordeiro@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Califorídeos são dípteros muscóides com distribuição mundial, comumente encontrados se desenvolvendo em matéria orgânica em decomposição (LINHARES, 1981). Devido a essa característica, muitas espécies são consideradas de importância forense, sendo utilizadas para obter informações no âmbito médico-legal, tais como a estimativa do intervalo *post-mortem* (IPM) (SMITH, 1986). Dessa forma, é de grande importância conhecer as espécies que podem ser úteis nesses casos, assim como sua biologia e distribuição.

Paralucilia Brauer & Bergenstamm é um gênero de califorídeos pertencentes à subfamília Chrysomyinae que compreende espécies comumente encontradas colonizando e se alimentando em carcaças em diferentes estudos (BARROS-SOUZA et al., 2012; ARMANI et al. 2015), incluindo um caso aplicado à entomologia forense em Rondônia (PUJOL-LUZ et al. 2006). Este gênero tem distribuição exclusivamente Neotropical, sendo encontrado em ambientes com pouca ou nenhuma perturbação antrópica, especialmente associado a fragmentos florestais (FERRAZ et al. 2010; BATISTA-DA-SILVA et al. 2011). Atualmente, 14 espécies do gênero são consideradas válidas (PAPE; THOMPSON, 2013), mas a literatura diverge quanto à este número (MELLO, 1969; DEAR, 1985; MARILUIS et al. 1994; MELLO, 1996).

Estudos filogenéticos têm contribuído para a compreensão das relações sistemáticas de diferentes grupos de dípteros (GRELLA et al. 2015; BUENAVENTURA et al. 2016). Atualmente, a utilização de marcadores moleculares e o avanço no desenvolvimento de análises por meio da bioinformática têm aumentado o uso desses métodos e ampliado as possibilidades de aprofundar esse conhecimento. Ainda assim, estudos filogenéticos envolvendo *Paralucilia* são escassos (SINGH; WELLS, 2011), e o acréscimo de espécies e marcadores moleculares auxiliaria na compreensão das relações internas e externas do grupo. Assim, o objetivo deste estudo foi propor uma hipótese filogenética de *Paralucilia* para a resolução de conflitos taxonômicos dentro do gênero.

2. METODOLOGIA

Dípteros adultos foram coletados ativamente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil, utilizando como iscas fígado bovino, moela e peixe putrefeitos. Posteriormente, as amostras foram levadas a laboratório, mortas em freezer a -20°C, e identificadas por meio de chave taxonômica (MELLO, 1996). Para dar seguimento às análises moleculares, foram acondicionadas em álcool absoluto.



Para a extração do DNA total foi utilizado kit comercial *DNeasy® Blood&Tissue Kit* (Qiagen), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. Os genes COI, ITS2 e 16S foram amplificados com os pares de *primers* LCO1490 e HCO2198, 5.8S-ITS2 e 28S-ITS2, e L1R e mtD34, respectivamente. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 10 µl, conforme protocolo indicado pelo fabricante da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). O programa da PCR foi realizado da seguinte forma: 3 min de desnaturação inicial a 95°C, 35 ciclos de 1min a 95°C (desnaturação), 1 min a 52°C (anelamento) e 1 min e 30 s a 72°C (extensão), finalizando com 5 min a 72°C (extensão final). Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose 1%, purificados com o kit *QIAquick® PCR Purification* (Qiagen) e sequenciados em empresa terceirizada. Sequências de espécies pertencentes à Chrysomyinae, assim como a espécie escolhida como grupo externo, *Sarconesia chlorogaster*, foram obtidas por meio do banco de dados de sequências nucleotídicas Genbank. As sequências obtidas foram editadas e montadas no programa Staden Package (STADEN, 1996). O alinhamento foi realizado individualmente para cada marcador genético com o algoritmo ClustalW (THOMPSON et al. 1994), inserido no MEGA6 (TAMURA et al. 2013) e, posteriormente, os dados foram concatenados. As análises de distâncias genéticas, Máxima verossimilhança e Neighbour-Joining também foram realizadas no programa MEGA6, com 1000 réplicas de Bootstrap, sendo que o modelo de substituição com melhor ajuste à matriz de dados analisada foi inferido utilizando-se a opção *Find Best DNA Model* implementado neste mesmo programa: GTR+G+I.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados concatenados dos marcadores moleculares COI, ITS2 e 16S somaram ao todo 1883pb para as análises. As árvores obtidas em ambas análises foram similares (Figura 1), com exceção da posição de *Hemilucilia semidiaphana* e *H. segmentaria*, que não foram recuperadas como um grupamento monofilético. Esse resultado pode ser explicado pelas características dos genes 16S e ITS2, visto que quando analisados separadamente, o COI recupera a monofilia do gênero *Hemilucilia*.

Apenas quatro espécies de *Paralucilia* foram sequenciadas neste estudo: *P. fulvinota*, *P. nigrofacialis*, *P. xanthogeneiates* e *P. pseudolyrcea*. A monofilia do gênero foi recuperada nas árvores geradas, com o mesmo agrupando com *Cochliomyia*, como fora observado por SINGH; WELLS (2011).

As distâncias genéticas entre as espécies variaram de 0,2 a 11,2%. Foi possível verificar que as comparações que obtiveram valores de divergência muito baixos foram entre *P. fulvinota* e *P. nigrofacialis* (0,3%), e *P. xanthogeneiates* e *P. pseudolyrcea* (0,2%). Isso sugere que as variações morfológicas encontradas entre tais espécies sejam intraespecíficas, apoiando a proposta de MARILUIS et al. (1994) em sinonimizar *P. fulvinota* e *P. nigrofacialis*, assim como *P. xanthogeneiates* e *P. pseudolyrcea*.

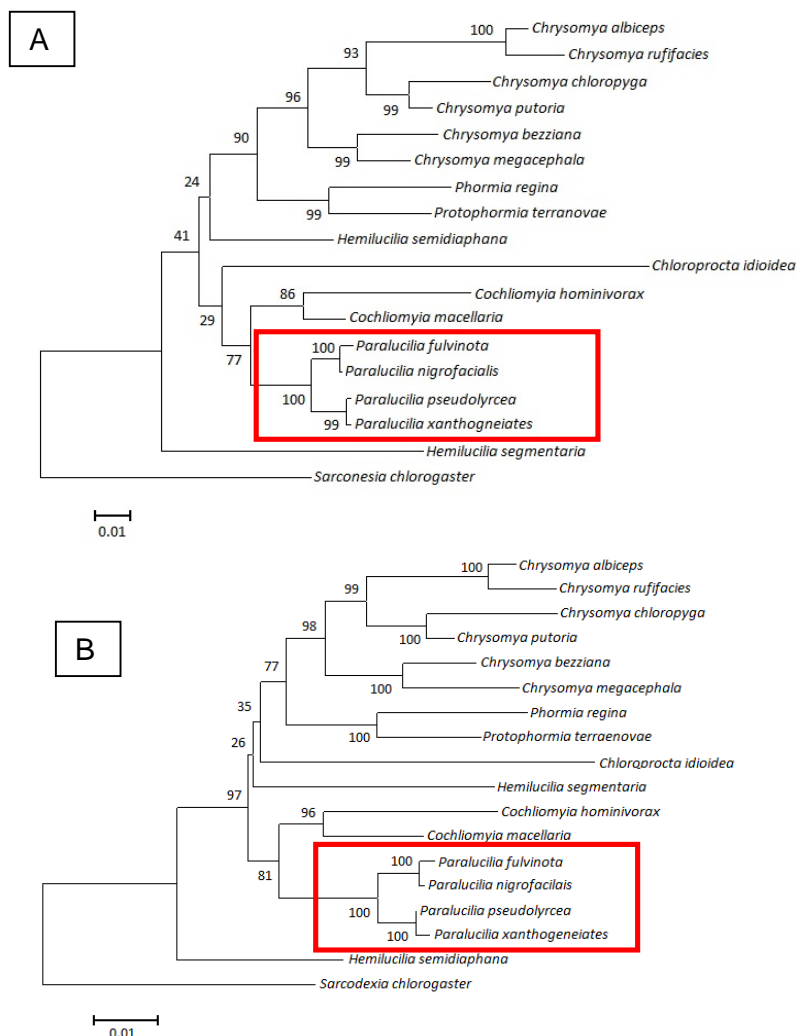


Figura 1. Árvore de Máxima verossimilhança (A) e de Neighbour-Joining (B) usando dados concatenados dos marcadores COI, ITS2 e 16S de Chrysomyinae, com destaque para o posicionamento de *Paralucilia*

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o gênero *Paralucilia* é monofilético e que estudos comparativos entre marcadores morfológicos e moleculares, com um maior número de espécies, devem solucionar as relações internas do gênero.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMANI, A.P.; CENTENO, N. D.; DAHINTEN, S. L. Primer estudio de artropodofauna cadavérica sobre modelos experimentales porcinos en el noreste de la provincia del Chubut, Argentina. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v.74, n.3-4, p.123-132, 2015.
- BARROS-SOUZA, A. S.; FERREIRA-KEPPLER, R. L.; AGRA, D. B. Development period of forensic importance Calliphoridae (Diptera: Brachycera) in urban area



- under natural conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **EntomoBrasilis**, Vassouras, v.5, n.2, p.99-105, 2012.
- BATISTA-DA-SILVA, J. A.; MOYA-BORJA, G. E.; MELLO, R. P.; QUEIROZ, M. M. C. Abundance and richness of Calliphoridae (Diptera) of public health importance in the Tinguá Biological Reserve, Nova Iguaçu (RJ), Brazil. **Entomotropica**, Maracay, v.26, n.3, p.137-142, 2011.
- BUENAVENTURA, E.; Whitmore, D.; Pape, T. Molecular phylogeny of the hyperdiverse genus *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae), and comparison between algorithms for identification of rogue taxa. **Cladistics**, p.1-25, 2016.
- DEAR, J. P. A revision of the new world Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.3, n.3, p.109-169, 1985.
- FERRAZ, A. C. P.; GADELHA, B. Q.; AGUIAR-COELHO, V. M. Influência Climática e Antrópica na Abundância e Riqueza de Calliphoridae (Diptera) em Fragmento Florestal da Reserva Biológica do Tinguá, RJ. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.39, n.4, p.476-485, 2010.
- GRELLA, M. D.; SAVINO, A. G.; PAULO, D. F.; Mendes, F. M.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; QUEIROZ, M. M. C. THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. Phenotypic polymorphism of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) may lead to species misidentification. **Acta Tropica**, Basel, v.141, p.60–72, 2015.
- PUJOL-LUZ, J. R. Pujol-Luz; Helder Marques, Alexandre Ururahy-Rodrigues; José Albertino Rafael, Fernando H.A. Santana, Luciano C. Arantes.; and Reginaldo Constantino. A forensic entomology case from the Amazon rain forest of Brazil, **Journal of Forensic Sciences**, Philadelphia, v. 51, n.5, p. 1151-1153.2006.
- LINHARES, A.X. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.25, p.189–215,1981.
- MARILUIS, J. C.; MORA, D. G.; PERIS, S. V. Consideraciones sobre el género *Paralucilia* Brauer el Bergenstarnrn, 1891 (Diptera, Calliphoridae). **Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural**, Madrid, v.91, n.I-4, p.15-18, 1994.
- MELLO, R. P. Contribuição ao estudo do gênero *Myolucilia* Hall, 1948 (Diptera, Calliphoridae). **Studia. Ent.**, v.12, p.1-4, 1969.
- MELLO, R. P. Revisão das espécies sul-americanas de *Paralucilia* Brauer & Bergenstamm (Diptera, Calliphoridae). **Entomologia y Vectores**, Rio de Janeiro, v.3, n.5, p. 137-143, 1996.
- PAPE, T.; THOMPSON, F. C. **Systema Dipterorum**. Copenhagen, 13 jun 2013. Acessado em 29 set. 2017. Online. Disponível em: <http://www.diptera.org>.
- SINGH, B.; WELLS, J. D. Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) is monophyletic: a molecular systematic analysis. **Systematic Entomology**, Oxford, v.36, p.415–420, 2011.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Londres: Cornell University Press, 1986.
- STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 5, p. 233-241, 1996
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673–4680, 1994.