**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Instituto de Biologia**

**Curso de Ciências Biológicas – Licenciatura**

Trabalho de Conclusão de Curso

# Identificação de espécies de *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae) usando o método de *DNA Barcode*

**Taís Madeira**

Pelotas, 2015

**Taís Madeira**

# Identificação de espécies de *Oxysarcodexia* (Diptera: Sacophagidae) usando o método de *DNA Barcode*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora:Profª Drª Patrícia Jacqueline Thyssen

Co-orientadora: Profª Drª Juliana Cordeiro

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M181i Madeira, Taís

Identificação de espécies de Oxysarcodexia (Diptera: Sarcophagidae) usando o método de DNA Barcode / Taís Madeira. – 50f. : il. - Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientadora Patrícia Jacqueline Thyssen ; coorientadora Juliana Cordeiro.

1.Biologia. 2.Entomologia forense. 3.Insetos necrófagos. 4.COI. 5.Barcode gap. I.Thyssen, Patrícia Jacqueline. II.Cordeiro, Juliana. III.Título.

CDD: 595.7153

**Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, Agnaldo e Haidi, por terem me dado a oportunidade de realizar minha graduação e por me motivarem sempre a crescer, sem deixar de amparar quando todas as coisas pareciam não dar certo. E agradeço também aos meus irmãos, Gabriel e Bruno, que nesta caminhada muitas vezes tiveram que ouvir conceitos científicos abstratos, coletar moscas e se deparar com insetos ao abrir o freezer. Amo vocês.

Agradeço ao meu noivo, Rodrigo, por ter iluminado meus dias nublados, por ser meu parceiro de estudos, avaliador dos ensaios das minhas apresentações, companheiro em coletas de insetos, ombro amigo nos momentos tensos e principalmente por me fazer rir e por me fazer sentir a garota mais linda do seu universo.

Agradeço às famílias que me acolheram em suas casas mesmo sem me conhecer muito bem. E não apenas pela cama e pelo teto, mas pelo carinho que demonstraram.

Agradeço às minhas orientadoras, Patrícia e Juliana, por sempre apostarem em mim, por me ajudarem a crescer como acadêmica e como pessoa, pela paciência ao me ensinar (mesmo quando eu tinha vontade de jogar o computador pela janela) e pelas oportunidades que me foram dadas.

Agradeço aos meus amigos por ouvirem com paciência (ou nem tanto assim) minhas explicações sobre a vida, o universo e tudo mais, por permitirem que eu coletasse insetos e plantas em suas casas e por me fazerem sentir-me tão em casa em Pelotas.

Agradeço aos meus colegas de graduação, principalmente à Débora e à Rejane, pela parceria nos trabalhos de aula, pelas discussões sobre qualquer coisa que me ajudaram a construir opiniões, pela troca de bolachinhas durante as disciplinas e por tentarem me manter acordada (o que vale é o esforço).

Agradeço ao pessoal dos laboratórios em que trabalhei pelos chás, cafés e comidas diversas, pelas conversas construtivas e desconstrutivas, pelo carinho, pelo otimismo e pelo apoio.

Por fim, quero agradecer a Deus por não me dar sempre as certezas que eu queria ter, por ter colocado todas as pessoas acima citadas em minha vida para que eu pudesse chegar até aqui e por ser fiel as suas promessas. Agradeço porque independente de qualquer discussão filosófica ou fato científico, podemos pensar, criar e investigar o mundo. E isso nos move.

“Se eu vi mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes”
(*Isaac Newton*)

**Resumo**

MADEIRA, Taís. **Identificação de espécies de *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae) usando o método de *DNA Barcode***. 2015. 47f. Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A família Sarcophagidae (Diptera) compreende espécies com hábitos diversificados tais como necrofagia, coprofagia e parasitismo, o que lhe confere importância médica, veterinária e forense. *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae)se destaca como um dos gêneros mais diversos na região Neotropical, por isso é particularmente fundamental a identificação de suas espécies quando se pretende utilizá-las para estimar o intervalo pós-morte (IPM) no âmbito forense. Contudo, isso é dificultado devido à grande similaridade morfológica interespecífica e ao diagnóstico restrito a observação da genitália masculina de indivíduos adultos. Assim, a identificação de espécies baseada em *DNA Barcode* pode ser uma alternativa valiosa para auxiliar a identificação de sarcofagídeos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da técnica de *DNA Barcode* para identificar espécies do gênero *Oxysarcodexia* registradas para o Rio Grande do Sul, assim como verificar a diversidade genética entre as diferentes populações. Amostras de dípteros adultos foram coletadas mensalmente, entre março de 2012 e fevereiro de 2013, em três municípios com perfis fisiogeográficos distintos. Em cada localidade, armadilhas apropriadas contendo iscas atrativas sem estágio inicial de decomposição foram expostas por 72 horas. Posteriormente, as armadilhas foram levadas para o laboratório onde os insetos foram triados, identificados e armazenados em álcool absoluto. Foram realizadas extrações, amplificações (*primers* universais para citocromo oxidase subunidade I – COI) e purificações de DNA utilizando kits comerciais. O gene COI foi sequenciado pelo método de Sanger. Foram analisados 687pb de 60 indivíduos, apresentando 161 nucleotídeos variáveis. A identificação de espécies por *DNA Barcode* seguiu análises baseadas em agrupamento mediante construção de árvore filogenética (método evolutivo Neighbor-Joining e modelo de evolução das sequências Kimura 2-parâmetros - K2P). Considerando 3% como limite entre duas espécies, foi possível delimitar indivíduos a partir das análises de divergência intraespecífica e interespecífica. Os resultados da análise de ABGD coincidiram com o verificado nas análises por monofilia de ramos e de divergência genética. Para as análises de Network, a diversidade haplotípica foi alta (97,7%), verificando-se maior proximidade de haplótipos em indivíduos que pertencem a mesma espécie. Assim, concluiu-se que o método de *DNA Barcode* é eficaz na identificação de *Oxysarcodexia.*

**Palavras-chave**:forense; insetos necrófagos; COI; *Barcode gap*

**Abstract**

MADEIRA, Taís.**Identification species *Oxysarcodexia* (Diptera: Sacophagidae) by using the *DNA Barcode* method**. 2015. 47f. Graduation in Biological Sciences – Degree, Biology Institute, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

The family Sarcophagidae (Diptera) comprises species with great diversity of habits such as necrophagy, coprophagy and parasitism, giving them medical, veterinary and forensics importance. *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae) is the one of the most diverse genus of sarcophagid in the Neotropical region, so it is particular essential to identify the species which it can be useful for estimating the postmortem interval (PMI) for forensic purposes. However, this is difficult because of the large interspecific morphological similarity and diagnosis restricted to observation of the male genitalia of adults. Thus, identification of DNA barcode-based species is a valuable alternative to assist the identification of sarcofagídeos. This study aimed to evaluate the effectiveness of *DNA Barcode* technique to identify species of the genus *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae) recorded for the Rio Grande do Sul, as well as verify the genetic diversity among different populations. Samples of adult flies were collected monthly between March 2012 and February 2013 in three municipalities in the south of the Rio Grande do Sul state. In each location, suitable traps with attractive baits in the early stages of decomposition were exposed in different environments. After 72 hours of exposure, the traps were taken to the laboratory where the insects were screened, identified and stored in absolute alcohol. Extraction, amplification and DNA purification were performed using commercial kits. The COI gene (cytochrome oxidase subunit I) was sequenced by the Sanger method. 687pb were analyzed from 60 individuals by presenting 161 variables nucleotides. A phylogenetic tree based on the analysis with the evolutionary method Neighbor-Joining and evolution model of the sequences Kimura 2-parameter (K2P), verifying that the morphologically identified as individuals of the same species were grouped was generated. Considering3% as a boundary between two species, it was possible to delimit individuals as of intraspecific and interspecific divergence analysis. The results of ABGD analysis coincided with the observed in analyzes by monophyletic branches and genetic divergence. For the analyzes of Network, the haplotype diversity was high (97.7%), checking up closer haplotypes which individuals belong to the same species. Thus, it was concluded that the *DNA Barcode* method was effective in identifying *Oxysarcodexia* species.

**Keyword**: forensic; carrion insects;*COI*; *Barcode gap*

## Lista de Figuras


Figura 1 Mapa do Rio Grande do Sul – Brasil, destacando em amarelo os municípios onde os espécimes foram coletados (Bagé, Pelotas e Piratini). Fonte: Google Earth ..... **19**

Figura 2 Árvore filogenética consenso gerada a partir da análise filogenética de 59 indivíduos de *Oxysarcodexia*, considerando o método evolutivo Neighbor-Joining e, como modelo de evolução das sequências, o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P). Outgroups: *Ravinia advena* e *Musca domestica* ..... **25**

Figura 3 Frequência de indivíduos por intervalos de distâncias genéticas. Divergências intraespecíficas representadas em cinza escuro. Divergências interespecíficas representadas em cinza claro ..... **27**

Figura 4 Rede de haplótipos do gene COI de espécies do gênero *Oxysarcodexia* A freqüência dos haplótipos é proporcional ao tamanho dos círculos. As cores dos círculos representam as seguintes espécies: *O. admixta* (azul claro), *O. avuncula* (preto), *bicolor* (rosa escuro), *O. culmiforceps* (verde), *O. paulistanensis* (amarelo), *O. terminalis* (cinza), *O. thornax* (azul), *O. riograndensis* (laranja) e *O. varia* (rosa claro). Os passos mutacionais estão representados na figura quando superiores a 10 ..... **28**

## Lista de Tabelas

Tabela 1 Indivíduos machos adultos de *Oxysarcodexia* spp coletados nos municípios de Bagé, Pelotas e Piratini e número de sequências analisadas por espécie/localidade. Espécimes não coletados e sequências não geradas estão representados por "-" ..... 23

Tabela 2 Valores de divergência interespecífica (abaixo da diagonal central), e valores de divergência intraespecífica (em negrito, na diagonal central) das sequências agrupadas por identificação morfológica, em comparações par a par, utilizando modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (%) ..... 26

**Sumário**


**1 Introdução..... 11**

**1.1 Objetivos..... 13**

**1.1 Objetivo Geral..... 13**

**1.2 Objetivos Específicos..... 13**

**2 Revisão de Literatura..... 14**

**3 Material e Métodos..... 19**

**3.1 Coleta e identificação dos espécimes..... 19**

**3.2 Análise molecular..... 20**

**3.2.1 Extração de DNA..... 20**

**3.2.2 Amplificação e sequenciamento do fragmento de interesse..... 20**

**3.2.3 Análise dos dados moleculares..... 21**

**4 Resultados..... 23**

**4.1 Identificação de espécies..... 23**

**4.2 Análises das sequências ..... 23**

**4.3 Análise de DNA *Barcode* ..... 24**

**4.3.1 Análise de identificação de *Operational Taxonomic Units* (OTUs) ..... 24**

**4.3.2 Identificação de *Barcode Gap* por análise por divergência genética.. 26**

**4.3.3 Análise de Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) ..... 27**

**4.3.4 Análise de rede de haplótipos ..... 27**

**5 Discussão ..... 29**

**5 Conclusão..... 32**

**Referências ..... 33**

**Apêndices ..... 41**

## 1 Introdução

Os dípteros são os organismos que mais têm se destacado na obtenção de informações forenses, visto que além de se apresentarem com maior diversidade no recurso, são os primeiros a chegar e colonizar a carcaça (OLIVEIRA-COSTA, 2003). Como ressalta Catts e Goff (1992), as famílias Calliphoridae e Sarcophagidae apresentam grande importância no âmbito forense, e têm contribuído no fornecimento de informações sobre o tempo, local e causa da morte. Contudo, a utilização de sarcofagídeos é dificultada devido à semelhança morfológica entre as espécies, cuja identificação se restringe à observação da genitália masculina de indivíduos adultos (CARVALHO; MELLO-PATIU, 2008) (Apêndice A). Isso significa que a identificação de fêmeas e indivíduos em fases imaturas, que estão frequentemente associados às carcaças, raramente pode ser alcançada. Existe ainda uma grande dificuldade imposta pelo impedimento taxonômico (BUTCHART et al, 2010), uma vez que o número de taxonomistas especializados é reduzido ou, muitas vezes, inexistente; além disso, aspectos biológicos e ecológicos do grupo em questão são pouco conhecidos tornando laboriosa as coletas pelo uso de irrestritas estratégias.

Apesar das dificuldades na utilização de sarcofagídeos em questões forenses, alguns autores destacam motivos pelos quais é importante estudar esta família. Primeiramente, a estratégia de viviparidade apresentada por este grupo proporciona vantagens às larvas sobre as espécies ovovivíparas como califorídeos, pois são capazes de explorar os recursos disponíveis antes mesmo da eclosão de seus competidores (KETTLE, 1984). Em segundo lugar, esses dípteros estão associados a todas as fases de decomposição, inclusive em etapas tardias (SMITH, 1986; BYRD; CASTNER, 2010), período em que todas as informações fornecidas pelas técnicas médico-legais se tornam mais imprecisas (AMENDT et al, 2004).

Na região Neotropical, o gênero *Oxysarcodexia* Townsend, 1917 se destaca como um dos mais diversos da subfamília Sarcophaginae (LOPES, 1969; VERVES, 1989; PAPE, 1996). Essas espécies estão associadas a uma ampla

gama de recursos tais como fezes, carcaças e vísceras (DIAS et al, 1984), incluindo cadáveres, o que ressalta a sua importância forense (KUTTY et al, 2010).

Com o objetivo de desenvolver um sistema universal para reconhecer espécies e identificar espécimes por meio de análises moleculares padronizadas, Hebert et al (2003) propuseram o “Projeto do Código de Barras da Vida” (*Barcode of Life Project*). Esta proposta utiliza uma região da parte inicial 5’ de 658pb do gene mitocondrial *citocromo oxidase, subunidade I* (COI) apresentando como premissa o fato de que os indivíduos de uma mesma espécie apresentem uma proximidade maior do padrão de sequências nucleotídicas atuando como um ‘código de barras’ para reconhecimento da espécie. A técnica de *DNA Barcode* está bem estabelecida (ROWAN; BARRETT, 2005; HAJIBABAEI et al, 2006; BOEHME et al, 2012, BARCOA et al, 2013), possibilitando a potencial identificação dos espécimes de forma confiável, relativamente rápida e barata.

Desta forma, a técnica de *DNA Barcode* é a alternativa para a identificação de sarcofagídeos encontrados em cenas criminais, visto que é capaz de transpor o impedimento taxonômico, além de tornar o procedimento de identificação das espécies mais rápido.

Ainda considerando alternativas que venham a contribuir na identificação de espécies do grupo em questão, redes de haplótipos representam graficamente a diversidade genética dos organismos estudados, sendo possível inferir sobre sua filogeografia através destas análises (e.g. FARIA et al, 2013). A partir disso, permite discriminar populações e, potencialmente, agrupar espécies que compartilham haplótipos, fazendo com que este seja mais uma estratégia para auxiliar a identificação de espécies (ZAIDAN, 2014).

De acordo com as informações acima, este trabalho apresenta como hipótese o fato de que a técnica de *DNA Barcode* será eficaz no reconhecimento das espécies e identificação dos espécimes de *Oxysarcodexia* coletados no Rio Grande do Sul.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar aspectos taxonômicos de *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae) registradas para o Rio Grande do Sul, assim como verificar a diversidade genética em diferentes populações, utilizando ferramentas como *DNA Barcode* e rede de haplótipos.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a aplicabilidade e eficiência da metodologia do *DNA Barcode* como ferramenta para conhecer a diversidade de espécies de *Oxysarcodexia* com distribuição no Rio Grande do Sul;
- Avaliar o grau de estruturação genética de populações de *Oxysarcodexia* neste Estado.

## 2 Revisão de Literatura

A utilização de insetos necrófagos para obtenção de informações forenses é antiga, datando como primeiro registro o caso do chinês Sung T'zu, em 1235, onde a presença de moscas sobre o instrumento de trabalho de um camponês acusou o assassino investigado (THYSSEN, 2011). Desde então, essa prática tem sido difundida pelo mundo, onde estudos sobre identificação (*e.g* CARVALHO; MELLO-PATIU, 2008), ecologia (*e.g* SOUZA; LINHARES, 1997) e biologia (*e.g* ESTRADA et al, 2009) de diversos grupos potenciais têm sido realizados, visando a busca de informações sobre a cena criminal.

Entre os dípteros da região Neotropical encontrados em carcaças e cadáveres, Sarcophagidae aparece com o maior número de espécies em muitos estudos (BARROS et al, 2008; ROSA et al, 2009; BEUTER et al, 2012; ALVES et al, 2014). Alves et al (2014), a partir de uma revisão de literatura buscando compilar registros de espécies das principais famílias de dípteros encontrados em carcaças e cadáveres na região Neotropical, constata a presença de 105 espécies de Sarcophagidae, seguido de Muscidae (53 spp.) e Calliphoridae (36 spp.). Porém, estes números poderiam ser ainda mais expressivos, visto que muitas vezes a identificação das espécies é limitada, em virtude do número restrito de especialistas e de chaves taxonômicas para todos os gêneros e/ou fases de desenvolvimento do inseto (ALVES et al, 2014).

Informações taxonômicas e sobre a biologia das espécies de Sarcophagidae têm permitido sua correta e ampla utilização na área forense em diferentes países (*e.g* BUENAVENTURA et al, 2009; CHERIX; WSS; PAPE, 2012; MARIANI et al, 2014; MATUSZEWSK; SZAFALOWICZ; JARMUSZ, 2013; POHJOISMAKI et al, 2010; SALAZAR-ORTEGA; LUZ; GOMEZ-PIÑEREZ, 2012; TABOR; FELL; BREWSTER, 2005; WOLFF et al, 2001). Como destaca Gennard (2007), a identificação do inseto é crucial para que seja possível estimar informações em relação à cena criminal. Considerando exclusivamente a família Sarcophagidae, a identificação é realizada a partir da utilização de chaves taxonômicas que remetem à observação de caracteres morfológicos de indivíduos adultos, como cerdas, veias das asas e, principalmente, genitália masculina (CARVALHO; MELLO-PATIU,

2008; BUENAVENTURA et al, 2009; SILVEIRA, 2011; VAIRO et al, 2011; VAIRO et al, 2014; VAIRO et al, 2015).

Desta forma, a identificação de fêmeas e indivíduos imaturos é negligenciada, tornando-se um problema taxonômico, pois estes são os principais grupos encontrados juntos às carcaças. Apesar de alguns trabalhos proporem chaves taxonômicas que diagnostiquem fêmeas (VAIRO et al, 2015), encontrar caracteres diagnósticos confiáveis ainda é um desafio para esse grupo. Para tanto, ferramentas moleculares de identificação de espécies vêm sendo desenvolvidas para auxiliar a taxonomia (AMENDT et al, 2004), em especial a dos grupos utilizados para a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) (SPERLING et al, 1994).

Amendt et al (2004) resgatam informações de diversos trabalhos, como por exemplo as alterações do corpo em decomposição e as possíveis técnicas utilizadas para descobrir o intervalo de tempo entre a morte do indivíduo e a sua decomposição completa. Uma vez que técnicas forense e médico-legais, tais como a medição da temperatura corporal ou análise do *livor* e *rigor mortis*, só podem ser feitos com certa medida de precisão nos primeiros dias após a morte, o uso de informações obtidas pela análise da presença de certos insetos é de extrema importância, em especial quando o corpo é encontrado após três dias da morte. Estes autores ainda destacam a possibilidade da utilização de ferramentas moleculares para alcançar uma identificação rápida e confiável dos insetos necrófagos.

Rodriguez e Bass (1983) conduziram estudos sobre a colonização de insetos em cadáveres ao longo do tempo, de acordo com a época do ano e com os estágios de decomposição. Observou-se que a atração do recurso sobre diferentes insetos necrófagos muda de acordo com a sua degradação, sendo possível verificar uma sucessão das famílias de insetos associados. Indivíduos adultos da família Sarcophagidae são mais frequentes entre a fase de inchamento e de deterioração do cadáver, mas são encontrados até mesmo na fase de seca. Essas informações vêm de encontro com estudos exclusivos com a família Sarcophagidae realizados a partir da decomposição de uma carcaça de suíno, onde indivíduos adultos atraídos pela carcaça em fase de inchamento e de deterioração somaram 86,2%, com presença de indivíduos em todas as fases (BARROS et al, 2008).

O uso de diferentes ferramentas moleculares tem contribuído com pesquisas dentro do âmbito forense (*e.g.* ZEHNER et al, 2004; THYSSEN et al 2005; SONG et al, 2008). Dentre esses, o DNA *barcode* vem ganhando destaque, sendo utilizado para solucionar desde casos envolvendo investigações de morte (*e.g.* RAJAGOPAL et al, 2012), até aqueles relacionados ao uso ilegal de espécies ameaçadas em produtos para comercialização (*e.g.* PINTO et al, 2015).

Caterino et al (2000) analisaram os avanços teóricos e metodológicos referentes a dados sobre sequências de DNA, e reuniram informações sobre os táxons e regiões sequenciadas descritas em trabalhos de filogenia de insetos. Entre os marcadores moleculares para DNA mitocondrial estão a região parcial da subunidade I da citocromo oxidase (*COI*), da subunidade II da citocromo oxidase (*COII)* e do gene 16S (*16S*). Quanto ao DNA nuclear, as regiões mais utilizadas são: região intergênica I e II do DNA ribossomal (*ITSI* e *ITSII*), e região parcial dos genes 18S (*18S*) e 28S (*28S*). A utilização destes marcadores é defendida pelos autores que as consideram como complemento e reforço do valor dos dados morfológicos e ecológicos, fazendo contribuições substanciais para a biologia evolutiva.

Existem poucos trabalhos utilizando dados moleculares sobre *Oxysarcodexia* (KUTTY et al, 2010; MEIKLEJOHN et al, 2011; MARINHO et al, 2012; MEIKLEJOHN et al, 2012; MEEIKLEJOH et al, 2013; STAMPER et al, 2013; PIWCZYNSKI et al, 2014); e dentre estes trabalhos apenas as espécies *O. thornax, O. varia, O. ventricosa, O. cingarus* e *O. avuncula* são contempladas. Todos os trabalhos incluíram *COI* como marcador molecular, oferecendo informações para futuras análises de *DNA Barcode* ou já aderindo ao método (MEIKLEJOHN et al, 2011; MEIKLEJOHN et al, 2012).

Kutty et al (2010) analisaram hipóteses filogenéticas para o clado Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) com ênfase na superfamília Oestroidea. Os autores analisaram sequências de genes mitocondriais (*12S, 16S, COI*) e genes nucleares (*18S, 28S*, CAD, fator de elongação-1α). A utilização de marcadores moleculares foi eficaz na separação entre os grupos. Apesar da espécie *O. avucula* aparecer como única representante do gênero, várias espécies de sarcofagídeos foram utilizados para a análise filogenética do grupo.

No trabalho de Meiklejohn et al (2011) foi utilizada a técnica de *DNA Barcode* para a identificação de sarcofagídeos da Costa Leste da Austrália. Os

autores analisaram 85 indivíduos representando 16 espécies, incluindo a espécie *O. varia*, obtendo um resultado positivo da utilização do método para tal objetivo. Este trabalho foi ampliado por Meklejohn et al (2012), que analisaram 580 espécimes representando 39 espécies de diversas regiões da Austrália. Apesar da ampliação de dados, *O. varia* permaneceu sendo a única espécie representante do gênero.

Apesar de mais focado em Calliphoridae, Marinho et al (2012) forneceram uma análise filogenética de Oestroidea a partir da observação das regiões gênicas *ITS2*, *28S*, *COI* e *16S*. Apenas três espécies de sarcofagídeos foram consideradas nesse estudo, dentre as quais *O. thornax* tendo sido analisadas as regiões *COI* e *16S*. Como resultado, os autores obtiveram árvores filogenéticas que revelaram relações consistentes para a maior parte dos grupos Calyptrate analisados. Todas as famílias de Oestroidea, incluindo Sarcophagidae, foram agrupadas como grupo monofilético com alto suporte.

Meeiklejoh et al (2013) avaliaram a eficácia de três fontes de dados para a resolução de relações filogenéticas do gênero *Sarcophaga*: *DNA Barcode*, 800 pb do gene nuclear CAD, e características morfológicas. Espécies de outros gêneros foram incluídas no teste de monofilia de Sarcophaginae, incluindo a espécie *O. varia*. Os indivíduos dessa espécie agruparam como monofiléticos, com maior proximidade de *Tricharea* sp.

Utilizando três regiões do *DNA* mitocondrial (*COI, COII* e *ND4*) de 43 espécies de sarcofagídeos, Stamper et al (2013) analisaram as relações filogenéticas de Sarcophaginae. Nesse trabalho encontram-se *O. ventricosa* e *O. cingarus*, grupo monofilético, considerado grupo irmão de *Ravinia*, concordando com o proposto por Roback (1954) e Pape (1996), o que faz com que sejam inclusos dentro da subtribo Raviniina.

No trabalho de Piwczynski et al (2014) o objetivo foi avaliar a quantidade e a qualidade de dados disponíveis no GenBank referentes a Sarcophagidae para a reconstrução filogenética. Além disso, tais dados moleculares foram utilizados para elaboração de uma filogenia dessa família. As espécies *O. ventricosa, O. thornax* e *O. avuncula* foram incluídas na análise, onde se apresentaram como grupo monofilético. Contradizendo os resultados de autores como Giroux et al (2010) (filogenia baseada em caracteres morfológicos) e Stamper (2013) (filogenia

baseada em caracteres moleculares), *Oxysarcodexia* não aparece como grupo irmão de *Ravinia*, mas de *Blaesoxipha*.

# 3 Material e Métodos

## 3.1 Coleta e identificação dos espécimes

Os espécimes foram coletados mensalmente no período de março de 2012 a fevereiro de 2013 em três ambientes diferentes (rural, silvestre e urbano) dos municípios de Bagé (31°19’43”S: 56°6’26”W), Pelotas (31°46’29”S: 52°20’33”W) e Piratini (31°26’32”S: 53°6’16”W), todos pertencentes ao estado do Rio Grande do Sul (Figura 1). Essas localidades apresentam diferentes perfis fisiogeográficos (Campanha, Planície Costeira e Serra do Sudeste, respectivamente) (PILLAR et al, 2009). O ambiente rural é caracterizado pela presença de animais de criação; ambiente silvestre se caracteriza como ambiente natural sem antropização; e o ambiente urbano é caracterizado pela modificação por ações antrópicas.

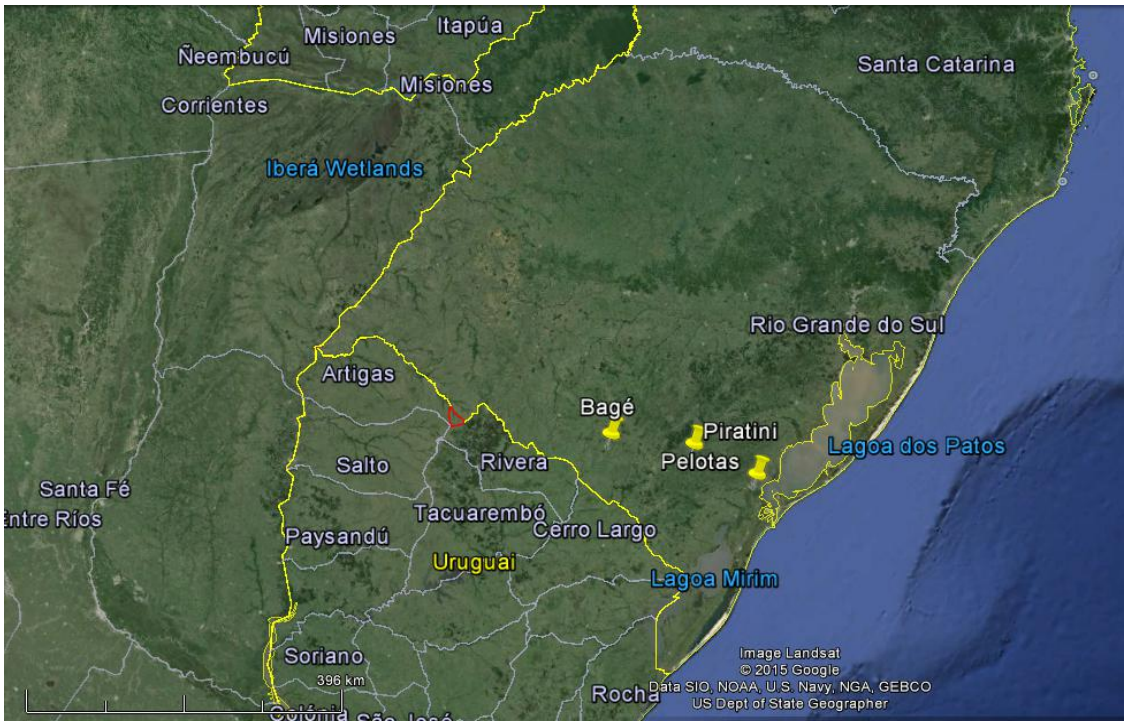



Figura 1 - Mapa do Rio Grande do Sul – Brasil, destacando em amarelo os municípios onde os espécimes foram coletados (Bagé, Pelotas e Piratini). Fonte: Google Earth (2013).

Foram utilizadas armadilhas para coleta de insetos alados adaptadas por Moretti et al (2009) (Apêndice B), as quais permaneceram expostas em ambiente por 72 horas contendo em seu interior fígado bovino, moela de frango e peixe em decomposição como isca atrativa. Em laboratório, o material foi triado, preservado em etanol absoluto e armazenado a 4°C. Posteriormente, os indivíduos foram identificados com auxílio de chaves taxonômicas (CARVALHO; MELLO-PATIU, 2008; BUENAVENTURA et al, 2009; VAIRO et al, 2011), usando método de comparação com espécimes depositados na coleção científica do Laboratório de Entomologia do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, além de consulta especialistas.

## 3.2 Análise molecular

### 3.2.1 Extração de DNA

O DNA de aproximadamente cinco indivíduos machos de cada uma das nove espécies coletadas (*O. paulistanensis, O. thornax, O. culmiforceps, O. varia, O. admixta, O. avuncula, O. bicolor, O. riograndensis* e *O. terminalis*) foi extraído com o kit de extração de *DNA DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen), totalizando 74 espécimes. A terminália de cada macho foi conservada em etanol absoluto, devidamente identificada e mantida no laboratório.

### 3.2.2 Amplificação e sequenciamento do fragmento de interesse

Para a análise de *DNA Barcode*, foi amplificado o gene mitocondrial *COI* utilizando o par de *primers* – LCO1490 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' e HCO2198 3' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 5' –,descritos por Folmer et al. (1994). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µl, com aproximadamente 25ng de *DNA*, 1X de tampão, 2,5mM de $MgCl_2$, 0,4 pmol/µl de cada *primer* e 1U de Taq DNA polimerase. O programa de PCR foi realizado da seguinte forma: 3 min de desnaturação à 95°C, 35 ciclos de 1 min à 95°C, 1 min de anelamento à 48ºC e 1,5 min de extensão à 72°C, finalizando com uma etapa de extensão de 5 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1%, com as amostras coradas com GelRed (Biotium). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit QIAquick® PCR Purification* (Qiagen, Valencia, CA, USA). O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger na empresa Macrogen (http://www.macrogen.com/eng).

### 3.2.3 Análise dos dados moleculares

Após a identificação das sequências, realizado no algoritmo BlastN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), edição e tratamento das sequências, realizado no programa Staden Package (STADEN, 1996), a matriz de sequências foi montada no programa MEGA6 (TAMURA et al, 2013) e o alinhamento foi realizado com o algoritmo ClustalW, inserido no MEGA6. Foi realizada uma análise filogenética utilizando o método de distância evolutiva Neighbor-Joining com o modelo de evolução das sequências Kimura 2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980), conforme indicado pela técnica de *DNA Barcode* (HEBERT et al, 2003). Sequências da espécie *Ravinia advena* (Walker, 1852) e *Musca domestica* Linnaeus, 1758, obtidas no GenBank, foram utilizadas como grupo externo. As divergências nucleotídicas intra e interespecíficas foram analisadas utilizando o programa MEGA6. Além disso, realizamos uma análise de identificação automática de *Barcode Gap* por meio do algoritmo *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (PUILLANDRE et al, 2012) testando os limites de *gap* proposto pelo BOLD por Hebert et al (2003) (3%), além de um intervalo mais baixo (2%) e mais alto (4%).

Para detectar e remover NUMTS das análises (pseudogenes presentes no genoma nuclear), as sequências de COI obtidas do GenBank foram traduzidas e inspecionadas à procura de *stop codons* e erros de matriz de leitura. Em relação às sequências geradas neste estudo, primeiramente verificou-se a identidade decada sequência no BlastN. Como NUMTS tendem a evoluir sobre condições de neutralidade, foi realizado um teste Z baseado em códons para rejeitar ou aceitar a hipótese de neutralidade (dN=dS) e, consequentemente, aceitar ou rejeitar a hipótese alternativa de seleção purificadora (dN<dS), com variância calculada por meio do teste de *bootsrap* (1000 réplicas) (ROBE et al, 2012). Esse teste foi realizado no software Mega6 utilizando o método de evolução das sequências de Nei-Gojobori (NEI; GOJOBORI, 1986).

As análises de comparação entre as sequências foram realizadas utilizando-se tanto análises filogenéticas, como descrito anteriormente, quanto análises de haplótipos em network. Na análise de network, utilizou-se o algoritmo de Median-joining networks por meio do programa Network 4.5.1.0 (BANDELT et al, 1999) (disponível em http://www.fluxus-engineering.com/). Através deste tipo de análise, as relações das sequências entre diferentes pontos de coleta e as variabilidades genéticas puderam ser vistas. As variabilidades genéticas foram analisadas em termos de substituições sinônimas por sítios sinônimos – dS; calculado no programa MEGA6. Assim como nas demais análises, outros programas foram avaliados quanto à eficácia.

Todas as sequências geradas nesse estudo e utilizadas nas análises foram depositadas no BOLD/Genbank, cujos códigos de acesso estão inclusos no Apêndice C.

# 4 Resultados

## 4.1 Identificação de espécies

Foram coletados ao todo 348 indivíduos machos adultos pertencentes ao gênero *Oxysarcodexia*, identificados morfologicamente conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 -Indivíduos machos adultos de *Oxysarcodexia* spp coletados nos municípios de Bagé, Pelotas e Piratini e número de sequências analisadas por espécie/localidade. Espécimes não coletados e sequências não geradas estão representados por "-"

| Espécies | Bagé | | Pelotas | | Piratini | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Total coletado | Sequências analisadas | Total coletado | Sequências analisadas | Total coletado | Sequências analisadas |
| *O. paulistanensis* | 53 | 05 | 50 | 05 | 63 | 05 |
| *O. thornax* | 04 | 02 | 09 | 01 | 39 | 05 |
| *O. culmiforceps* | 33 | 04 | 28 | 05 | 34 | 05 |
| *O. varia* | 06 | - | 03 | 03 | 07 | 05 |
| *O. admixta* | - | - | 01 | 01 | - | - |
| *O. avuncula* | - | - | - | - | 01 | 01 |
| *O. bicolor* | - | - | - | - | 03 | 01 |
| *O. riograndensis* | - | - | 09 | 07 | - | - |
| *O. terminalis* | 01 | 01 | - | - | 03 | - |
| *O. injuncta* | - | - | - | - | 01 | - |

Dentre as espécies coletadas, *O. paulistanensis* foi a mais abundante, com um total de 166 indivíduos para os três municípios. As espécies *O. admixta*, *O. avuncula*, *O. bicolor* e *O. terminalis* se destacam como novos registros para o Rio Grande do Sul.

## 4.2 Análises das sequências

Foi amplificado um fragmento de 687pb do gene mitocondrial *COI* de 60 indivíduos de nove espécies de *Oxysarcodexia* (Apêndice A). Esse fragmento apresenta 161 sítios variáveis, sendo que 134 foram considerados caracteres

parcimoniosamente informativos. As frequências dos nucleotídeos adenina e timina foram altas (65,8%), mas próximo do valor esperado de 50%, e a composição nucleotídica consiste em 29,4% de adenina, 17,8% de citosina, 16,3% de guanina e 36,4% de timina. Os testes para a identificação de NUMTS rejeitaram a hipótese que as sequências estão evoluindo por neutralidade (dN=dS) e de seleção positiva (dN>dS), confirmando que nossas sequências são mitocondriais.

### 4.3 Análise de *DNA Barcode*

#### 4.3.1 Análise de identificação de *Operational Taxonomic Units* (OTUs)

A árvore filogenética, gerada pelo método evolutivo Neighbor-Joining para as análises da relação de monofilia entre as sequências estudadas de *Oxysarcodexia*, permitiu observar agrupamentos de clados monofiléticos pertencentes à mesma espécie, como havia sido identificado a partir da observação morfológica dos caracteres anatômicos, com o suporte dos ramos variando em 99-100% (Figura 2).

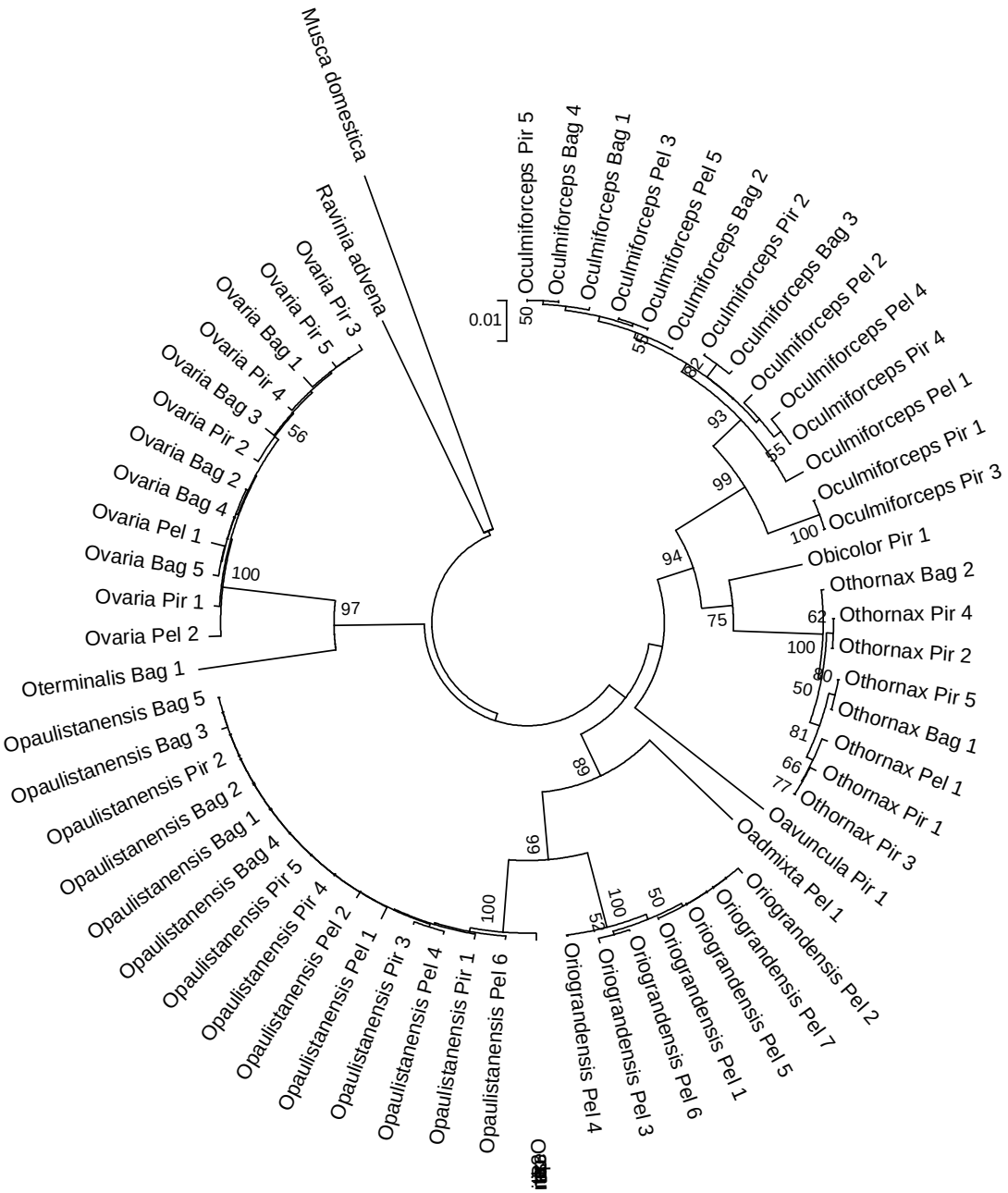



Figura 2 - Árvore filogenética consenso gerada a partir da análise de 59 indivíduos de *Oxysarcodexia*, considerando o método evolutivo Neighbor-Joining e, como modelo de evolução das sequências, o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P). Grupos externos: *Ravinia advena* e *Musca domestica*. Os suportes de ramos estão representados quando superiores a 50.

### 4.3.2 Identificação de *Barcode Gap* de análise por divergência genética

As análises de divergência interespecíficas e intraespecíficas estão, respectivamente, representadas nas tabelas 2. De uma forma geral, os valores de divergência interespecífica variaram de 4,2 a 12,5% (O. varia e O. thornax) (Tabela 2). As divergências intraespecíficas variaram entre 0,2% (*O paulistanensis*) e 1,2% (*O. culmiforceps*) (SE = 0,2%). No entanto, não foi possível analisar esse recurso para espécies com apenas um espécime processado, como foi o caso de *O. admixta*, *O. bicolor* e *O. terminalis*.

Tabela 2–Valores de divergência interespecífica (abaixo da diagonal central), e valores de divergência intraespecífica (em negrito, na diagonal central) das sequências agrupadas por identificação morfológica, em comparações par a par, utilizando modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (%).

| Espécies | O.ad | O.av | O.bi | O.cu | O.pa | O.ri | O.th | O.va | O.te |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***O.ad*** | * | | | | | | | | |
| ***O.av*** | 7,6 | * | | | | | | | |
| ***O.bi*** | 8,5 | 7,6 | * | | | | | | |
| ***O.cu*** | 10,1 | 8,7 | 6,3 | **1,2** | | | | | |
| ***O.pa*** | 6,5 | 9,5 | 8,4 | 9,9 | **0,2** | | | | |
| ***O.ri*** | 6,7 | 8,9 | 9,4 | 9,3 | 4,2 | **0,2** | | | |
| ***O.th*** | 9,8 | 8,3 | 4,4 | 5,8 | 9,6 | 9,4 | **0,5** | | |
| ***O.va*** | 9,6 | 10,3 | 11,0 | 11,9 | 10,2 | 10,7 | 12,5 | **0,5** | |
| ***O.te*** | 9,6 | 9,1 | 10,6 | 11,8 | 11,2 | 12,0 | 11,6 | 6,7 | * |

***** valor não calculado por haver apenas uma sequência representante.
O.ad = *Oxysarcodexia admixta*, O.av = *O. avuncula*, O.bi = *O. bicolor*, O.cu = *O. culmiforceps*, O.pa = *O. paulistanensis*, O.ri = *O. riograndensis*, O.th = *O. thornax*, O.va = *O. varia*, O.te = *O. terminalis*

A figura 3 apresenta os dados da tabela 2 de forma a possibilitar a identificação de potenciais valores de *Barcode gap*. Podemos identificar que nossos resultados apresentam um *gap* entre os valores de divergência genética intraespecíficos e interespecíficos entre 2,1% e 4,0%. Nesta etapa, consideramos 3,05% como valor médio de gap encontrado por esta metodologia.

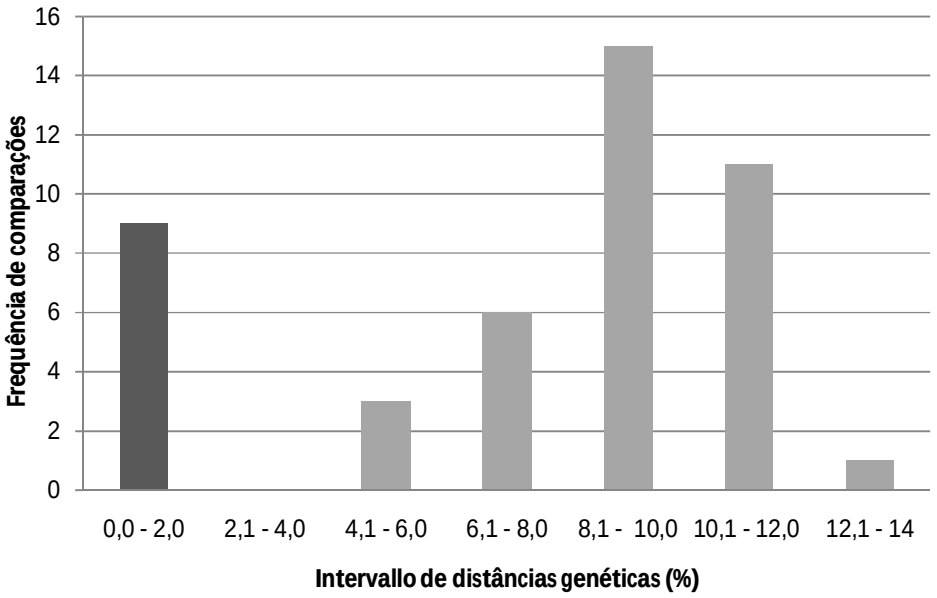



Figura 3 – Distribuição das comparações de divergência genética em intervalos de valores em porcentagem. Divergências intraespecíficas representadas em cinza escuro. Divergências interespecíficas representadas em cinza claro.

### 4.3.3 Análise de identificação automática de *Barcode Gap*

Todos os valores de *Barcode Gap* testados no programa ABGD (2%, 3% e 4%) geraram nove possíveis agrupamentos de potenciais espécies (Apêndice D). O intervalo de divergência genética entre os valores de divergência intraespecífica e interespecífica (*Barcode gap*) gerado pelos dados obtidos neste estudo (Figura 3) foi de 2,1% a 4%, portanto a média foi de 3,05%. Não testamos este valor como *gap* no programa ABGD por ser uma informação redundante. Na tabela 1 do apêndice D foi possível perceber que, na grande maioria dos agrupamentos, houve distinção das sequências em nove potenciais espécies. Quando se observa os agrupamentos de espécies considerando distâncias muito baixas, verifica-se a presença de 10 potenciais espécies, sendo que Oxysarcodexia culmiforceps se dividiu em dois grupos.

### 4.3.4 Análise de rede de haplótipos

Foram gerados ao todo 48 haplótipos dentre as 60 sequências analisadas, com alta diversidade haplotípica (97,7%), 141 sítios polimórficos e diversidade

nucleotídica (π) de 7,2% (Figura 4), com visível separação entre as espécies. Observa-se que a menor variação interespecífica ocorreu entre *O. paulistanensis* e *O. riograndensis*, com 22 passos mutacionais, seguido de *O. thornax* e *O. bicolor*, com 25 passos mutacionais. Já a espécie com maior variação mutacional intraespecífica é O. culmiforceps, com 13 passos mutacionais (Figura 4).

Verifica-se que na análise de network as espécies *O. paulistanensis* e *O. riograndensis* ficam próximas, assim como na árvore filogenética. As espécies *O. varia* e *O. terminalis* também estão próximas em ambas as análises. Observa-se ainda que a menor variação de divergência genética interespecífica ocorreu entre *O. paulistanensis* e *O. riograndensis*, com 22 passos mutacionais (4,2%), seguido de *O. thornax* e *O. bicolor*, com 25 passos mutacionais (4,4%) (Tabela 2; Figura 4).

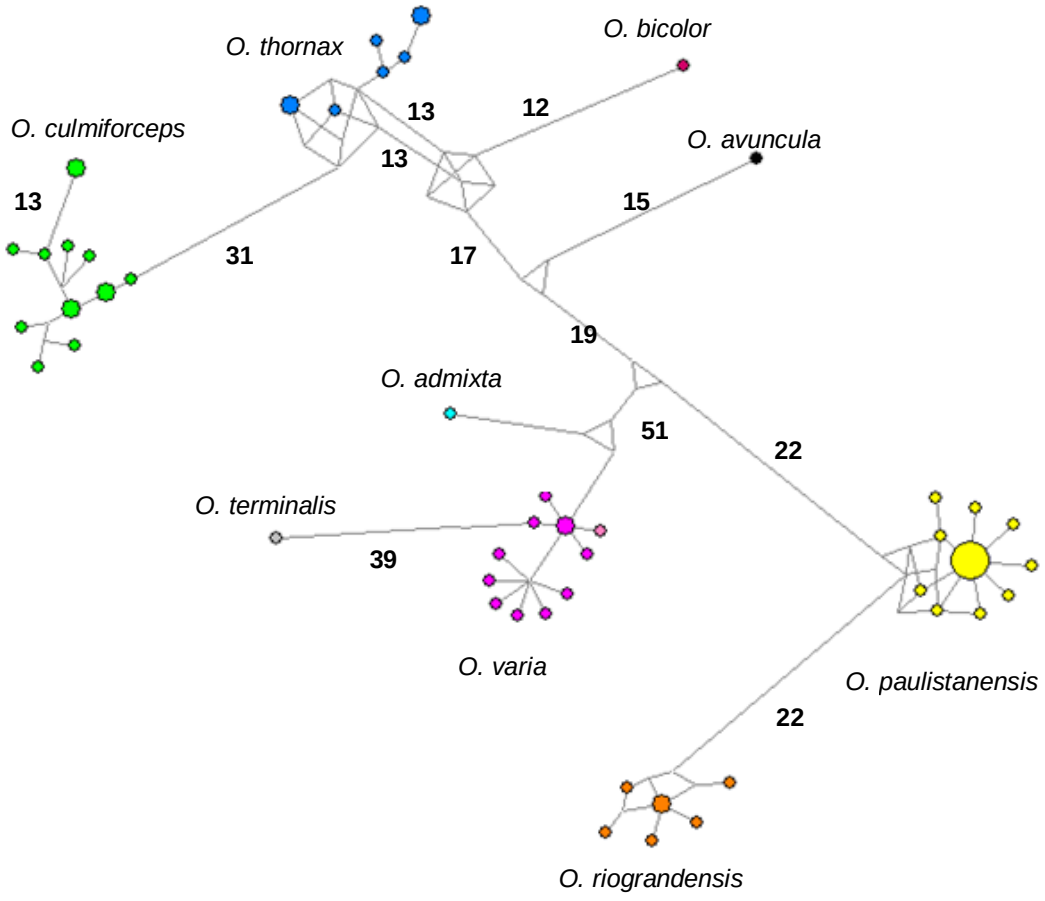



Figura 4. Rede de haplótipos do gene COI de espécies do gênero *Oxysarcodexia.* A frequência dos haplótipos é proporcional ao tamanho dos círculos. As cores dos círculos representam as seguintes espécies: *O. admixta* (azul claro), *O. avuncula* (preto), *O. bicolor* (rosa escuro), *O. culmiforceps* (verde), *O. paulistanensis* (amarelo), *O. terminalis* (cinza), *O. thornax* (azul), *O. riograndensis* (laranja) e *O. varia* (rosa claro). Os passos mutacionais foram representados nessa figura quando superiores a 10.

# 5 Discussão

A região nucleotídica gerada neste estudo está dentro do esperado para a região *COI* do *DNA* mitocondrial para insetos, incluindo no que diz respeito a frequência de adenina e timina (HEBERT et al, 2003). Da mesma forma, a proporção de sítios variáveis encontrados para as espécies de *Oxysarcodexia* aqui investigadas (~ 23,4%) seguiu o padrão relatado para a mesma região gênica de outras espécies de sarcofagídeos: aproximadamente 24% (a partir de um fragmento *COI* de 296 pb, com 71 sítios variáveis) (BAJPAI; TEWARI, 2010) e aproximadamente 36% (a partir de um fragmento de *COI* de 465 pb, com 123 sítios variáveis) (SHARMA et al, 2015).

De acordo com o proposto por alguns autores, *Oxysarcodexia* está distribuído em cinco agrupamentos morfológicos: "grupo *paulistanensis*" (LOPES, 1973; 1975b), "grupo *peltata*" (LOPES, 1975a; TIBANA; MELLO, 1983), "grupo *thornax*" (LOPES, 1976), "grupo *ventricosa*" (LOPES, 1975a) e "grupo *xarcophaga*" (LOPES, 1975a; SOARES; MELLO-PATIU, 2010). Os agrupamentos moleculares obtidos dentro dos clados da árvore filogenética (Figura 2), para algumas espécies, mantiveram uma correspondência esperada com seus respectivos agrupamentos morfológicos, por exemplo, *O. paulistanensis* e *O. riograndensis* pertencentes ao grupo "*paulistanensis*". Por outro lado, espécies que não estão incluídas em um grupo morfológico, mas que apresentam similaridade nesse aspecto foram agrupadas, como por exemplo, *O. terminalis* e *O. varia*.

Apesar da possibilidade de se estabelecer uma relação entre alguns grupos morfológicos e moleculares, algumas espécies apresentaram agrupamentos não esperados. *Oxysarcodexia avuncula* e *O. ventricosa*, por exemplo, agrupadas morfologicamente dentro do grupo "*ventricosa*" juntamente com *O. admixta*, que ficaram em clados distantes (Figura 2).

Segundo o proposto por Hebert et al (2003), uma divergência interespecífica com valor acima de 3% seria suficiente para gerar um *gap* entre duas espécies, ou seja, para que se possa separar uma espécie de outra. Apesar de alguns estudos demonstrarem que este valor varia de acordo com o organismo estudado, e outros

questionarem até mesmo a sua existência, para dípteros parece que este limiar se mantém (MEIER et al, 2008). Neste estudo, todas as divergências interespecíficas se apresentaram com valores acima de 3% (Tabela 2; Figura 3), ou seja, pelo método *DNA Barcode* confirma-se que se trata de espécies distintas. E esses dados foram confirmados com a análise de ABGD. Vários estudos que vêm considerando este valor, proposto pelo método aqui adotado, têm obtido resultados satisfatórios para espécies de Sarcophagidae (MEIKLEJOHN et al, 2011; MEIKLEJOHN et al 2012). Meiklejohn et al (2012), por exemplo, conseguiram separar espécies de alguns gêneros de Sarcophagidae, com divergências interespecíficas variando entre 3,75-11,23%, com exceção de *Sarcophaga megafilosia* e *S. meiofilosia*, com 2,81% de divergência, sugerindo uma divergência recente.

Quanto às divergências intra-específicas, todos os valores foram abaixo do preconizado pelo *DNA Barcode*, resultado esperado, visto que cada valor é gerado para indivíduos que pertencem a uma mesma espécie. Em outros estudos, é possível encontrar diferentes intervalos de divergências intraespecíficas, tais como 0-1,5% (MEIKLEJOHN et al, 2011) e 0-12,8% (MEIKLEJOHN et al, 2012). Neste último, chegou-se a conclusão de que a espécie que apresenta uma alta divergência intraespecífica (*Sarcophaga bancroftorum*), na verdade, representa mais de uma espécie.

Em relação a análise de haplótipos, o alto número de haplótipos gerados se deve à grande diversidade entre as sequências analisadas. Isto vai ao encontro com o observado na divergência intra-específica (Tabela 2) e na formação de clados na árvore filogenética (Figura 2). *Oxysarcodexia paulistanensis* pode ser considerada a espécie cujos indivíduos apresentam menor divergência, pois além dos haplótipos estarem separados por poucos passos mutacionais, um haplótipo se destaca sendo relacionado com oito indivíduos.

Apesar de *O. thornax* ter se distinguido de *O. bicolor* por poucos passos mutacionais (Figura 4) e, por estarem relacionados em um clado com suporte abaixo de 80% na árvore filogenética (Figura 2), é possível que a falta de amostragem explique o baixo suporte que agrupa essas espécies.

Quanto a *O. culmiforceps*, verifica-se que dois indivíduos se distanciam dos demais da espécie com 13 passos mutacionais (Figura 4) e 1,2% de divergência intraespecífica (Tabela 2). A árvore filogenética também representa esta diferença

ao separar esses espécimes em dois clados (Figura 2). Isto, potencialmente, é consequência da alta divergência intraespecífica desta espécie (Tabela 2), verificado também pela separação desses indivíduos como espécie potencial na análise de ABGD (Apêndice D).

Por fim, é possível verificar que há uma falta de amostragem para que se possam definir relações com *O. admixta* e *O. avuncula*. Mesmo assim, cabe ressaltar que, independentemente dos resultados para relações entre espécies, as análises foram eficazes para distinção de espécies. Por outro lado, utilizando a análise de rede de haplótipos, foi impossível determinar alguma relação das amostras com a sua origem geográfica.

## 6 Conclusões

Ao final deste estudo, verificou-se a diferenciação interespecífica de espécies de *Oxysarcodexia* com 687pb, concluindo-se que o método de *DNA barcode* é eficaz para a separação das diferentes espécies, sendo uma potencial alternativa à identificação de fêmeas e imaturos

## Referências


ALVES, A. C. F.; SANTOS, W. E.; CREÃO-DUARTE, A. J. Diptera (Insecta) de importância forense da região Neotropical. **Entomotropica**, Maracay, v. 29, n. 2, p. 77-94, 2014.

ALY, S. M.; WEN, J. Applicability of partial characterization of cytochrome oxidase I in identification of forensically important flies (Diptera) from China and Egypt. **Parasitology Researth**, Berlin, v. 112, p. 2667–2674, 2013.

ALY, S. M.; WEN, J.; CAI, J. Cytochrome oxidase II gene “short fragment” applicability in identification of forensically important insects. **Romanian Journal of Legal Medicine**, Bucharest, v. 20, p. 231-236, 2012.

ALY, S. M.; WEN, J.; WANG X. Identification of forensically important Sarcophagidae (Diptera) based on partial mitochondrial cytochrome oxidase i and II genes. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**,Philadelphia, v. 34, n. 2, p. 159-163, 2013.

AMENDT, J.; KRETTEK, R.; ZEHNER, R. Forensic entomology. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 91, p. 51-65, 2004.

AMORIM, J. A.; SOUZA, C. M.; THYSSEN, P. J. Molecular characterization of *Peckia ( Pattonella ) intermutans* (Walker, 1861) (Diptera: Sarcophagidae) based on the partial sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene. **Journal Forensic Researth**, v. 5, n. 3, 2014.

BAJPAI, N.; TEWARI, R. R. Mitochondrial DNA sequence-based phylogenetic relationship among flesh flies of the genus Sarcophaga (Sarcophagidae: Diptera). **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 89, n. 1, p.51-54, 2010.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.**Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BARCOA, A.; EVANSBC, J.; SCHEMBRIC, P. J.; TAVIANIDE, M.; OLIVERIOA, M. Testing the applicability of DNA barcoding for Mediterranean species of top-shells (Gastropoda, Trochidae, Gibbula s.l.). **Marine Biology Research,** v. 9, n. 8, p. 785-793, 2013

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 de Entomologia**, Curitiba, v. 52, n. 4, p. 606-609, 2008.

BEUTER, L. et al. Insetos de potencial importância forense e na saúde pública em região urbana de Minas Gerais: frequência relativa e variação sazonal de fauna atraída e criada em carcaças de roedores. **Revista de Patologia Tropical** [da] Universidade Federal de Goiás, Goiânia, v. 41, n. 4, p. 480-490, 2012.

BOEHME, P.; AMENDT, J.; ZEHNER, R. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany.**Parasitology Researth**, Berlim, v. 110, p. 2325–2332, 2012.

BUENAVENTURA, E. et al. Sarcophagidae (Diptera) de importancia forense en Colombia: claves taxonómicas, notas sobre subiología y distribución. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 35, n. 2, p. 189-196, 2009.

BUTCHART, S. H. M. et al. Global biodiversity: indicators of recent declines. **Science**, Washington, v. 328, p. 1164-1168, 2010.

BYRD, J. H.; J. L. CASTNER. Insects of forensic importance. In: BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. (Eds.). **Forensic entomology**: the utility of arthropods in legal investigations. 2.ed. New York: CRC Press, 2010. p. 39-126.

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**, Curitiba, v. 52, n.3, p. 390-406, 2008.

CATERINO, M. S.; CHO, S.; SPERLING, F. A. H. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 45, p. 1–54, 2000.

CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 253-272, 1992.

CHERIX, D.; WSS, C.; PAPE, T. Occurrences of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) on human cadavers in Switzerland, and their importance as forensic indicators. **Forensic Science international**, Lausanne, v. 210, p. 158-163, 2012.

DIAS, E. S.; NEVES, D. P.; LOPES, H. S. Estudos sobre a fauna de Sarcophagidae (Diptera) de Belo horizonte, Minas Gerais III – Atratividade das iscas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 413-417, 1984.

ESTRADA, D. A.; GRELLA, M. D.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 203-207, 2009.

FARIA, M. B.; OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Filogeografia de populações brasileiras de *Marmosa (Marmosa) murina* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Revista Nordestina de Biologia**, v. 21, n. 2, p. 27-52, 2013.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Cambridge, v. 3, p. 294–299, 1994.

GENNARDT, Dorothy E. **Forensic entomology**: an introduction. : Wiley-Blackeell, 2007. 224 p.

GIROUX, M.; PAPE, T.; WHEELER, T. A. 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**, Londres, v. 158, p.740-778, 2010.

GUO, Y. D. et al. Identification of the forensically important sarcophagid flies *Boerttcherisca peregrina*, *Parasarcophaga albiceps* and *Parasarcophaga dux* (Diptera: Sarcophagidae) based on COII gene in China. **Tropical Biomedicine**, v. 27, n. 3, p. 451–460, 2010a.

GUO, Y. D. et al. Identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) based on COI gene in China. **Romanian Journal of Legal Medicine**, Bucharest, v. 18, p. 217 – 224, 2010b.

GUO, Y. D. et al. Identification of forensically important flesh flies based on a shorter fragment of the cytochrome oxidase subunit I gene in China. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford v. 26, n. 3, p. 307-313. 2012a.

GUO, Y. D. et al. The utility of Mitochondrial DNA fragments for genetic identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) in China. **Tropical Biomedicine**, v. 29, n. 1, p. 51-60, 2012b.

HAJIBABAEI, M.; JANZEN, D. H.; BURNS, J. N.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 103 n. 4, p. 968–971, 2006.

HARVEY, M. L.; DADOUR, I. R.; GAUDIERI, S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important flies species (Diptera) in western Australia. **Forensic Science International**, Lausanne, v.131, p.134-139, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society**, Londres, v. 270, p. 313–321, 2003.

JORDAENS, K. et al. Identification of forensically important *Sarcophaga* species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene. **International Journal Legal Medicine**, Heidelberg, v. 127, p. 491-504, 2013.

KETTLE, Douglas Steawart. **Medical and veterinary entomology**. London and Sydney: Croom Helin, 1984. 658 p.

KIM, Y. H. et al. Molecular identification of necrophagous Muscidae and Sarcophagidae fly species collected in Korea by mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I nucleotide sequences. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-9.

KIMURA, Motoo. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.16, p. 111–120, 1980.

KUTTY, S. N. et al. 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**, Oxford, v. 35, p. 614–635, 2010.

LOPES, Hugo de Sousa. **A Catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States:** Family Sarcophagidae. Departamento de Zoologia, Secretaria da Agricultura, São Paulo, v. 103, p. 1-88, 1969.

LOPES, Hugo de Sousa.Collecting and rearing sarcophagid flies (Diptera) in Brazil during forty years. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de janeiro, v. 45, p. 279-299, 1973.

LOPES, Hugo de Sousa. New or little known *Oxysarcodexia* (Diptera, Sarcophagidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 35, p. 461-483, 1975a.

LOPES, Hugo de Sousa. Female holotypes of some American species described by Francis Walker and J. Macquart (Diptera, Sarcophagidae, Calliphoridae).**Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 2, p. 535-550, 1975b.

LOPES, Hugo de Sousa.On the holotypes, mostly females, of some Sarcophagidae (Diptera) described by Francis Walker. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 629-641, 1976.

MARIANI, R. et al. Entomofauna of a buried body: study of the exhumation of a human cadaver in Buenos Aires, Argentina. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 237, p. 19-26, 2014.

MARINHO, M. A. T. et al. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: insight into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 65, p. 840-854, 2012.

MATUSZEWSK, S.; SZAFALOWICZ, M.; JARMUSZ, M. Insects colonizing carcasses in open and forest habitats of Central Europe: search for indicators of corps relocation. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 231, p. 234-239, 2013.

MEIER, R.; ZHANG, G.; ALI, F. The Use of Mean Instead of Smallest Interspecific Distances Exaggerates the Size of the "Barcoding Gap" and Leads to Misidentification. **Systematic Biology**, Basingstoke, v.57, n. 5, p. 809-813, 2008.

MEIKLEJOHN, K. A. et al. Comprehensive evaluation of DNA barcoding for the molecular species identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). **Invertebrate Systematics**, Collingwood, v. 26, p. 515–525, 2012.

MEIKLEJOHN, K. A.; WALLMAN J. F.; DOWTON, M. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). **International Journal Legal Medicine**, Heidelberg, v. 125, p. 27–32, 2011.

MEIKLEJONH, K. A. et al. Utility of COI, CAD and morphological data for resolving relationships withing the genus *Sarcophaga* (*sensu* lato) (Diptera: Sarcophagidae): A preliminary study. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 69, p. 133-141, 2013.

MORETTI, T.C.; THYSSEN, P. J.; SOLIS, D. R. Breeding of the scuttle fly *Megaselia scalaris* in a fish carcass and Implications for the use in forensic entomology (Diptera: Phoridae). **Entomology Generalis**, Stuttgart, v. 31, n. 4, p. 349–353, 2009.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 3, p. 418-426, 1986.

OLIVEIRA-COSTA, Janira. **Entomologia forense:** quando os insetos são vestígios. Campinas: Millennium, 2003. 257 p.

PAI, C. et al. Identification of forensically important Sarcophagidae (Diptera) by DNA- based method coupled with morphological characteristics. **Romanian Journal of Legal Medicine**, Bucharest, v. 22, p. 209-214, 2014.

PAPE, Thomas. **Catalogue of the Sarcophagidae of the world (Insecta: Diptera).** Gainesville: Associated Publishers, 1996. 558 p.

PILLAR, V. D. et al. **Campos sulinos.** Conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília: MMA, 2009. 403 p.

PINTO, A. D. et al. Species identification in fish fillet products using DNA barcoding. **Fisheries Research**, v. 170, p. 9-13, 2015.

PIWCZYNSKI, M. et al. A large-scale molecular phylogeny of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). **Systematic Entomology,** Oxford, v. 39, p. 783–799, 2014.

POHJOISMAKI, J. L. O. et al. Indoors forensic entomology: colonization of human remain in closed environments by specific species of sarcosaprophagous flies. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 199, p. 38-42, 2010.

RAJAGOPAL, K.;NAZNI.W. A.; CHYE, T. T.; LIM, L. H.; AZIRUN, M. S. Molecular identification of fly maggots recovered from corpses during death scene investigation in Malaysia. **Asia-Pacific Journal of Moleular Biology and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 73-82, 2012.

ROBACK, S. S. The evolution and taxonomy of the Sarcophaginae (Diptera, Sarcophagidae). **Illinois Biological Monographs**, v.23, p.1–181, 1954.

ROBE, L. J.; MACHADO, S.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L. The DNA barcoding and the caveats with respect to its application to some species of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda). **Zoological Science**, Tokyo, v. 29, p. 714-724, 2012

RODRIGUEZ, W. C.; BASS, W. M. Insect activity and its relationship to decay rates of human cadavers in east Tennessee. **Journal Forensic Science**, Londres, v. 28, p. 423-432, 1983.

ROSA, T. A. et al. Dípteros de interesse forense em dois perfis de vegetação de cerrado em Uberlândia, MG.**Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 6, p. 859-866, 2009.

ROWAN D. H.; BARRETT, P. D. N. Hebert. Identifying spiders through DNA barcodes.**Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 481-491, 2005.

SALAZAR-ORTEGA, J. A.; LUZ, E. A.; GOMEZ-PIÑEREZ, M. A check list of necrophagous flies (Diptera: Calyptratae) from urban area in Medellín, Colombia. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 83, p. 562-565, 2012.

SILVEIRA, Beatriz Ern da. **Morfometria geométrica comparativa de asas de Sarcophagidae (Diptera) de interesse forense: uma ferramenta eficaz para a identificação?** 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SMITH, Kenneth G.V. **A manual of forensic entomology.** Ithaca Nova York: British Museum of Natural History and Cornell University Press, 1986. 205 p.

SOARES, W. F.; MELLO-PATIU, C. A. Two new Neotropical species of the genus *Oxysarcodexia* Townsend (Diptera, Sarcophagidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 54, n. 1, p. 72-75, 2010.

SONG, Z. K.; WANG, X. Z.; LIANG, G. Q. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). **Forensic Science International**, Lausanne, v. 175, p. 17-22, 2008.

SOUZA, Carina Mara de. **Diversidade de espécies e abordagem filogenética do gênero *Oxysarcodexia* Townsend, 1917 (Diptera: Sarcophagidae)**. 2014. 212f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

SOUZA, A. M.; LINHARES, A. X. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 11, p. 8-12, 1997.

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. **Journal of Forensic Science**, Londres, v. 39, n. 2, p. 418–427, 1994.

STADEN, Rodger. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 5, p. 233-241, 1996.

STAMPER, T. et al. Phylogenetic relationships of flesh flies in the subfamily Sarcophaginae based on three mtDNA fragments (Diptera: Sarcophagidae). **Systematic Entomology**, Oxford, v. 38, p. 35–44, 2013.

TABOR, K. L.; FELL, R. D.; BREWSTER, C. C. Insect fauna visiting carrion in Southwest Virginia. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 150, p. 73-80, 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

THYSSEN, Patrícia Jacqueline. Entomologia Forense. In. MARCONDES, Carlos Brisola. **Entomologia médica e veterinária,** 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 129-137.

THYSSEN, P. J. et al. 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**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 777-783, 2005.

TIBANA, R.; MELLO, C. A. Estudo sobre as fêmeas de *Oxysarcodexia* do Grupo Peltata (Diptera, Sarcophagidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 241-250, 1983.

VAIRO, K. P.; MELLO-PATIU, C. A.; CARVALHO, C. J. B. Pictorial identification key for species of Sarcophagidae (Diptera) of potential forensic importance in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 55, n. 3, p. 333-347, 2011.

VAIRO, K. P. et al. Sarcophagidae (Diptera) with forensic potential in Amazonas: a pictorial key. **Tropical Zoology**, v. 27, n. 4., p. 140-152, 2014.

VAIRO, K. P.; MOURA, M. O.; MELLO-PATIU, C. A. Comparative morphology and identification key for females of nine Sarcophagidae species (Diptera) with forensic importance in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 59, p. 177-187, 2015.

VERVES, Y. Prof. Hugo de Souza Lopes and the modern system of Sarcophagidae (Diptera). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 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 Science**, Londres, v. 46, n. 5, p. 1098-1102, 2001.

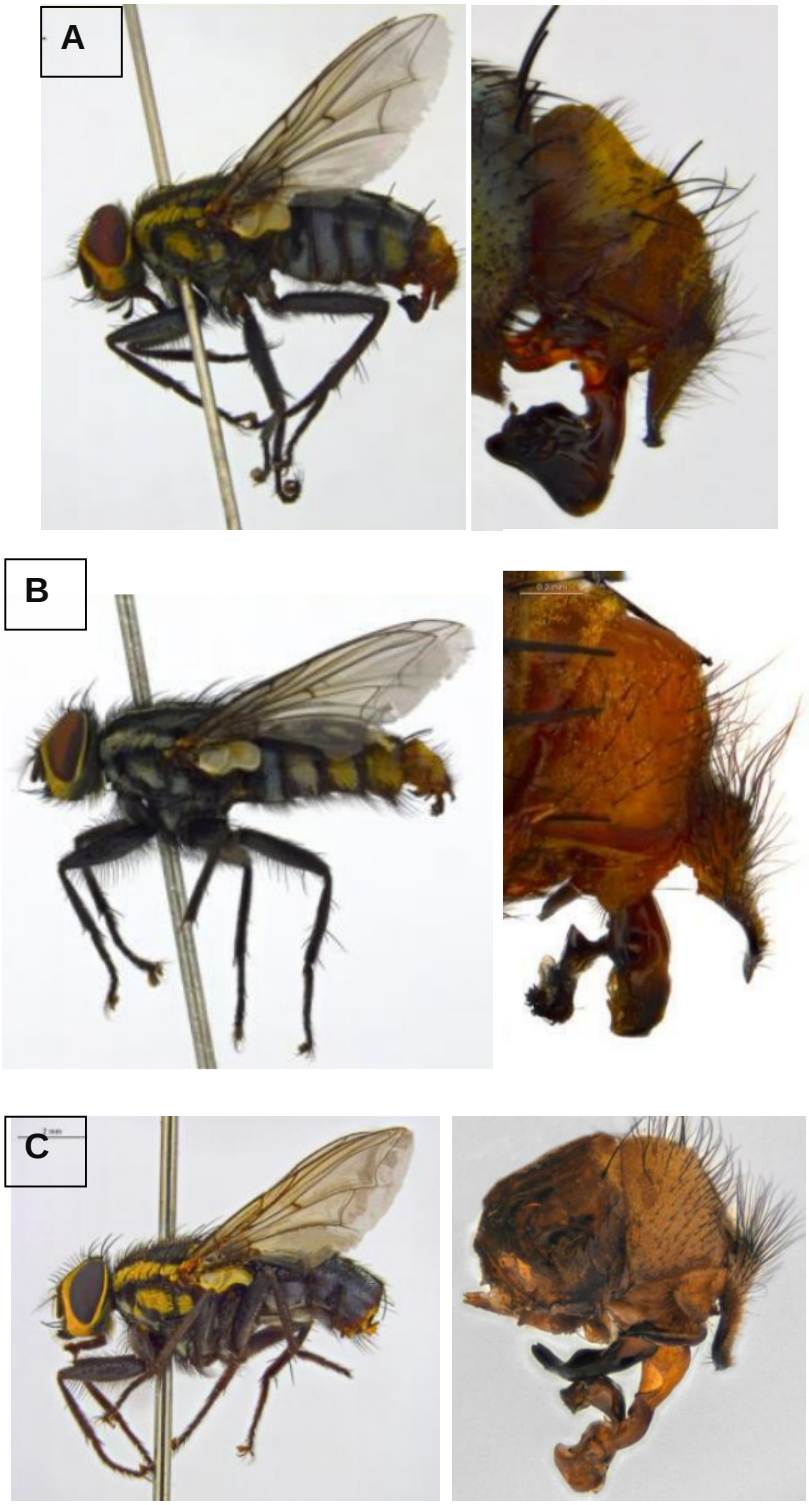
WOLFF, M. et al. A preliminary study of forensic entomology in Medllín, Colombia. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 120, p. 53-59, 2001.

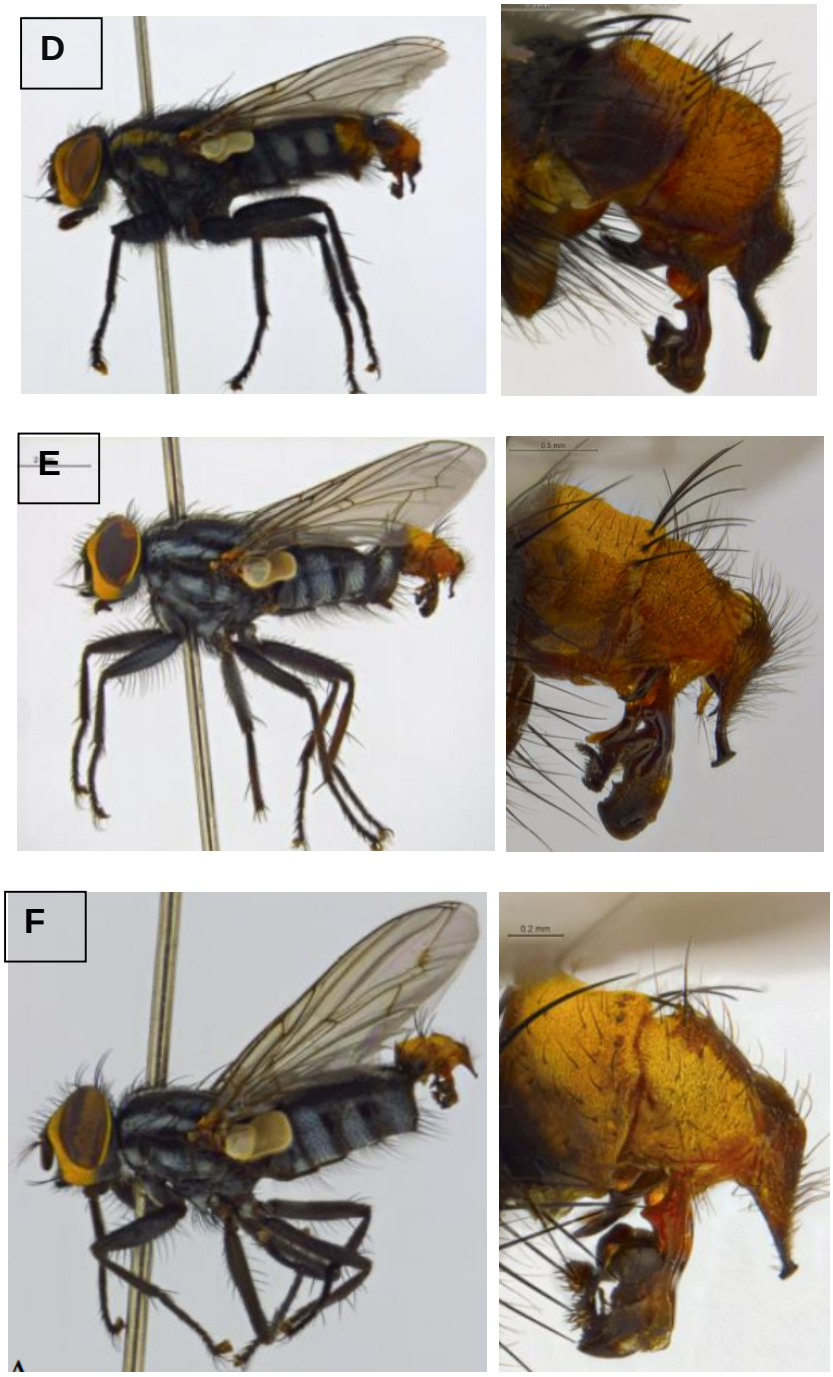
ZAIDAN, Fernanda Couto. **Caracterização molecular de três species de *Trachycephalus* (Anura: Hylidae): investigando potenciais híbridos interespecíficos**. 2014. 73f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

ZEHNER, R. et al. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). **International Journal Legal Medicine**, Heidelberg, v. 118, p. 245–247, 2004.

# Apêndices

**Apêndice A – Indivíduos machos adultos das espécies de *Oxysarcodexia* utilizadas neste estudo**




D
E
F

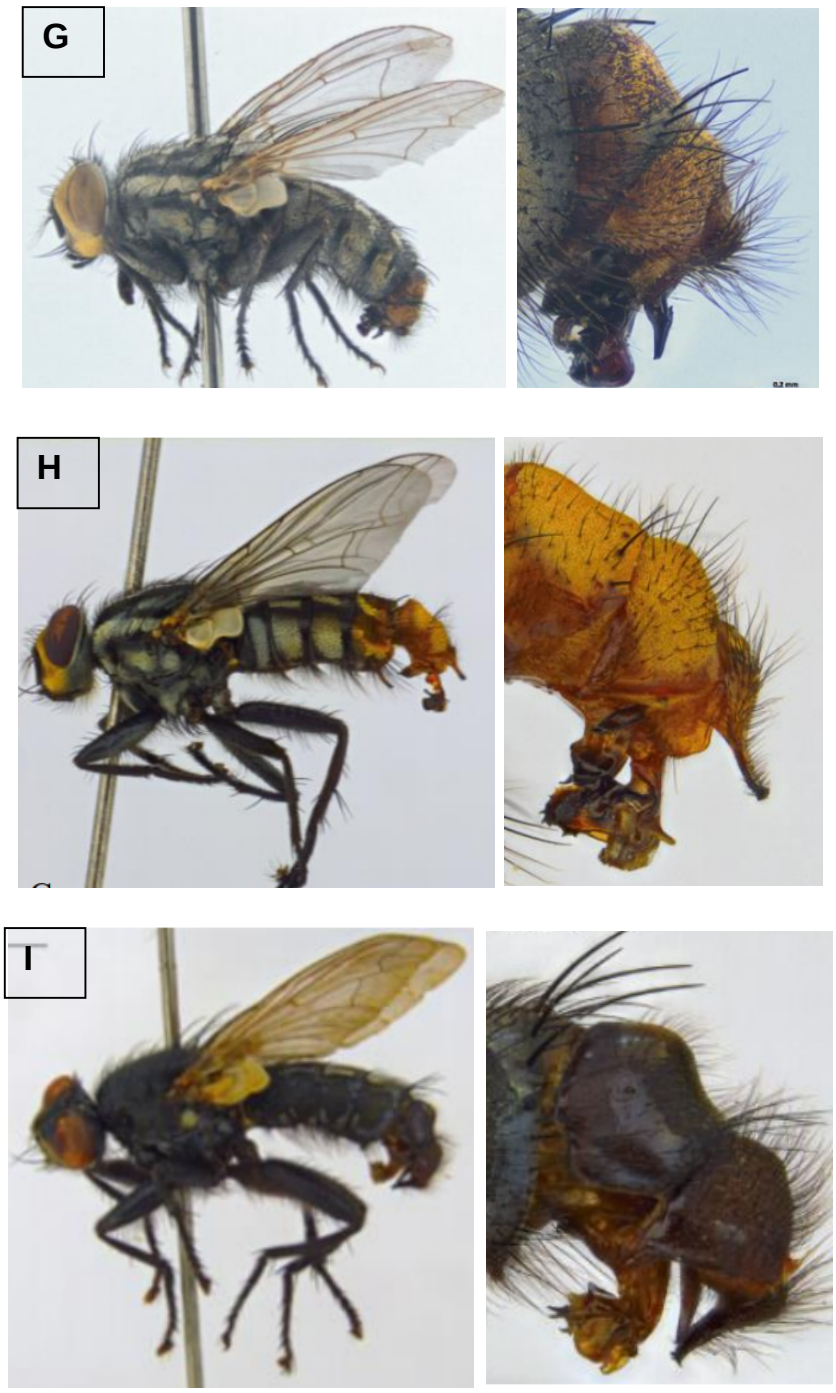



Figura 1A - Indivíduos adultos de *Oxysarcodexia,* à direita, e a aproximação da genitália masculina exposta, caráter diagnóstico para espécies de Sarcophagidae, à esquerda. A = *O. admixta*; B = *O. avuncula*; C = *O. bicolor*; D = *O. culmiforceps*; E = *O. paulistanensis*; F = *O. riograndensis*; G = *O. terminalis*; H = *O. thornax*; I = O. varia. Fonte: SOUZA, 2015

## Apêndice B – Armadilha de coleta

Figura 1B – Armadilha de coleta de insetos alados adaptadas pó Moretti et al (2009)

## Apêndice C – Dados dos espécimes analisados neste estudo

Tabela 1C – Informações sobre os espécimes investigados nesse estudo

| Espécies | Código do espécime | Localidade | Voucher | #Acesso BOLD/ GenBank |
|---|---|---|---|---|
| *Oxysarcodexia admixta* (Lopes, 1933) | Oadmixta Pel 1 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 115 | KT762624 |
| *Oxysarcodexia avuncula* (Lopes, 1933) | Oavuncula Pir 1 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 117 | KT799777 |
| *Oxysarcodexia bicolor* Lopes, 1946 | Obicolor Pir 1 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 118 | KT799778 |
| *Oxysarcodexia culmiforceps* Dodge, 1966 | Oculmiforceps Bag 1 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 134 | KT808268 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Bag 2 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 135 | KT821070 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Bag 3 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 136 | KT821071 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Bag 4 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 137 | KT821072 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pel 1 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 129 | KT821073 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pel 2 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 130 | KT821074 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pel 3 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 131 | KT821075 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pel 4 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 132 | KT821076 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pel 5 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 133 | KT821077 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pir 1 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 124 | KT832536 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pir 2 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 125 | KT832537 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pir 3 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 126 | KT832538 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pir 4 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 127 | KT832539 |
| *O. culmiforceps* | Oculmiforceps Pir 5 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 128 | KT832540 |
| *Oxysarcodexia paulistanensis* Mattos, 1919 | Opaulistanensis Bag 1 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 138 | KT864706 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Bag 2 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 139 | KT864707 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Bag 3 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 140 | KT864708 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Bag 4 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 141 | KT864709 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Bag 5 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 142 | KT864710 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pel 1 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 143 | KT864711 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pel 2 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 144 | KT878388 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pel 3 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 145 | KT878389 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pel 4 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 146 | KT878390 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pel 6 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 148 | KT878391 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pir 1 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 149 | KT878392 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pir 2 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 150 | KT878393 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pir 3 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 151 | KT878394 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pir 4 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 152 | KT878395 |
| *O. paulistanensis* | Opaulistanensis Pir 5 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 153 | KT878396 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Oxysarcodexia riograndensis* Lopes, 1946 | Oriograndenisis Pel 1 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 155 | KT878397 |
| *O. riograndensis* | Oriograndenisis Pel 2 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 156 | KT878398 |
| *O. riograndensis* | Oriograndenisis Pel 3 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 157 | KT878399 |
| *O. riograndensis* | Oriograndenisis Pel 4 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 158 | KT878400 |
| *O. riograndensis* | Oriograndenisis Pel 5 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 159 | KT878401 |
| *O. riograndensis* | Oriograndenisis Pel 6 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 160 | KT878402 |
| *O. riograndensis* | Oriograndenisis Pel 7 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 161 | KT878403 |
| *Oxysarcodexia terminalis* Wiedemann, 1830 | Oterminalis Bag 1 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 162 | KT878404 |
| *Oxysarcodexia thornax* Walker, 1849 | Othornax Bag 1 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 163 | KT878405 |
| *O. thornax* | Othornax Bag 2 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 164 | KT878406 |
| *O. thornax* | Othornax Pel 1 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 165 | KT878407 |
| *O. thornax* | Othornax Pir 1 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 167 | KT878408 |
| *O. thornax* | Othornax Pir 2 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 168 | KT878409 |
| *O. thornax* | Othornax Pir 3 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 169 | KT878410 |
| *O. thornax* | Othornax Pir 4 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 170 | KT878411 |
| *O. thornax* | Othornax Pir 5 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 171 | KT878412 |
| *Oxysarcodexia varia* Walker, 1836 | Ovaria Bag 1 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 172 | KT832541 |
| *O. varia* | Ovaria Bag 2 | Bagé, Rio Grande do Sul, | ZUEC DIP 173 | KT832542 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Brasil | | |
| *O. varia* | Ovaria Bag 3 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 174 | KT832543 |
| *O. varia* | Ovaria Bag 4 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 175 | KT832544 |
| *O. varia* | Ovaria Bag 5 | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 176 | KT832545 |
| *O. varia* | Ovaria Pel 1 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 177 | KT832546 |
| *O. varia* | Ovaria Pel 2 | Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 178 | KT832547 |
| *O. varia* | Ovaria Pir 1 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 180 | KT832548 |
| *O. varia* | Ovaria Pir 2 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 181 | KT832549 |
| *O. varia* | Ovaria Pir 3 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 182 | KT832550 |
| *O. varia* | Ovaria Pir 4 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 183 | KT832551 |
| *O. varia* | Ovaria Pir 5 | Piratini, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 184 | KT832552 |
| *Ravinia advena* (Walker, 1852)[+] | Ravinia ádvena | Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil | ZUEC DIP 185 | KT832553 |
| *Musca domestica* Linnaeus, 1758* [+ 6] | Musca domestica | United States of America | - | KC617838 |

## Apêndice D – Resultado gerado pelo *Automatic Barcode Gap Discovery*

Tabela 1D - Resultado da análise de identificação automática de *Barcode Gap* pelo *Automatic Barcode Gap Discovery* – 1%, 3% e 4% de valor relativo de *gap*

| Combinação | Grupo | Espécies discriminadas |
|---|---|---|
| **1** | 1 | O.paulistanensis_Pel_6 |
| | 2 | O.thornax_Pir_1; O.thornax_Pir_2; O.thornax_Pir_3; O.thornax_Pir_4; O.thornax_Pir_5; O.thornax_Pel_1; O.thornax_Bag_1; O.thornax_Bag_2 |
| | 3 | O.culmiforceps_Pel_1; O.culmiforceps_Pel_2; O.culmiforceps_Pel_3; O.culmiforceps_Pel_4; O.culmiforceps_Pel_5; O.culmiforceps_Pir_2; O.culmiforceps_Pir_4; O.culmiforceps_Pir_5; O.culmiforceps_Bag_1; O.culmiforceps_Bag_2; O.culmiforceps_Bag_3; O.culmiforceps_Bag_4; |
| | 4 | O.varia_Pir_1; O.varia_Pir_2; O.varia_Pir_3; O.varia_Pir_4; O.varia_Pir_5; O.varia_Pel_1; O.varia_Pel_2; O.varia_Bag_1; O.varia_Bag_2; O.varia_Bag_3; O.varia_Bag_4; O.varia_Bag_5 |
| | 5 | O.admixta_Pel_1 |
| | 6 | O.avuncula_Pir_1 |
| | 7 | O.bicolor_Pir_1 |
| | 8 | O.riograndensis_Pel_1; O.riograndensis_Pel_2; O.riograndensis_Pel_3; O.riograndensis_Pel_4; O.riograndensis_Pel_5; O.riograndensis_Pel_6; O.riograndensis_Pel_7 |
| | 9 | O.terminalis_Bag_1 |
| | 10 | O.paulistanensis_Pir_2; O.paulistanensis_Pir_4; O.paulistanensis_Pir_5; O.paulistanensis_Bag_1; O.paulistanensis_Bag_2; O.paulistanensis_Bag_4; O.paulistanensis_Bag_5; |
| | 11 | O.paulistanensis_Pel_3 |
| | 12 | O.paulistanensis_Pel_4 |
| | 13 | O.paulistanensis_Bag_3 |
| | 14 | O.paulistanensis_Pel_1 |
| | 15 | O.paulistanensis_Pel_2 |
| | 16 | O.paulistanensis_Pir_1 |
| | 17 | O.paulistanensis_Pir_3 |
| | 18 | O.culmiforceps_Pir_1; O.culmiforceps_Pir_3 |
| **2, 3 e 4** | 1 | O.paulistanensis_Pel_1; O.paulistanensis_Pel_2; O.paulistanensis_Pel_3; O.paulistanensis_Pel_4; O.paulistanensis_Pel_6; O.paulistanensis_Pir_1; O.paulistanensis_Pir_2; O.paulistanensis_Pir_3; O.paulistanensis_Pir_4; O.paulistanensis_Pir_5; O.paulistanensis_Bag_1; O.paulistanensis_Bag_2; O.paulistanensis_Bag_3; O.paulistanensis_Bag_4; O.paulistanensis_Bag_5 |
| | 2 | O.thornax_Pir_1; O.thornax_Pir_2; O.thornax_Pir_3; O.thornax_Pir_4; |

| | | |
|---|---|---|
| | 3 | O.thornax_Pir_5; O.thornax_Pel_1; O.thornax_Bag_1; O.thornax_Bag_2 O.culmiforceps_Pel_1; O.culmiforceps_Pel_2; O.culmiforceps_Pel_3; O.culmiforceps_Pel_4; O.culmiforceps_Pel_5; O.culmiforceps_Pir_2; O.culmiforceps_Pir_4; O.culmiforceps_Pir_5; O.culmiforceps_Bag_1; O.culmiforceps_Bag_2; O.culmiforceps_Bag_3; O.culmiforceps_Bag_4; |
| | 4 | O.varia_Pir_1; O.varia_Pir_2; O.varia_Pir_3; O.varia_Pir_4; O.varia_Pir_5; O.varia_Pel_1; O.varia_Pel_2; O.varia_Bag_1; O.varia_Bag_2; O.varia_Bag_3; O.varia_Bag_4; O.varia_Bag_5 |
| | 5 | O.admixta_Pel_1 |
| | 6 | O.avuncula_Pir_1 |
| | 7 | O.bicolor_Pir_1 |
| | 8 | O.riograndensis_Pel_1; O.riograndensis_Pel_2; O.riograndensis_Pel_3; O.riograndensis_Pel_4; O.riograndensis_Pel_5; O.riograndensis_Pel_6; O.riograndensis_Pel_7 |
| | 9 | O.terminalis_Bag_1 |
| | 10 | O.culmiforceps_Pir_1; O.culmiforceps_Pir_3 |
| **5, 6, 7 e 8** | 1 | O.paulistanensis_Pel_1; O.paulistanensis_Pel_2; O.paulistanensis_Pel_3; O.paulistanensis_Pel_4; O.paulistanensis_Pel_6 O.paulistanensis_Pir_1; O.paulistanensis_Pir_2; O.paulistanensis_Pir_3; O.paulistanensis_Pir_4; O.paulistanensis_Pir_5; O.paulistanensis_Bag_1; O.paulistanensis_Bag_2; O.paulistanensis_Bag_3; O.paulistanensis_Bag_4; O.paulistanensis_Bag_5 |
| | 2 | O.thornax_Pir_1; O.thornax_Pir_2; O.thornax_Pir_3; O.thornax_Pir_4; O.thornax_Pir_5; O.thornax_Pel_1; O.thornax_Bag_1; O.thornax_Bag_2 |
| | 3 | O.culmiforceps_Pel_1; O.culmiforceps_Pel_2; O.culmiforceps_Pel_3; O.culmiforceps_Pel_4; O.culmiforceps_Pel_5; O.culmiforceps_Pir_1; O.culmiforceps_Pir_2; O.culmiforceps_Pir_3; O.culmiforceps_Pir_4; O.culmiforceps_Pir_5; O.culmiforceps_Bag_1; O.culmiforceps_Bag_2; O.culmiforceps_Bag_3; O.culmiforceps_Bag_4 |
| | 4 | O.varia_Pir_1; O.varia_Pir_2; O.varia_Pir_3; O.varia_Pir_4; O.varia_Pir_5; O.varia_Pel_1; O.varia_Pel_2; O.varia_Bag_1; O.varia_Bag_2; O.varia_Bag_3; O.varia_Bag_4; O.varia_Bag_5 |
| | 5 | O.admixta_Pel_1 |
| | 6 | O.avuncula_Pir_1 |
| | 7 | O.bicolor_Pir_1 |
| | 8 | O.riograndensis_Pel_1; O.riograndensis_Pel_2; O.riograndensis_Pel_3; O.riograndensis_Pel_4; O.riograndensis_Pel_5; O.riograndensis_Pel_6; O.riograndensis_Pel_7 |
| | 9 | O.terminalis_Bag_1 |