

GUILHERME SCHNELL E SCHÜHLI

SEQÜÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAIS E NUCLEARES APLICADAS À
FILOGENIA DE MUSCIDAE (DIPTERA)

Tese apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de concentração em
Entomologia, da Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial para
a obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

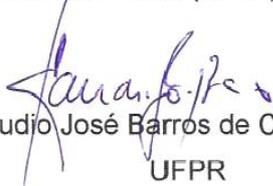
Curitiba

2005

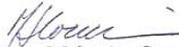
GUILHERME SCHNELL E SCHÜHLI

“SEQÜÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAIS E NUCLEARES APLICADAS À
FILOGENIA DE MUSCIDAE (DIPTERA).”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Doutor em
Ciências”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela
Comissão formada pelos professores:



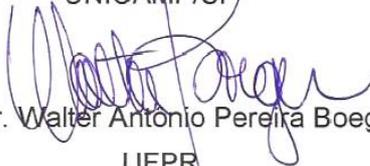
Prof. Dr. Claudio José Barros de Carvalho (Orientador)
UFPR



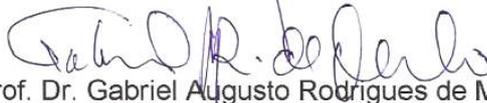
Profa. Dra. Márcia Souto Couri
MN/UFRJ



Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin
UNICAMP/SP



Prof. Dr. Walter Antonio Pereira Boeger
UFPR



Prof. Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo
UFPR

Curitiba, 23 de fevereiro de 2005.

Los Enigmas

Me habeis preguntado que hila el crustaceo
 entre sus patas de oro
 y os respondo: El mar lo sabe.
 Me decis, que espera la ascidia en su campana
 trasparente? Que espera?
 Yo os digo, espera como vosotros el tiempo.
 Me preguntais: a quien alcanza el abrazo del alga
 Macrocostis?
 Indagadlo, indagadlo a cierta hora, en cierto mar
 que conozco.
 Sin duda me preguntareis por el marfil maldito
 del narwhal, para que yo os conteste
 de que modo el unicornio marino agoniza
 arponeado.
 Me preguntais tal vez por las plumas alcionarias
 que tiemblan
 en los puros origenes de la marca austral?
 Y sobre la construccion cristalina del polipo
 habeis barajado, sin duda,
 una pregunta mas, desgranandola ahora?
 Quereis saber la electrica materia de las puas
 del fondo?
 La armada estalactita que camina
 quebrandose?
 El anzuelo del pez pescador, la musica extendida?
 en la profundidad como un hilo de agua?

Yo os quiero decir que esto lo sabe el mar,
 que la vida en sus arcas
 es ancha como la arena, innumerable y pura
 y entre las uvas sanguinarias el tiempo ha pulido
 la dureza de un petalo, la luz de la medusa
 y ha desgranado el ramo de sus hebras de corales
 desde una cornucopia de nacar infinito.

Yo no soy sino la red vacia que adelanta
 ojos humanos, muertos en aquellas tinieblas,
 dedos acostumbrados al triangulo, medidas
 de un timido hemisferio de naranja.

Anduve como vosotros escarbando
 la estrella interminable,
 y en mi red, en la noche, me desperte desnudo,
 unica presa, pez encerrado en el viento.

Pablo Neruda

Cantos Generales, 1950.

“Nature is mortal; we shall outlive her. When all the suns and nebulae have passed away, each one of you will still be alive. Nature is only the image, the symbol; but it is the symbol Scritpures invites me to use. We are summoned to pass in through nature, beyond her, into that splendour wich she fitfully reflects. And in there, in beyond nature, we shall eat of the tree of life.”

C.S. Lewis

Transpositions and others address, 1949.

Índice

Índice	iii
Agradecimentos	v
Prefácio	1
Referências Bibliográficas	4
Sobre o status taxonômico de <i>Ophyra</i> Robineau-Desvoidy (Muscidae): uma abordagem molecular.	7
Abstract.....	7
Introdução.....	7
<i>Ophyra</i> Robineau-Desvoidy: História Taxonômica	8
Materiais e métodos.....	10
Amostragem dos táxons	10
Métodos laboratoriais	12
Análise filogenética	14
Resultados e discussão	15
Conclusão	19
Agradecimentos	19
Referências	20
Relações filogenéticas em Muscidae (Diptera, Calyptratae) baseadas em caracteres moleculares.	25
Resumo	25
Abstract.....	25
1. Introdução.....	26
2. Material e métodos	33
2.1. Amostragem dos Taxa.....	33
2.2. Extração de DNA, escolha dos primers e amplificação	36
2.3. Sequenciamento, construção dos contig e edição.....	37
2.4. Alinhamento dos nucleotídeos e análise filogenética.....	38
3. Resultados.....	42
3.1. Características das seqüências e alinhamento	43
3.2. Análise filogenética	46
3.2.1 Análises individuais dos dados de cada gene.....	49
3.2.2 Análises de MP dos dados combinados.....	62
3.2.3 Análises de ML dos dados combinados.....	64
3.2.4 Inferência bayesiana dos dados combinados.....	67
3.2.5 Consenso entre análises	69
4. Discussão.....	73
4.1 Características das seqüências.....	73
4.2 Propostas anteriores.....	75
4.3 Grupo externo.....	77
4.4 Análises individuais e combinadas.....	78
4.5 Consensos entre análises	83
5. Conclusões.....	87
6. Agradecimentos.....	88

7 Referências bibliográficas	89
8 Anexos	101

Agradecimentos

Este período de doutorado se interpola a todo o caminhar acadêmico e científico que venho trilhando. E deste tenho muito a agradecer a diversas pessoas. Mas especialmente gostaria de agradecer ao meu ascendente científico, em toda a sua responsabilidade parternal pelos quase 10 anos de orientação e ensino. Obrigado Professor Claudio pelos encontros e desencontros que fizeram nossa relação cada vez mais verossímil. Muito obrigado pela educação científica, meticulosamente bordada de história, com personagens dos mais ilustres. Obrigado por levantar os nossos olhos em direção das coisas significativas, dos axiomas centrais, nos convidando a planejar sob a perspectiva de paisagens mais amplas. E este discipulado me traz a convicção plena de que qualquer sistemata posicionaria seus discípulos, baseado em evidências colecionadas em nosso trabalho no apertado do laboratório antigo, na triagem de tantas moscas paraguaias, nas densas discussões epistemológicas, nos tantos passeios e garimpos em sua fantástica coleção bibliográfica e nos tranqüilos chás das cinco, em um único clado monofilético com origem determinada no seu trabalho.

I would like to thank all the people who taught me in USA. There I meet many advisors and all of them where much more than I could ever think. I was amazed by the simplicity of Brian. In the time that we spent together he taught me how to be hip and enjoy the scientific world. His lab was a serious playground. We shared music, Linux, British beer, cool music and, sure, flies and genes. Thank you Brian, I look forward to meet you again. Thanks to all the NCSU lab crew who make my learning so enjoyable. Thanks Brian Cassel, my Jedi teacher for all the advices in life and molecular research. Thanks to: Hilary, Kevin, Shaun.

Obrigado aos amigos que fizeram a estadia dos peregrinos possível com todo auxílio financeiro e material. Mais do que isto forneceram espaço para o aprendizado integral, misturaram seus dias com os nossos, pruned us, nos regaram e sempre nos fizeram produzir mais frutos do que pensamos que podíamos. Danke schön unsere Eltern Spiekers: Vatti Edmund und Mutti Marli. E muitíssimo obrigado aos nossos queridos Willard and Simone Keith. Não importa muito quem voôu primeiro, vocês sempre merecerão as nossas honras.

Obrigado ao pessoal do Laboratório UFPR e particularmente meus companheiros históricos de sala. Por todas as homoplasias que nos trouxeram tão próximos. Obrigado Gustavo pelas horas de divã e por nosso trabalho de pesquisa em história do rock; Obrigado Zé e Marcela pela convivência sempre tão tranqüila; obrigado Jorge pelas conversas eclesiásticas tão profundas; obrigado Ana por sua contra-cultura, obrigado Lisete pela amizade gaudéria. Obrigado Silvio pela amizade e um obrigado a Elaine em todo o seu entusiasmo e metal filogenético. Extendo meus agradecimentos ao Maurício, ao Rodrigo, ao Márcio, ao Rogério, ao Marcus e Karin. Obrigado a todos os demais pesquisadores do departamento, mas em especial aos professores Gabriel, Lúcia, Luciane, Maria Luíza (depto. Genética UFPR), Mario, Mielke, Mirna, Rodney e Walter com os quais convivi mais proximamente.

Obrigado a minha família por suporte constante. Obrigado ao meu pai, Renato e a minha mãe Marilis. Na hibridização de um engenheiro e uma artista nasce sempre um cientista. Agradeço a meus irmãos por colaborarem em minhas idéias mirabolantes: Eduardo (e Gisele), Daniel e Alexandre. Agradeço a família nova por toda a poesia. Beijos ao Carlos Catito e a Dagmar e abraço no irmão Lukas.

Agradeço em todo o tempo a minha namorada (esposa) por discutir filogenia e culinária sempre tão tarde da noite, pela aventura de financiar minha ciência com seu tempo tão precioso. Sabine, é maravilhoso saber que está do outro lado do microscópio.

Prefácio

Poucos trabalhos examinaram a história filogenética da família Muscidae através de uma metodologia filogenética. A segunda proposta de classificação da família apresentada por Hennig (1965) foi a primeira a aplicar sua teoria de 1950 na classificação dos muscídeos. Willi Hennig utilizou caracteres da disposição de cerdas da cabeça e principalmente caracteres da estrutura do ovipositor para a construção de uma hipótese filogenética para a família. Skidmore (1985) apresentou um detalhado estudo das formas imaturas propondo uma organização taxonômica para Muscidae. O primeiro trabalho a fazer uso de uma metodologia filogenética numérica para a investigação da história evolutiva dos muscídeos foi o trabalho de Carvalho (1989). Carvalho analisou 27 gêneros e 35 caracteres, a maioria destes retirados da estrutura do ovipositor. A matriz de caracteres do trabalho de Carvalho (1989) também incluía caracteres de probóscide. Recentemente Couri e Carvalho (2003) apresentaram um trabalho sobre o relacionamento sistemático entre os gêneros *Philornis* e *Passeromyia*. Para tanto analisaram, através de uma abordagem filogenética numérica, 28 gêneros de Muscidae representando sete subfamílias. A matriz de dados construída para tal estudo incluiu caracteres diversificados incorporando até mesmo caracteres de biologia.

Em decorrência deste cenário de poucos estudos filogenéticos para Muscidae ainda persistem debates sobre a validade taxonômica de diversas subfamílias assim como sobre seu posicionamento sistemático dentro do universo da família. Muitas espécies ainda são conhecidas unicamente de descrições originais ou somente de formas adultas, fato que dificulta o entendimento de caracteres importantes para a família (Carvalho 2002). Poucos conjuntos de caracteres puderam ser examinados como consequência deste pequeno número de trabalhos cladísticos sendo predominantes os caracteres do ovipositor. Este diagnóstico enfatiza a necessidade de inclusão de novos caracteres de diferentes conjuntos amostrais para um teste mais consistente das homologies que sustentam os principais grupos de Muscidae. Esta necessidade já havia sido observada por Carvalho em seu trabalho de 1989 e é notável nas diferentes topologias apresentadas nos estudos.

O presente trabalho acrescentou 1085 caracteres significativos para a análise de parcimônia (PI) da família Muscidae. Estes caracteres foram obtidos de quatro genes

distintos, provenientes de dois conjuntos genômicos diferentes (mitocondrial e nuclear). Este grande número de caracteres, característico de abordagens moleculares (ver Moritz e Hillis 1987) originários de diferentes conjuntos possibilita um novo nível de análise conhecido como meta-análise (Glass 1976). Através desta, os diferentes desempenhos dos conjuntos de caracteres podem ser confrontados com o desempenho da evidência total. A meta-análise permite a avaliação qualitativa dos caracteres informando sobre sua adequação para a definição de determinados grupamentos. Através da meta-análise é possível avaliar qualitativamente os caracteres utilizados na construção da filogenia.

Além da filogenia da família, que pôde ser hipotetizada através de um número muito maior de caracteres, estes dois conjuntos de dados permitiram comparações entre o desempenho particular de cada gene no resgate das relações históricas entre espécies, gêneros, subfamílias e até mesmo famílias. Características de adequação destes genes à origem dos grupos amostrados puderam ser avaliadas através desta comparação conciliando informações de outros estudos onde estes caracteres já foram utilizados. Diversos aspectos dos caracteres morfológicos utilizados para a definição dos grupos puderam ser revistos na comparação com os resultados provenientes da análise molecular.

Neste sentido, o trabalho apresenta um segundo nível de importância oferecendo subsídios fundamentais para estudos posteriores como a tecnologia de amplificação que envolve o longo trabalho de desenvolvimento e adequação de primers e programas de amplificação de seqüências adequadas a este nível taxonômico; a percepção dos grupos que necessitam de amostragem mais intensa; a descrição da adequação dos diferentes genes utilizados e dos critérios aplicados; a publicação de seqüências que permitam o alinhamento de novos táxons. Traz também importantes discussões teóricas sobre a metodologia aplicada ao tratamento dos dados. Exemplo disto é a discussão sobre a validade da combinação de diferentes conjuntos de dados frente a um teste significativo de ILD (*Incongruence Length Difference*, ILD - Farris *et al.* 1994).

Este trabalho foi desenvolvido em conjunto com a Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCSU), Raleigh, Estados Unidos da América através do financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES em uma bolsa do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior - PDDE. O trabalho no laboratório de Sistemática Molecular da NCSU permitiu a elaboração de dois trabalhos de aplicação de

sistemática molecular em Muscidae. Cada um destes trabalhos será apresentado em um capítulo desta tese, assumindo o formato particular do periódico a que está sendo submetido.

O primeiro capítulo apresenta a controversa discussão sobre o posicionamento sistemático do gênero *Ophyra* entre os demais muscídeos, particularmente em relação ao gênero *Hydrotaea*. Pont (1986) e Vockeroth (1996) consideraram os dois gêneros como sinônimos em contraste com visão de outros pesquisadores como Albuquerque (1958), Hennig (1965), Pamplona e Couri (1989). A análise filogenética de máxima parcimônia revelou um novo posicionamento para *Ophyra* e a distinguiu do gênero *Hydrotaea* com bons valores de suporte. O trabalho é significativo na indicação de um posicionamento em Muscinae para *Ophyra* (corroborando a hipótese de Hennig 1965) e na apresentação de novos caracteres (os genes CAD, Citocromo Oxidase I e II – COI e COII e Fator de alongamento -1 ∞ - EF-1 ∞) sendo aplicados na filogenia de Muscidae.

O segundo capítulo reúne todas as espécies seqüenciadas em análises individuais e combinadas das seqüências dos dois genes mitocondriais, COI e COII e dos dois genes nucleares, CAD e EF-1 ∞ . Foram amostradas 28 espécies de Muscoidea: duas espécies de Anthomyiidae; uma espécie de Fanniidae; uma espécie de Scathophagidae; e 24 espécies de Muscidae representando 18 gêneros e 6 subfamílias. Para estas espécies, foram analisados 2989 caracteres (1085 PI) em uma análise representativa da família Muscidae. A análise empregou a máxima parcimônia, a máxima verossimilhança e a inferência bayesiana como critérios de avaliação dos caracteres. Os resultados foram congruentes indicando a monofilia de Muscidae através das espécies amostradas. A avaliação dos genes utilizados, particularmente de CAD, indica uma origem mais antiga para a família do que a proposta por Michelsen (1991) e Pont e Carvalho (1997).

Em anexo, o trabalho inclui a publicação do artigo do primeiro capítulo, uma mídia eletrônica contendo os arquivos a serem disponibilizados através da internet (matriz no formato Nexus e Phylip e alinhamento no formato NBRF).

Referências Bibliográficas

- Albuquerque, D.O., 1958 Sobre *Ophyra* R.-D., 1830 na América do Sul, com descrição de uma espécie nova (Diptera-Muscidae). Bol. Mus. nac. Rio de J. (Zoologia), 181, 1-13.
- Carvalho, C.J.B. de, 1989. Classificação de Muscidae (Diptera): uma proposta através da análise cladística. Revta. Bras. Zool. 6, 627-648.
- Carvalho, C.J.B. de, 2002. (Ed.) Muscidae (Diptera) of the Neotropical region. Editora da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Couri, M.S., Carvalho, C.J.B., 2003. Systematic relations among *Philornis* Meinert, *Passeromyia* Rodhain & Villeneuve and allied genera (Diptera, Muscidae). Braz. J. Biol. 63, 223-232.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. Cladistics 10, 315-319.
- Glass, G.V., 1976. Primary, secondary and meta-analysis of research. Educ. Res. 5:3-8.
- Hennig, W., 1950. Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Deutscher Zentralverlag. Berlin.
- Hennig, W., 1955-1964. Muscidae. In: Lindner, E. (Ed.). Die Fliegen der paläarktischen Region, Teil 63b, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Tafeln, Stuttgart, pp. 97-1056.
- Hennig, W., 1965. Vorarbeiten zu einem phylogenetischen System der Muscidae (Diptera: Cyclorrhapha). Stuttg. Beitr. Naturk., 141, 1-100.
- Michelsen, V., 1991. Revision of the aberrant New World genus *Coenosopsia* (Diptera: Anthomyiidae), with a discussion of anthomyiid relationships. Syst. Entomol. 16, 85-104.
- Moritz, C., Hillis, D., 1987. Molecular systematics: context and controversies. In: Hillis, D., Moritz, C., Mable, B. (Eds.), Molecular Systematics. 2nd Edition. Sinauer, Sunderland, pp. 1-13.
- Pamplona, D.M., Couri, M.S., 1989. Revisão das espécies neotropicais de *Ophyra* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Muscidae, Azeliinae). Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, 84, Suppl. 4, 419-429.
- Pont, A.C., 1986. Family Muscidae. In: Sóos, A.S., Papp, L. (Eds.), Catalogue of the Palearctic Diptera, vol. 11. Hungarian Natural History Museum, Budapeste.

- Pont, A.C., Carvalho, C.J.B. de, 1997. Three new species of Muscidae (Diptera) from Dominican amber. *Studia dipterologica* 4, 173-181.
- Skidmore, P., 1985. The biology of the Muscidae of the world. *Series Entomologica*, 29.
- Vockeroth, J.R., 1996. Key to genera of Muscidae (Diptera) of Mexico, Central America, and the West Indies. *Mem. Entomol. Soc. Wash.*, 18, 280-288.

*“Você muitas vezes encontra na natureza
personagens tão extravagantes que um poeta
prudente não se aventuraria a colocá-las no
palco”*

Lorde Chesterfield

*“The caterpillar and Alice looked at each
other for some time in silence: at last the
Caterpillar took the hookah out of his mouth,
and addressed her in a languid, sleepy voice.
'Who are you?' said the Caterpillar”*

Lewis Carroll

Sobre o status taxonômico de *Ophyra* Robineau-Desvoidy (Muscidae): uma abordagem molecular.

Abstract

The muscid genus *Ophyra* has long been the subject of debate over its placement within the higher-level classification of the family. However, a phylogenetic study has never been conducted that would clarify its systematic position. In the present paper, phylogenetic relationships are examined between *Ophyra albuquerquei* and related muscid genera. The mitochondrial genes Cytochrome Oxidase subunit I and II were used combined with the nuclear genes CAD and Elongation Factor - 1 α to compose a matrix with 2898 characters (716 parsimony informative). These characters were analyzed under parsimony resulting in a single most parsimonious tree. Contrary to some recent classifications, our molecular data suggest the placement of *Ophyra* within the Muscinae, in a separate position from the azeliine genus *Hydrotaea*.

Key words: *Ophyra*, *Hydrotaea*, Muscidae, molecular systematics, CAD, Elongation Factor 1 - α , Cytochrome Oxidase subunit I and II.

Introdução

Ophyra Robineau-Desvoidy, um pequeno gênero de Muscidae com cerca de 20 espécies, encontram-se distribuídas mundialmente nas regiões de clima quente. Algumas de suas espécies, como *O. chalcogaster* (Wiedemann), têm sido transportadas por atividade antrópica para muitos países. Outras espécies, como *O. aenescens* (Wiedemann), têm sido utilizadas como agentes de controle biológico de *Musca domestica* L. (ver Skidmore 1985 para maiores detalhes).

A posição taxonômica de *Ophyra* têm sido objeto de debate desde sua descrição original. Em algumas classificações recentes, vários caracteres morfológicos têm sido empregados para justificar posicionamentos alternativos entre as subfamílias de Muscidae

(Hennig 1965, Skidmore 1985, Carvalho e Couri 2002). No presente estudo, apresentamos novas evidências baseadas em seqüências de nucleotídeos de genes nucleares e mitocondriais para o esclarecimento do status e do posicionamento taxonômico de *Ophyra albuquerquei*. Nossos dados moleculares sugerem o posicionamento de *Ophyra albuquerquei* dentro de Muscinae, em uma posição bastante distinta do gênero *Hydrotaea*.

Ophyra Robineau-Desvoidy: História Taxonômica

Na curta descrição do gênero, Robineau-Desvoidy (1830) posicionou *Ophyra* nos “*Aricines Littorales*” ou “*Aquatiques*”. Posteriormente, Macquart (1835) considerou *Ophyra* como parte da Seção Anthomyzides de Diptera. Wulp (1896) posicionou *Ophyra* em Anthomyiinae.

Os estudos dos espécimes do Museu Britânico amostrados de diversas regiões do mundo conduziram Malloch (1923) ao posicionamento de *Ophyra* na subfamília Phaoniinae (Muscidae). No mesmo estudo, Malloch publicou uma chave para machos e fêmeas de cinco espécies.

Alternativamente, Séguy (1923) posicionou o gênero no grupo Aricinae, Muscidae, porém mais tarde adotou a visão de Malloch (1923) posicionando-o como um Phaoniinae em sua diagnose, em sua chave e em suas observações biológicas (Séguy 1937). Aldrich (1928) posicionou *Ophyra* dentro de sua concepção de Anthomyiidae.

Emden (1943) concordou com o posicionamento de *Ophyra* dentro de Phaoniinae (Malloch 1923, Séguy 1937) incluindo o gênero em seu grupo *Phaonia* dentro dos Phaoniinae da Etiópia. Emden (1943) propôs o relacionamento filogenético entre os gêneros *Ophyra* e *Hydrotaea* Robineau-Desvoidy, 1830 como um grupamento próximo de seu grupo *Limnophora*, baseado na presença de uma seta posterodorsal na tíbia posterior. O mesmo autor propôs também que características de *Ophyra* e *Hydrotaea* forneciam evidências de uma conexão entre o grupo *Limnophora*, seus gêneros próximos e os Fanniinae. Emden (1943) enfatizou a importância taxonômica do compartilhamento da seta posterodorsal na tíbia posterior entre *Ophyra*, *Hydrotaea* e *Phaonia*

Mais tarde, Albuquerque (1958) chamou atenção para as diferenças entre os adultos de *Ophyra* e *Hydrotaea*. Hennig (1965) considerou ambos os gêneros como Muscinae, Hydrotaeini citando como evidências homologias na formação do plastron no ovo. Estes caracteres de desenvolvimento do ovo foram também considerados evidências de que *Ophyra* e *Hydrotaea* eram, dentre os Hydrotaeini, provavelmente os táxons mais proximamente relacionados de Muscini. No mesmo trabalho, Hennig (1965) apresentou *Hydrotaea* como um gênero monofilético baseado em características do fêmur do macho.

A classificação de Hennig (1965) foi mantida por Pont (1972) em seu catálogo dos Muscidae Neotropicais. Um ano depois, Pont (1973) publicou uma revisão das famílias australianas de Muscinae e Stomoxyinae, incluindo *Ophyra* em Muscinae. Pont (1972) também revisou a literatura existente para *Ophyra* para todas as regiões biogeográficas e forneceu uma chave, redescrição e algumas notas sobre três espécies australianas. Alguns anos depois, em seus catálogos de Muscidae da Região Oriental e Afrotropical, Pont (1977, 1980) permaneceu na proposta de Hennig (1965) onde *Ophyra* e *Hydrotaea* são posicionados em uma tribo distinta dentro de Muscinae, os Hydrotaeini. Skidmore (1985) considerou *Ophyra* como Azeliinae-Hydrotaeini juntamente de outros gêneros baseado principalmente em caracteres de estágios imaturos. Skidmore (1985) também discutiu as evidências do suporte de uma relação filogenética próxima entre *Ophyra* e *Hydrotaea*.

Pont (1986), em seu catálogo dos Muscidae paleárticos, apresentou *Ophyra* como um sinônimo júnior de *Hydrotaea* (Azeliini). Esta visão foi mantida em seu catálogo de Muscidae da Australásia e regiões da Oceania (Pont 1989).

Na mesma época, Pamplona e Couri (1989) publicaram uma revisão das espécies Neotropicais de *Ophyra*, apresentando sinonímia, redescrições e uma chave para espécies.

A árvore filogenética para Muscidae publicada por Carvalho (1989) coloca *Hydrotaea* em Azeliini, no entanto, *Ophyra* não foi incluída nesta análise. Carvalho *et al.* (1993), baseado em sua análise filogenética prévia de Muscidae, manteve *Ophyra* e *Hydrotaea* como Azeliini em seu catálogo Neotropical, corroborando a proposta de Skidmore (1985). Mais recentemente, Vockeroth (1996) não reconheceu *Ophyra* como um gênero válido, considerando-o sinônimo júnior de *Hydrotaea* seguindo a proposta de Pont (1986, 1989). Apesar destas considerações, Carvalho e Couri (2002) reconheceram *Ophyra* e *Hydrotaea* como gêneros distintos dentro de Azeliini.

Materiais e métodos

Amostragem dos táxons

Moscas adultas foram coletadas entre janeiro de 2001 e agosto de 2002. Em todos os casos, os adultos foram preservados em etanol 95-100% e armazenados em -20°C. Grupos externos foram obtidos da coleção do Laboratório de Sistemática Molecular, Universidade Estadual da Carolina do Norte (North Carolina State University - NCSU). Treze espécies foram incluídas na análise sistemática molecular, incluindo 11 Muscidae mais 1 Scathophagidae e 1 Anthomyiidae como grupo externo (Tabela 1). Todas as seqüências foram obtidas de um único espécime. As seqüências de *Musca domestica* foram obtidas do GenBank e seus números de acesso encontram-se especificados na Tabela 2. Espécimes coespecíficos do mesmo local e com a mesma data de coleta foram mantidos como *vouchers* assim como qualquer parte restante dos espécimes cujo material genético foi extraído. Os *vouchers* encontram-se depositados na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure - DZUP do Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR - Brasil. A Tabela 2 apresenta o número de acesso para cada seqüência de DNA utilizada em nossa análise.

TABELA 1. Espécies utilizadas na análise, sexo, procedência, data de coleta, coletor. NC - Carolina do Norte; PR - Paraná; RS - Rio Grande do Sul.

Especies	Sexo	Procedência	Data	Coletor
<i>Hylemya</i> sp.	macho	Smoky Mountain, NC, Estados Unidos	28.IV.01	Wiegmann, B.M.
<i>Scathophaga stercoraria</i>	macho	Mt. Mitchell, NC, Estados Unidos	14.viii.96	Wiegmann, B.M.
<i>Biopyrellia bipuncta</i>	macho	Chapada, RS, Brasil	28.iv.00	Lorini, L.M.
<i>Helina lasiophthalma</i>	fêmea	Oxford, Reino Unido	ix.02	Pont, A.C.
<i>Hydrotaea</i> sp.	macho	Passo Fundo, RS, Brasil	10.xi.00	Lorini, L.M.
<i>Morellia ochrichornis</i>	macho	Chapada, RS, Brasil	28.iv.00	Lorini, L.M.
<i>Morellia xanthoptera</i>	fêmea	Morretes, PR, Brasil	21-27.ix.01	Schühli, G.S.
<i>Ophyra albuquerquei</i>	macho	Passo Fundo, RS, Brasil	10.xi.00	Lorini, L.M.
<i>Phaonia tuguriorum</i>	macho	Oxford, Reino Unido	ix.02	Pont, A.C.
<i>Philornis blanchardi</i>	macho	Chapada, RS, Brasil	13.xi.00	Lorini, L.M.
<i>Polietina nigra</i>	fêmea	Morretes, PR, Brasil	5-23.i.02	Schühli, G.S.
<i>Stomoxys calcitrans</i>	fêmea	Anita Garibaldi, RS, Brasil	26.ii.02	Lorini, L.M.

TABELA 2. Espécies utilizadas na análise e seus respectivos números de acesso do GenBank para cada sequência utilizada: **CAD**, **EF-1 α** - Fator de Alongamento - 1 alfa, **COI** – Citocromo Oxidase subunidade I, **tRNA-Leu and COII** - tRNA Leucina e Citocromo Oxidase subunidade II.

Taxon	COI	COI	TRNA-leu e COII	EF-1α	CAD
<i>Hylemya</i> sp.	AJ617702	AJ623305	AJ627903	AJ605071	AJ605059
<i>Scathophaga stercoraria</i>	AJ617694	AJ623297	AJ627895	AJ605063	AJ605051
<i>Biopyrellia bipuncta</i>	AJ617695	AJ623298	AJ627896	AJ605064	AJ605052
<i>Helina lasiophthalma</i>	AJ617698	AJ623301	AJ627899	AJ605067	AJ605055
<i>Hydrotaea</i> sp.	AJ617692	AJ623295	AJ627893	AJ605061	AJ605049
<i>Morellia ochricornis</i>	AJ617697	AJ623300	AJ627898	AJ605066	AJ605054
<i>Morellia xanthoptera</i>	AJ617696	AJ623299	AJ627897	AJ605065	AJ605053
<i>Musca domestica</i>	AF259518	AF104622	AF104622	AF503149	AY280689
<i>Ophyra albuquerquei</i>	AJ617701	AJ623304	AJ627902	AJ605070	AJ605058
<i>Phaonia tuguriorum</i>	AJ617700	AJ623303	AJ627901	AJ605069	AJ605057
<i>Philornis blanchardi</i>	AJ617699	AJ623302	AJ627900	AJ605068	AJ605056
<i>Polietina nigra</i>	AJ617691	AJ623294	AJ627892	AJ605060	AJ605048
<i>Stomoxys calcitrans</i>	AJ617693	AJ623296	AJ627894	AJ605062	AJ605050

Métodos laboratoriais

DNA genômico foi extraído dos espécimes preservados em álcool por homogeneização das moscas inteiras aplicando um protocolo de extração baseado em SDS/proteinase K (50mM Tris, pH 8.0; 50mM EDTA, pH 8.0; 2% SDS, 75mM NaCl; 50mM Sacarose; 100mg de proteinase K). As amostras foram homogeneizadas em 700 μ l de buffer de lise, aquecidas em uma placa térmica a 55°C por um intervalo de 6-24 horas e extraídas duas vezes: uma com 1x seu volume com a mistura fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich) e outra com 1x seu volume com a mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Foi adicionado um décimo do volume de acetato de sódio 3M e 1x o volume de isopropanol gelado (-20°C) à fase aquosa da segunda extração para a precipitação do DNA. Este DNA precipitado foi peletizado através de microcentrifugação. O DNA foi lavado com 1ml de etanol 70% e 95%, secado, ressuspensão em 100 μ l de TE e armazenado em -80°C. Em poucos casos onde somente um espécime encontrava-se disponível, os ácidos nucleicos foram extraídos do tórax, deixando a cabeça, asas e abdome como *voucher*. Os oligonucleotídeos designados como primers (ver Tabela 3) para amplificar Citocromo Oxidase subunidade I (COI) (Simon *et al.* 1994) e Citocromo Oxidase subunidade II (COII) (Ver Fig. 1 para diagrama dos produtos da PCR) (Brown *et al.*, 1994), Fator de Alongamento - 1 α (EF-1 α) (Meier and Wiegmann 2002, Collins and Wiegmann 2002) e CAD ou Rudimentar (Moulton and Wiegmann, 2004) foram sintetizados por Sigma Genosys (Woodlands, TX). Foi utilizado DNA PCR padrão de três passos com Ex Taq™ TaKaRa (Mirus Corp., Madison, WI) exceto para CAD onde foi utilizado PCR touchdown (Hecker and Roux 1996) com Ex Taq™ TaKaRa. Aproximadamente 1Kb do gene EF-1 α foi amplificado em duas seções sobrepostas através de RT-PCR (Kawasaki 1990) utilizando o kit GeneAmp RNA PCR (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) e o protocolo RT sugerido pelo kit, seguido do mesmo protocolo de PCR utilizado para DNA PCR. O primer EF6 utilizado em conjunto com EF4 para amplificação foi substituído pelo EF51 no processo de seqüenciamento. Para COI, COII e EF-1 α foi utilizado anelamento a 50°C e 30 ciclos. Para CAD, foi utilizado o método de PCR touchdown consistindo de anelamento a 55° C por 6 ciclos, seguido de anelamento a 50° C por 36 ciclos.

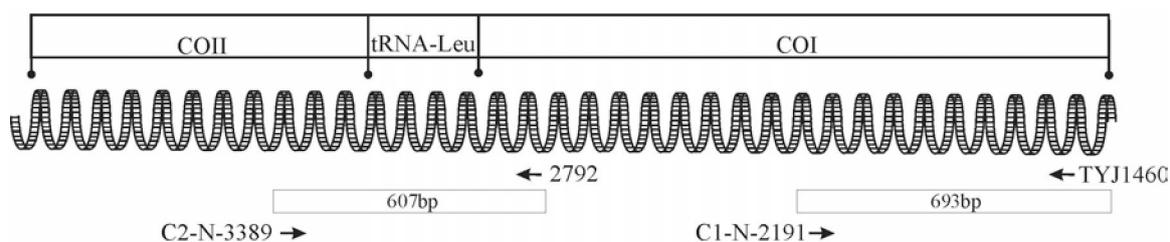


FIGURA 1. Diagrama indicando a posição das seqüências de Citocromo Oxidase subunidade I (COI) e II (COII), seus respectivos conjuntos de primers e tamanho em pares de bases (bp). tRNA-Leu - tRNA Leucina.

As seqüências foram obtidas por seqüenciamento através de dye terminator cycle, utilizando o kit ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing (PE Biosystems, Warrington, England). A confirmação das seqüências foi realizada por comparação das fitas complementares e tradução de aminoácidos. As seqüências de aminoácido utilizadas para comparação foram as publicadas para *Musca domestica* (CAD - AY280689; EF-1 α - AF503149; COI - AF259518; COI and II - AF104622). A edição das seqüências de nucleotídeos, construção dos contigs e consenso de seqüência foram feitos através do software Sequencher 4.0.5 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, 1991).

TABELA 3. Primers utilizados para cada gene, tamanho da porção amplificada e número e percentagem dos sítios informativos para parcimônia (PI) para a árvore dos dados combinados.

Primer	gene	tamanho (bases)	PI
TY-J-1460/C1-N-2191	Citocromo Oxidase subunidade I	694	167 (24%)
2792/C2-N-3389	Citocromo Oxidase subunidade I e II	607	303 (45%)
EF4/EF6 EF2/EF5	Fator de Alongamento - 1 alfa	1036	145 (14%)
60/364	CAD	724	268 (37%)

Análise filogenética

O conjunto de dados filogenéticos consiste de quatro partições básicas compreendendo as seqüências de DNA para CAD, EF-1 α , COI e COII. Os alinhamentos dos nucleotídeos para cada gene foi inferido manualmente empregando o programa Genetic Data Environment (GDE 2.2, Smith *et al.* 1994). O arquivo do alinhamento encontra-se disponível em <http://zoo.bio.ufpr.br/diptera/diptera-c/guilherme.html>. O alinhamento foi não ambíguo para todos os genes exceto para COI (C2N3389/2792) onde *Helina lasiophthalma* apresentou um indel de três bases nas suas últimas 20 bases. Encontram-se ausentes no alinhamento de EF-1 α as regiões referentes à porção amplificada por EF2/EF5 (379bp) para os táxons *Biopyrellia bipuncta*, *Phaonia tuguriorum* e *Scathophaga stercoraria* e as regiões de EF4/EF6 (656bp) referentes a *Ophyra albuquerquei*. Estas regiões foram codificadas como *missing data*. A região codificadora do tRNA-Leu foi excluída do alinhamento devido ao seu alinhamento subjetivo e pequeno tamanho.

Para avaliar a congruência entre as partições CAD, COI, COII, EF-1 α , o teste de incongruência de diferença de comprimento (ILD, Farris *et al.* 1994) foi aplicado como implementado pelo PAUP* versão 4.0b10 (Swofford 2001). A análise foi efetuada com 100 réplicas com adição aleatória de seqüências, árvores iniciais para o *branch swapping* obtidas pelo procedimento de *stepwise addition*, 10 réplicas adicionais por réplica de ILD e TBR (*tree bisection-reconnection*).

A análise de parcimônia (*unweighted parsimony*- MP) foi executada através do programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford 2001) empregando os critérios de busca heurística e 1000 réplicas de busca de adições aleatórias com o uso de *branch swapping* do tipo *tree bisection-reconnection* - TBR. Em todos os casos, os seguintes critérios foram utilizados: todos os caracteres foram não ordenados, a opção *steepest descent* desativada, número máximo de árvores ilimitado (automaticamente acrescentado em mais 100), se o comprimento do ramo for zero este é colapsado, opção *MulTrees* em efeito.

O suporte de ramo para as árvores mais parcimoniosas (AMP) foi estimado através de *bootstrap* não paramétrico (Felsenstein 1985) e suporte de Bremer (Bremer 1988, 1994). A análise de *bootstrap* foi executada com buscas de 1000 réplicas com adição simples das seqüências e *branch swapping* do tipo TBR. Os índices de deterioração de ramo (*index*

decay), representados pelos valores de suporte de Bremer e suporte particionado de Bremer (Baker e DeSalle 1997), foram calculados para cada nodo da AMP com o emprego do programa TreeRot V2 (Sorenson 1999) em conjunto com PAUP*. Também foi empregado o procedimento de pesagem sucessiva (SWP) (Farris 1969) utilizando o índice de consistência re-escalado como uma forma de pesagem de caracteres a posteriori. Este procedimento procura reduzir o efeito das homoplasias na análise, atribuindo pesos menores a caracteres menos consistentes. SWP foi implementada da seguinte maneira: primeiro os caracteres receberam novos pesos baseados nos valores obtidos da primeira análise de MP; uma nova MP foi executada nestes dados com novos pesos de caracteres; o processo foi repetido até que em consecutivas interações convergissem em uma mesma AMP ou em um mesmo conjunto de AMP.

Resultados e discussão

Baseado nos resultados do teste ILD, a hipótese de congruência foi rejeitada ($p < 0,05$) para comparações entre todas as partições. O mesmo resultado foi encontrado em comparações entre conjuntos de dados mitocondriais e nucleares. Conhecendo-se que o resultado do teste ILD confunde incongruência devido a sinais conflitantes com incongruência decorrente de homoplasia (Dolphin et al, 2000), decidimos pela inclusão de todas as partições de dados em uma análise combinada. A decisão de combinar todos os dados minimiza o erro de amostragem e aumenta o poder explanatório dos dados (Kluge 1989, Kluge e Wolf 1993). A oportunidade de ocorrência de erros estocásticos nesta abordagem é menor do que quando os dados são analisados separadamente. Mesmo quando os conjuntos de dados são homogêneos estes erros estocásticos podem conduzir a diferentes topologias em análises individuais (Johnson e Soltis 1998).

A matriz de dados combinada compreende 2989 nucleotídeos, dos quais 438 são posições variáveis não informativas (14,7% do total) e 716 são sítios informativos para a parcimônia - PI (24% do total). Uma tabela com o número de PI para cada gene é apresentada (Tabela 3). Se considerados juntos COI (TYJI460/C1-N-2191) e COI-COII (2797/C2-N-3389) resultaram em um conjunto de 941pb e 235 PI (25%). COII isoladamente representou um conjunto de 288pb e 68 PI (23,6%). A análise de MP dos dados combinados resultou em uma única AMP (Fig. 2, comprimento 2732 passos, índice de consistência 0,57,

índice de retenção 0,37). A AMP obtida do SWP foi idêntica em sua topologia a esta encontrada sob o critério de pesos iguais (Fig.2).

A AMP apresenta evidências de dois grandes clados: um composto largamente dos gêneros representantes de Muscinae, incluindo as espécies de *Hydrotaea* e *Ophyra*; e um segundo clado com os dois gêneros de Phaoniinae formando um conjunto com o gênero *Philornis* (Reinwardtiini sensu Carvalho *et al.* 1993). Este resultado contradiz a antiga hipótese taxonômica que posiciona *Ophyra* como integrante dos Phaoniinae (Malloch 1923, Séguy 1937, Emden 1943). Esta hipótese já havia sido rejeitada por vários autores (Albuquerque 1958, Hennig 1965, Pont 1972, 1973, 1977, 1980, Pamplona and Couri 1989, Carvalho *et al.* 1993, Carvalho e Couri 2002), mas não havia sido testada rigorosamente para *Ophyra* através de uma análise filogenética quantitativa.

Os dados moleculares deste estudo posicionam a espécie estudada de *Ophyra* entre os Muscinae com valores altos de *bootstrap* e de suporte de Bremer. Hennig (1965) defendeu a monofilia da subfamília baseado em caracteres do ovipositor. Carvalho (1989), Couri e Carvalho (1997) e Carvalho e Couri (2002) também reconheceram caracteres do ovipositor somados de caracteres de forma do ovo e a presença de sétulas no anepímero como sinapomorfias.

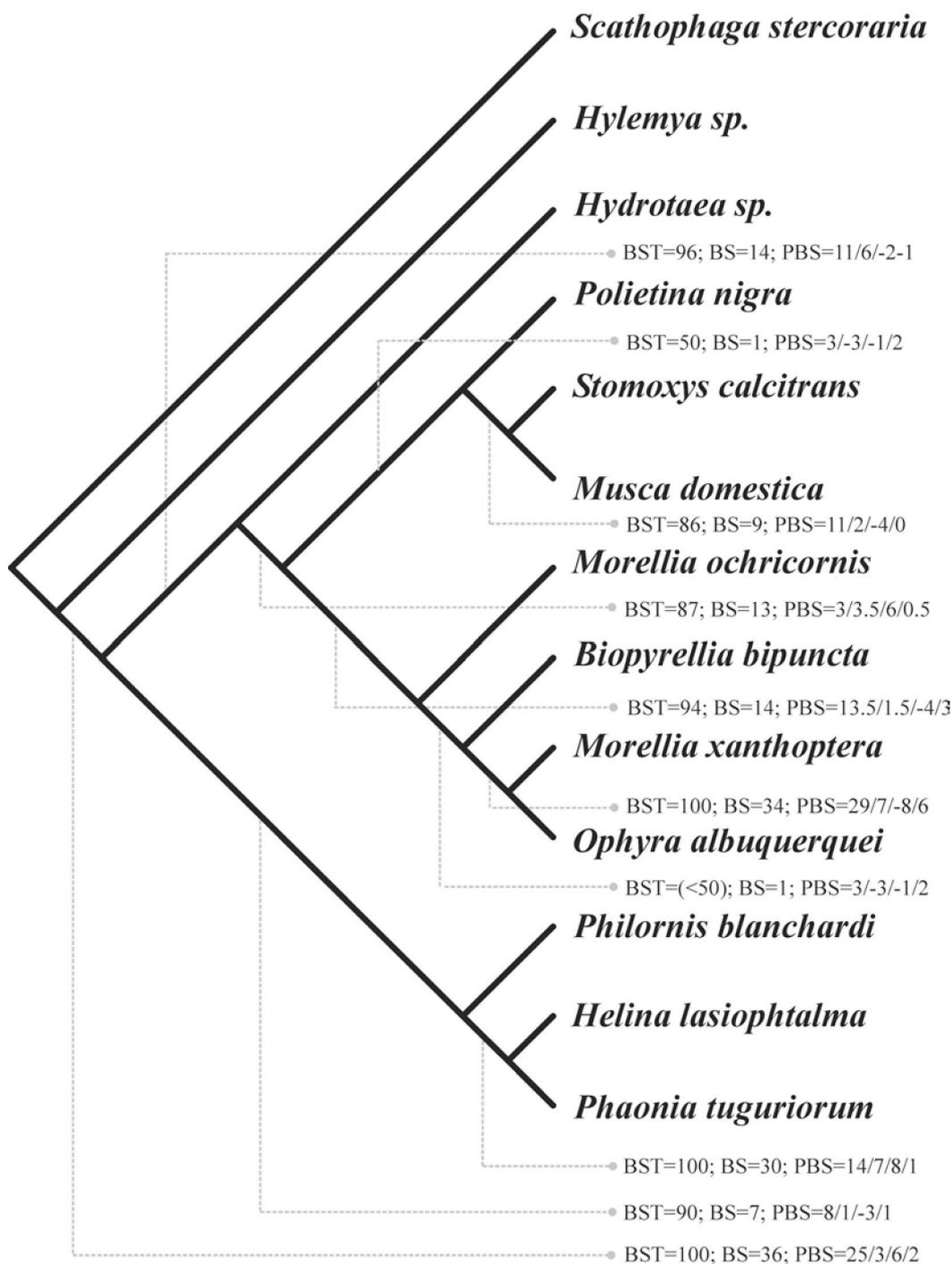


FIGURA 2. Árvore filogenética mais parcimoniosa: comprimento 2732 passos, índice de consistência 0.57, índice de retenção 0.37. BST - valores de *bootstrap* (1000 replicas), BS - valores de suporte de Bremer e PBS – valores de suporte de Bremer particionado para as partições CAD, EF1- α , COI (TY-J-1460/C1-N-2191) e COI-COII (2792/C2-N-3389).

Além destas conclusões a análise sugere *Hydrotaea* como grupo irmão de todos os Muscinae amostrados. *Hydrotaea* foi considerado por Hennig (1965) como gênero monofilético e por Carvalho e Couri (2002) como provavelmente monofilético baseado em caracteres do fêmur anterior. Mas estas hipóteses de monofilia ainda necessitam de testes quantitativos rigorosos.

Nossos dados posicionam *Polietina* como gênero basal de Muscinae. Couri e Carvalho (1997) posicionaram *Polietina* em Muscini baseados em caracteres de terminália de machos.

Tradicionalmente, os Muscinae têm sido divididos em duas tribos - Muscini e Stomoxyini (Carvalho 1989, Carvalho *et al.* 1993 e Couri e Carvalho 2002). Em nossa análise, os Muscini amostrados foram divididos de forma peculiar pelo posicionamento de *Stomoxys* (Stomoxyini) (Fig. 2). Em estudos futuros, será necessária a inclusão de seqüências de outros Stomoxyini, especialmente *Haematobia* Latreille, 1828 e *Neivamyia* Pinto e Fonseca, 1930 para analisar adequadamente a monofilia e os interrelacionamentos entre Stomoxyini e Muscini. De forma semelhante, o estado parafilético das duas espécies amostradas de *Morellia* Robineau-Desvoidy, 1830 indica a necessidade de uma revisão extensiva do gênero (ver Carvalho e Couri 2002).

Nossos dados moleculares suportam *Ophyra albuquerquei* como grupo irmão de *Morellia xanthoptera* Pamplona, 1986 em Muscinae. O gene nuclear codificador de proteína, CAD apresentou o maior suporte para este clado seguido dos genes também codificadores de proteína EF-1 α (nuclear) e Citocromo Oxidase II (mitocondrial) (COII; PBS, Fig.2). Ambos os genes são considerados úteis em filogenias moleculares para relacionamentos taxonômicos de famílias e níveis superiores em insetos holometábolos (Moulton e Wiegmann 2004, Caterino *et al.* 2000). Entretanto, dados do gene COI contradizem fortemente este posicionamento de *Ophyra*. Este conflito entre genes pode ser devido a diferenças marcantes na taxa de evolução entre genes mitocondriais de Citocromo Oxidase (Simon *et al.* 1994). COII é geralmente considerado como um gene de evolução mais rápida sendo mais adequado para aplicações em pesquisas filogenéticas em nível de espécies (Caterino *et al.* 2000, Simon *et al.* 1994). É claro que amostragens futuras de ambas as espécies são necessárias para a completa elucidação do poder de resolução dos vários genes para a filogenia de Muscidae.

Finalmente, o suporte particionado de Bremer para a partição EF-1 α é baixo ou negativo em nossa AMP. Este gene nuclear é considerado informativo em níveis taxonômicos mais baixos devido a sua extrema conservação nas posições codificadoras e sua rápida evolução em sítios de terceira posição (Cho *et al.* 1995). Este padrão de alta variabilidade somente em 3ª posição é também verdadeiro para os gêneros de Muscidae. 85% dos PI para EF-1 α foram em 3ª posição (105 de 124). Estes resultados sugerem que estas posições de EF-1 α devem evoluir muito rapidamente para de forma confiável recuperarem relacionamentos das divergências mais antigas de Muscidae.

Conclusão

Uma única AMP baseada em seqüências de DNA de genes mitocondriais e nucleares sugerem a validade taxonômica de *Ophyra albuquerquei* como uma linhagem dentro da subfamília Muscinae. Estes dados contradizem a hipótese de um relacionamento taxonômico próximo entre *Ophyra* e *Hydrotaea*. Mesmo sendo promissores, os presentes dados moleculares são limitados em seu poder de resolução para a filogenia de Muscidae. Seqüências adicionais de vários outros táxons são requeridos para uma classificação filogenética mais consistente para toda a família.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer Lisete M. Lorini e Adrian C. Pont pelas espécies fornecidas. Obrigado a Márcio Pie, Silvio Shigueo Nihei, Gustavo Graciolli e Elaine G. Soares por sugestões valiosas e discussão do manuscrito. Obrigado também a Hilary Hill, Shaun Winterton, Kevin Moulton, e especialmente a Brian Cassel, do NCSU Insect Molecular Systematics Lab, por conselhos técnicos e ajuda no trabalho de seqüenciamento. Agradecemos aos dois revisores anônimos que aprimoraram o manuscrito com suas contribuições. Este projeto foi apoiado por financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Programa de Doutorado com Estágio no Exterior - PDEE/BEX0143/02-2), bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número do processo 140700/2001-3 (GSS) e 304.148/2002-4 (CJBC) e bolsa do US National Science Foundation (DEB-

0098745) (BMW e J. Thorne). Esta é a contribuição número 1478 do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

Referências

- Albuquerque, D.O. (1958) Sobre *Ophyra* R.-D., 1830 na América do Sul, com descrição de uma espécie nova (Diptera-Muscidae). *Boletim do Museu Nacional. Nova série Zoologia*, 181, 1-13.
- Aldrich, J.M. (1928) New Diptera or two-winged flies from South America. *Proceedings of the United States National Museum*, 74(art.1), 1-25.
- Baker, R.H. & DeSalle, R. (1997) Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. *Systematic Biology*, 46, 654-673.
- Bremer, K. (1984) Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10, 295-304.
- Bremer, K. (1988) The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, 42, 795-803.
- Brown, J.M., Pellmyr, O., Thompson, J.N. & Harrison, R.G. (1994) Mitochondrial DNA phylogeny of the Proxidae (Lepidoptera: Incurvarioidea) indicates rapid ecological diversification of Yucca Moths. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 795-809.
- Carvalho, C.J.B. de (1989) Classificação de Muscidae (Diptera): uma proposta através da análise cladística. *Revista Brasileira de Zoologia*, 6, 627-648.
- Carvalho, C.J.B. de & Couri, M.S. (2002) Part I. Basal groups. In: Carvalho, C.J.B. de (Ed.), *Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region*, Editora Universidade Federal do Paraná, Curitiba, pp.17-132.
- Carvalho, C.J.B. de; Couri, M.S.; Pont, A.C.; Pamplona, D. & Lopes, S.M. (1993) Part II. Muscidae. In: Carvalho, C.J.B. de (Ed.), *A catalogue of the Fanniidae and Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region*, Sociedade Brasileira de Entomologia, São Paulo, pp. 1-201.
- Caterino, M.S., Cho, S. & Sperling, F.A.H. (2000) The Current State Of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology*, 45: 1-54.

- Cho, S., Mitchel, A., Regier, J.C., Mitter, C., Poole, R.W., Friedlander, T.P. & Zhao, S. (1995) A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor-1a recovers morphology-based tree for heliotine moths. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 650-656.
- Collins, K.P. & Wiegmann, B.M. (2002) Phylogenetic relationships and placement of the Empidoidea (Diptera: Brachycera) based on 28s rDNA and EF1- α sequences. *Insect Systematics and Evolution*, 33, 421-444.
- Couri, M.S. & Carvalho, C.J.B. de (1997) Revision of *Polietina* Schnabl & Dzierzicki (Diptera, Muscidae) and considerations on its new systematic position. *Revista Brasileira de Zoologia*, 14, 225-281.
- Dolphin, K., Belshaw, R., Ormer, C.D.L., & Quicke, D. (2000) Noise and incongruence: interpreting results of the incongruence length difference test. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17, 401-406.
- Emden, F.I. van (1943) Keys to the Muscidae of the Ethiopian Region: *Phaonia*-group. *Annals and Magazine of Natural History*, 62, 73-101.
- Farris, J.S. (1969) A successive approximations approach to character weighting. *Systematic Zoology*, 18, 374-385.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., & Bult, C. (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10, 315-320.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Hecker, K.H. & Roux, K.H. (1996) High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in “Touchdown” and “StepDown” PCR. *BioTechniques*, 20, 478-485.
- Hennig, W. (1965) *Vorarbeiten zu einem phylogenetischen System der Muscidae (Diptera: Cyclorrhapha)*. Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde, Stuttgart, 141, 1-100.
- Johnson, L.A. & Soltis, D.E. (1998) Assessing congruence: empirical examples from molecular data. In: Soltis, P.S., Soltis, D.E., & Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular systematics of plants. Vol. II*. Chapman and Hall, Nova Iorque, pp. 297-343.
- Kawasaki, E.S. (1990) Amplification of RNA. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, pp. 21-27.

- Kluge, A.G. (1989) A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis for relationships among Epicrates (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology*, 38, 1–25.
- Kluge, A.G. & Wolf, A.J. (1993) Cladistics: what's in a word? *Cladistics*, 9, 183–199.
- Macquart, J. (1835) *Histoire Naturelle des Insectes. Diptères*. Paris. 1-703.
- Malloch, J.R. (1923) Exotic Muscaridae (Diptera). *IX Annals and Magazine of Natural History*, (9) 11, 664-675.
- Meier, R. & Wiegmann, B.M. (2002) A phylogenetic analysis of Coelopidae (Diptera) based on morphological and DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 393-407.
- Moulton, J.K. & Wiegmann, B.M. (2004) Evolution and phylogenetic utility of cad (rudimentary) among Mesozoic-aged eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 363-378.
- Pamplona, D.M. & Couri, M.S. (1989) Revisão das espécies neotropicais de *Ophyra* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Muscidae, Azeliinae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84, Suppl. 4, 419-429.
- Pinto, C. & Fonseca, F. da (1930) Novo genero e nova especie de mosca hematophaga da sub-familia Stomoxydinae, hospedadora intermediaria da *Dermatobia hominis*. *Revista medico-cirúrgica do Brasil*, 38, 241-247.
- Pont, A.C. (1972) Family Muscidae. In: *A catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 97, 111 pp.
- Pont, A.C. (1973) Studies on Australian Muscidae (Diptera). IV. A revision of the Subfamilies Muscinae and Stomoxyinae. *Australian Journal of Zoology, supplementary series*. 21, 129-296.
- Pont, A.C. (1977) Family Muscidae. In: Delfinado, M.D. and Hardy, D.E. (Eds.), *A catalogue of the Diptera of the Oriental Region. Vol. III. Suborder Cyclorrhapha (excluding Division Aschiza)*. The University Press of Hawaii, Honolulu, 834 pp.
- Pont, A.C. (1980) Family Muscidae. In: Crosskey, R.W. (Ed.), *Catalogue of Diptera of the Afrotropical Region*. British Museum (Natural History), Londres, 1437 pp.

- Pont, A.C. (1986) Family Muscidae. *In*: Sóos, A.S. and Papp, L. (Eds.), *Catalogue of the Palaearctic Diptera. Vol. 11*. Hungarian Natural History Museum, Budapest, 311 pp.
- Pont, A.C. (1989) Family Muscidae. *In*: Evenhuis, N. (Ed.), *Catalog of the Diptera of Australasia and Oceania Regions*. Special Publications of the Bernice Pauahi Bishop Museum, 86, 1155 pp.
- Robineau-Desvoidy, A.J.B. (1830) Essai sur les Myodaires. *Mémoires présentés par divers Savants à l'Académie des Sciences de l'Institut de France*, 2: 813 pp.
- Séguy, E. (1923) Diptères Anthomyidae. *In: Faune de France*. Les Presses Universitaires de France, Paris 6:393 pp.
- Séguy, E. (1937) Diptera, Family Muscidae. *In*: Wytsman, P., *Genera Insectorum*. Bruxelles, fac. 205, 604 pp.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651-701.
- Skidmore, P. (1985) The biology of the Muscidae of the world. *Series Entomologica*, 29, 1-550.
- Smith, S.W., Overbeek, R., Woese, C.R., Gilbert, W. & Gillevet, P.M., (1994) The genetic data environment and expandible GUI for multiple sequence analysis. *Computer Applications Biosciences*, 10, 671-675.
- Sorenson, M.D. (1999) *TreeRot*, version 2. Boston University, Boston, MA.
- Swofford, D.L., (2001) *PAUP**. *Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Vockeroth, J.R. (1996) Key to genera of Muscidae (Diptera) of Mexico, Central America, and the West Indies. *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, 18, 280-288.
- Wulp, F.M. van der (1896) Group Anthomyinae. [Part] *In*: Godman, F.D. and Salvin, O. (Eds.), *Biologia Centrali-Americana. Zoologia-Insecta-Diptera*. London, 2 (part 131) pp. 313-320.

*“Deve ser tudo ordenado
na preclusão e no intento,
no presente, no passado,
no princípio e no seu fecho,
manancial nunca esgotado,
quando verte, não transborda;
quando seca, recomeça”*

Carlos Nejar

Relações filogenéticas em Muscidae (Diptera, Calyptratae) baseadas em caracteres moleculares.

Resumo

As relações entre 24 espécies de Muscidae (18 gêneros, 6 subfamílias) foram analisadas através de análises individuais e combinadas de seqüências de dois genes mitocondriais, COI e COII e dois genes nucleares, CAD e EF-1 α compondo um total de 2989 caracteres (1085 PI). Os caracteres foram analisados através de análise de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana. As diferentes análises apresentam-se concordantes quanto à monofilia de Muscidae, relacionaram Coenosiini a Phaoniinae e este conjunto aos Reinwardtiini e Cyrtoneurini amostrados. *Ophyra* e *Hydrotaea* foram posicionados em Muscinae e *Stomoxys* foi posicionada como grupo irmão de *Musca*. *Polietina* foi diagnosticado como monofilético e o gênero *Morellia* como parafilético. A análise combinada aumentou a eficiência do resgate das informações filogenéticas mesmo sendo os conjuntos de caracteres combinados diagnosticados como incongruentes através do teste ILD.

Abstract

The relationships among 28 species of Muscid (18 genera and 6 subfamilies) were analyzed through a set of 2989 characters (1085 PI) derived from sequences of mitochondrial (COI and COII) and nuclear genes (CAD and EF-1 α). The data was analyzed combined and separately applying the criterion of Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, and Bayesian Inference. The results of the different analyses support the monophyly of Muscidae and the sister-group relationship between Coenosiini and Phaoniinae. This group was diagnosed as connected to the species of Reinwardtiini and Cyrtoneurini sampled. The genera *Ophyra* and *Hydrotaea* were positioned in Muscinae and *Stomoxys* come out as sister group of *Musca*. *Polietina* was presented as a monophyletic genus while *Morellia* was presented as paraphyletic. The combined analysis raised the efficiency of the phylogenetic analysis despite the data sets diagnosed as incongruent in an ILD test.

Palavras chave: Sistemática Molecular, Muscoidea, Filogenia, Citocromo Oxidase, Fator de alongamento - 1α , CAD, ILD.

1. Introdução

A família Muscidae é uma das famílias de dípteros mais bem conhecidas e estudadas (Thompson 1990). Além de sua importância médico-sanitária o conhecimento taxonômico da família é reflexo direto dos esforços de formação de sistematas de Muscidae. A ampla distribuição de suas espécies também contribui para que a família seja bastante conhecida. Os muscídeos ocorrem em todas as regiões biogeográficas com exceção das regiões mais áridas (Carvalho *et al.* 1993). Em regiões de grande altitude, até 4900m (Pont 1972), ainda se encontra uma proporção bastante significativa de muscídeos, tanto em número de espécies quanto em número de indivíduos (Pont 1986).

Calcula-se que Muscidae seja composta hoje por cerca de 4000 espécies (Michelsen 1991), o que representa cerca de 5% da diversidade de Brachycera e 21% da diversidade de Calypterae (baseado em Yeates e Wiegmann 1999).

Várias tentativas de classificação dos muscídeos foram propostas, a maioria delas de caráter tipológico (e.g. Malloch 1934, Séguy 1937, Roback 1951, Hennig 1955-1964). Estas classificações utilizaram critérios variados que resultaram em diferentes números de subfamílias. Esta discordância estabelece extremos que vão de quatro subfamílias para a classificação de Hennig (1955) até quinze para a de classificação de Séguy (1937).

A primeira aplicação de um critério filogenético para a classificação de Muscidae foi proposta por Hennig (1965). Em sua classificação, Hennig (1965) empregou fundamentalmente caracteres de terminália feminina para definição dos limites das subfamílias e tribos subordinadas. Esta definição dos grupos baseados em um conjunto particular de caracteres suscita dúvidas quanto à validade destes grupamentos.

Uma nova proposta foi publicada no extenso trabalho sobre a biologia de Muscidae do mundo (Skidmore 1985). Caracteres de formas imaturas foram avaliados para a elaboração de uma nova classificação para a família. Dez subfamílias foram propostas baseadas no estudo de 440 espécies estudadas.

Abordagens cladísticas numéricas no estudo das relações filogenéticas de Muscidae são recentes. A primeira aplicação da metodologia cladística numérica na construção de um sistema de classificação para os Muscidae foi apresentada por Carvalho (1989b) (Fig.1). Neste trabalho, através de análise de parcimônia, foram empregados 35 caracteres morfológicos para 27 gêneros de Muscidae e uma nova proposta de classificação filogenética foi apresentada com base no cladograma obtido. A classificação de Carvalho (1989b) assemelha-se à proposta taxonômica de Skidmore (1985).

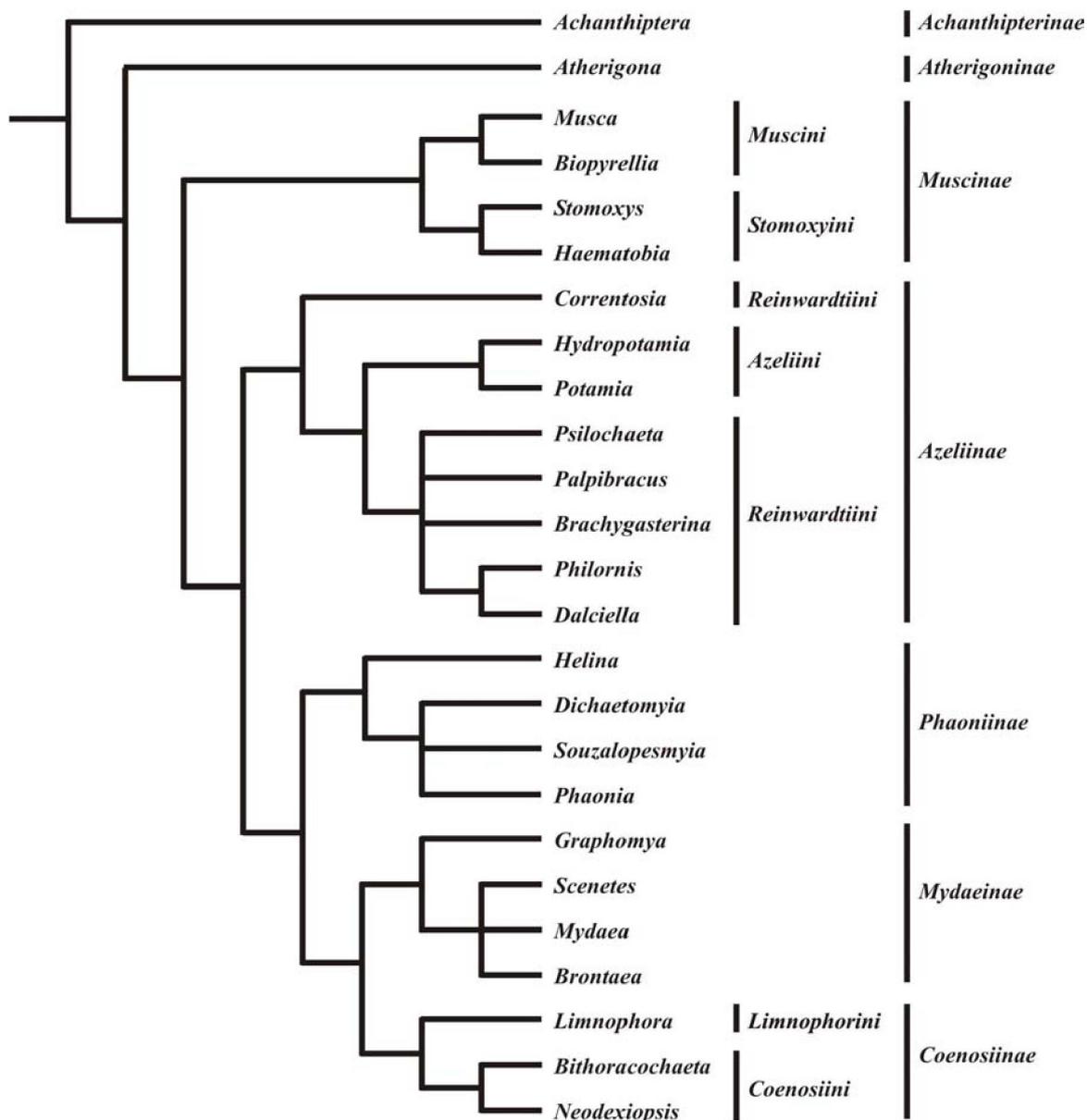


Fig. 1. Cladograma apresentado por Carvalho (1989b) para apresentação de sua proposta de classificação para Muscidae (modificado de Carvalho 1989b). Classificação apresentada segue o trabalho original.

Uma segunda proposta cladística para Muscidae foi apresentada por Couri e Carvalho (2003). Neste trabalho os autores analisaram 30 gêneros de Muscidae através de 54 caracteres e apresentaram um cladograma trazendo novas idéias sobre a idade da família

comparativamente com a distribuição de alguns gêneros, em particular *Passeromyia* e *Philornis* (Fig. 2).

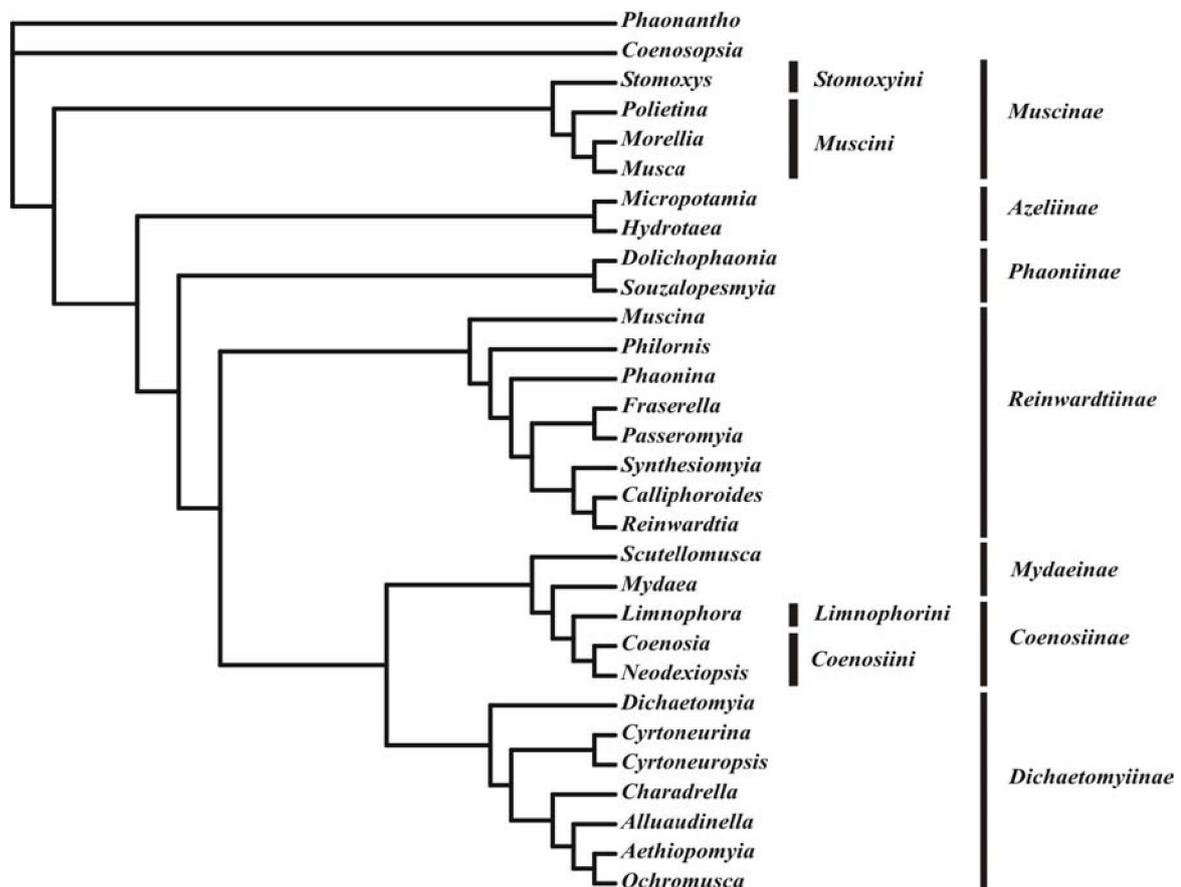


Fig. 2. Cladograma proposto por Couri e Carvalho 2003, baseado em análise de caracteres morfológicos, apresentando as relações entre as espécies de alguns gêneros de Muscidae (modificado de Couri e Carvalho 2003). Classificação apresentada segue o trabalho original.

Outros esforços taxonômicos recentes empregando a metodologia cladística apresentaram revisões para diversos gêneros (*Eudasyphora*: Cunny 1980, *Souzalopesmyia*: Carvalho 1999, *Cyrtoneurina* e *Cyrtoneuropsis*: Pamplona 1999, *Bithoracochaeta*: Motta e Couri 2000, *Apsil* e *Reynoldsia*: Carvalho e Couri 2002, *Philornis* e *Passeromyia*: Couri e Carvalho 2003, *Thrichops*: Savage 2004) e para a tribo Coenosiini (Couri e Pont 2000).

As hipóteses filogenéticas vigentes para Muscidae necessitam de corroboração através da inclusão de novos táxons e, principalmente através do emprego novos conjuntos de caracteres. Este empenho é necessário para o reexame da validade de grupamentos duvidosos e de caracteres complexos (Carvalho 1989b). A extrema plasticidade morfológica dos dípteros dificulta o reconhecimento de homologias primárias (Yeates e Wiegmann 1999) e pode comprometer hipóteses baseadas nestes caracteres.

Neste estudo, optamos pelo emprego de conjuntos de caracteres moleculares para a construção de uma hipótese filogenética para Muscidae e para discussão das propostas taxonômicas para a família. Quatro regiões de genes codificadores de proteínas foram selecionadas para a análise de 24 espécies de Muscidae, representando cinco das sete subfamílias propostas por Carvalho (1989b) e Dichaetomyiinae apresentada na análise de Couri e Carvalho (2003).

Os genes utilizados foram as subunidades I e II do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COI, COII) que têm sido amplamente utilizadas em estudos de sistemática de insetos (Brower e DeSalle 1994, Brown *et al.* 1994, Simon *et al.* 1994, Sperling *et al.* 1994, Baker e DeSalle 1997, Caterino e Sperling 1999, Bernasconi *et al.* 2000a, 2000b, 2001, Scheffer e Wiegmann 2000, Sharpe *et al.* 2000, Johnson *et al.* 2001, Rokas *et al.* 2002, Eastwood e Hughes 2002, Beckenbach e Borkent 2003). Os genes COI e COII codificam dois polipeptídeos que são parte de um conjunto de sete do complexo citocromo c oxidase (Capaldi *et al.* 1999). Ambas as subunidades têm sido aplicadas na resolução de filogenias de vários níveis taxonômicos que vão desde espécies próximas (Sperling e Hickey 1994, Beckenbach *et al.* 1993, Brower 1996) a gêneros e subfamílias (Fрати *et al.* 1997, Bernasconi *et al.* 2001), famílias (Howland e Hewitt 1995, Bernasconi 2000a) e até mesmo, ordens (Liu e Beckenbach 1992).

Considerando certas limitações filogenéticas inerentes de genes mitocondriais (Moulton e Wiegmann 2004), utilizamos também seqüências de dois genes nucleares: o Fator de Alongamento – 1 alfa (EF-1 α) (Brower e DeSalle 1994, Cho *et al.* 1995, Fang *et al.* 1997, Friedlander *et al.* 1998, Mitchel *et al.* 2000, Yang *et al.* 2000, Baker *et al.* 2001, Johnson *et al.* 2001, Winterton *et al.* 2001, Collins e Wiegmann 2002) e o Rudimentar ou CAD (Moulton e Wiegmann 2004).

O gene EF-1 α é responsável pela codificação de uma proteína chave no processo de alongamento na tradução da informação genética (Cho *et al.* 1995), e tem se mostrado bastante efetivo em estudos filogenéticos de insetos (Collins e Wiegmann 2002). Sua seqüência de aminoácidos altamente conservada tem a propriedade de reter sinal filogenético útil nas terceiras posições de códons para divergências do Terciário e de períodos mais recentes (Cho *et al.* 1995, Mitchel *et al.* 1997, Yang et al. 2000). Moulton e Wiegmann (2004) indicam que o EF-1 α é eficiente até mesmo para eventos do Mesozóico. As substituições neste gene, sejam as sinônimas ou as particularmente escassas não sinônimas, tendem a ser altamente informativas em níveis taxonômicos mais basais (Fang *et al.* 1997). A eficiência filogenética do gene pode ser observada no poder de recuperação e suporte de resoluções obtidas de evidência morfológica em outros estudos (Mitchel *et al.* 2000). Este grau de resolução eficiente já foi observado até o nível de subfamília em Noctuoidea (Mitchel *et al.* 2000).

O gene CAD é codificador de uma proteína fusionada responsável pelas três primeiras atividades enzimáticas da cadeia biossintética *de novo* da pirimidina: carbamoilfosfato sintetase, aspartato transcarbamilase e dihidroorotase (Moulton e Wiegmann 2004). Carbamoilfosfato sintetase (CPS) é o maior dos três domínios do gene CAD. Apresenta cerca de 4Kb e encontra-se dividido em duas regiões: cadeia menor e maior de CPS. Foram seqüenciados cerca de 724pb da CPS menor para o presente estudo.

Tanto CAD quanto EF-1 α têm as vantagens inerentes a genes de cópia única além de possuírem as suas seqüências de aminoácidos codificadas conhecidas. Além disto, devido à conservação da seqüência da proteína e a ausência de inserções ou deleções os alinhamentos de CAD e EF-1 α tornam-se mais fáceis de se inferir e, conseqüentemente, mais confiáveis.

Cada um dos quatro conjuntos de caracteres foi considerado como uma partição de processo (Bull *et al.* 1993, Kluge e Wolf 1993, Miyamoto e Fitch 1995) dentro do conjunto de nossos dados. As partições permitem acessar a equivalência de informação filogenética derivada de diferentes fontes (Baker e DeSalle 1997). A organização dos dados em partições tem sido vista como um requisito para a análise filogenética. Alguns autores têm sugerido que sinais distintos em várias matrizes de dados precisam ser considerados separadamente em um contexto taxonômico de congruência (Mickey e Farris 1981, Swofford 1991, Miyamoto e Fitch 1995).

Existem argumentos negando esta abordagem e sugerindo a combinação dos dados em todos os casos (Kluge 1989, Barret *et al.* 1991, Eernisse e Kluge 1993, Kluge e Wolfe 1993, Nixon e Carpenter 1996). Segundo estes autores, a melhor explicação incluiria todos os dados relevantes e a utilização de uma análise particionada seguida de consenso implicaria em pesagem arbitrária de caracteres (Cracraft e Mindell 1989).

Consideramos a ênfase na exploração dos dados e a maximização da informação da abordagem de combinação de partições como uma vantagem inerente do método (Page e Holmes 1998). A qualidade e a quantidade de dados moleculares compilados para o trabalho permitem a avaliação do desempenho de cada um dos conjuntos de dados. Os quatro métodos propostos em Baker *et al.* (2001) para quantificar a utilidade filogenética em diferentes partições são aplicáveis ao nosso conjunto de dados: (a) o exame das propriedades dos dados antes da análise filogenética (Friedlander *et al.* 1994, Graybeal 1994); (b) o exame das propriedades dos dados especificamente aplicados a uma filogenia (Milinkovitch *et al.* 1996, Naylor e Brown 1998, Bremer 1994); (c) a comparação dos resultados com uma filogenia bem suportada (Friedlander *et al.* 1994, Graybeal 1994, Russo *et al.* 1996, Cunningham 1997a, 1997b) e (d) a congruência entre os dados comparáveis das diferentes fontes (Miyamoto *et al.* 1994, Friedlander *et al.* 1998, Allard *et al.* 1999). Além destes a comparação entre a resolução dos diferentes conjuntos, a sua congruência ou conflito, pode ser avaliada como medida de eficiência (Baker *et al.* 2001).

Um segundo nível da análise compreende a avaliação do desempenho do conjunto de dados quando avaliado através de diferentes critérios filogenéticos. Os diferentes resultados provindos destes critérios oferecem uma visão do grau de qualidade do conjunto de dados: sua coerência filogenética e homogeneidade. Três critérios são empregados na construção de uma nova hipótese evolutiva para a família: máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana.

O trabalho vem apresentar estas considerações sobre a congruência dos diversos conjuntos de dados moleculares frente às filogenias já propostas. As resoluções apresentadas são discutidas frente às propostas morfológicas anteriores, com base nos caracteres e hipóteses que foram utilizados para justificar de seus grupamentos taxonômicos. Novas análises das propostas anteriores são executadas com os mesmos critérios e algoritmos aplicados aos dados moleculares para permitir uma melhor comparação entre os resultados.

2. Material e métodos

2.1. Amostragem dos Taxa

Muscídeos adultos foram coletados durante o período de Janeiro de 2001 a agosto de 2002. Os espécimes foram preservados diretamente em etanol 95-100°GL e armazenados a -20°C. Os táxons utilizados como grupo externo a Muscidae foram obtidos da coleção do Laboratório de Sistemática Molecular da Universidade Estadual da Carolina do Norte (North Carolina State University – NCSU). Cinco espécies de muscídeos foram coletadas e enviadas por Adrian Charles Pont da Coleção Entomológica Hope, Museu da Universidade, Londres. As seqüências de *Musca domestica* foram obtidas do GenBank.

O posicionamento taxonômico apresentado em texto, tabelas e cladogramas segue, quando não especificado, a proposta de Carvalho (1989b). A Tabela 1 e 2 apresentam as espécies utilizadas na análise, sua posição taxonômica, os números de acesso para o GenBank e sua procedência. Ao todo foram 24 espécies de Muscidae representando 18 gêneros e 6 subfamílias. Duas espécies de Anthomyiidae, uma de Fanniidae e uma de Scathophagidae foram amostradas como representantes das demais famílias de Muscoidea.

Os *vouchers* e material associado encontram-se depositados na coleção Pe. Jesus Santiago Moure – DZUP do departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, PR).

Tabela 1

Espécies utilizadas na análise e número de acesso do Gen Bank para cada gene utilizado. Note que as seqüências de COI (2792/C2N3389), tRNA-Leu e COII (2792/C2N3389) são contíguas e foram obtidas de um mesmo conjunto de primers podendo estarem depositadas sob mesmo número de acesso

Espécies	COI	COI	TRNA-Leu+COII	EF-1 α	CAD
	TYJI460/C1N2191	2792/C2N3389	2792/C2N3389		
<i>Eustalomya</i> sp.	AJ879602	AJ879617	AJ879617	AJ871213	AJ867946
<i>Fannia canicularis</i>	AJ879592	AJ879606	AJ879606	AJ871202	AJ867935
<i>Hylemya</i> sp.	AJ617702	AJ623305	AJ627903	AJ605071	AJ605059
<i>Scathophaga stercoraria</i>	AJ617694	AJ623297	AJ627895	AJ605063	AJ605051
<i>Biopyrellia bipuncta</i>	AJ617695	AJ623298	AJ627896	AJ605064	AJ605052
<i>Cordiluroides megalopyga</i>	AJ879590	AJ879604	AJ879604	AJ871200	AJ867933
<i>Cyrtoneuropsis maculipennis</i>	AJ879591	AJ879605	AJ879605	AJ871201	AJ867934
<i>Helina evecta</i>	AJ879593	AJ879607	AJ879607	AJ871203	AJ867936
<i>Helina lasiophthalma</i>	AJ617698	AJ623301	AJ627899	AJ605067	AJ605055
<i>Hydrotaea</i> sp.	AJ617692	AJ623295	AJ627893	AJ605061	AJ605049
<i>Limnophora deleta</i>	AJ879594	AJ879608	AJ879608	AJ871203	AJ867937
<i>Morellia ochricornis</i>	AJ617697	AJ623300	AJ627898	AJ605066	AJ605054
<i>Morellia xanthoptera</i>	AJ617696	AJ623299	AJ627897	AJ605065	AJ605053
<i>Musca domestica</i>	AF259518	AF104622	AF104622	AF503149	AY280689
<i>Muscina stabulans</i>	AJ879595	AJ879609	AJ879609	AJ871205	AJ867938
<i>Neodexiopsis</i> sp.	AJ879597	AJ879611	AJ879610	AJ871207	AJ867940
<i>Neomuscina inflexa</i>	AJ879596	AJ879610	AJ879610	AJ871206	AJ867939
<i>Ophyra albuquerquei</i>	AJ617701	AJ623304	AJ627902	AJ605070	AJ605058
<i>Phaonia shannoni</i>	AJ879614	AJ879614	AJ879614	AJ871210	AJ867943
<i>Phaonia tuguriorum</i>	AJ617700	AJ623303	AJ627901	AJ605069	AJ605057
<i>Philornis blanchardi</i>	AJ617699	AJ623302	AJ627900	AJ605068	AJ605056
<i>Polietina nigra</i>	AJ617691	AJ623294	AJ627892	AJ605060	AJ605048
<i>Polietina orbitalis</i>	AJ879599	AJ879613	AJ879613	AJ871209	AJ867942
<i>Polietina prima</i>	AJ879601	AJ879616	AJ879616	AJ871212	AJ867945
<i>Polietina steini</i>	AJ879598	AJ879612	AJ879612	AJ871208	AJ867941
<i>Pseudoptilolepis fulvapoda</i>	AJ879603	AJ879618	AJ879618	AJ871214	AJ867947
<i>Psilochaeta pampiana</i>	AJ879600	AJ879615	AJ879615	AJ871211	AJ867944
<i>Stomoxys calcitrans</i>	AJ617693	AJ623296	AJ627894	AJ605062	AJ605050

Tabela 2

Espécies utilizadas na análise, suas subfamílias e tribos correspondentes (baseado em Carvalho 2002 e Couri e Carvalho 2003) e dados de origem do espécime

Subfamília	Tribo	Espécies	Localidade
(Anthomyiidae)		<i>Hylemya</i> sp.	Great Smoky Mountain N.P., NC, USA
(Anthomyiidae)		<i>Eustalomya</i> sp.	Great Smoky Mountain N.P., NC, USA
(Fanniidae)		<i>Fannia canicularis</i>	48°22'N 69°22'W M. Giroux, Canadá
(Scathophagidae)		<i>Scathophaga stercoraria</i>	Mt. Mitchell, NC, USA
Azeliinae	Azeliini	<i>Hydrotaea</i> sp.	Passo Fundo, RS, Brasil
	Azeliini	<i>Ophyra albuquerquei</i>	Passo Fundo, RS, Brasil
	Azeliini	<i>Pseudoptilepis fulvapoda</i>	Vanini, RS, Brasil
	Reinwardtiini	<i>Muscina stabulans</i>	Curitiba, PR, Brasil
	Reinwardtiini	<i>Philornis blanchardi</i>	Passo Fundo, RS, Brasil
	Reinwardtiini	<i>Psilochaeta pampiana</i>	Chapada, RS, Brasil
Coenosiinae	Coenosiini	<i>Cordiluroides megalopyga</i>	Morretes, PR, Brasil
	Coenosiini	<i>Neodexiopsis</i> sp.	Morretes, PR, Brasil
	Limnophorini	<i>Limnophora deleta</i>	Passo Fundo, RS, Brasil
Cyrtoneurinae		<i>Cyrtoneuropsis maculipennis</i>	Morretes, PR, Brasil
		<i>Neomuscina inflexa</i>	Morretes, PR, Brasil
Muscinae	Muscini	<i>Biopyrellia bipuncta</i>	Chapada, RS, Brasil
	Muscini	<i>Morellia ochricornis</i>	Chapada, RS, Brasil
	Muscini	<i>Morellia xanthoptera</i>	Morretes, PR Brasil
	Muscini	<i>Polietina nigra</i>	Morretes, PR Brasil
	Muscini	<i>Polietina orbitalis</i>	Morretes, PR Brasil
	Muscini	<i>Polietina prima</i>	Morretes, PR Brasil
	Muscini	<i>Polietina steini</i>	Morretes, PR Brasil
	Stomoxyni	<i>Stomoxys calcitrans</i>	Anita Garibaldi, RS, Brasil
Phaoniinae		<i>Helina evecta</i>	Oxford, United Kingdom
		<i>Helina lasiophthalma</i>	Oxford, United Kingdom
		<i>Phaonia shannoni</i>	Morretes, PR, BRASIL
		<i>Phaonia tuguriorum</i>	Oxford, United Kingdom

2.2. Extração de DNA, escolha dos primers e amplificação

O DNA genômico foi extraído das espécies preservadas em álcool por maceração das moscas inteiras utilizando protocolo de extração baseado em SDS/proteinase K (50mM Tris, pH 8.0; 50mM EDTA, pH 8.0; 2% SDS, 75mM NaCL; 50mM Sacarose; 100mg proteinase K). As amostras foram homogeneizadas em 700µl de tampão de lise, colocadas em uma placa térmica a 55°C por 6-24 horas. A extração foi efetuada em duas etapas: primeiro com mistura fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich) e segundo com a mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Ambas as misturas de extração foram utilizadas na proporção de 1:1 com o volume do material macerado.

Um décimo do volume de solução de acetato de sódio 3M e 1x o volume de isopropanol gelado foram adicionados à fase aquosa da segunda extração para precipitar o DNA. Este precipitado foi peletizado por microcentrifugação. O *pellet* foi submetido à lavagem com 1ml de etanol 70°GL e 95°GL e subsequente secagem. Em seguida, o *pellet* seco foi diluído em 100µl de TE e armazenado em freezer -80°C. Em poucos casos onde somente um único espécime encontrava-se disponível, os ácidos nucleicos foram extraídos do tórax, deixando-se a cabeça, asas, pernas e abdome como *voucher*.

Os oligonucleotídeos utilizados como *primers* (ver Tabela 3) para amplificar os genes COI (Simon *et al.*, 1994), COII (Brown *et al.*, 1994), EF - 1 α (Méier e Wiegmann 2002, Collins e Wiegmann 2002) e CAD (Moulton and Wiegmann 2004) foram sintetizados por Sigma Genosys (Woodland, TX, EUA).

Tabela 3
Conjuntos de *primers* utilizados e respectivos autores

Gene	Primer	Seqüência (5'-3')
Citocromo Oxidase subunidade I	TY-J-1460	TAC AAT TTA TCG CCT AAA – CTT CAG CC
Simon et al. 1994	C1-N-2191	CCC GGTAAG ATT AAA ATA TAA ACT TC
Citocromo Oxidase subunidade I e II	S2792	ATA CCT CGA CGT TAT TCA GA
Simno et al 1994/Brown et al. 1994	C2-N-3389	TCA TAA GTT CAR TAT CAT TG
Fator de Alongamento – 1α	EF4	GAR CGT GGT ATY ACM ATT GA
Méier e Wiegmann 2002/Collins e Wiegmann 2002	EF6	CWC CAG TTT CWA CAC GWC C
	EF51*	CAT GTT GTC RCC RTG CCA TCC
	EF2	GGA TGG CAY GGY GAC AAC ATG
	EF5	CTC ATA TCA CGT ACA GCR AAR CG
CAD (Rudimentar)	60F	GAR GTN GTN TTY CAR ACN GGN AT
Moulton e Wiegmann 2004	364R	TCN ACN GCR AAN CCR TGR TTY TG

*EF51 foi utilizado para substituir EF6 na reação de seqüenciamento.

Os segmentos dos genes foram amplificados com PCR padrão de três etapas exceto para CAD onde utilizamos PCR *touchdown* (Hecker e Roux, 1996). Para ambos os tipos de amplificação foi utilizada Ex Taq polimerase TaKaRa (Mirus Corp., Madison, WI, EUA).

O gene EF-1 α foi amplificado em duas seções sobrepostas através de RT - PCR (Kawasaki 1990) utilizando o kit GeneAmp RNA PCR (PE Applied Biosystems, Cidade de Foster, CA, EUA) através do protocolo sugerido pelo kit para RT - PCR seguido do protocolo de PCR utilizado para DNA PCR. Para os genes COI, COII e EF -1 α foi utilizado anelamento a 50°C e 30 ciclos. Para a amplificação do gene CAD através de *touchdown* PCR foi utilizado anelamento a 55°C por seis ciclos seguidos de outro anelamento a 50° C e 36 ciclos.

2.3. Seqüenciamento, construção dos contig e edição

Os genes foram seqüenciados em um seqüenciador *dye terminator* utilizando o kit de seqüenciamento dRhodamine (PE Biosystems, Warrington, Inglaterra). Para o seqüenciamento do gene EF-1 α , o oligonucleotídeo EF6 foi substituído pelo EF51 (Tabela 3) para a reação de seqüenciamento. A confirmação das seqüências foi efetuada através de

comparação das fitas complementares de DNA. A edição das seqüências de nucleotídeos, montagem dos *contigs* e seqüência consenso foram feitas com auxílio do programa Sequencher 4.0.5 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, EUA, 1991).

2.4. Alinhamento dos nucleotídeos e análise filogenética

Os limites dos conjuntos de dados referentes às seqüências de cada gene foram reconhecidos e identificados em quatro partições: COI, composta dos segmentos do conjunto TY-J-1460/C1-N-2191 e C2-N-3389/2792 respectivamente; COII; CAD e EF - 1 α . Outras formas de subdivisão dos dados incluíram partições de dados discriminando os genes nucleares dos mitocondriais e as diferentes posições de códon. Esta divisão dos dados em partições foi baseada no pressuposto de que as seqüências pertencentes a cada gene evoluem como unidades discretas.

O alinhamento de cada um dos genes foi inferido manualmente através do programa Genetic Data Environment (GDE 2.2, Smith *et al.*, 1994).

O alinhamento das seqüências de CAD foi baseado na tradução dos códon da seqüência completa para *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.* 2000; AE003503), *Anopheles gambiae* (Holt *et al.* 2002; EAA06526) e seqüências parciais de *Epalpus signifer* (Moulton e Wiegmann 2004; AY280680).

O produto do conjunto de *primers* C2-N-3389 (Simon *et al.* 1994) e 2792 (Brown *et al.* 1994) empregados para a amplificação de Citocromo Oxidase foi uma região que compreendia a porção de término do gene COI (incluindo seu códon de parada), o DNA codificador do RNA transportador de Leucina (tRNA Leu) e a porção inicial do gene COII (ver Fig.3). A porção codificadora do tRNA Leu foi desprezada na análise tendo em vista seu pequeno tamanho e a subjetividade em seu alinhamento.

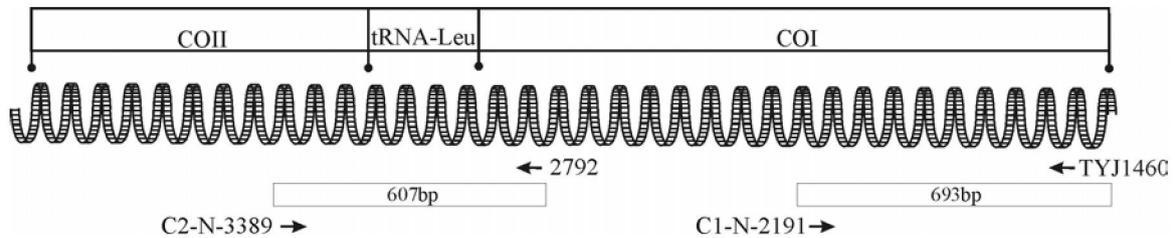


Fig. 3. Diagrama indicando a posição das seqüências de Citocromo Oxidase subunidade I (COI) e II (COII), seus respectivos conjuntos de *primers* e comprimento. tRNA-Leu - tRNA Leucina (figura retirada de Schuehli *et al.* 2004).

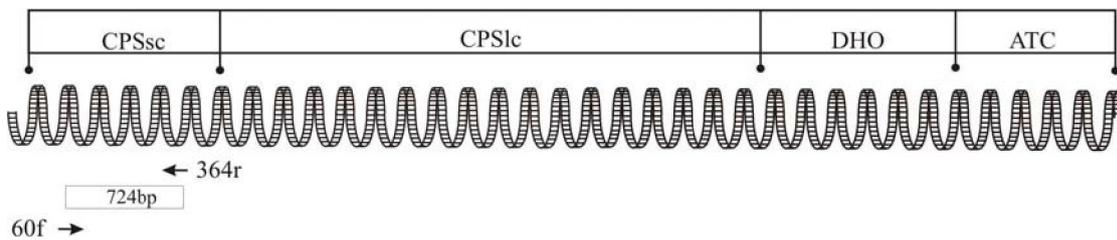


Fig. 4. Diagrama indicando a posição da porção cadeia menor de carbamoilfosfato sintetase (CPSsc) no gene CAD. CPSlc – Cadeia maior de carbamoilfosfato sintetase; DHO – dihidroorotase; ATC – aspartato transcarbamilase (figura adaptada de Moulton e Wiegmann 2004).

Ambas as regiões de COI e o gene COII foram alinhadas baseadas na tradução dos códons publicada para *Cochliomyia homnivorax* (Calliphoridae) (Lessinger *et al.* 2000 - AF260826).

O alinhamento de EF-1 α foi baseado na seqüência de *Musca domestica* (Collins e Wiegmann 2002; AF503149) e em sua seqüência de aminoácidos.

O teste de homogeneidade entre as partições ou incongruência de diferença de comprimento (*Incongruence Length Difference*, ILD - Farris *et al.* 1994) como implementado pelo software PAUP*, versão 4.0b10 (Swofford 2002) foi aplicado às seguintes partições: CAD, EF-1 α , COI e COII; CAD e EF-1 α , COI e COII. Também foi testado o conjunto de seqüências de origem mitocondrial (COI e COII) contra o conjunto de seqüências de origem nuclear (CAD e EF-1 α). A análise foi executada com 100 réplicas,

início de busca *stepwise*, 10 réplicas aleatórias de adições de seqüências e embaralhamento TBR (*tree bisection-reconnection*).

O táxon *Scathophaga stercoraria* foi empregado como grupo-externo de todas as análises dentre os demais táxons de não-Muscidae.

Para permitir comparações com as propostas filogenéticas anteriores para Muscidae, o trabalho de Carvalho (1989b) foi analisado na nova versão do software PAUP* utilizando a matriz apresentada no trabalho original, busca heurística com adições aleatórias das seqüências e 1000 réplicas. O trabalho de Couri e Carvalho (2003) originalmente analisado no software Hennig86 também foi re-analisado no software PAUP* com os mesmos critérios descritos no trabalho: busca heurística associada à pesagem sucessiva, aplicando como critérios de busca a adição aleatória das seqüências e 1000 réplicas e o índice para pesagem sucessiva como sendo o índice de consistência. Os táxons apresentados como grupo-externo foram mantidos. Todos os caracteres em ambas as novas análises foram tratados como não ordenados.

Análise de parcimônia sem pesagem diferencial dos caracteres moleculares (máxima parcimônia - MP) foi efetuada através do programa PAUP* utilizando a opção de busca heurística e 1000 réplicas de adição aleatórias de seqüências com TBR *branch swapping*. Todos os caracteres foram considerados não ordenados, opção *steepest descent* desativada, número máximo de árvores ilimitado (automaticamente acrescido de 100), ramos colapsam se o maior comprimento for zero e opção *multrees* acionada. Quando a busca heurística resultou em múltiplas AMPs estas foram sumarizadas em um consenso estrito. Cada partição foi analisada individualmente e posteriormente o conjunto total dos dados segundo os mesmos critérios.

A estratégia *ratchet* (Nixon 1999) foi também implementada para o conjunto total dos dados através do programa PAUPrat (Sikes e Lewis 2001) com as mesmas opções de busca no PAUP*. Em todos os casos, as seguintes opções foram utilizadas: todos os caracteres do tipo não-ordenado, opção *steepest descent* desativada, *MaxTrees* ilimitada (auto acrescentada em 100), ramos colapsados se o maior comprimento de ramo for zero e opção *MulTrees* ativada.

Os valores de suporte de ramo para as árvores de MP foram estimados através de análise de *Bootstrap* não paramétrico (Felsenstein 1985) e Suporte de Bremer (Bremer 1988,

1994). As análises de *Bootstrap* foram executadas com 1000 réplicas com adição de seqüências simples e *TBR branch swapping*. Foram calculados os valores de suporte de Bremer para cada nodo do consenso estrito das árvores para os conjuntos de dados combinados e os valores de Bremer particionado (Baker e DeSalle 1997) para os conjuntos de dados individuais através do programa TreeRot V2 (Sorenson 1999) em conjunto com PAUP*. Este software produz um arquivo de comando NEXUS para ser executado no software PAUP* que por sua vez executa a busca heurística com 20 réplicas de adições aleatórias para cada nodo determinado (*constraint*).

O critério de máxima verossimilhança (ML) para a reconstrução filogenética exige o pressuposto de um modelo de evolução de nucleotídeos. A opção do modelo mais simples (aquela que melhor descreve os dados com o menor número de parâmetros) é geralmente assumida como a mais apropriada. Quando o modelo assumido apresenta excesso de parâmetros (é muito complexo), variâncias desnecessárias de amostragem são introduzidas pela estimativa dos parâmetros extras (Lemmon e Moriarty 2004). Esta variância adicional pode comprometer a acurácia filogenética (Cunningham *et al.* 1998). Casos onde o modelo assumido apresenta escassez de parâmetros (é muito simples) são bastante problemáticos para estimativas filogenéticas por muitas vezes conduzirem ao fenômeno de *long-branch attraction* onde a confiança na estimativa de uma bipartição incorreta aumenta na medida em que mais dados são incluídos na análise (Swofford *et al.* 2001). A validade da adição de parâmetros ao modelo é freqüentemente testada através dos testes de proporção de máxima verossimilhança (*likelihood ratio tests* - LRTs). Os LRTs calculam os valores de máxima verossimilhança de uma árvore de teste utilizando vários modelos (Huelsenbeck e Rannala 1997). Os valores de proporção de máxima verossimilhança apresentam uma distribuição χ^2 com os graus de liberdade sendo igual à diferença em número de parâmetros estimados para os dois modelos.

Para cada partição e para todo o conjunto completo foram testados 46 modelos através do programa Modeltest (Posada e Crandall 1998). Este software auxilia a escolha de um modelo de evolução apropriado para os dados através de uma série de LRTs hierárquicos baseados em uma árvore teste de neighbor joining (aplicando o modelo de Jukes-Cantor). Os modelos sugeridos pelo programa foram selecionados através do critério de informação Akaike (critério de informação teórica mínima – AIC – Akaike 1974, Posada e Crandall

1998). Os modelos sugeridos foram utilizados como modelos de evolução para a análise de ML e alguns de seus parâmetros foram utilizados no estabelecimento dos critérios da análise bayesiana.

Os modelos também foram utilizados para a determinação da variável tempo relativo e na determinação do número de transições (ti) e transversões (tv) para cada gene.

Cada partição individualmente e o conjunto total de dados foram analisados segundo o critério de ML seguindo o modelo particularmente sugerido. A busca de ML foi executada no programa PAUP* utilizando em todas as opções como árvore inicial a árvore de MP equivalente obtida para o conjunto de dados analisados.

Para computar valores de suporte para as árvores de ML aplicou-se a Estratégia dos Quartetos (Strimmer e von Haeseler 1996, Schmidt *et al.* 2002). Os valores de suporte do *puzzling* dos quartetos foram calculados através da reconstrução da árvore obtida pela análise no PAUP* com o emprego do programa TreePuzzle v.5.2 (Schmidt *et al.* 2002). O mesmo modelo utilizado no PAUP* foi utilizado para o cálculo dos valores de suporte da árvore. A análise de *Bootstrap* foi executada com 1000 réplicas no software TreePuzzle, empregando também a Estratégia dos Quartetos através do software SeqBoot do pacote Phylip (Felsenstein 1993).

Para a inferência bayesiana foi utilizado o software MrBayes (Huelsenbeck e Ronquist 2001). Para todas as partições foi aplicado o modelo geral de substituição padrão (4 por 4), número de substituições igual a seis, e distribuição gama de taxa de variação entre nucleotídeos. As frequências dos estados de caracteres, a proporção de sítios invariantes e a forma do parâmetro gama foram analisadas individualmente pelo programa para cada partição. Os critérios de busca do método *Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo* (mcmc) foram 2.500.000 gerações com 4 cadeias e número de árvores ignoradas no consenso (*burn in*) igual a 4000. A frequência de amostragem da cadeia de Markov foi ajustada para 100 ciclos.

3. Resultados

3.1. Características das seqüências e alinhamento

As seqüências dos genes somaram somaram cerca de 2989 nucleotídeos com 1073 sítios informativos para parcimônia (PI) e 987 PI especificamente para os muscídeos (Tabela 4). Os valores composicionais apresentam-se homogêneos entre os genes com exceção do conteúdo de G e C para os genes mitocondriais (Tabela 5). Os altos valores do conteúdo A + T na terceira posição do códon para os genes mitocondriais podem ser percebidos na comparação com as demais posições e genes (Tabela 6).

A relação entre número de t_i e t_v com tempo relativo para cada gene estudado (Fig. 5) não caracteriza saturação. A comparação destes valores especificamente para o gene EF-1 α (Fig. 5d) apresenta duas tendências distintas remetendo a taxas de evolução diferenciadas. A adequação das taxas de evolução dos genes ao relógio molecular (regularidade) é mais acentuada nos valores do coeficiente de determinação (R^2) de t_v para os genes mitocondriais (Tabela 7). Estes valores de t_i são muito semelhantes em todos os genes analisados (Tabela 7). Dentre as porções dos genes mitocondriais examinadas, COI apresenta taxa de evolução mais elevada revelando um alto número de substituições em um determinado período de tempo quando comparado com COII (Tabela 7). O gene COI é conhecido (Bernasconi et al. 2000b) como o gene de evolução mais lenta do genoma mitocondrial. Muito provavelmente o resultado de um coeficiente angular mais alto para COI em comparação com COII reflete o exame parcial da seqüência do gene. Diferentes regiões do gene COI e II se mostraram relacionadas a diferentes pressões seletivas, apresentando valores de taxa de evolução diferentes, dentro do mesmo gene (Simon et al. 1994, Caterino e Sperling 1999). Os valores de taxa de evolução de EF-1 α são maiores do que os valores obtidos para CAD, mostrando-se particularmente altos para t_i (Tabela 7). Dentre todos os genes experimentados, EF-1 α foi o que apresentou maior taxa de evolução (dada pelo coeficiente angular) em seus valores de t_i (Tabela 7). Este valor propõe adequação do gene especialmente a divergências mais recentes enquanto sugere COII e demais genes de valor de taxa de evolução baixa como adequados a divergências mais antigas.

Tabela 4

Número de pares de bases em cada gene (comp.); porcentagem de sítios variáveis entre os táxons de Muscoidea (Variáveis Muscoidea); porcentagem de sítios variáveis informativos para Parcimônia entre táxons de Muscoidea (variáveis informativos Muscoidea); porcentagem de sítios variáveis entre os táxons de Muscidae (Variáveis Muscidae); porcentagem de sítios variáveis informativos para Parcimônia entre táxons de Muscidae (PI)

gene	comp. (pb)	Variáveis Muscoidea	PI Muscoidea (%)	variáveis Muscidae (%)	PI Muscidae (%)
CAD	724	429 (59,3%)	338 (46,7%)	403 (55,7%)	315 (43,5%)
COI	941*	453 (48,1%)	334 (35,5%)	418 (44,4%)	313 (33,3%)
COII	288	143 (49,7%)	105 (36,5%)	140 (48,6%)	98 (34%)
EF-1 α	1036	464 (44,8%)	296 (28,6%)	414 (40%)	255 (24,6%)

* este valor é referente ao comprimento das duas porções de COI seqüenciadas, 694 pb e 247 pb.

Tabela 5

Freqüência média de Bases por genes.

Gene	A (%)	C (%)	G (%)	T (%)
CAD	0,27	0,20	0,25	0,28
COI	0,31	0,16	0,14	0,39
COII	0,34	0,14	0,09	0,43
EF-1 α	0,24	0,27	0,24	0,25

Tabela 6

Freqüência média do conteúdo A + T nas diferentes posições dos códons.

gene	1 ^a (%)	2 ^a (%)	3 ^a (%)
CAD	50,08	59,46	55,94
COI	59,38	58,46	90,99
COII	66,53	72,90	92,54
EF-1 α	46,48	58,53	42,98

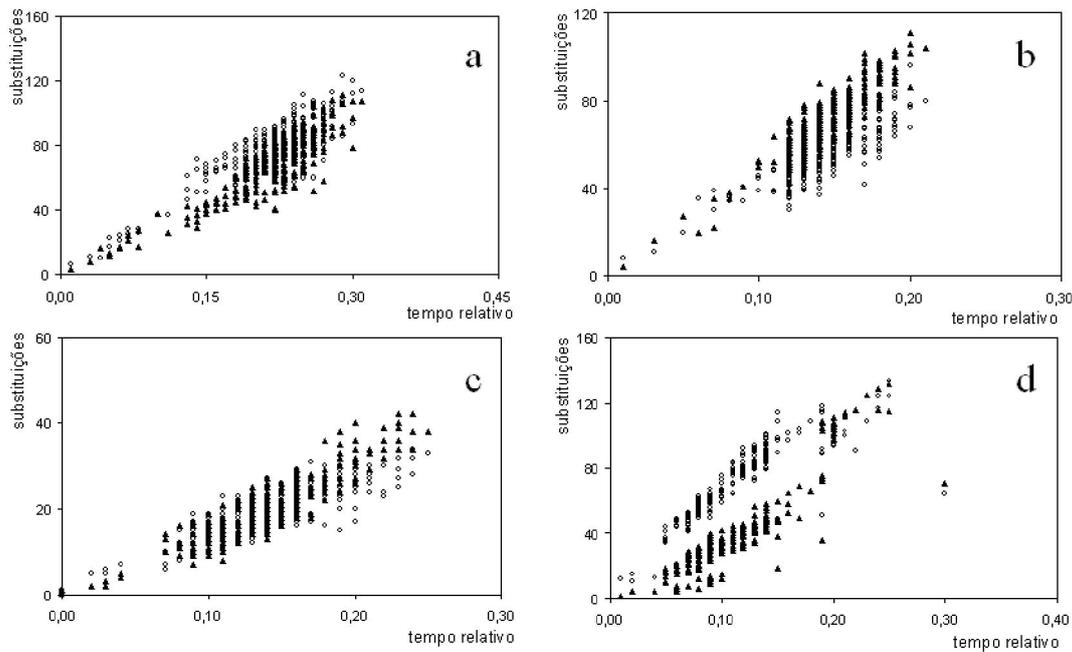


Fig. 5. Número de substituições (transições – representado pelos círculos vazados; e transversões – representado pelos triângulos) por tempo relativo (distância corrigida com base nos modelos individuais). (a) CAD; (b) Citocromo Oxidase subunidade I; (c) Citocromo Oxidase subunidade II; (d) Fator de Alongamento - 1α .

Tabela 7

Valores do Coeficiente angular (a) da reta de regressão da comparação transição (ti)/transversão (tv) x Tempo e coeficiente de determinação (R^2) para cada partição e seu respectivo modelo.

gene		a	R^2
CAD	tv	315,90	0,75
	ti	356,04	0,68
COI	tv	493,61	0,81
	ti	391,65	0,63
COII	tv	144,68	0,81
	ti	139,23	0,64
EF-1 α	tv	374,76	0,74
	ti	589,86	0,61

Os modelos de evolução de nucleotídeos propostos pelo teste estatístico da taxa de verossimilhança (Tabela 8) incluíram para todos os genes a distribuição gama e, com exceção do gene CAD, todos os modelos propostos incluíram sítios invariantes (Tabela 8).

Tabela 8
Modelos e respectivos valores do teste estatístico de taxa de verossimilhança para cada partição

gene	Modelo proposto (AIC)	-lnL
CAD	TrN + G	243,2256
COI	GTR + I + G	6463,9409
COII	TVM + I + G	2722,3979
EF-1 α	SYM + I + G	8145,0898
Conjunto	GTR + I + G	31874,2871

Todos os genes apresentaram alinhamento não ambíguo com exceção do gene COI (C2N3389/2792) onde três espécies apresentaram uma região de indel nas últimas 21 bases do alinhamento: *Neodexiopsis* sp. (15pb), *Helina evecta* (6pb) e *Helina lasiophthalma* (3pb). O alinhamento de todos os genes encontra-se em anexo.

O teste de homogeneidade entre todos os conjuntos de dados (CAD, COI, COII e EF-1 α) e entre suas diferentes combinações (nucleares: CAD e EF-1 α ; mitocondriais: COI e COII; nucleares e mitocondriais: CAD, EF-1 α e COI, COII; CAD e COI; CAD e COII; EF-1 α e COI e EF-1 α e COII) resultou em um valor significativo ($p < 0,05$) de 0,01.

Foram incluídas como *missing data* na matriz as seguintes regiões que falharam na amplificação ou sequenciamento: para o gene CAD os táxons *Hylemya* sp. (posição 236-368 na matriz), *Scathophaga stercoraria* (255-381); para COI (TYJ1460/C1N2191) o táxon *Polietina steini* (725-1418); para EF-1 α (EF4/EF6) o táxon *Phaonia tuguriorum* (1954-2506) e para EF-1 α (EF2/EF5) os táxons *Limnophora deleta* (2554-2889) e *Ophyra albuquerquei* (2554-2889).

3.2 Análise filogenética

3.2.1 Re-análise das propostas anteriores.

A re-análise da matriz de Carvalho (1989b) resultou em 354 AMPs com 80 passos, CI = 0,5250 e RI = 0,7343 (Fig. 6). Com a inclusão do grupo-externo original apresentado no trabalho, a re-análise da matriz resultou em 126 AMPs de 83 passos CI = 0,5422 e RI = 0,7467. A análise original apresentava 100 AMPs de 85 passos e CI = 0,529 (RI não informado). As diferenças entre a árvore de consenso da re-análise e a árvore original foram apresentadas na base do cladograma e em alguns clados em particular. Os gêneros *Phaonia*, *Dichaetomyia* e *Souzalopesmyia* (Phaoniinae) foram apresentados como um grupo monofilético, como na análise original, mas sem resolver as relações internas entre estes gêneros. Uma grande politomia na base da árvore reúne o gênero *Achanthiptera* (Achanthipterinae), o clado ((Coenosiinae, Mydaeinae) Phaoniinae) e um clado que agrupa os demais táxons da análise. Neste, Muscinae foi apresentado como grupo monofilético com *Philornis* e *Dalcyella* (Reinwardtiini) na base.

A re-análise da matriz de Couri e Carvalho (2003) resultou em 13 AMP de 158 passos CI = 0,3987, RI = 0,6570. A pesagem sucessiva resultou nas mesmas 13 árvores obtidas com a busca sem pesagem diferencial. O consenso estrito destas AMPs (Fig. 7) apresentou uma topologia diferente da original. Quando analisado sem a pesagem sucessiva, a topologia apresentada no trabalho original apresenta comprimento de 161 passos, CI = 0,3913 e RI = 0,6462.

O clado *Hydrotaea* + *Micropotamia* (Azeliinae) apareceu em posição mais basal do que no estudo original. Nesta re-análise, o clado foi apresentado como grupo irmão dos demais táxons de Muscidae. *Stomoxys* aparece não mais como pertencente ao clado Muscinae (*Stomoxys* (*Polietina* (*Morellia*, *Musca*))), mas como gênero irmão do conjunto politômico *Aluadinella*, *Ochromusca*, *Charadrella* e *Aethiomyia* (parte de Dichaetomyiinae). O gênero *Philornis* foi excluído do clado Reinwardtiinae sendo apresentado como grupo irmão dos (Dichaetomyiinae (Mydaeinae, Coenosiinae)). *Cyrtoneurina* e *Cyrtoneuropsis* (Dichaetomyiinae sensu Couri e Carvalho 2003 e Cyrtoneurinae sensu Carvalho 1989b e 2002 e Carvalho *et al.* 1993) aparecem como grupo irmão de (*Dichaetomyia* (*Scutellomusca* (*Mydaea* (*Limnophora* (*Neodexiopsis*, *Coenosia*))))).

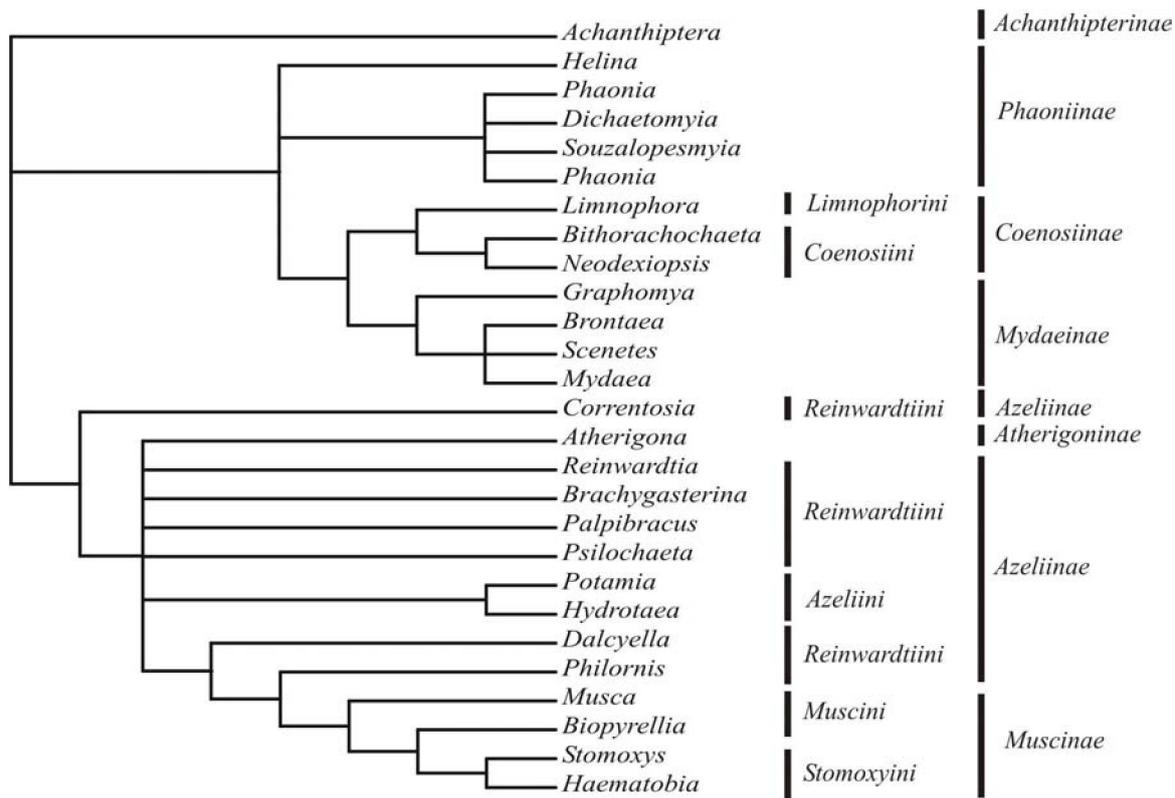


Fig. 6. Consenso estrito não enraizado das 28 árvores resultantes da re-análise da matriz de dados de Carvalho (1989). Comprimento = 80 passos, CI = 0,5250 e RI = 0,7343

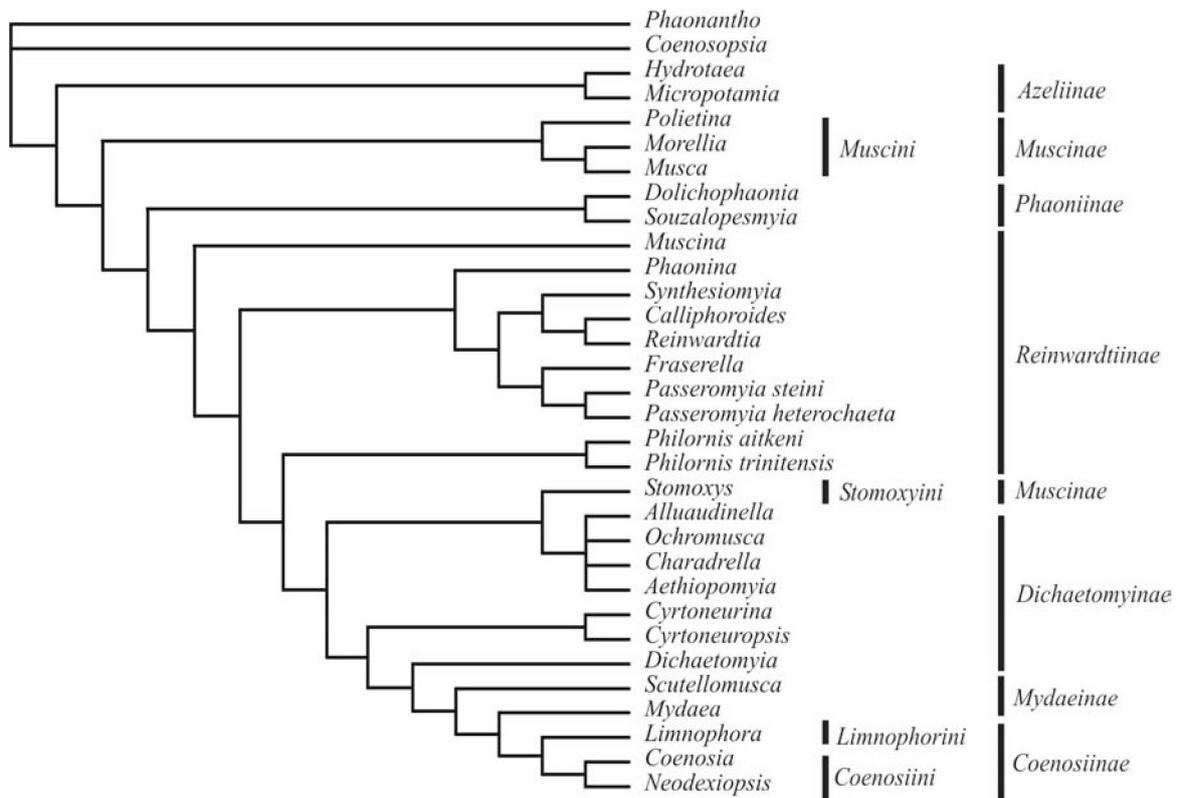


Fig. 7. Consenso estrito das 13 árvores resultantes da re-análise da matriz de dados do trabalho de Couri e Carvalho (2003). Comprimento = 158 passos CI = 0,3987, RI = 0,6570. Classificação apresentada segue o trabalho original.

3.2.1 Análises individuais dos dados de cada gene.

As Figs. 7-10 apresentam os consensos individuais das árvores de MP construídas através da análise de cada gene isoladamente. Os valores de *Bootstrap* e Suporte de Bremer para cada ramo são apresentados nas mesmas figuras. As estatísticas de árvore para as análises dos genes individuais, genes mitocondriais, genes nucleares e análise combinada encontram-se descritas na Tabela 9.

Tabela 9

Estatísticas para árvores de Máxima Parcimônia (MP) COI = Citocromo Oxidase subunidade I; COII = Citocromo Oxidase subunidade II; EF-1 α = Fator de Alongamento – 1 α ; Nuc = CAD + EF-1 α ; Mit = COI + COII; todos = todos os dados combinados; AMP = número de árvores mais parcimoniosas; PI = número de caracteres informativos para Parcimônia; CI = Índice de Consistência; RI = Índice de Retenção

	CAD	COI	COII	EF-1 α	Nuc	Mit	Tot
Caracteres	724	941	288	1036	1760	1229	2989
AMP	2	11	23	4	2	2	3
Comprimento MP	1831	1740	505	1443	3404	2299	5810
Comprimento ML	5895	6255	6175	6358	X	X	5832
PI	340	340	106	299	639	446	1085
CI	0,3601	0,3718	0,3492	0,4705	0,4142	0,3706	0,3893
RI	0,5236	0,3616	0,4393	0,4281	0,4529	0,356	0,3978

O gene CAD (Fig. 8) apresentou boa resolução da árvore de consenso com uma única politomia na base no posicionamento dos gêneros de Anthomyiidae e Scathophagidae. Muscidae foi apresentada distintamente monofilética com bom suporte de *bootstrap*. As espécies amostradas permitem a identificação de clados representativos de algumas subfamílias e tribos de Muscidae. Phaoniinae apresenta-se em um relacionamento de grupo irmão com as espécies de Coenosiini. Reinwardtiini encontra-se no ápice de um clado que incorpora em sua base duas espécies de gêneros considerados pertencentes a Cyrtoneurinae, em disposição parafilética. Muscinae inclui os gêneros *Ophyra* e *Hydrotaea* e apresenta Muscini peculiarmente dividida pelo posicionamento de *Stomoxys*, (Stomoxysiini).

COI (Fig. 9) apresenta uma resolução limitada dos relacionamentos filogenéticos entre as espécies amostradas. Muscidae encontrou-se em politomia com as duas espécies de Anthomyiidae. Na base de Muscidae, 18 ramos encontraram-se sem definição de posição. A árvore de consenso distingue os Muscídeos como unidade monofilética e dentro destes foi capaz de apresentar Coenosiini, porém sem suporte considerável de *Bootstrap* (<50%). As espécies de *Polietina* (Muscini) tiveram seu relacionamento definido em um clado distinto. Alguns poucos representantes de Muscini: *Musca domestica*, *Ophyra albuquerquei* e *Stomoxys calcitrans* foram apresentadas como uma unidade monofilética.

COII (Fig. 9) apresentou melhor resolução dos ramos do que a de COI, porém com posicionamentos anômalos como o grupamento de *Muscina stabulans* (Reinwardtiini), *Neomuscina inflexa* (Cyrtoneurinae) e *Pseudoptilolepis fulvapoda* (Azeliini, Schuehli e Carvalho 2005) com o gênero de Anthomyiidae *Eustalomya* sp. Muscidae não foi reconhecido como grupo monofilético e a base da árvore é composta de 14 ramos politômicos. As espécies de *Polietina* foram novamente agrupadas como clado distinto, porém com duas espécies em politomia. *Morellia xanthoptera* e *Ophyra albuquerquei* foram reconhecidas como unidade monofilética.

EF-1 α (Fig. 11) também apresentou boa resolução, mas com relacionamentos questionáveis. Duas politomias foram encontradas no posicionamento de *Biopyrellia bipuncta* e *Morellia ochricornis* na base do clado das espécies de *Polietina* e outras três foram apresentadas entre as duas espécies de *Helina* e *Phaonia tuguriorum* e o clado formado por *Psilochaeta* e *Pseudoptilolepis*. Ambos os gêneros de Anthomyiidae foram posicionados dentro do clado apical de Muscidae. O mesmo se deu para a espécie *Fannia canicularis*. Os grupamentos representativos recuperados nesta análise limitam-se a Coenosiini e ao clado das espécies de *Polietina*.

O consenso estrito das árvores individuais dos quatro genes revelou *Polietina* como o único clado distinto entre as demais politomias. Ainda assim, *P. orbitalis* e *P. steini* apresentaram-se em politomia.

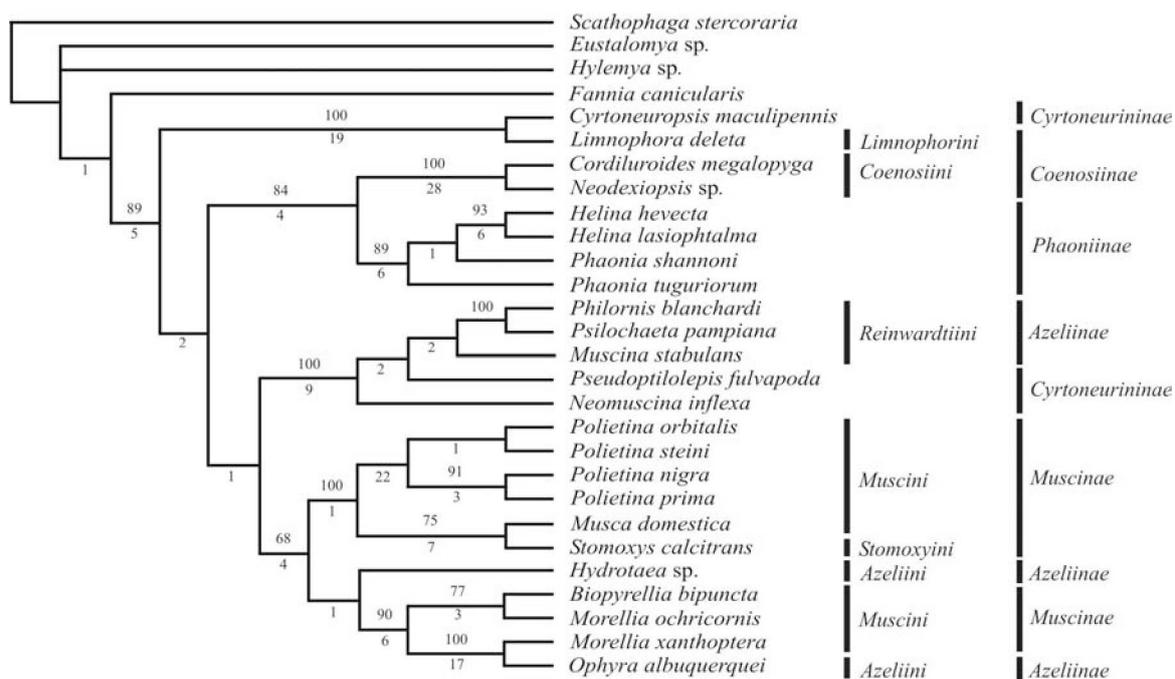


Fig. 8. Consenso estrito das árvores de parcimônia dos dados do gene CAD. Os números de *Bootstrap* e Suporte de Bremer encontram-se apresentados, respectivamente, sobre e sob os ramos a que se referem. Comprimento = 1831; CI = 0,3992; RI = 0,5236.

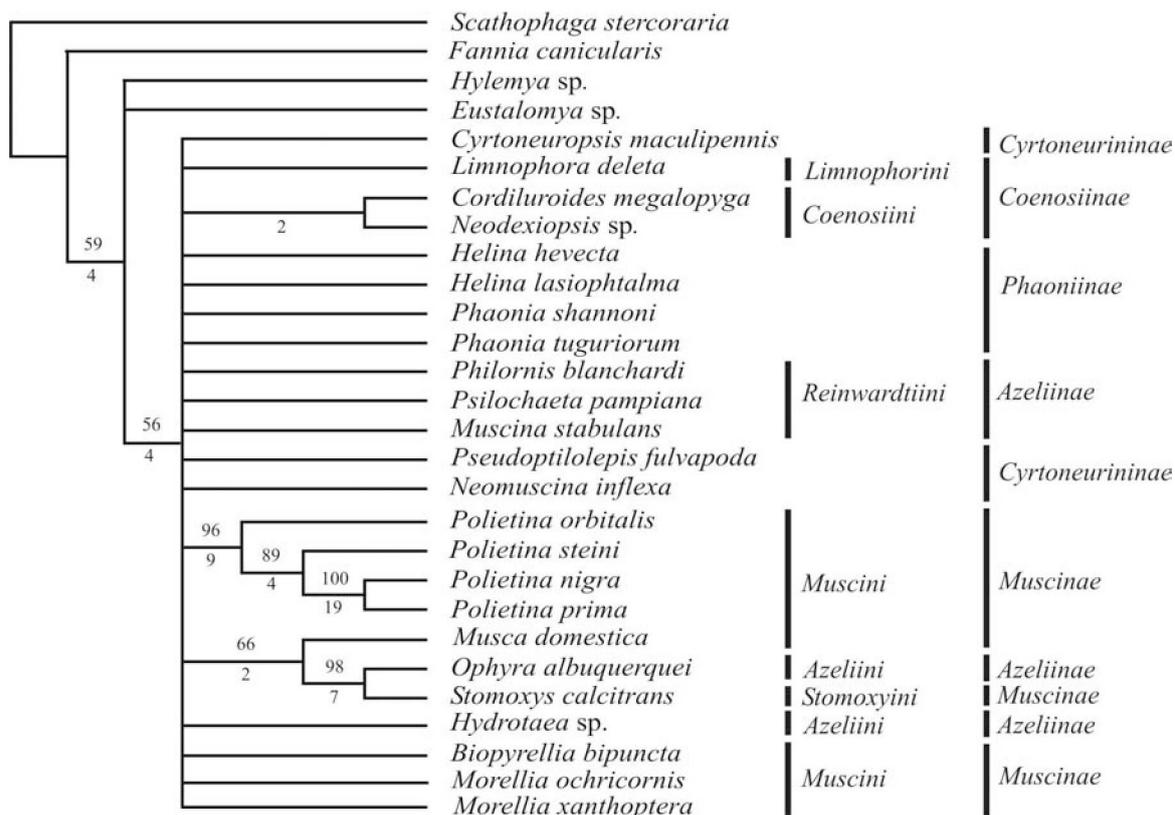


Fig. 9. Consenso estrito das árvores de parcimônia dos dados do gene COI. Os números de *Bootstrap* e Suporte de Bremer encontram-se apresentados, respectivamente, sobre e sob os ramos a que se referem. Comprimento = 1740; CI = 0,3718; RI = 0,3616.

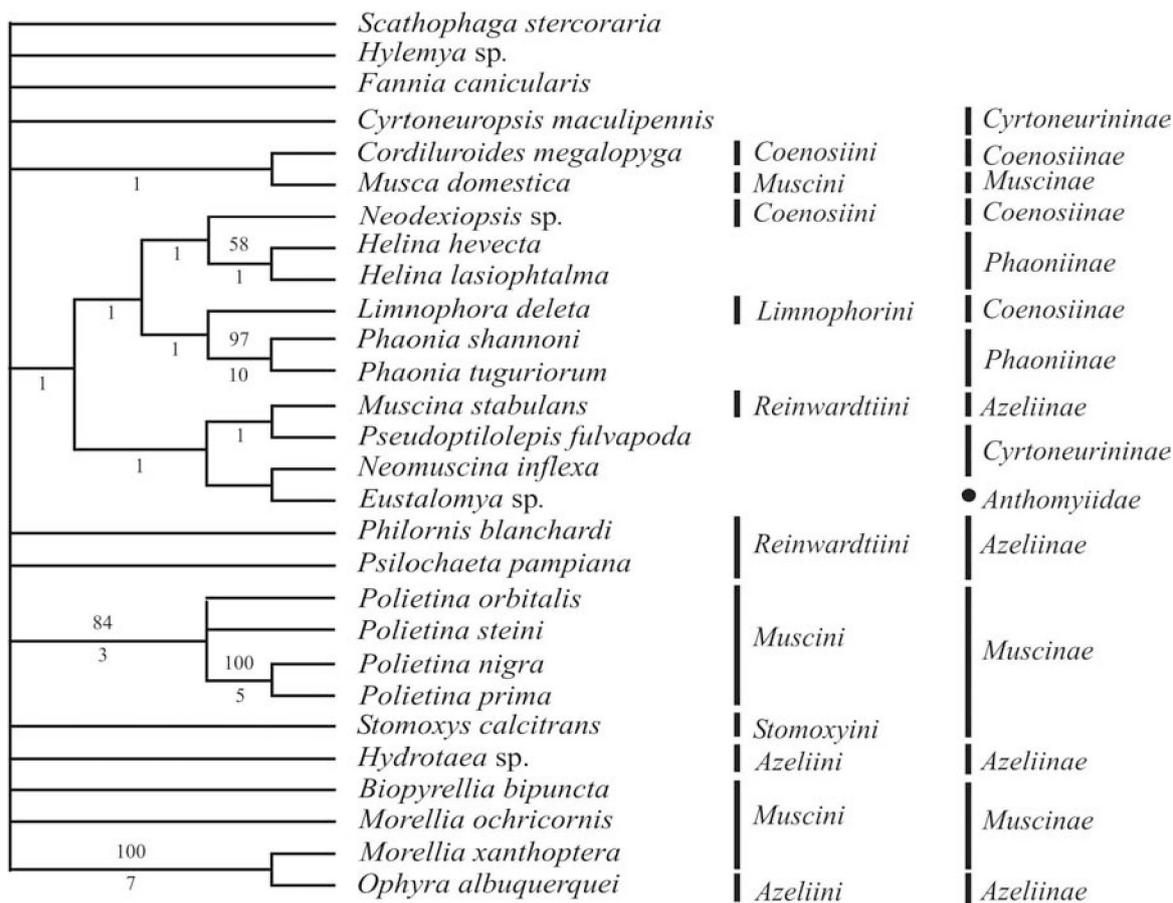


Fig. 10. Consenso estrito das árvores de parcimônia dos dados do gene COII. Os números de *Bootstrap* e Suporte de Bremer encontram-se apresentados, respectivamente, sobre e sob os ramos a que se referem. Comprimento = 505; CI = 0,4059; RI = 0,4393.

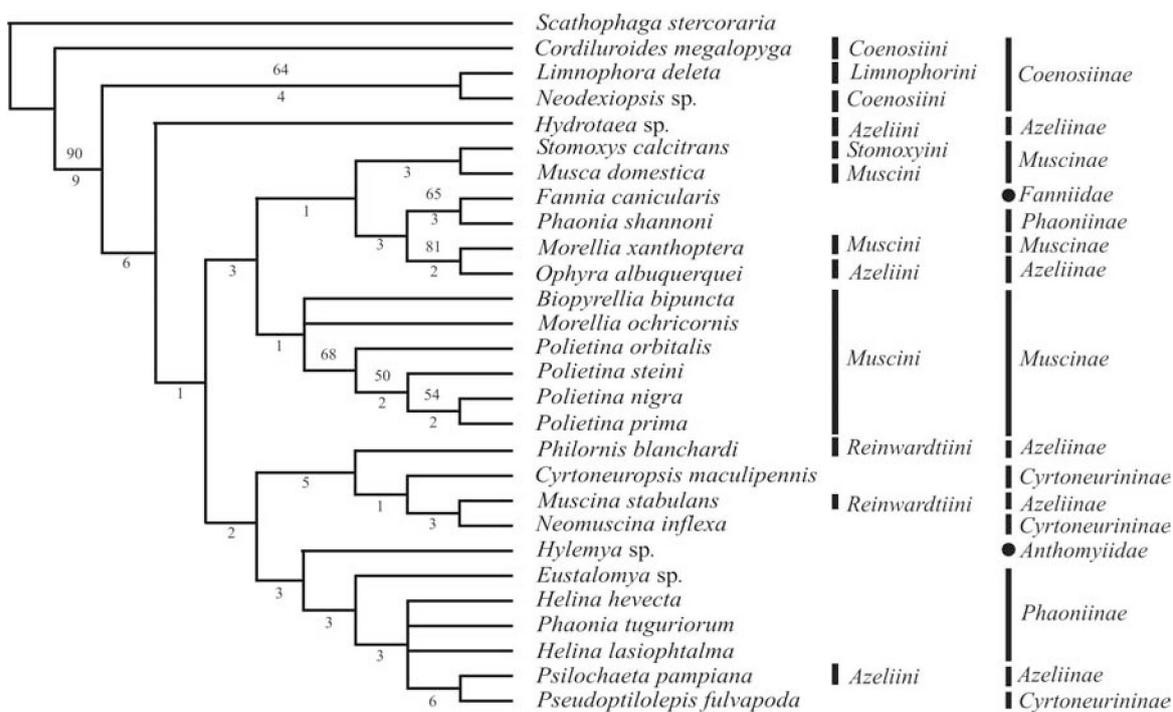


Fig. 11. Consenso estrito das árvores de parcimônia dos dados do gene EF-1 α . Os números de *Bootstrap* e Suporte de Bremer encontram-se apresentados, respectivamente, sobre e sob os ramos a que se referem. Comprimento = 1443; CI = 0,4705; RI = 0,4281.

As Figs. 12- 15 apresentam as árvores de ML construídas a partir da análise de cada gene isolado. Os valores de comprimento de árvore para as análises de ML dos dados individuais podem ser observados na Tabela 9. A árvore de ML para o gene CAD (Fig. 12) foi a que apresentou os maiores comprimentos de ramo quando comparada com as demais resoluções. As espécies do gênero *Polietina* foram apresentadas como um grupo distinto em todas as árvores de ML, porém com topologia bastante frágil nas árvores de CAD (Fig 12), COII (Fig. 14) e EF-1 α (Fig. 15) pelo pequeno comprimento de ramo, principalmente entre as espécies *P. prima* e *P. nigra*.

A árvore de ML para o gene CAD (Fig. 12) apresentou $-\ln \text{likelihood} = 9686,69577$ e topologia bastante semelhante às encontradas com o emprego do critério de MP. A diferença apresentada foi a resolução do clado ((*Philornis*, *Psilochaeta*), ((*Muscina*, *Neomuscina*) *Pseudoptilolepis*)) que na análise de MP posicionava *Neomuscina* na base. Os comprimentos de ramo foram homogêneos sem nenhum táxon apresentando taxa de evolução destacada do conjunto.

COI (Fig. 13) apresentou $-\ln \text{likelihood} = 8428,09468$ e os mesmos grupamentos definidos pela árvore de consenso estrito de MP com exceção do grupo *Cordiluroides* e *Neodexiopsis*. Muscidae foi apresentado como grupo monofilético. A topologia apresentada pela análise permite o reconhecimento de Cyrtoneurinae na base dos Muscidae. *Cordiluroides* (Coenosiini) e *Limnophora* (Limnophoriini) foram posicionados peculiarmente entre os Phaoniinaes dividindo as duas espécies do gênero *Phaonia*. *Muscina* (Reinwardtiini) e *Neodexiopsis* (Coenosiinae) apareceram inseridos em um grande grupo composto pelas espécies de Muscinae e Reinwardtiinae.

Para COII (Fig. 14), os relacionamentos peculiares de componentes do grupo externo posicionados dentro do grupo interno também foram notados na árvore de ML. O valor apresentado de $-\ln \text{likelihood}$ foi 2490,14392. *Neomuscina* e *Eustalomya* permanecem agrupados e uma associação anômala de Anthomyiidae (*Hylemya*) e Muscidae (*Cyrtoneuroopsis*) apareceu na base da árvore. A associação *Musca* e *Stomoxys* também encontrada nas análises de MP e ML do gene CAD encontrou-se presente na análise de COII. *Neodexiopsis* (Coenosiini) apresentou um comprimento de ramo distinto do conjunto dos demais táxons. Seu posicionamento em um clado contendo representantes de

Reinwardtiini, Limnophoriini e Phaoniinae não encontrou suporte em nenhuma outra resolução dentre os genes estudados.

A resolução da análise de ML para os dados de EF-1 α (Fig. 15) apresentou $-\ln likelihood = 7667,75471$ e novamente posicionamentos anômalos para as espécies do grupo externo. Os gêneros de Anthomyiidae e Fanniidae compõem grupamentos heterogêneos com os Muscidae: *Helina* e *Phaonia* (Phaoniinae), *Pseudoptilolepis* (Azeliini), *Psilochaeta* (Reinwardtiini) e *Eustalomya* (Anthomyidae); e *Biopyrellia*, *Morellia*, *Musca*, *Ophyra*, *Polietina* (Muscini), *Cordiluroides* (Coenosiini), *Fannia* (Fanniidae), *Hydrotaea* (Azeliini), *Hylemya* (Anthomyidae), *Phaonia* (Phaoniinae), *Stomoxys* (Stomoxyni).

O clado composto pelas espécies de *Polietina* foi o único grupamento comum a todas as análises. Em um consenso estrito, o clado foi apresentado sem definição interna, politômico com relação ao posicionamento de suas espécies.

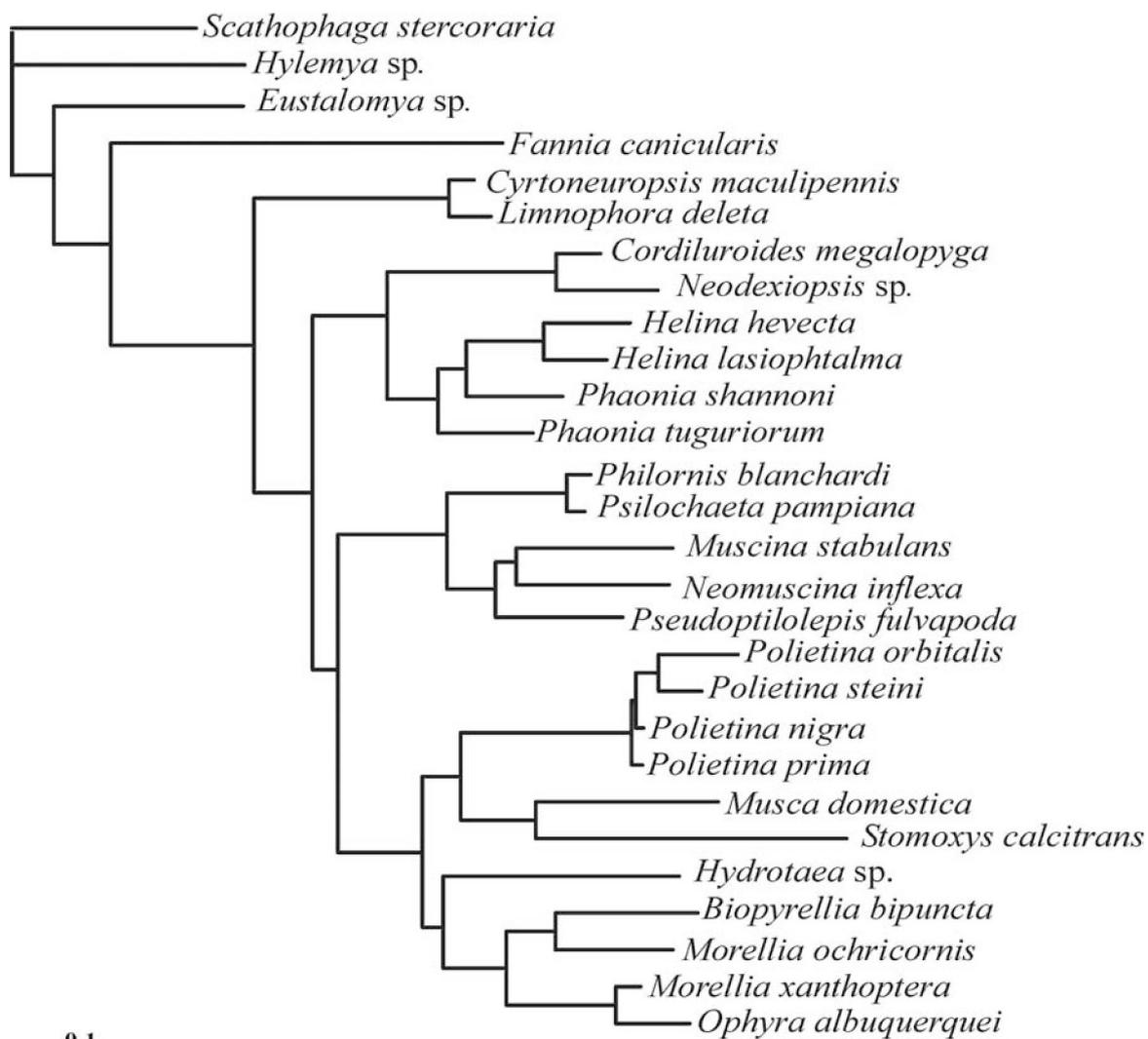


Fig. 12. Árvore de máxima verossimilhança dos dados do gene CAD. $-\ln \text{Likelihood} = 9686.69577$.

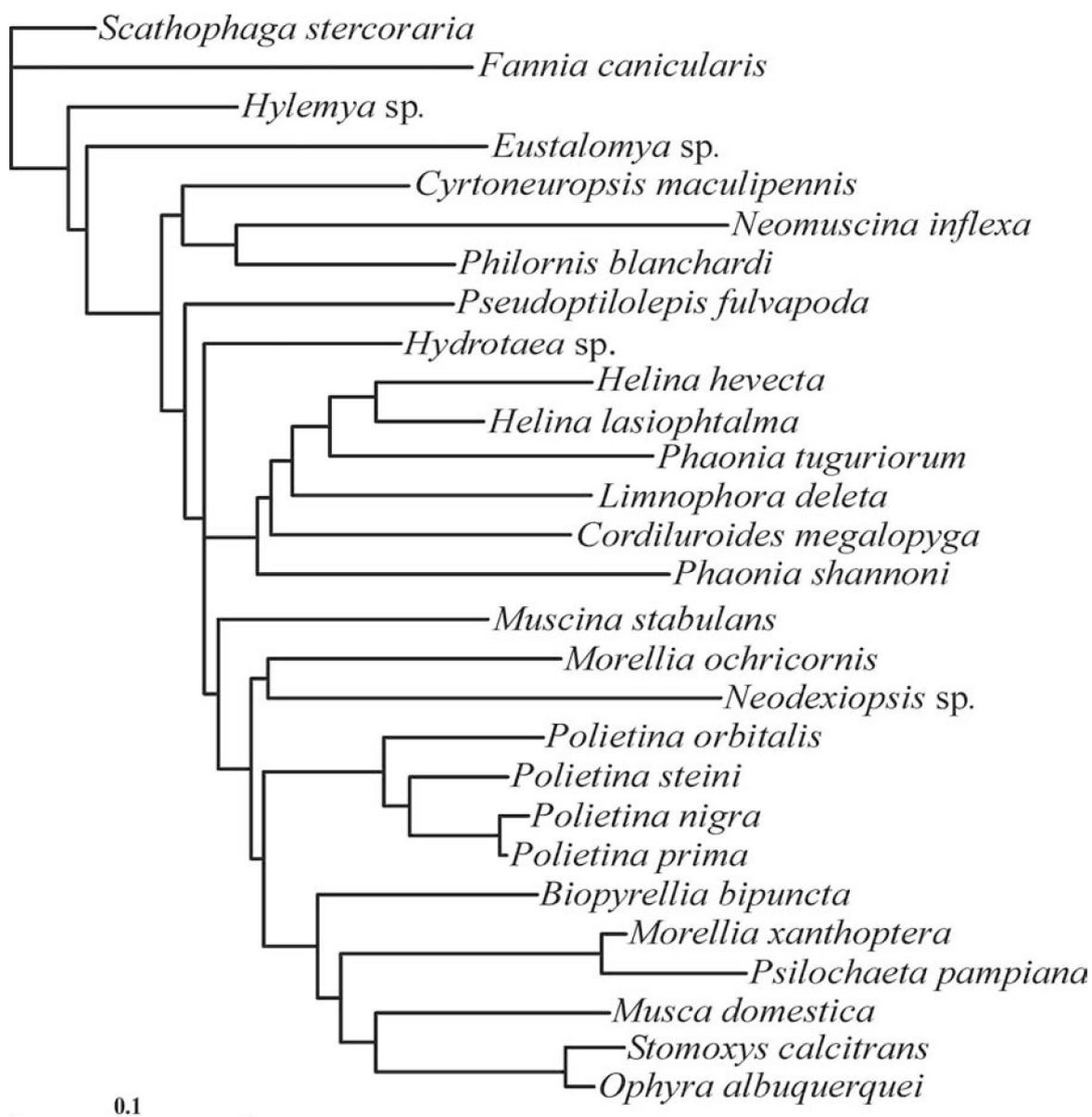
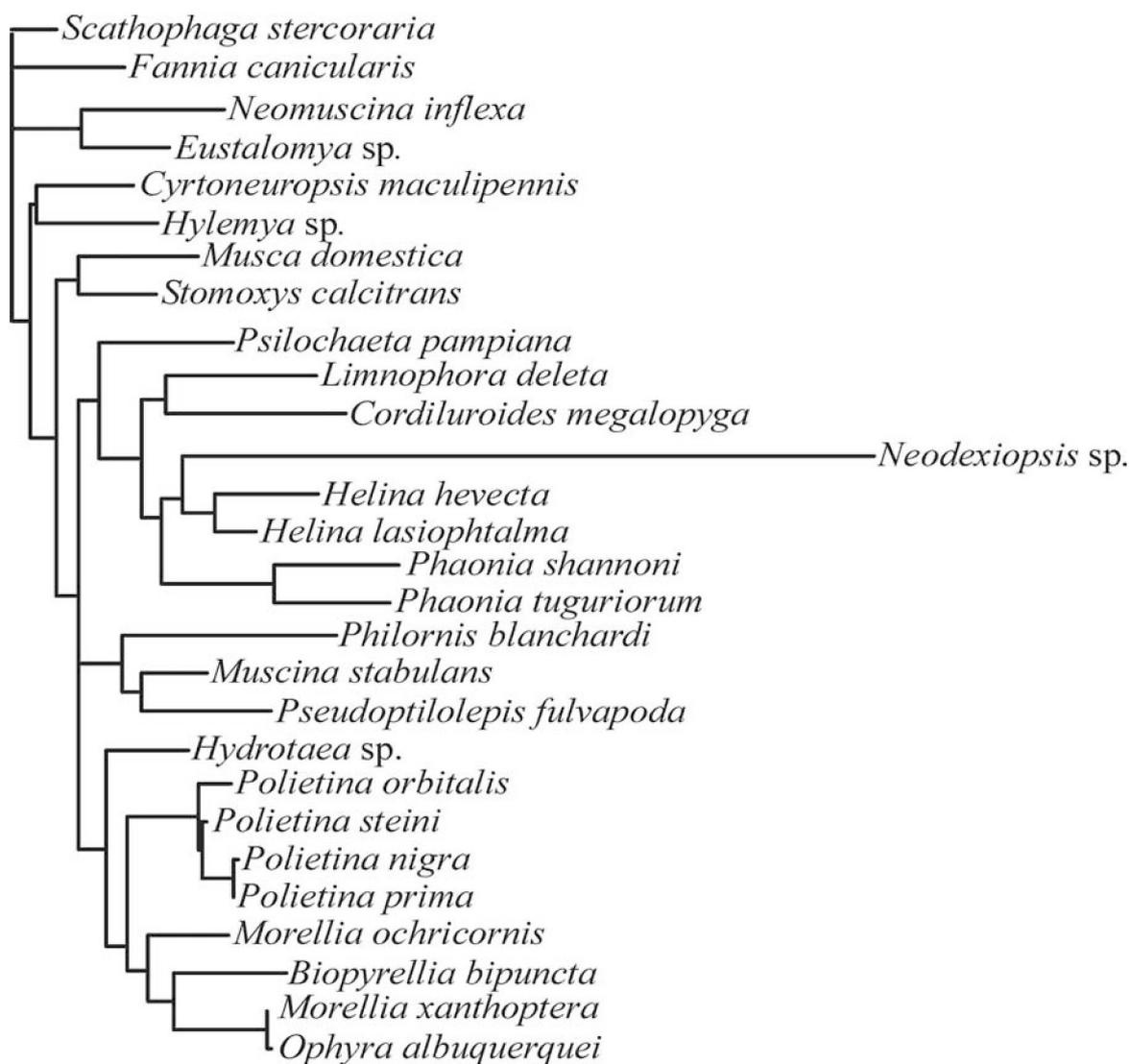


Fig. 13. Árvore de máxima verossimilhança dos dados do gene COI. $-\ln \text{Likelihood} = 8428.09468$.



0.1
 Fig. 14. Árvore de máxima verossimilhança dos dados do gene COII. $-\ln \text{Likelihood} = 2490.14392$.

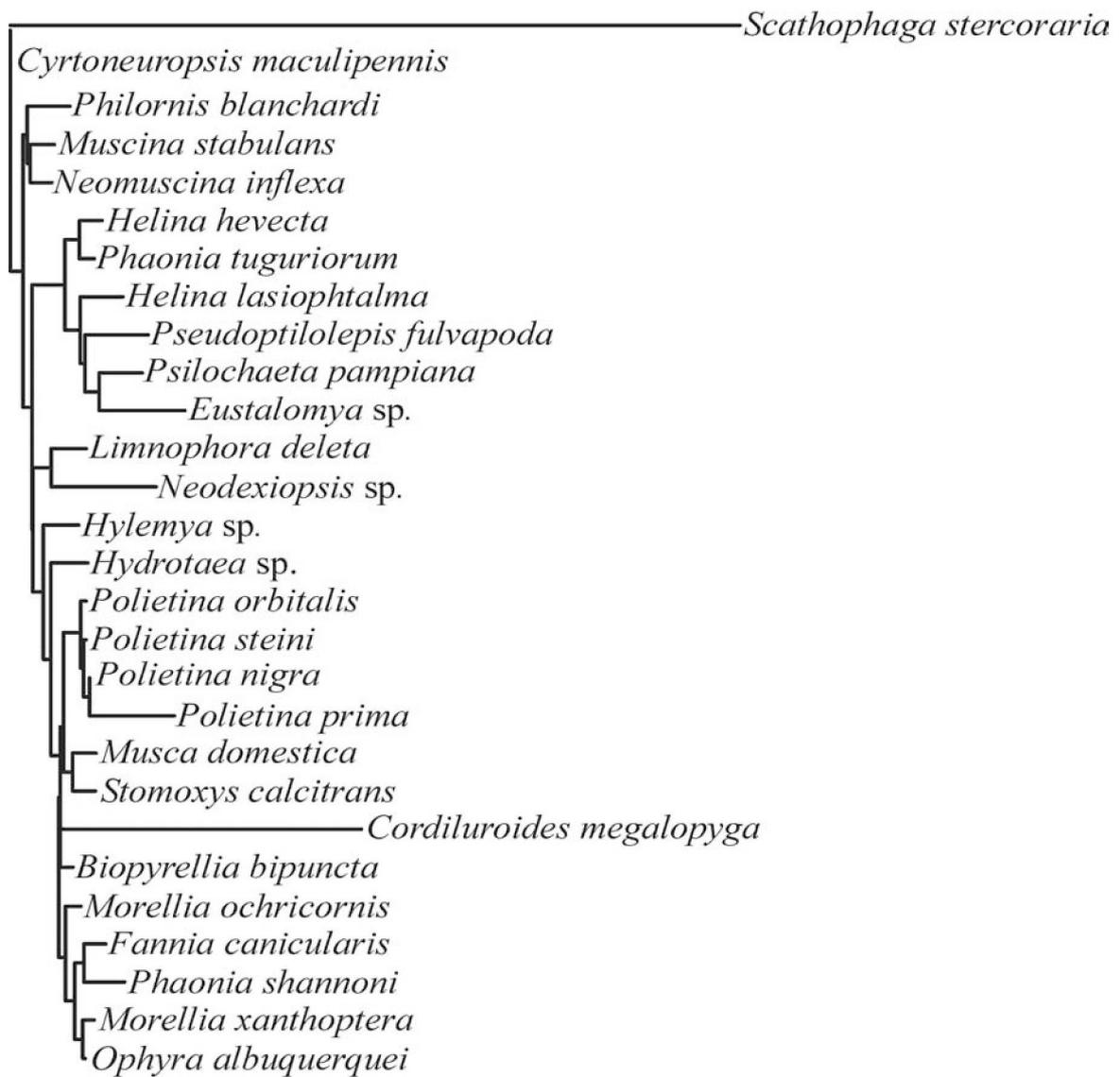


Fig. 15. Árvore de máxima verossimilhança dos dados do gene EF-1 α . $-\ln \text{Likelihood} = 7667.75471$.

3.2.2 Análises de MP dos dados combinados.

A análise combinada dos quatro conjuntos de genes sob o critério de MP resultou em três AMP de 5810 passos, CI = 0,3893 e RI = 0,3978. O resultado do consenso estrito destas árvores encontra-se apresentado na Fig. 16. A topologia da árvore de consenso apresentou seis ramos politômicos e altos valores de *bootstrap*. Os valores de suporte de Bremer também foram altos em diversos níveis da árvore. A Tabela 10 apresenta os valores particionados do suporte de Bremer. Considerando estes valores, CAD foi o gene de maior participação na definição da topologia apresentada seguido do EF-1 α , COII e COI. Alguns genes apresentaram definições conflitantes em diversos ramos da árvore como EF-1 α e COII, CAD e COI, EF-1 α e COI.

A topologia apresentou os dois gêneros representantes de Anthomyiidae como um grupamento monofilético com alto suporte de *bootstrap*. Esta relação foi definida principalmente devido à contribuição dos dados do EF-1 α (suporte particionado de Bremer 11,3). As espécies representantes de Coenosiini foram posicionadas em um clado em conjunto com o conjunto das espécies de Phaoniinae compondo o clado monofilético Coenosiini-Phaoniinae com bons valores de suporte de *bootstrap* e Bremer. Os Azeliinae encontraram-se divididos: as espécies de Reinwardtiini formaram um clado monofilético incorporando uma espécie de Cyrtoneurinae: *Neomuscina inflexa* e um Azeliini: *Pseudoptilolepis fulvapoda*. As demais espécies de Azeliini encontraram-se inseridas dentro do clado composto pelas espécies de Muscinae. Os clados encontrados Coenosiini + Phaoniinae, Reinwardtiini e Muscinae + *Hydrotaea* sp. encontram-se em politomia. *Hydrotaea* sp. foi posicionada como grupo irmão de todas as demais espécies de Muscinae com valor absoluto de *bootstrap* e considerável suporte dos genes CAD e COII. Muscinae apresentou-se composto de três grupamentos monofiléticos dispostos em politomia e com altos valores de suporte de *bootstrap* e Bremer. O primeiro deles foi o clado das espécies de *Polietina*, o segundo grupo foi composto das espécies: *Musca domestica* e *Stomoxys calcitrans* e o terceiro foi composto das espécies de gêneros *Biopyrellia* e *Morellia* e da espécie *Ophyra albuquerquei*. *Morellia* apresentou-se como gênero não monofilético.

A análise de MP através da aplicação do algoritmo *ratchet* resultou no mesmo conjunto de árvores da busca anterior.

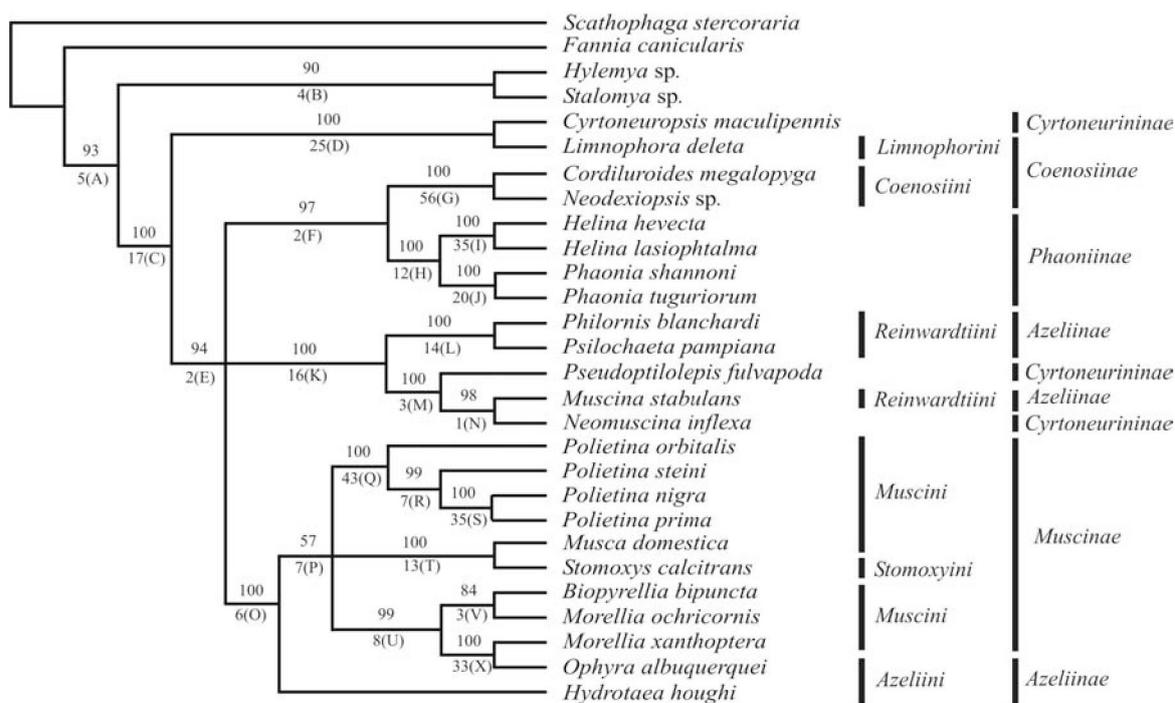


Fig. 16. Consenso estrito das três árvores de parcimônia da análise combinada de todos os genes. Os valores de *bootstrap* e suporte de bremer encontram-se, respectivamente, sobre e sob os ramos. A letra em parênteses remete a tabela dos valores de suporte particionado de Bremer (Tabela 10). Comprimento = 5810; CI = 0,3893; RI = 0,3978.

Tabela 10

Distribuição dos valores de suporte particionado de Bremer por ramo da árvore de consenso estrito da análise de máxima parcimônia. BS - Suporte de Bremer.

Ramo	CAD	COI	COII	EF-1a	BS
A	-2,0	3,3	-0,3	4,0	5,0
B	-3,8	-2,7	-0,8	11,3	4,0
C	9,0	9,3	-3,3	2,0	17,0
D	14,0	1,3	-1,3	11,0	25,0
E	8,0	-1,7	-0,3	-4,0	2,0
F	4,0	-2,7	3,2	-2,5	2,0
G	29,0	-0,7	0,2	27,5	56,0
H	9,0	1,8	0,2	1,0	12,0
I	8,5	3,3	0,7	22,5	35,0
J	5,0	0,3	12,7	2,0	20,0
K	14,0	3,3	0,7	-2,0	16,0
L	43,0	2,3	3,7	-35,0	14,0
M	8,0	-4,7	0,2	-0,5	3,0
N	3,0	-4,7	2,7	0,0	1,0
O	8,0	-1,7	1,7	-2,0	6,0
P	7,0	0,3	-0,3	0,0	7,0
Q	26,5	5,8	2,2	8,5	43,0
R	0,0	3,3	0,7	3,0	7,0
S	3,4	21,3	5,5	4,8	35,0
T	18,3	-5,7	-1,3	1,7	13,0
U	2,0	5,3	-0,3	1,0	8,0
V	10,3	-6,7	-1,3	0,7	3,0
X	30,0	-9,7	8,2	4,5	33,0

3.2.3 Análises de ML dos dados combinados.

A análise de ML dos dados combinados (Fig. 17) resultou em uma árvore com $-\ln likelihood = 29175.69159$. Anthomyiidae e Muscidae foram apresentados como clados monofiléticos. O restante da árvore assemelha-se à resolução apresentada na análise combinada de MP. As diferenças foram apresentadas na resolução de pontos politômicos da árvore de MP. O clado *Cyrtoneuropsis* + *Limmophora* encontrou-se inserido como grupo irmão do grupamento Reinwardtiini da análise combinada de MP. O grupo irmão que foi relacionado a este último grupamento foi o grupo Coenosiini + Phaoniinae. *Ophyra* e *Hydrotaea* foram inseridos em Muscinae como na análise de MP. *Hydrotaea* na base de todos os Muscinae seguida do clado *Stomoxys* + *Musca*. Os dois clados apicais de Muscinae

foram compostos pelo conjunto das espécies de *Polietina* e o outro pelos grupamentos *Biopyrellia* + *Morellia ochricornis* e *Ophyra* + *Morellia xanthoptera*.

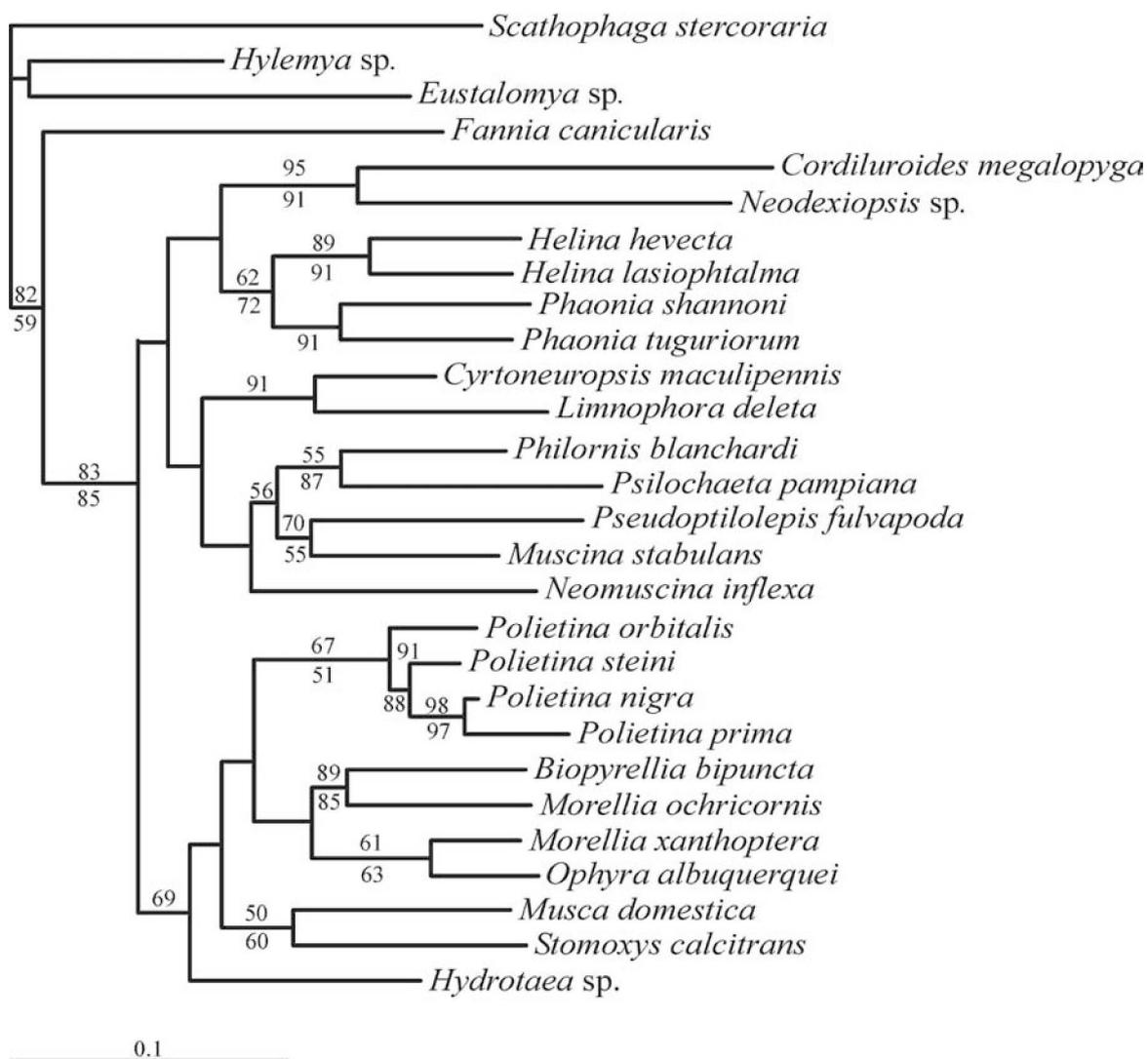


Fig. 17. Análise de máxima verossimilhança combinada de todos os genes. Os valores de *bootstrap* e valores de suporte (suporte do *puzzling*) encontram-se, respectivamente, sobre e sob os ramos. $-\text{Ln likelihood} = 29175.69159$.

3.2.4 Inferência bayesiana dos dados combinados.

A inferência bayesiana teve os valores de *likelihood* estabilizados com cerca de 7.000 gerações (Fig. 18). A inferência bayesiana do conjunto de dados combinados resultou em uma árvore de topologia idêntica a apresentada na análise de ML (Fig. 19) com um valor médio de $-\ln likelihood = 28874,839$. Os comprimentos de ramos foram relativos à média da densidade da probabilidade posterior e os valores de probabilidade do ramo são apresentados sobre estes (Fig. 19). A maioria dos clados apresentou probabilidade máxima com exceção do clado formado pelas duas espécies de Anthomyiidae (58%); clado ((*Cyrtoneuropsis*, *Limnophora*) Reinwardtiini) (84%); clado *Pseudoptilolepis* + *Muscina* (87%); clado (*Polietina* ((*Biopyrellia*, *Morellia ochricornis*)(*Morellia xanthoptera*, *Ophyra albuquerquei*))) (98%) e clado *Biopyrellia* + *Morellia cochricornis* (88%).

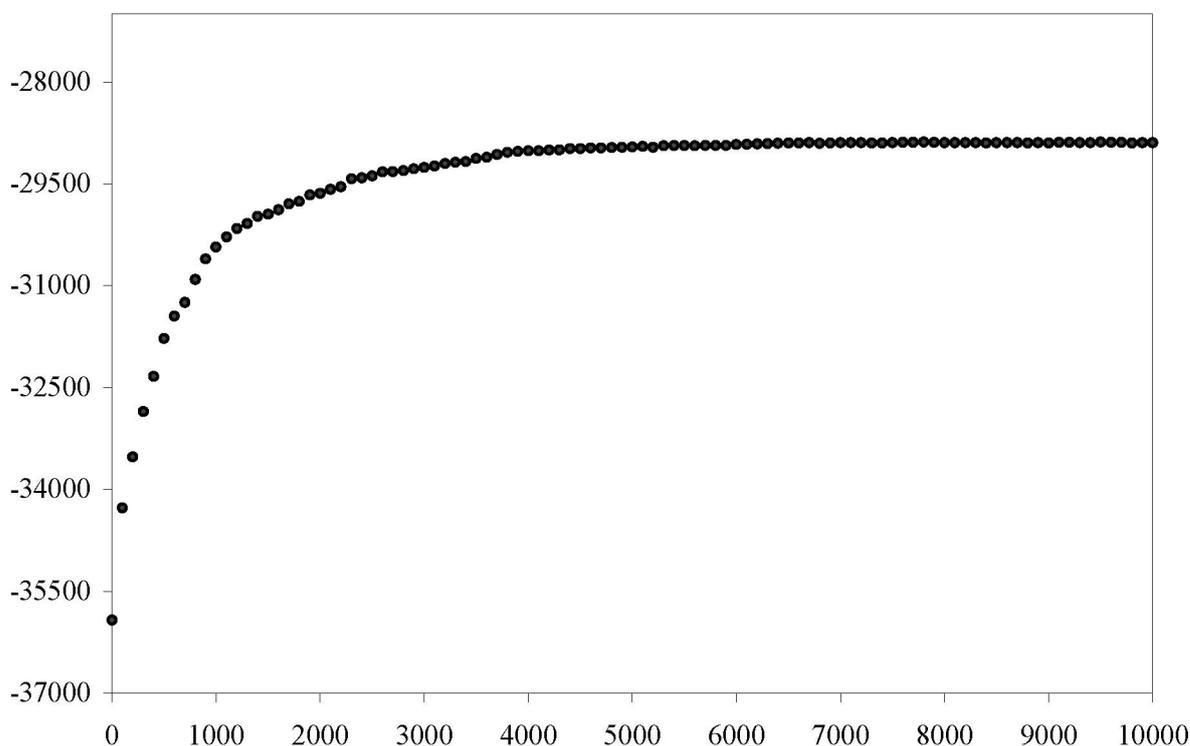


Fig. 18. Gráfico apresentando o valor de $-\ln likelihood$ das árvores em cada geração da inferência bayesiana. Eixo x = gerações, eixo y = $-\ln likelihood$.

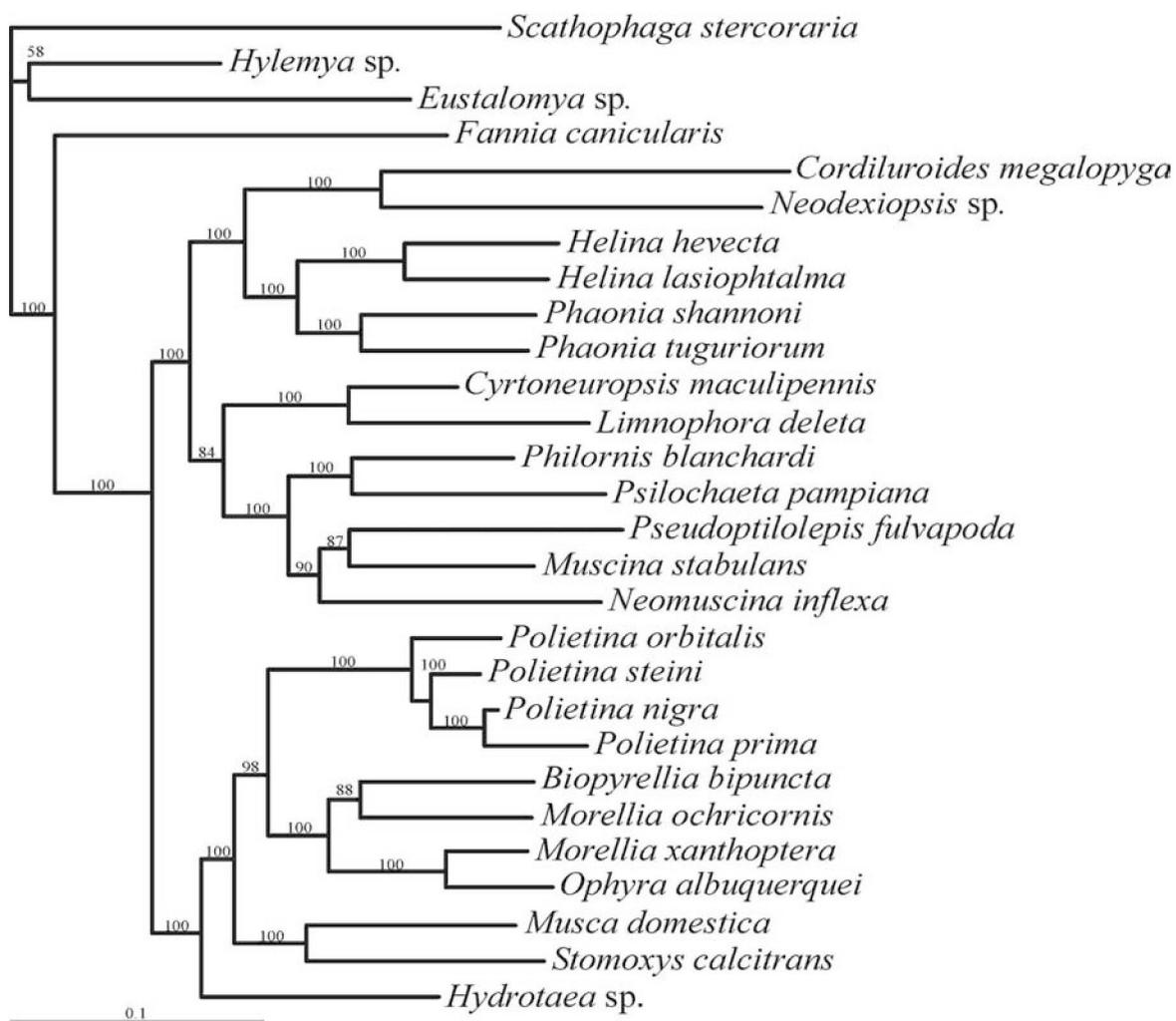


Fig. 19. Inferência bayesiana combinada de todos os genes. A média da densidade da probabilidade posterior é representada nos comprimentos de ramos e os valores de probabilidade são apresentados sobre estes. Valor médio de $-\ln \text{likelihood} = 28874,839$.

3.2.5 *Consenso entre análises.*

O consenso estrito das três propostas: árvore de consenso das AMPs (MP), árvore de ML e árvore consenso da inferência bayesiana resultou na topologia apresentada na Fig. 20. Esta árvore apresenta os pontos de incongruência entre as três hipóteses. Estes pontos consistiram basicamente na definição dos relacionamentos entre os clados *Cyrtoneuropsis* + *Limnophora*, Coenosiini + Phaoniinae, Reinwardtiini e Muscinae. Os componentes de Reinwardtiini também foram apresentados como elementos de topologia conflitante. Além dos componentes de Reinwardtiini, os clados internos de Muscinae, com exceção do posicionamento de *Hydrotaea* como gênero basal também foram apresentados como conflitantes nas três propostas apresentadas.

As comparações entre as resoluções apresentadas nos diversos consensos das árvores mais parcimoniosas (AMPs) individuais e combinadas podem ser observadas na Tabela 11 e os diferentes grupos recuperados nas diversas análises podem ser observados na Tabela 12.

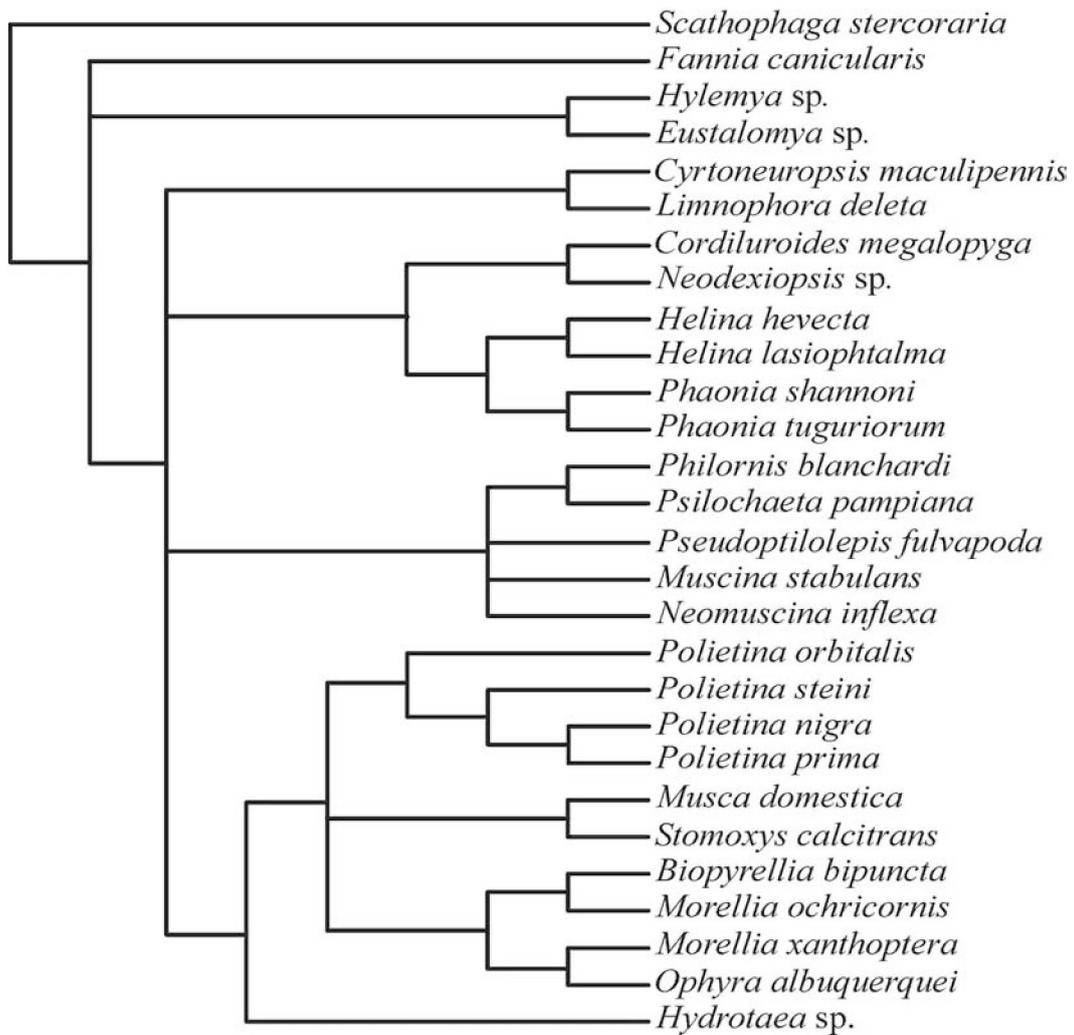


Fig. 20. Consenso estrito das árvores de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana.

Tabela 11

Comparações entre as resoluções apresentadas nos diversos consensos das árvores mais parcimoniosas (AMPs) provenientes de diferentes conjuntos de dados. TODOS = análise combinada de todos os dados. MP = Máxima Parcimônia

consenso AMPs	ramos resolvidos	Ramos presentes na árvore combinada de MP
CAD	24	9
EF-1 ∞	21	6
COI	7	4
COII	12	3
CAD + EF-1 ∞	18	7
COI + COII	18	7
TODOS	22	X

Tabela 12

Grupos recuperados nas diferentes análises. MP = máxima parcimônia; ML = máxima verossimilhança; Com = dados combinados; COI e COII = Citocromo Oxidase I e II; EF-1 α = Fator de Alongamento – 1 α ; BY = bayesiana; CON = consenso MP, ML e BY.

grupos recuperados	MP				ML				CON			
	CAD	COI	COII	EF-1 α	CAD	COI	COII	EF-1 α	MP	ML	BY	CON
Anthomyiidae	P	P	P	Ñ	P	Ñ	Ñ	Ñ	M	M	M	M
Muscidae	M	M	P	Ñ	M	M	Ñ	Ñ	M	M	M	M
Muscinae	M1	P	P	Ñ	M1	M1	Ñ	Ñ	M1	M1	M1	M1
Muscini	Ñ	P	P	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	P	M	M	P
Polietina	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>Stomoxys</i> + <i>Musca</i>	M	P	P	M	M	Ñ	M	M	M	M	M	M
<i>Ophyra</i> + <i>Morellia</i>	M	Ñ	M	M	M	Ñ	M	M	M	M	M	M
<i>xanthoptera</i>												
<i>Biopyrellia</i> + <i>Morellia</i>	M	P	P	P	M	Ñ	Ñ	Ñ	M	M	M	M
<i>ochricornis</i>												
((<i>Biopyrellia</i> , <i>M.</i>	M	Ñ	P	Ñ	M	Ñ	Ñ	Ñ	M	M	M	M
<i>ochricornis</i>)(<i>Ophyra</i> , <i>M.</i>												
<i>xanthoptera</i>))												
Azeliinae	Ñ	P	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ
Reinwardtiini	M	P	P	Ñ	M1	Ñ	Ñ	Ñ	M1	M1	M1	M1
Phaoniinae	M	P	Ñ	Ñ	M	Ñ	Ñ	Ñ	M	M	M	M
Cyrtoneurinae	Ñ	P	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ
Coenosiinae	Ñ	P	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ	Ñ
Coenosiini	M	M	Ñ	M	M	Ñ	Ñ	Ñ	M	M	M	M

M – recuperado como grupo monofilético

M1 – recuperado como grupo monofilético com inclusão de 1-2 espécies de outras subfamília(s)/tribo(s)

P – grupo não resolvido, politômico

Ñ – grupo parafilético

Azeliini, Limnophorini e Dichaetomyiinae não foram apresentados por necessitarem de maior amostragem

4. Discussão

4.1 Características das seqüências

As divergências relacionadas à origem da família e dos principais grupos de Muscidae têm sido tentativamente posicionadas em diversos períodos. O primeiro, baseia-se unicamente na interpretação do registro fóssil. Pont e Carvalho (1997) descreveram o primeiro fóssil proveniente de um depósito de âmbar Dominicano, cerca de 15-20 milhões de anos atrás (ma.), no estágio Burdigaliano do Mioceno. Evenhuis (1994) identificou um fóssil mais antigo datado do Eoceno. Outra interpretação sugere um período anterior baseado em padrões biogeográficos da distribuição de Muscidae. Carvalho (1999), Couri e Carvalho (2003) e Nihei e Carvalho (2004) basearam-se em modelos de vicariância (Amorim e Pires 1996, Petri e Fúlfaro 1983, Pitman *et al.* 1993, Lundberg *et al.* 1998 e Frailey 2002) para o estabelecimento de hipóteses de origem Gondwanica (135-106 ma.) para Muscidae-Anthomyiidae. A datação do registro fóssil de um Muscidae (Pont e Carvalho 1997) e de um Anthomyiidae (Amorim e Silva 2002) de âmbar dominicano foi considerada frente ao posicionamento da placa do Caribe. Durante o Mioceno-Oligoceno a placa do Caribe já quase ocupava sua posição atual. Logo, a separação da placa do Caribe tomada como evento vicariante indica origem anterior aos propostos 20 ma. Nihei e Carvalho (2004) apontam um intervalo de 25 a 80 ma. para idade mínima do surgimento de Anthomyiidae.

Os genes utilizados deveriam apresentar a característica de serem conservados o bastante para permitir o acesso à informação de nível taxonômico mais alto para a distinção de Muscidae dos demais muscoideos e de apresentarem um número suficiente de variação a ponto de permitir a distinção entre relacionamentos mais recentes como entre espécies e gêneros. Os genes escolhidos cumpriram estas exigências recuperando os dois extremos de informação. O gene CAD é conhecido por sua capacidade de resgate de divergências datadas do Mesozóico (65-250 ma.) (Moulton e Wiegmann 2004). No presente estudo as análises de MP dos dados das seqüências de CAD foram capazes de resolver mesmo relacionamentos entre espécies de um mesmo gênero.

Os genes COI e COII têm sido amplamente utilizados para diversos níveis de divergências taxonômicas. Diversos autores, entretanto, advertem que os dados podem ser saturados para níveis taxonômicos mais altos (Simon et al 1994, Bernasconi *et al.* 2000b). A capacidade de resolução dos genes COI e COII particularmente para o presente estudo mostrou-se bastante precária para acesso de informações taxonômicas mais antigas. COI desempenhou melhor eficiência quando comparado a COII mesmo este apresentando maior número de PI. COI e COII apresentaram-se, baseado em seus valores de coeficiente de determinação (R^2), como os genes de comportamento mais compassado (*clocklike*) em seus valores de t_v (Fig. 5 b e c; Tabela 7). Quando comparados com os demais genes, COI e COII mostram-se como os mais adequados para estimativas de tempo de divergência em estudos de relógio molecular. O número de substituições comparado ao tempo relativo (taxa de divergência) (Fig. 5 e Tabela 7) indica ainda uma evolução rápida para COI e EF-1 α , o primeiro com maior número de t_v e o segundo de t_i , seguidos de CAD e COII.

O EF-1 α é conhecido como um gene de evolução bastante rápida na terceira posição do códon (Yang *et al.* 2000, Collins e Wiegmann 2002). No entanto, outras posições podem reter considerável grau de informação filogenética para relacionamentos mais antigos. Este alto grau de substituições na terceira posição pode conduzir a um maior nível de ruído mascarando a informação contida no gene. Esta quantidade de ruído pode ser notada nos relacionamentos anômalos apresentados na análise particular dos dados de EF-1 α . Relações taxonômicas de nível mais alto, como as relações entre os táxons de Muscoidea aparecem com topologias controversas. Entretanto, relacionamentos recentes são recuperados com eficiência da mesma forma como nos dados do gene CAD.

CAD foi o gene que apresentou a melhor proporção de PI por comprimento de sequência (Tabela 4) sendo o gene mais informativo para parcimônia dentro do conjunto examinado. Esta proporção pode ser visualizada na resolução fornecida pelas análises dos dados dos genes individuais (Fig. 8) e nos valores de suporte de Bremer particionados (Tabela 12) para a árvore de MP dos dados combinados (Fig. 16).

Há algum tempo a característica de uma composição rica em A + T para o genoma mitocondrial tem sido apresentada em diversos níveis dentro de muitos grupos de invertebrados protostomados e particularmente em algumas ordens mais derivadas de insetos (Simon *et al.* 1994 e Sperling e Hickey 1994). Esta tendência é corroborada nos

valores de composição do conteúdo A + T principalmente na terceira posição do códon para os genes mitocondriais COI e COII (Tabela 5 e 6). Os demais genes apresentam conteúdo homogêneo de bases em todas as posições dos códons.

4.2 Propostas anteriores

A viabilidade de comparação entre as propostas anteriores dependeu da nova análise dos caracteres apresentados, sob os mesmos critérios e algoritmos. Na estratégia original de Carvalho (1989b) a árvore foi apresentada enraizada através de um único táxon ancestral sumarizando as famílias Fanniidae, Calliphoridae e Anthomyidae. Esta sumarização dos elementos do grupo externo em uma única unidade taxonômica na matriz impede considerações mais conclusivas sobre a monofilia de Muscidae e principalmente a expansão da hipótese de relacionamentos filogenéticos entre Muscidae e Muscoidea. A re-análise da matriz, incluindo este grupo-externo, resultou em 126 AMPs de 83 passos CI = 0,5422 e RI = 0,7467 (Fig. 6) enquanto a análise original apresenta 100 AMPs de 85 passos e CI = 0,529 (RI não informado). Esta diferença no número de AMP pode estar relacionada com as diversas mudanças no algoritmo de busca heurística do software PAUP que potencializaram sua capacidade de busca. A apresentação de um consenso destas árvores encontradas na busca heurística permite a visualização da capacidade de resolução da matriz. Os resultados da re-análise trazem importantes considerações sobre a proposta baseada em dados morfológicos de Carvalho (1989b). As maiores divergências encontram-se no posicionamento de *Atherigona*, não mais na base do cladograma, mas inserida entre Reinwardtiini, Azeliini e Muscinae; em Muscinae que incorporou dois gêneros de Reinwardtiini em sua base; e na politomia entre os ramos *Achanthiptera*, o clado (Phaoniinae (Coenosiinae, Mydaeinae)) e o clado formado pelos Azeliinae e Muscinae.

O gênero monobásico *Achanthiptera* já foi considerado como uma das tribos de Phaoniinae. Hennig (1965) apresentou o gênero como um dos Muscidae mais basais, ou “pertencendo aos Muscidae mais originais” considerando a conservação do 6º par de espiráculos abdominais na fêmea e características do ovipositor. Hennig (1965) menciona o comum posicionamento de *Achanthiptera* entre os Phaoniinae como uma hipótese frágil tendo em vista seu entendimento de Phaoniinae como um grupo não monofilético. A consideração sobre o posicionamento basal de *Achanthiptera* e a corroboração da

interpretação dos caracteres apresentados por Hennig (1965) depende de uma amostragem de um grupo externo mais consistente. A árvore da Fig. 6 encontra-se, apesar de organizada como tal, sem raiz sendo a posição de *Achantiptera* função da inclusão de um grupo externo.

Hennig associou Muscinae a Hydrotaeini baseando-se na estrutura do ovipositor feminino. Este grupamento Hydrotaeini indicado no trabalho de Hennig (1965) compreende diversos gêneros posicionados na classificação de Carvalho (1989b) em Azeliini. Logo, a topologia da re-análise é coerente com a idéia hennigiana de Hydrotaeini (representada no grupamento Azeliini) como grupo relacionado a Muscinae.

A distinção de *Atherigona* como Atherigoninae foi proposta na classificação de Skidmore (1985). Anteriormente à sua proposta, *Atherigona* foi incluída em Coenosiinae (Roback 1951) posição questionada por Hennig (1965), baseado principalmente em características do ovipositor. Hennig (1965), apresenta como alternativa única o posicionamento de *Atherigona* como um gênero plesiomórfico de Phaoniinae. A re-análise da matriz de Carvalho (1989) não permite associação deste gênero com Phaoniinae ou Coenosiinae e não fornece subsídios para considerações sobre o posicionamento basal na árvore.

Na re-análise de Couri e Carvalho (2003) (Fig. 7), *Stomoxys* é apresentado não mais entre os Muscinae, mas associado a Dichaetomyinae. Este resultado contrasta com as hipóteses de posicionamento de *Stomoxys* que o apresentam como associado a Muscinae (e.g. Roback 1951, Hennig 1965, Carvalho, 1989, Carvalho e Couri 2002, Schuehli *et al.* 2004). Uma análise forçando o posicionamento de *Stomoxys* na base de Muscinae [*Constraints* Muscinae = (((((Morellia, Musca) Polietina) Stomoxys)))] com os mesmos parâmetros descritos para a busca heurística da re-análise conduziu a 2 árvores de 159 passos (CI = 0,3962 e RI = 0,6534), um passo a mais do que o comprimento da árvore resultante da re-análise e valores de CI e RI bastante próximos. Provavelmente o caráter 26 (apresentado como sinapomórfico para Muscinae na árvore original) no estado especificado como *missing-data* possa estar confundindo a análise na consideração ambígua deste estado. Nesta situação, o software atribui um estado que reflita a opção mais parcimoniosa e não necessariamente o estado real. No clado onde aparece inserido na re-análise, os caracteres 17 e 20 que também são sinapomórficos para Muscinae aparecem em homoplasia como

sinapomórficos para Dichaetomyinae. Desta forma, justifica-se o posicionamento anômalo de *Stomoxys* em Dichaetomyinae pela interpretação dúbia do caráter 26 (sem estado definido para o táxon) e pelo aparecimento homoplástico dos demais caracteres sinapomórficos de Muscinae em Dichaetomyinae.

A topologia da re-análise corrobora em sua grande maioria a topologia apresentada na análise original. É útil na apresentação de grupos de resolução mais frágil como o grupo Dichaetomyinae. A topologia de Dichaetomyinae na proposta original dificulta o emprego deste clado, em particular, para a confirmação do padrão de distribuição Gondwânico e da provável origem Gondwânica de Muscidae.

4.3 Grupo externo

Existem algumas hipóteses que buscam esclarecer as relações filogenéticas entre os grupos constituintes de Muscoidea, Muscidae, Anthomyiidae, Fanniidae e Scathophagidae. Mas poucas apresentaram uma amostragem necessária ou critérios adequados para o estabelecimento de uma hipótese robusta onde o grupo irmão de Muscidae pudesse ser apresentado. Roback (1951) organizou as relações entre os Muscoidea apresentando Muscidae como grupo irmão de Fanniidae e estes dois como grupo irmão de Anthomyiidae. Em sua concepção, Anthomyiidae incluía Scathophagidae como uma subfamília, Scopeumatinae. Hennig (1955) apresentou concordância com a hipótese de Roback (1951), porém mais tarde (Hennig 1965) reconsiderou o status de família atribuído a Fanniidae por Roback (1951) apresentando-os como subfamília (Fanniinae) de Muscidae. Apesar do status taxonômico, Hennig (1965) manteve a hipótese sobre o relacionamento de grupo irmão entre Fanniinae e Muscidae estrito senso. Pont (1986) posiciona Fanniidae como grupo irmão de todo o conjunto de Muscoidea ou mesmo Calyptratae, colocando em dúvida a homologia do critério hennigiano de associação aplicado a Muscidae e Fanniidae: o encurtamento da primeira veia anal. Esta idéia do posicionamento de Fanniidae encontrou corroboração no trabalho filogenético baseado em RNA ribossomal publicado por Vossbrinck e Friedman (1989). A proposta de McAlpine (1989) considerando Fanniidae como o grupo irmão de Muscidae não foi baseada em uma abordagem numérica, sendo passível de contestação. Michelsen (1991) apresentou uma nova hipótese considerando Anthomyiidae como grupo irmão de Muscidae baseando-se na características atribuídas ao

plano-básico de Muscidae e Anthomyiidae: presença de cerdas interfrontais na fêmea e sétulas no macho e a composição da terminália masculina. Uma análise molecular baseada em seqüências mitocondriais de COI e COII (Bernasconi *et al.* 2000b) apresentou uma hipótese controversa posicionando ((((((Calliphoridae, Scathophagidae) Anthomyiidae) Drsoophilidae) Muscidae) Fanniidae). O suporte filogenético para o clado Calyptratae é reconhecido como mais forte do que para qualquer outro grupo de Schizophora (Yeates e Wiegmann 1999). Desta forma o posicionamento apresentado por Bernasconi (2000b) de Drosophilidae (Acalyptratae) em meio aos Calyptratae não encontra suporte em nenhuma outra proposta para Muscoidea. O poder de resolução das porções dos genes estudados (COI, tRNA-Leu, COII) é apontado pelo próprio autor (Bernasconi 2000b) como não adequado para filogenias de altos níveis taxonômicos. Recentemente a análise filogenética de Couri e Carvalho (2003) para Muscidae incluiu como grupo externo dois Anthomyiidae. Tais posicionamentos reforçam a visão de que o completo entendimento das relações filogenéticas entre os Muscoidea encontra-se longe de ser alcançado (Michelsen 1991) e depende de maiores esforços amostrais e técnicas de análises apropriadas.

A utilização de representantes das quatro famílias componentes de Muscoidea (Anthomyiidae, Scathophagidae, Fanniidae e Muscidae) na presente análise é razoável para permitir a proposta de monofilia de Muscidae e útil para o enraizamento das árvores. Porém, o esclarecimento entre as relações destes elementos de Muscoidea depende da inclusão de táxons externos relativos ao universo de Muscoidea, como por exemplo, representantes de Tachinidae ou Calliphoridae. Portanto, a resolução das relações filogenéticas entre Muscoidea encontrou-se fora do escopo principal deste trabalho. Os grupos-externos trabalhados encontram-se apresentados neste trabalho sempre com Scathophagidae como táxon mais basal. Esta decisão não reflete de forma alguma um posicionamento ou hipótese para as relações entre Muscoidea.

4.4 Análises individuais e combinadas

A importância da utilização de diversas fontes de informação filogenética tem sido cada vez melhor compreendida na medida em que numerosos estudos utilizando partições de dados têm demonstrado as limitações inerentes às partições únicas para a reconstrução filogenética (Cao *et al.* 1994, Olmstead e Sweere 1994, Cummings *et al.* 1995, Baker e

DeSalle 1997, Baker *et al.* 2001). A utilização dos quatro conjuntos de dados neste trabalho reforça esta importância e enfatiza a limitação presente mesmo em conjuntos de dados relativamente grandes. Com 1085 caracteres filogeneticamente informativos, a matriz apresentada para Muscidae é maior do que qualquer outra abordagem molecular em Muscoidea. O fato das árvores combinadas resultantes apresentarem poucos ramos não resolvidos e altos valores de suporte para os ramos apresentados é encorajador. A congruência das topologias resultantes com as hipóteses morfológicas também reforça a validade do emprego de um conjunto diverso de caracteres para a análise filogenética. No entanto, alguns ramos ainda apresentam-se sem definição e/ou baixo grau de suporte sugerindo a necessidade de outras ferramentas para o acesso e resolução dos relacionamentos filogenéticos para estes táxons.

Na medida em que aumentamos a quantidade de dados em um estudo sistemático, as questões relacionadas à análise se tornam cada vez mais complexas e controversas (Baker *et al.* 2001). A possibilidade de combinação destes dados tem recebido atenção especial tanto em estudos teóricos (Bull *et al.* 1993, Eernisse e Kluge 1993, Miyamoto e Fitch 1995, Nixon e Carpenter 1996, DeSalle e Brower 1997) quanto em estudos empíricos (Baker e DeSalle 1997, Cunningham 1997a, 1997b, Miller *et al.* 1997, Davis *et al.* 1998, Baker *et al.* 2001). A principal ferramenta de análise da congruência entre diferentes conjuntos de dados tem sido o teste de homogeneidade de partição (ILD). Este teste tem sido utilizado amplamente em diversos estudos filogenéticos como critério para a combinação ou rejeição da combinação dos dados.

Em nosso estudo, o teste ILD apontou os conjuntos das partições de dados nucleares (CAD e EF-1 α); mitocondriais (COI e COII); nucleares e mitocondriais (CAD, EF-1 α e COI, COII); CAD e COI; CAD e COII, EF-1 α e COI; EF-1 α e COI; EF-1 α e COII e todos os conjuntos (CAD e EF-1 α e COI e COII) como significativamente incongruentes ($p=0,01 < 0,05$).

O significado exato de um resultado significativo do teste ILD entre partições foi recentemente apontado como ambíguo por Felsenstein (2004). Podemos remeter a simulações apresentadas por Dolphin *et al.* (2000), Downton e Austin (2002), Darlu e Lecointre (2002) e Baker e Lutzoni (2002) onde se concluiu que taxas desiguais de evolução em diferentes conjuntos de dados, utilizando a mesma árvore, poderiam resultar em uma

elevada taxa de rejeição da hipótese nula. Flook *et al* (1999) demonstraram que a combinação de conjuntos de dados com taxas de evolução variadas conduziram a melhores resultados do que a análise dos conjuntos individuais separadamente. O poder do teste ILD como critério de combinação tem sido seriamente criticado. O efeito do ruído em cada conjunto de caracteres pode, por si mesmo, gerar resultados altamente significantes em testes de ILD (Dolphin *et al.* 2000).

As simulações e análises de dados empíricos apresentaram como argumento principal uma taxa excessiva de erro do tipo I quando o teste ILD foi aplicado como ferramenta de detecção de incongruência (Cunningham 1997a e b, Stanger-Hall e Cunningham 1998, Dolphin *et al* 2000, Yoder *et al.* 2001, Barker e Lutzoni 2002, Darlu e Lecointre 2002). Disparidades entre níveis de homoplasias entre os conjuntos de dados pode ser a causa deste tipo de comportamento.

Para situações onde o grau de incongruência significativo entre partições é apresentado através do teste ILD, como em nosso trabalho, estas partições podem não apresentar histórias filogenéticas diferentes mas sim diferentes níveis de resolução filogenética de uma mesma árvore, ou seja, os diferentes conjuntos de caracteres são úteis na resolução de nodos em diferentes níveis da árvore não implicando em histórias filogenéticas distintas (Felsenstein 2004). Desta forma, a combinação de dados heterogêneos pode ser uma estratégia eficiente para aumento da acurácia de uma análise (Baker e Lutzoni 2002).

Acreditamos que a análise combinada minimiza erros de amostragem e maximiza o poder explanatório dos dados (Kluge 1989, Kluge e Wolf 1993). O maior número de caracteres alcançado pela combinação dos conjuntos de dados pode facilitar a recuperação ou o aumento do suporte de clados verdadeiros. A probabilidade de erros estocásticos nesta abordagem é menor do que quando os dados são analisados separadamente. Mesmo quando os diferentes conjuntos de dados são diagnosticados como homogêneos através do teste ILD, estes podem conduzir a diferentes topologias quando analisados separadamente (Johnson e Soltis 1998).

Estas considerações nos levaram a assumir o teste de ILD como um possível indicador de homogeneidade em situações especiais específicas, porém inválido como critério de rejeição da combinação de partições (Barker e Lutzoni 2002).

A análise individual dos dados das partições apresenta a redução do poder de resolução dos dados refletidos no grau de resolução das árvores. Este poder de resolução deve ser ponderado na habilidade de recuperação de grupos compatíveis.

CAD apresenta o maior grau de resolução dentre as árvores das análises de MP individuais. CAD foi apresentado como gene apropriado para recuperação de informações de divergências do Mesozóico (Moulton e Wiegmann 2004). A análise particular da partição CAD apresenta uma resolução satisfatória para todos os níveis de relacionamentos em Muscidae. A proposta de idade mínima de 20 ma. para Muscidae implicaria na hipótese de que esta porção utilizada de CAD seria útil na resolução de relações em uma faixa de 250 até 20 ma. Esta capacidade é pouco provável tendo em vista as características do gene que não indicam saturação (Moulton e Wiegmann 2004). Este resultado confronta a hipótese de origem de Muscidae no Mioceno-Oligoceno e sugere suporte às hipóteses de origem mais antiga (Carvalho 1999, Couri e Carvalho 2003 e Nihei e Carvalho 2004).

EF-1 α também apresenta elevado grau de resolução de árvore, porém seus grupamentos apresentam combinações duvidosas associando espécies de diferentes famílias. A árvore individual de ML para EF-1 α (Fig. 15) demonstra o pequeno suporte que os dados oferecem à resolução apresentada, o que explica algumas associações conflitantes apresentadas na resolução de parcimônia. Estes resultados remetem à alta taxa de evolução apresentada na terceira posição dos códons para o gene EF-1 α (Yang *et al.* 2000, Collins e Wiegmann 2002). Esta taxa pode explicar a alta frequência de PI (77,9%) encontrada distribuída na terceira posição dos códons como indicativo de um alto número de caracteres homoplásticos resultado de múltiplas substituições. A Fig. 5 apresenta tendências diferentes de valores de t_i e t_v para este gene. Estas diferenças residem em diferentes taxas de evolução para diferentes posições nos códons. A exclusão das terceiras posições conduz a topologias com um maior número de clados não resolvidos, principalmente aqueles que apontam hipóteses de relacionamentos recentes como o grupo de espécies de *Polietina* ou o clado *Morellia xanthoptera* e *Ophyra*. Este resultado indica a presença significativa de caracteres homólogos na terceira posição, úteis na distinção destes relacionamentos filogenéticos recentes. Quando combinado com os demais dados, EF-1 α foi capaz de detectar relacionamentos de nível taxonômico mais alto como a definição do clado Anthomyiidae onde EF-1 α apresenta o maior valor de suporte particionado de Bremer

(11,3). O novo posicionamento de *Fannia* também é congruente com os dados de EF-1 α (suporte particionado de Bremer = 4) em um contexto de análise combinada. Na análise individual, *Fannia* foi posicionada dentro de Muscidae com suporte de *Bootstrap* 65 e suporte de Bremer = 3. Na análise individual EF-1 α apresentou suporte para 6 ramos da árvore combinada (Tabela 11). No contexto da matriz combinada, EF-1 α apresentou suporte positivo para 22 ramos da análise (Tabela 10, suporte particionado de Bremer > 0). Este resultado justifica a combinação de dados mesmo em uma situação de ILD significativo. A análise individual do gene não permitiu distinção de caracteres homoplásticos de forma eficiente como aconteceu no contexto da matriz combinada, onde neste caso, recuperou com suporte positivo diversos relacionamentos antes não apresentados.

Os dados de COI foram capazes de reconhecer relacionamentos mais antigos, mas apresentaram dificuldade na recuperação de informações filogenéticas mais recentes. O gene COI tem sido considerado como o gene mais conservado dentre os genes codificadores de proteína do genoma mitocondrial (Simon *et al.* 1994, Bernasconi 2000b). Com relativamente pouca informação filogenética disponível os relacionamentos recuperados através da análise individual de ML foram, em certo grau, incongruentes em suas relações internas com os resultados das análises combinadas. COII apresentou uma maior capacidade de resgate de relacionamentos recentes, mesmo sendo considerado um dos genes codificadores de proteína mais conservado do genoma mitocondrial. O resgate dos relacionamentos recentes apresentados pela análise de COII considerou artefatos capazes de deslocar o posicionamento dos grupos externos para dentro de grupamentos de Muscidae. A análise de ML foi capaz de resgatar muito da topologia combinada, mesmo sendo o gene COII o que apresentou o menor número de caracteres totais e PI dentre o conjunto de dados. Este resultado reflete resultados obtidos em comparações entre diversos métodos de investigação filogenética em simulações, onde, a máxima verossimilhança desempenhou um grau de acurácia superior ao apresentado pela parcimônia (e.g. Wiens e Servedio 1998).

A combinação de genes de evolução mais lenta como COI com genes de evolução mais rápida como COII confirma a expectativa de uma resolução mais consistente (Tabela 11) e bem suportada. Esta combinação de dados é o ponto central na obtenção de hipóteses filogenéticas mais robustas (Cryan *et al.* 2001).

O conjunto de caracteres resultante da combinação dos dados das quatro partições conduziu a topologias semelhantes sob os diferentes critérios de análise utilizados, indicando um bom sinal filogenético contido na matriz combinada. Os grupos recuperados descritos no consenso estrito das propostas de MP, ML e inferência bayesiana demonstram esta congruência (Fig. 20, Tabela 12).

4.5 Consensos entre análises

As árvores de MP, ML e inferência bayesiana apresentaram topologias congruentes com diversas hipóteses evolutivas publicadas para Muscidae.

Phaoniinae, um dos grupos taxonômicos mais complexos em sua definição, é apresentado como grupo seguramente monofilético. Hennig (1965) apresentava Phaoniinae com bastante ressalva. Para Hennig, os cercos esclerotizados com extremidades livres, sobressaindo da placa pós-genital não eram caracteres seguros para o estabelecimento da subfamília como grupo natural. Couri e Carvalho (2003) identificaram o caráter homoplástico – ausência de cílios no esternito – 1 como sinapomorfia para os dois representantes de Phaoniinae, *Dolichophaonia* e *Souzalopesmyia*, em sua análise. Este estado também se encontrou presente (Couri e Carvalho 2003) nos representantes de Coenosiini (*Coenosia*, *Neodextiopsis*), Limnophorinii (*Limnophora*) e Mydaeinae (*Mydaea*). Porém, esta similaridade não foi suficiente para relacionar Phaoniinae com estas outras subfamílias, Mydaeinae e Coenosiinae. Skidmore (1985) apresentou Coenosiinae como a subfamília mais complexa de Muscidae e que só era dificilmente diferenciada de Mydaeinae com base em morfologia de adultos. O relacionamento de proximidade entre estas subfamílias havia sido proposto no estudo de Hennig (1965) que atribuía caracteres que considerava plesiomórficos (na unidade Muscidae), como cerda fronto-orbital proclinada presente na fêmea e segmento distal do edeago em forma de um saco membranoso, como características gerais do conjunto Phaoniinae + Mydaeinae + Limnophorinae. Curiosamente a análise de MP dos caracteres combinados, apresentou Phaoniinae como grupo irmão de Coenosiini. A falta de um representante de Mydaeinae com seqüências para todos os genes em estudo em nossa análise impediu qualquer consideração sobre o posicionamento deste grupo com relação aos demais Muscidae. A ausência de cílios no esternito 1 para justificar a relação de Phaoniinae com Coenosiinae + Mydaeinae no trabalho de Couri e Carvalho

(2003) deve ser revisado como possível sinapomorfia para este grupo mais amplo. Toda a consideração sobre o posicionamento de Phaoniinae assim como a monofilia da família depende de um estudo mais amplo. Phaoniinae é um grupo diverso composto de vários gêneros de distribuição mundial que são apontados como prováveis agregados de diferentes gêneros. Desta forma, as conclusões do presente estudo ficam submetidas primariamente a uma ampla revisão desta subfamília.

Uma análise filogenética morfológica da subfamília Coenosiinae foi apresentada em Couri e Pont (2000). Um único caráter foi encontrado para a justificativa de um grupamento Coenosiini monofilético. Um grande número de árvores mais parcimoniosas foi obtido (115) mesmo com a aplicação da estratégia de pesagem sucessiva (aplicando o índice de consistência) o que indica a necessidade de uma investigação mais criteriosa para o posicionamento dos gêneros dentro da subfamília e um estudo mais amplo para a corroboração de seu estado monofilético. Nossa análise apresenta apenas dois componentes da subfamília, mas que seguramente se apresentam como uma unidade monofilética. Os gêneros *Cordiluroides* e *Neodexiopsis* foram posicionados como unidade monofilética em todos os cladogramas resultantes da análise conjunta dos genes (máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana).

Snyder (1954) erigiu a subfamília Cyrtoneurinae, que foi apresentada por Hennig (1965) como um grupo monofilético. No cladograma apresentado por Hennig (1965) Cyrtoneurinae foi uma das duas subfamílias de Muscidae apresentadas como *incertae sedis*. Recentemente, vários trabalhos têm apontado Cyrtoneurinae como um grupo não monofilético (Skidmore 1985, Carvalho 1993 *et al.*, Couri e Carvalho 1997, Carvalho 2002) com vários de seus gêneros sendo transferidos para outras subfamílias. Reinwardtiini também tem sua monofilia questionada. A tribo foi sustentada por caracteres primitivos em relação ao plano básico de Muscidae. O caráter único diagnosticado por Carvalho (1989b) para a monofilia da tribo é descrito mais tarde (Carvalho e Couri 2002) como homoplástico no trabalho onde considera Reinwardtiini como provavelmente não monofilético. A consideração de ambos os grupamentos, Cyrtoneurinae e Reinwardtiini como grupos não naturais não corrobora a disposição dos gêneros amostrados *Philornis* + *Psilochaeta* e *Muscina* (Reinwardtiini) e *Pseudoptilolepis* (Azeliini) e *Neomuscina* (Cyrtoneurinae) que se apresentaram como um clado bem sustentado. A necessidade de inclusão de uma amostra

maior destes dois grupamentos é evidente. Quanto ao posicionamento deste clado dentro de Muscidae, se for considerada a hipótese de Pont (1986, 1989) que trata Reinwardtiini como a tribo que inclui os gêneros mais primitivos de Muscidae for considerada, o grupo deve ter seu posicionamento de forma a permitir a associação dos demais componentes da politomia. Isto sugere uma associação entre Muscinae e Phaoniinae + Coenosiinae no ápice do cladograma. Esta visão encontra reforço na interpretação alternativa de que o caráter homoplástico apresentado em Couri e Carvalho (2003) justifique a visão Hennigiana (Hennig 1965) também apresentada por Carvalho (1989b) de associação entre Phaoniinae, Mydaeinae e Coenosiinae.

Uma análise mais conclusiva da subfamília Azelinae fica dependente de uma amostragem representativa de Azeliini. Os representantes, *Ophyra* e *Hydrotaea*, revelaram-se pertencentes a Muscinae impedindo uma discussão conclusiva quanto ao posicionamento de Azeliini. As conclusões sobre os Reinwardtiini ficam dependentes desta análise mais ampla.

Muscinae foi o grupo melhor amostrado dentro de nosso conjunto de dados. Todos os gêneros agrupados são, atualmente, reconhecidos como Muscinae com exceção de *Ophyra* e *Hydrotaea* (Azeliinae, Azeliini). Hennig (1965) sustentou a monofilia do grupo baseado na forma do ovipositor feminino entre outras características como presença de cerda fronto-orbital proclínada na fêmea e cerda posterodorsal na terceira tíbia. A presença de cerda posterodorsal na terceira tíbia é considerada como caráter plesiomórfico para Muscidae (Carvalho 1993), não sendo próprio para definição de grupos monofiléticos. Outros caracteres apresentaram uma boa definição da subfamília como caracteres do ovipositor, forma do ovo e a presença de sétulas no anepímero (Carvalho 1989b). A associação de *Hydrotaea* e *Ophyra* com os Muscinae encontra respaldo na argumentação de Hennig (1965) que apontou ambos os gêneros dentre os gêneros “primitivos” “pleseomórficos” (provisoriamente agrupados em Hydrotaeini) como os mais próximos de Muscini. A concepção de que ambos os gêneros fossem pertencentes à tribo Hydrotaeini manteve-se em propostas de classificações posteriores à de Hennig (1965) (Pont 1972, 1973, 1977, 1980). Skidmore (1985) manteve *Ophyra* como pertencente à tribo Hydrotaeini, porém como parte de outra subfamília, Azeliinae. Todos estes autores apresentaram evidências de suporte de uma relação filogenética próxima entre *Ophyra* e *Hydrotaea*. Esta

hipótese conduziu Pont (1986), em seu catálogo dos Muscidae paleárticos, à apresentação de *Ophyra* como um sinônimo júnior de *Hydrotaea*. Esta visão foi mantida em seu catálogo de Muscidae da Australásia e regiões da Oceania (Pont 1989) e reforçada recentemente por Vockeroth (1996). Apesar destes posicionamentos, Carvalho e Couri (2002) reconheceram *Ophyra* e *Hydrotaea* como gêneros distintos dentro de Azeliini. Schuehli et al. (2004) em sua análise molecular de alguns gêneros de Muscidae apresentaram a validade de ambos os gêneros. Schuehli et al. (2004) também obtiveram o posicionamento basal de *Hydrotaea* com relação a Muscinae. Estes resultados apontam para a inclusão de *Hydrotaea* e *Ophyra* em Muscinae, possibilidade que deve ser examinada em um maior conjunto amostral. Outros gêneros apareceram mais proximamente relacionados a *Ophyra* opondo-se, neste aspecto, à idéia de Hennig (1965) de que *Hydrotaea* seja o gênero mais próximo de *Ophyra*.

Morellia foi apresentada como gênero não monofilético. Hennig (1965) apresentou o encurtamento da parte posterior das larvas e os ganchos orais curvados para cima nas larvas de segundo instar como caracteres sinapomórficos de *Morellia* mesmo ciente de que estes não estavam presentes em todas as espécies. Nihei (2004) apresentou uma hipótese de parafilia para *Morellia* em sua análise filogenética de Muscini. A associação de *Morellia* com o gênero monobásico *Biopyrellia* é razoável frente à afirmação de Hennig sobre os três gêneros de Townsend (*Parapyrellia* Townsend, *Biopyrellia* Townsend e *Chaetopyrellia* Townsend – esta já sinonimizada como *Morellia flavicornis*), de constituírem uma unidade monofilética.

A associação do gênero *Stomoxys* (Stomoxyini) com *Musca* (Muscini) remete a hipótese de Hennig (1965) de que *Musca* seja um gênero proximamente relacionado através da forma do esqueleto cefalofaríngeano aos grupos mais apicais de Muscini. Particularmente, Hennig (1965) apontou *Musca* como partilhando características únicas com *Stomoxys*. Nihei (2004) apresentou, em seu cladograma com pesos iguais, ambos os gêneros reunidos como gêneros irmãos. O posicionamento de *Stomoxys* + *Musca* em Muscinae foi apresentado como indefinido nas análises combinadas de MP e basal nas análises combinadas de ML e inferência bayesiana. Em um consenso semi-estrito (Hillis 1987, Bremer 1990), *Stomoxys* + *Musca* é posicionado na base de Muscinae. O posicionamento de Stomoxyini em Muscinae ainda não foi seguramente apresentado. O trabalho de Carvalho (1989b) não oferecia amostragem significativa de Muscini para definir relações em

Muscinae. No entanto, a re-análise da matriz de Carvalho (1989b) apresentou Stomoxyini como grupo derivado de Muscinae, hipótese contrastante com a hipótese resultante do consenso semi-estrito das árvores de MP, ML e inferência bayesiana e com a proposta de Couri e Carvalho (2003). Esta questão evidencia a necessidade de inclusão de novos táxons de Stomoxyini como *Haematobia* Lepelletier & Serville e *Neivamyia* Pinto e Fonseca para uma resolução mais clara do relacionamento de Stomoxyini, incluindo o posicionamento de *Musca*, dentro de Stomoxyini. A monofilia de Muscini depende fundamentalmente deste refinamento do estudo de Stomoxyini e suas relações com Muscinae.

5. Conclusões

Este estudo faz-se relevante para o estudo da família na medida em que permite comparações com diversas hipóteses taxonômicas para Muscidae. A monofilia da família é demonstrada para o conjunto amostrado. As análises suportaram o estreito relacionamento entre a tribo Coenosiini e a subfamília Phaoniinae. Este clado por sua vez, mostrou-se nas análises de ML e inferência bayesiana como relacionado ao conjunto dos componentes amostrados de Reinwardtiini e Cyrtoneurinae. As análises concordaram na monofilia das subfamílias Muscinae e Phaoniinae e da tribo Coenosiini. Diversos gêneros tiveram seu posicionamento revisto. *Ophyra* e *Hydrotaea* foram posicionados em Muscinae; *Stomoxys* foi posicionada como grupo irmão de *Musca* em Muscini; *Pseudoptilolepis* e *Neomuscina* foram posicionadas em Reinwardtiini. Não houve outros representantes de Azeliini inclusos na análise além de *Ophyra* e *Hydrotaea*, por isto, a monofilia dos Reinwardtiini deve ser vista com ressalvas. O gênero *Polietina* foi diagnosticado como seguramente monofilético sendo a espécie *P. orbitalis* a espécie mais basal do conjunto amostrado e as espécies *P. nigra* e *P. prima* as mais derivadas (apicais). O gênero *Morellia* foi diagnosticado como parafilético. O gene CAD foi bastante eficiente no resgate das informações filogenética em diversos níveis da análise refletindo em muito da conclusão da análise combinada. Esta eficiência do gene CAD, reconhecido como a utilização da abordagem da análise combinada aumentou a eficiência no resgate das informações filogenéticas mesmo sendo os conjuntos de caracteres combinados diagnosticados como incongruentes através do teste ILD. No contexto da análise combinada, o gene EF-1 α apresentou valores de suporte positivo para diversas topologias não apresentadas originalmente em seu conjunto particular de dados.

A congruência entre os resultados obtidos através dos diferentes critérios de análise, o suporte dos dados às topologias apresentadas e principalmente a conformidade com hipóteses morfológicas refletem a adequação dos caracteres utilizados para o estudo das relações filogenéticas em Muscidae. Os trabalho de investigação filogenética molecular em Muscoidea pode ter continuidade pela inclusão de novos táxons na presente matriz. Análises com base em caracteres de um único gene deste conjunto podem ser orientadas pelas conclusões aqui apresentadas.

6. Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer Lisete M. Lorini e Adrian C. Pont pelas espécimes enviadas. Obrigado a Márcio Pie e Elaine G. Soares por sugestões importantes e discussão do manuscrito. Obrigado também a Hilary Hill, Shaun Winterton, Kevin Moulton e especialmente a Brian Cassel, do laboratório de Sistemática Molecular de Insetos da NCSU Insect Molecular Systematics Lab, por aconselhamento técnico e auxílio no laboratório de sequenciamento. Este projeto foi financiado por uma bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Programa de Doutorado com Estágio no Exterior – PDEE/BEX0143/02-2), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número de processo 140700/2001-3 (GSS) e 304.148/2002-4 (CJBC), e da Fundação Nacional de Ciências dos Estados Unidos (US National Science Foundation) (DEB-0098745) (BMW e J. Thorne).

7 Referências bibliográficas

- (182 co-authors) Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., *et al.*, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr.* 19, 716-723.
- Allard, M.W., Farris, J.S., Carpenter, J.M., 1999. Congruence among mammalian mitochondrial genes. *Cladistics* 15, 75-84.
- Amorim, D.S., Pires, M.R.S., 1996. Neotropical biogeography and a method for maximum biodiversity estimation. In: Bicudo, C.E.M., Menezes, N.A. (Eds.), *Biodiversity in Brazil, a first approach*. CNPq, São Paulo, pp. 183-219.
- Amorim, D.S., Silva, V.C., 2002. How far advanced was Diptera evolution in the Pangea? *Ann. Soc. entomol. Fr.* 38, 177-200.
- Baker, F.K., Lutzoni, F.M., 2002. The utility of the incongruence length difference test. *Syst. Biol.* 51, 625-637.
- Baker, R.H., DeSalle, R., 1997. Multiple sources of character information and the phylogeny of the Hawaiian drosophilids. *Syst. Biol.* 46, 654-673.
- Baker, R.H., Wilkinson, G.S., DeSalle, R., 2001. Phylogenetic utility of different types of molecular data used to infer evolutionary relationships among Stalk-Eyed flies (Diopsidae). *Syst. Biol.* 50, 87-105.
- Barker, F.K., Lutzoni, F.M., 2002. The utility of the incongruence length difference test. *Syst. Biol.* 51, 625-637.
- Barret, M., Donoghue, M.J., Sober, E., 1991. Against consensus. *Syst. Biol.* 40, 486-493.
- Beckenbach, A.T., Borkent, A., 2003. Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27, 21-35.
- Beckenbach, A.T., Wei, Y.W., Liu, H., 1993. Relationships in the *Drosophila obscura* species group, inferred from mitochondrial cytochrome oxidase II sequences. *Mol. Biol. Evol.* 10, 619-634.

- Bernasconi, M.V., Pawlowski, J., Valsangiacomo, C., Piffaretti, J.-C., Ward, P.I., 2000a. Phylogeny of the Scathophagidae (Diptera, Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 308-315.
- Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Piffaretti, J.-C., Ward, P.I., 2000b. Phylogenetic relationships among Muscoidea (Diptera: Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Insect Mol. Biol.* 9, 67-74.
- Bernasconi, M.V., Pawlowski, J., Valsangiacomo, C., Piffaretti, J.-C., Ward, P.I., 2001. Phylogeny of the genus *Scathophaga* (Diptera: Scathophagidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Can. J. Zool.* Vol. 79, 517-524.
- Bremer, K., 1988. The Limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42, 795-803.
- Bremer, K., 1990. Combinable component consensus. *Cladistics* 6, 369-372.
- Bremer, K., 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10, 295-304.
- Brower, A., 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends Ecol. Evol.* 11, 334-335.
- Brower, A.V.Z., DeSalle, R., 1994. Practical and theoretical considerations for choice of a DNA sequence region in insect molecular systematics, with a short review of published studies using nuclear gene regions. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 702-716.
- Brown, J.M., Pellmyr, O., Thompson, J.N., Harrison, R.G., 1994. Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Proxidae) based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: congruence with morphological data. *Mol. Biol. Evol.* 11, 128-141.
- Bull, J.J., Huelsenbeck, J.P., Cunningham, C.W., Swofford, D.L., Waddell, P.J., 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42, 384-397.
- Cao, Y., Adachi, J., Janke, A., Pääbo, S., Hasegawa, M., 1994. Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: instability of a tree based on a single gene. *J. Mol. Evol.* 39, 519-527.
- Capaldi, R.A., Malatesta, F., Darley-Usmar, V.M., 1983. Structure of cytochrome oxidase. *Biochem. Biophys. Acta* 726, 135-148.
- Carvalho, C.J.B. de, 1989a. Revisão das espécies e posição sistemática de *Palpibracus* Rondani (Diptera, Muscidae). *Revta. Bras. Zool.* 6, 325-376.

- Carvalho, C.J.B. de, 1989b. Classificação de Muscidae (Diptera): uma proposta através da análise cladística. *Revta. Bras. Zool.* 6, 627-648.
- Carvalho, C.J.B. de, 1999. Revision, cladistics and biogeography of the neotropical genus *Souzalopesmyia* Albuquerque (Diptera: Muscidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 101, 123-137.
- Carvalho, C.J.B. de, 2002 (Ed). Muscidae (Diptera) of the Neotropical region. Editora da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Carvalho, C.J.B. de, Couri, M.S., 2002. Part I. Basal groups. In: Carvalho, C.J.B. de (Ed.), Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region, Editora Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Carvalho, C.J.B. de, Couri, M.S., 2002. A cladistic and biogeographic analysis of *Apsil Malloch* and *Reynoldsia* Malloch (Diptera, Muscidae) of southern South America. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 104, 309-317.
- Carvalho, C.J.B. de, Couri, M.S., Pont, A.C., Pamplona, D., Lopes, S.M., 1993. Part II. Muscidae. In: Carvalho, C.J.B. de (Ed.), A catalogue of the Fanniidae and Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia, São Paulo.
- Caterino, M.S., Sperling, F.A.H., 1999. *Papilio* phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11, 122-137.
- Cho, S. Mitchell, A., Regier, J.C., Mitter, C., Poole, C., Friedlander, T.P., Zhao, S., 1995. A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor 1-alpha recovers morphology-based tree for Heliothine moths. *Mol. Biol. Evol.* 12, 650-656.
- Collins, K.P., Wiegmann, B.M., 2002. Phylogenetic relationships of the lower Cyclorrhapha (Diptera: Brachycera) based on 28s rDNA sequences. *Insect Syst. Evol.* 33, 445-456.
- Couri, M.S., Carvalho, C.J.B. de, 1997. Revision of *Polietina* Schnabl & Dziedzicki (Diptera, Muscidae) and considerations on its new systematic position. *Revta. bras. Zool.* 14, 255-281.
- Couri, M.S., Carvalho, C.J.B., 2003. Systematic relations among *Philornis* Meinert, *Passeromyia* Rodhain & Villeneuve and allied genera (Diptera, Muscidae). *Braz. J. Biol.* 63, 223-232.
- Couri, M.S., Pont, A.C., 2000. A cladistic analysis on Coenosiinae (Diptera, Muscidae). *Syst. Entomol.* 25, 373-392.

- Cracraft, J., Mindell, D.P., 1989. The early history of modern birds: a comparison of molecular and morphological evidence. In: Fernholm, B., Bremer, K., Jörnvall, H. (Eds.), *The hierarchy of life*. Elsevier, Amsterdam pp. 389-403.
- Cryan, J.R., Liebherr, J.K., Fetzner, J.W., Whiting, M.F., 2001. Evaluation of relationships within the endemic Hawaiian Platynini (Coleoptera: Carabidae) based on molecular and morphological evidence. *Mol. Phylogen. Evol.* 21, 72-85.
- Cummings, M.P., Otto, S.P., Wakeley, J., 1995. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 12, 814-822.
- Cunningham, C.W., 1997a. Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Mol. Biol. Evol.* 14, 733-740.
- Cunningham, C.W., 1997b. Is congruence between data partitions a reliable predictor of phylogenetic accuracy? Empirically testing an interactive procedure for choosing among phylogenetic methods. *Syst. Biol.* 46, 464-478.
- Cunningham, C.W., Zhu, H., Hillis, D.M., 1998. Best-fit maximum-likelihood models for phylogenetic inference: empirical tests with known phylogenies. *Evolution* 52, 978-987.
- Cunney, R., 1980. Revision of the genus *Eudasyphora* Townsend (Diptera: Muscidae), and reflections on its evolution. *Can. Ent.* 112, 345-373.
- Darlu, P., Lecointre, G., 2002. When does the incongruence length difference test fail? *Mol. Biol. Evol.* 19, 432-437.
- Davis, J.I., Simmons, M.P., Stevenson, D.W., Wendel, J.F., 1998. Data decisiveness, data quality, and incongruence in phylogenetic analysis: an example from the monocotyledons using mitochondrial atp A sequences. *Syst. Biol.* 47, 282-310.
- de Queiroz, A., 1993. For consensus (sometimes). *Syst. Biol.* 42, 368-372.
- DeSalle, R., Brower, V.Z., 1997. Process partitions, congruence, and the independence of characters: inferring relationships among closely related Hawaiian *Drosophila* from multiple gene regions. *Syst. Biol.* 46, 751-764.
- Dolphin, K., Belshaw, R., Orme, C.D.L., Quicke, D.L.J., 2000. Noise and incongruence: interpreting results of the incongruence length difference test. *Mol. Phylogen. Evol.* 17, 401-406.

- Downton, M., Austin, A.D., 2002. Increased incongruence does not necessarily indicate increased phylogenetic accuracy: the behavior of the ILD test in mixed-model analyses. *Syst. Biol.* 51, 19-31.
- Eastwood, R., Hughes, J.M., 2002. Molecular phylogeny and evolutionary biology of *Acrodipsas* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 27, 93-102.
- Eernisse, D.J., Kluge, A.G., 1993. Taxonomic congruence versus total evidence, and amniote phylogeny inferred from fossils, molecules, and morphology. *Mol. Biol. Evol.* 10, 1170-1195.
- Evenhuis, N.L., 1994. Catalogue of the fossil flies of the world (Insecta: Diptera). Leiden, Backhuys.
- Fang, Q.Q., Cho, S., Regier, J.C., Mitter, C., Matthews, M., Poole, R.W., Friedlander, T.P., Zhao, S., 1997. A new nuclear gene for insect phylogenetics: dopa decarboxylase is informative of relationships within Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae). *Syst. Biol.* 46, 269-283.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Felsenstein, J., 2004. Bootstrap, jackknife, and permutation tests. In: *Inferring Phylogenies*, Sinauer, Sunderland, pp. 335-363.
- Flook, P.K., Klee, S., Rowel, C.H.F., 1999. Combined molecular phylogenetic analysis of the Orthoptera (Arthropoda, Insecta) and implications for their higher systematics. *Syst. Biol.* 48, 233-253.
- Frailey, C.D., 2002. Neogene paleogeography of the Amazon basin. In: Dort, W. Jr. (Ed.), *TER-QUA Symposium series, 3*. Institute for Tertiary-Quaternary Studies, Lincoln pp. 71-97.
- Fрати, F., Simon, C., Sullivan, J., Swofford, D.L., 1997. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *J. Mol. Evol.* 44, 145-158.

- Friedlander, T.P., Horst, K.R., Regier, J.C., Mitter, C., Peigler, R.S., Fang, Q.Q., 1998. Two nuclear genes yield concordant relationships within Attacini (Lepidoptera: Saturniidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 9, 131-140.
- Friedlander, T.P., Regier, J.C., Mitter, C., 1994. Phylogenetic information content of five nuclear gene sequences in animals: initial assessment of character sets from concordance and divergence studies. *Syst. Biol.* 43, 511-525.
- Glass, G.V., 1976. Primary, secondary and meta-analysis of research. *Educ. Res.* 5, 3-8.
- Graybeal, A., 1994. Evaluating the phylogenetic utility of genes: a search for genes informative about deep divergences among vertebrates. *Syst. Biol.* 43, 174-193.
- Hecker, K.H., Roux, K.H., 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in "Touchdown" and "StepDown" PCR. *BioTechniques* 20, 478-485.
- Hennig, W., 1955-1964. Muscidae. In: Lindner, E. (Ed.). *Die Fliegen der paläarktischen Region*, Teil 63b, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Tafeln, Stuttgart, pp. 97-1056.
- Hennig, W., 1965. Vorarbeiten zu einem phylogenetischen System der Muscidae (Diptera: Cyclorrhapha). *Stuttg. Beitr. Naturk.*, 141, 1-100.
- (119 co-authors) Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., *et al.*, 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 129-149.
- Howland, D.E., Hewitt, G.M., 1995. Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. *Insect Mol. Biol.* 4, 203-15.
- Huelsenbeck, J.P., Rannala, B., 1997. Phylogenetic methods come of age: testing hypothesis in a evolutionary context. *Science* 276, 227-232.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Johnson, K.P., Moylet, R.G., Witt, C.C., Faucett, R.C., Weckstein, J.D., 2001. Phylogenetic relationships in the louse genus *Penenirmus* based on nuclear (EF-1 α) and mitochondrial (COI) DNA sequences. *Syst. Entomol.* 26, 491-497.
- Johnson, L.A., Soltis, D.E., 1998. Assessing congruence: empirical examples from molecular data. In: Soltis, P.S., Soltis, D.E., Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular systematics of plants*. Vol. II. Chapman and Hall, New York, pp. 297-343.

- Kawasaki, E.S., 1990. Amplification of RNA. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., PCR protocols. Academic Press, San Diego, pp. 21–27.
- Kluge, A.G., 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis for relationships among Epicrates (Boidae, Serpentes). *Syst. Zool.* 38, 1-25.
- Kluge, A.G., Wolf, A.J., 1993. Cladistics: what's in a word? *Cladistics* 9, 183-199.
- Lemmon, A.R., Moriarty, E.C., 2004. The importance of proper model assumption in bayesian phylogenetics. *Syst. Biol.* 53, 265-277.
- 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.L., 2000. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia homnivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Mol. Biol.* 9, 521-529.
- Liu, H., Beckenbach, A.T., 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1, 41-52.
- Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M.C.S.L., Wesselingh, F., 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of Tropical South American rivers. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 13-48.
- Malloch, J.R., 1934. Muscidae. In: *Diptera of Patagonia and South Chile* 7, 171-346.
- McAlpine, J.F., 1989. Phylogeny and classification of the Muscomorpha. In: *Manual of Nearctic Diptera*, vol 3. Res. Branch Agric. Canada, Ottawa, pp. 1397-1518.
- Meier, R., Wiegmann, B.M., 2002. A phylogenetic analysis of Coelopidae (Diptera) based on morphological and DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 393-407.
- Michelsen, V., 1991. Revision of the aberrant New World genus *Coenosopsia* (Diptera: Anthomyiidae), with a discussion of anthomyiid relationships. *Syst. Entomol.* 16, 85-104.
- Mickevich, M.F., Farris, J.S., 1981. The implications of congruence in *Menidia*. *Syst. Zool.* 30, 351-370.
- Milinkovitch, M.C., LeDuc, R.G., Adachi, J., Farnir, F., Georges, M., Hasegawa, M., 1996. Effects of character weighting and species sampling on phylogeny reconstruction: a case study based on DNA sequences data in cetaceans. *Genetics* 144, 1817-1833.

- Miller, J.S., Brower, A.V.Z., DeSalle, R., 1997. Phylogeny of the neotropical moth tribe Josiini (Notodontidae: Dioprinae): comparing and combining evidence from DNA sequences and morphology. *Biol. J. Linn. Soc.* 60, 297-316.
- Mitchell, A., Cho, S., Regier, J.C., Mitter, C., Poole, R.W., Matthews, M., 1997. Phylogenetic utility of elongation factor-1 α in Noctuoidea (Insecta: Lepidoptera): the limits of synonymous substitution. *Mol. Biol. Evol.* 14, 381-390.
- Mitchell, A., Mitter, C., Regier, J.C., 2000. More taxa or more characters revisited: combining data from nuclear protein-encoding genes for phylogenetic analyses of Noctuoidea (Insecta: Lepidoptera). *Syst. Biol.* 49, 202-224.
- Miyamoto, M.M., Allard, M.W., Adkins, R.M., Janecek, L.L., Honeycutt, R.L., 1994. A congruence test of reability using linked mitochondrial DNA sequences. *Syst. Biol.* 43, 236-249.
- Miyamoto, M.M., Fitch, W.M., 1995. Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Syst. Biol.* 44, 64-76.
- Motta, H.C.G., Couri, M.S., 1999. Revisão das espécies de *Bithoracochaeta* Stein (Diptera, Muscidae). *Revta. Bras. Zool.* 16, 665-689.
- Moulton, J.K., Wiegmann, B.M., 2004. Evolution and phylogenetic utility of CAD (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 363-378.
- Naylor, G.J.P., Brown, W.M., 1998. Amphioxus mitochondrial DNA, chordate phylogeny, and the limits of inference based on comparisons of sequences. *Syst. Biol.* 47, 61-76.
- Nihei, S.S., Carvalho, C.J.B. de, 2004. Taxonomy, cladistics and biogeography of *Coenosopsia* Malloch (Diptera, Anthomyiidae) and its significance to the evolution of anthomyiids in the Neotropics. *Syst. Entomol.* 29, 260-275.
- Nihei, S.S., 2004. Sistemática e biogeografia de Muscini (Diptera, Muscidae). Tese apresentada ao curso de Pós –Graduação em Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Nixon, K.C., 1999. The Parsimony Ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15, 407-414.
- Nixon, K.C., Carpenter, J.M., 1996. On simultaneous analysis. *Cladistics* 12, 221-241.

- Olmstead, R.G., Sweere, J.A., 1994. Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Syst. Biol.* 43, 467-481.
- Page, D.M., Holmes, E.C., 1998. *Molecular evolution: a phylogenetic approach*. Blackwell, Malden.
- Pamplona, D.M., 1999. Nova caracterização de *Cyrtoneurina* Giglio-Tos, 1893 e descrição de *Paracyrtoneurina* g.n. (Diptera, Muscidae). *Revta. Bras. Ent.* 43, 9-24.
- Petri, S., Fúlfaro, V.J., 1983. *Geologia do Brasil (Fanerozóico)*. T.A. Queiroz e EDUSP, São Paulo.
- Pitman, W.C., Cande, S., LaBrecque, J., Pindell, J., 1993. Fragmentation of Gondwana: the separation of Africa and South America. In: Goldblatt, P. (Ed.), *Biological relationships between Africa and South America*. Yale University Press, New Haven, pp. 15-34.
- Pont, A.C., 1972. Family Muscidae. In: *A catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States*, 97. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Pont, A.C., 1973. Studies on Australian Muscidae (Diptera). IV. A revision of the subfamilies Muscinae and Stomoxyinae. *Austr. Journ. of Zool. suppl. ser.* 21, 129-296.
- Pont, A.C., 1977. Family Muscidae. In: Delfinado, M.D., Hardy, D.E. (Eds.), *A catalogue of the Diptera of the Oriental Region. Vol. III. Suborder Cyclorrhapha (excluding Division Aschiza)*. The University Press of Hawaii, Honolulu.
- Pont, A.C., 1980. Family Muscidae. In: Crosskey, R.W. (Ed.), *Catalogue of Diptera of the Afrotropical Region*. British Museum (Natural History), Londres.
- Pont, A.C., 1986. Family Muscidae. In: Sóos, A.S., Papp, L. (Eds.), *Catalogue of the Palaearctic Diptera*, vol. 11. Hungarian Natural History Museum, Budapeste.
- Pont, A.C., 1989. Family Muscidae. In: Evenhuis, N. (Ed.), *Catalog of the Diptera of Australasia and Oceania Regions. Special Publications of the Bernice Pauahi Bishop Museum*, 86, pp. 675-699.
- Pont, A.C., Carvalho, C.J.B. de, 1997. Three new species of Muscidae (Diptera) from Dominican amber. *Studia Dipterologica* 4, 173-181.
- Posada, D., Crandal, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.

- Roback, S.S., 1951. A classification of the muscoid calyprate Diptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 44, 327-361.
- Rokas, A., Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Stone, G.N., 2002. A maximum-likelihood analysis of eight phylogenetic markers in gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae): implications for insect phylogenetic studies. *Mol. Phylogen. Evol.* 22, 206-219.
- Russo, C.A.M., Takezaki, N., Nei, M., 1996. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* 13, 525-536.
- Savage, J., Wheeler, T.A., Wiegmann, B.M., 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Thricops* Rondani (Diptera: Muscidae) based on molecular and morphological characters. *Syst. Entomol.* 29, 395-414.
- Scheffer, S., Wiegmann, B.M., 2000. Molecular phylogenetics of the holly leafminers (Diptera: Agromyzidae: *Phytomyza*): species limits, speciation, and dietary specialization. *Mol. Phylogen. Evol.* 17, 244-255.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M., von Haeseler, A., 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18, 502-504.
- Schuehli, G.S., Carvalho, C.J.B. de, Wiegmann, B.M., 2004. Regarding the Taxonomic Status of *Ophyra* Robineau-Desvoidy (Diptera: Muscidae): A Molecular Approach. *Zootaxa*, 712, 1-12.
- Schuehli, G.S. e Carvalho, C.J.B. de, 2005. Revision and cladistics of the Neotropical genus *Pseudoptilolepis* Snyder, (Diptera: Muscidae). *Revta. Bras. Zool.*, no prelo.
- Séguy, E., 1937. Diptera, Family Muscidae. In: Wytsman, P., *Genera Insectorum*. fasc. 205. Bruxelles.
- Sharpe, R.G., Harbach, R.E., Butlin, R.K., 2000. Molecular variation and phylogeny of members of the Mimus group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Syst. Entomol.* 25, 263-272.
- Sikes, D.S., Lewis, P.O., 2001. PAUPrat, beta version 1. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, CT.

- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.
- Skidmore, P., 1985. The biology of the Muscidae of the world. *Series Entomologica*, 29.
- Smith, S.W., Overbeek, R., Woese, C.R., Gilbert, W., Gillevet, P.M., 1994. The genetic data environment and expandible GUI for multiple sequence analysis. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 671-675.
- Snyder, F.M., 1954. A revision of *Cyrtoneurina* Giglio-Tos, with notes on related genera (Diptera, Muscidae). *Bull. Am. Mus. nat. Hist.* 103, 417-464.
- Sorenson, M.D., 1999. TreeRot, version 2. Boston University, Boston, MA.
- Sperling, F.A.H., Hickey, D.A., 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). *Mol. Biol. Evol.* 11, 656-665.
- Sperling, F.A.H., Anderson, G.S., Hickey, D.A., 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.* 39, 418-427.
- Stanger-Hall, I.K., Cunningham, C.W., 1998. Support for a monophyletic Lemuriformes: Overcoming incongruence between data partitions. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1572-1577.
- Strimmer, K., von Haeseler, A., 1996. Quartet puzzling : a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13, 964-969.
- Swofford, D.L., 1991. When are phylogeny estimates from molecular and morphological data incongruent? In: Miyamoto, M.M., Cracraft, J. (Eds.), *Phylogenetic analysis of DNA sequences*. Oxford University Press, Nova Iorque, pp. 295-333.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)* Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Swofford, D.L., Waddell, P.J., Huelsenbeck, J.P., Foster, P.G., Lewis, P.O., Rogers, J.S., 2001. Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Syst. Biol.* 50, 525-539.
- Thompson, F.C., 1990. Biosystematic information dipterists ride the third wave. In: Kosztaab, M., Schaefer, C.W., *Systematics on the North American Insects and Aracnids: status and needs*. Virginia agricultural experiment station information series 90-1, Virginia polytechnic Institute and State University, Blacksburg, pp. 179-201.

- Vockeroth, J.R., 1996. Key to genera of Muscidae (Diptera) of Mexico, Central America, and the West Indies. *Mem. Entomol. Soc. Wash.* 18, 280-288.
- Vossbrinck, C.R., Friedman, S., 1989. A 28S ribosomal RNA phylogeny of certain cyclorrhaphous Diptera based upon a hypervariable region. *Syst. Entomol.* 14, 417-431.
- Wiens, J.J., Servedio, M.R., 1998. Phylogenetic analysis and intraspecific variation: performance of parsimony, likelihood, and distance methods. *Syst. Biol.* 47, 228-253.
- Winterton, S.L., Yang, L., Wiegman, B.M., Yeates, D.K., 2001. Phylogenetic revision of Agapophytinae subf.n. (Diptera: Therevidae) based on molecular and morphological evidence. *Syst. Entomol.* 26, 173-211.
- Yang, L., Wiegmann, B.M., Yeates, D.K., Irwin, M.E., 2000. Higher-level phylogeny of the Therevidae (Diptera: Insecta) based on 28s ribosomal and Elongation Factor-1 α gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15, 440-451.
- Yeates, D.K., Wiegmann, B.M., 1999. Congruence and controversy: toward a higher-level phylogeny of Diptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 397-428.
- Yoder, A.D., Irwin, J.A., Payseur, B.A., 2001. Failure of the ILD to determine data combinability of the ILD to determine data combinability for slow loris phylogeny. *Syst. Biol.* 50, 408-424.

8 Anexos

Regarding the taxonomic status of *Ophyra* Robineau-Desvoidy (Diptera: Muscidae): A molecular approach

GUILHERME SCHNELL E SCHUEHLI¹, CLAUDIO JOSÉ BARROS DE CARVALHO² & BRIAN M. WIEGMANN³

Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, C.P. 19020, Curitiba, 81.531-980, Brasil; e-mail: ¹schnell@onda.com.br, ²cjbarva@ufpr.br.

³North Carolina State University, Department of Entomology, College of Agriculture and Life Sciences, Gardner Hall, Campus Box 7613, Raleigh, NC, 27695-7613, USA.

Abstract

The muscid genus *Ophyra* has long been the subject of debate over its placement within the family. However, a phylogenetic study has never been conducted that would clarify its systematic position. In the present paper, phylogenetic relationships are examined between *Ophyra albuquerquei* and related muscid genera. The mitochondrial genes Cytochrome Oxidase I and II and tRNA-Leu were used combined with the nuclear genes CAD and Elongation Factor - 1 α to compose a matrix with 2989 characters (716 parsimony-informative). These characters were analyzed under parsimony resulting in a single most parsimonious tree. Contrary to some recent classifications, our molecular data suggest the placement of *Ophyra albuquerquei* within the Muscinae in a separate position from the azeliine genus *Hydrotaea*.

Key words: *Ophyra*, *Hydrotaea*, Muscidae, molecular systematics, CAD, Elongation Factor 1 - α , Cytochrome Oxidase I and II

Introduction

Ophyra Robineau-Desvoidy is a small muscid genus with about 20 species and is distributed in warm climates worldwide. Some of its species, such as *O. chalcogaster* (Wiedemann), have been transported by human activity to many countries, and others, such as *O. aenescens* (Wiedemann), have been used as biological control agents for *Musca domestica* L. (see Skidmore 1985 for details).

The taxonomic position of *Ophyra* has been the subject of debate almost from the time it was first described. In some recent classifications, various morphological characters

have been used to justify several alternative placements within the Muscidae (Hennig 1965; Skidmore 1985; Carvalho & Couri 2002). In this study, we bring new evidence to bear on the taxonomic status and classificatory position of *Ophyra albuquerquei* from nucleotide sequences of nuclear and mitochondrial genes. Our molecular data suggest the placement of *Ophyra albuquerquei* within the Muscinae, in a separate position from the Azeliinae genus *Hydrotaea*.

Taxonomic history of *Ophyra* Robineau-Desvoidy

Robineau-Desvoidy (1830) placed *Ophyra* in the “*Aricines Littorales*” or “*Aquatiques*” in his short original description of the genus. Soon thereafter, Macquart (1835) treated *Ophyra* as part of the Section Anthomyzides of Diptera. Wulp (1896) later placed *Ophyra* in the Anthomyiinae.

Study of specimens in the British Museum sampled from several regions of the world led Malloch (1923) to place *Ophyra* in the muscid subfamily Phaoniinae. In the same study, he published a key to the males and females of five species. Alternatively, Séguy (1923) placed the genus in the muscid group Aricinae, but later followed Malloch (1923) by including it in the Phaoniinae in his diagnosis, key, and biological observations. Aldrich (1928) placed *Ophyra* in his Anthomyiidae.

Emden (1943) placed *Ophyra* in the Phaoniinae, in agreement with Malloch (1923) and Séguy (1937). He included the genus in his *Phaonia*-group within the Phaoniinae of the Ethiopian Region. He proposed a systematic relationship between *Ophyra* and *Hydrotaea* Robineau-Desvoidy together as close relatives of his *Limnophora*-group based on the presence of a posterodorsal seta on the hind tibia. He also proposed that characteristics of *Ophyra* and *Hydrotaea* provide evidence of a connection between the *Limnophora*-group, its close relatives, and the Fanniinae. Emden (1943) stressed the importance of the posterodorsal seta on the hind tibia in *Ophyra*, *Hydrotaea* and *Phaonia* as evidence of a relationship among these genera.

Later, Albuquerque (1958) emphasized the differences of adults between *Ophyra* and *Hydrotaea*. Hennig (1965) considered both genera as Hydrotaeini of the Muscinae, citing as evidence homologies in plastron formation in the egg. These egg-stage characters were also considered evidence that *Ophyra* and *Hydrotaea* are likely the closest relatives of Muscini in the Hydrotaeini. In the same paper, Hennig (1965) presented *Hydrotaea* as a monophyletic genus based on characteristics of the male fore femur.

The classification of Hennig (1965) was followed by Pont (1972) in his catalogue of Neotropical Muscidae. One year later, Pont (1973) published a revision of the Australian subfamilies Muscinae and Stomoxyinae, and included *Ophyra* in the former. He also reviewed the existing literature on *Ophyra* for all biogeographic regions and provided a key, re-description, and some notes on three Australian species. Several years later, in his catalogues of Muscidae from the Oriental and Afrotropical Regions, Pont (1977, 1980)

followed Hennig's (1965) view that *Ophyra* and *Hydrotaea* are best placed in a separate tribe within the Muscinae, the Hydrotaeini. Skidmore (1985) treated *Ophyra* in Azeliinae-Hydrotaeini together with several other genera based mostly on characters of the immature stages. Skidmore (1985) also discussed the evidence in support of a close phylogenetic relationship between *Ophyra* and *Hydrotaea*.

Pont (1986), in his catalogue of the Palearctic Muscidae, presented *Ophyra* as a junior synonym of *Hydrotaea* within the Azeliini (subfamily Muscinae). He retained this view in his catalogue of Australasia and Oceania Regions (Pont 1989). Around the same time, Pamplona and Couri (1989) published a revision of the Neotropical species of *Ophyra* with a synonymy, re-descriptions and a key for species. Pamplona and Couri (1989) positioned *Ophyra* in Hydrotaeini based on Skidmore (1985). The phylogenetic tree for Muscidae published by Carvalho (1989) placed *Hydrotaea* in the Azeliini, however *Ophyra* was not included in this analysis. Carvalho *et al.* (1993), based on his earlier phylogenetic analysis of Muscidae, retained *Ophyra* and *Hydrotaea* in the Azeliini for the Neotropical catalogue corroborating Skidmore's view (1985). Most recently, Vockeroth (1996) did not recognize *Ophyra* as a valid genus, considering it a junior synonym of *Hydrotaea* following Pont (1986, 1989). Nonetheless, Carvalho and Couri (2002) recognized *Ophyra* and *Hydrotaea* as separate Azeliini genera.

Materials and methods

Taxon Sampling

Adult flies were collected between January 2001 and August 2002. In all cases, adults were preserved in 95–100% ethanol and stored at -20°C. Outgroup taxa were obtained from the collection of the Laboratory of Molecular Systematics, North Carolina State University. Twelve species were included in the molecular systematic analyses, representing ten Muscidae and one species each of Scathophagidae and Anthomyiidae as outgroups (Table 1). All sequences were obtained from single specimens of each species. Conspecific specimens from the same collection site and with the same sample date were kept as vouchers as well as any remaining parts of the sequenced specimen. Vouchers were deposited in the Collection Pe. Jesus Santiago Moure – DZUP of the Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR – Brazil. The sequences for *Musca domestica* were downloaded from GenBank. Table 2 presents the GenBank accession numbers for the DNA sequences used in our analysis.

Laboratory methods

Genomic DNA was extracted from specimens preserved in alcohol by homogenization of whole flies using a SDS/proteinase K-based extraction protocol (50mM Tris, pH 8.0; 50mM EDTA, pH 8.0; 2% SDS, 75mM NaCl; 50mM Sucrose; 100mg proteinase K). Samples were homogenized in 700 µl of lysis buffer, placed in a heating block at 55°C for 6–

24 hours, and twice extracted: once with a 1X volume of a phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) mixture (Sigma-Aldrich) and again with a 1X volume of a chloroform: isoamyl alcohol (24:1) mixture. One-tenth volume of a 3M sodium acetate solution and a 1X volume of chilled (-20°C) isopropanol were added to the aqueous phase from the second extraction to precipitate the DNA, which was pelleted by microcentrifugation. DNA was washed with 1 ml of 70% and 95% EtOH, air dried, resuspended in 100 ml of TE, and stored at -80°C. In a few cases where only a single specimen was available, nucleic acids were extracted from the thorax leaving the head, wings, and abdomen as a voucher. Oligonucleotide primers (Table 3) designed to amplify COI (Simon et al. 1994) and COII (Brown et al., 1994) (see Fig. 1 for diagram of the PCR products), EF-1 α (Meier & Wiegmann 2002; Collins & Wiegmann 2002) and CAD (Moulton & Wiegmann 2004), were synthesized by Sigma Genosys (Woodlands, TX). We used standard three-step DNA PCR with TaKaRa Ex Taq™ (Mirus Corp., Madison, WI) except for CAD where we used touchdown PCR (Hecker & Roux 1996) with TaKaRa Ex Taq™ (Mirus Corp., Madison, WI). Approximately 1Kb of the EF-1 α gene was amplified in two overlapping sections via RT-PCR (Kawasaki 1990) using GeneAmp RNA PCR Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) and the RT protocol suggested in the kit, followed by the same PCR protocol used for DNA PCR. For COI, COII and EF-1 α we used 50°C annealing and 30 cycles. For CAD, a touchdown PCR method was used consisting of 55°C annealing for 6 cycles, followed by 50°C for 36 cycles.

TABLE 1. Species used in the analysis, sex, precedence, date of collection, collector. NC = North Carolina; PR = Paraná; RS = Rio Grande do Sul.

Species	Sex	Locality	Date	Collector
<i>Hylemya</i> sp	male	Great Smoky Mountain N.P., NC, USA	28.IV.01	Wiegmann, B.M.
<i>Scathophaga stercoraria</i>	male	Mt. Mitchell, NC, United States	14.viii.96	Wiegmann, B.M.
<i>Biopyrellia bipuncta</i>	male	Chapada, RS, Brazil	28.iv.00	Lorini, L.M.
<i>Helina lasiophthalma</i>	female	Oxford, United Kingdom	ix.02	Pont, A.C.
<i>Hydrotaea</i> sp.	male	Passo Fundo, RS, Brazil	10.xi.00	Lorini, L.M.
<i>Morellia ochrichornis</i>	male	Chapada, RS, Brazil	28.iv.00	Lorini, L.M.
<i>Morellia xanthoptera</i>	female	Morretes, PR, Brazil	21–27.ix.01	Schühli, G.S.
<i>Ophyra albuquerquei</i>	male	Passo Fundo, RS., Brazil	10.xi.00	Lorini, L.M.
<i>Phaonia tuguriorum</i>	male	Oxford, United Kingdom	ix.02	Pont, A.C.
<i>Philornis blanchardi</i>	male	Chapada, RS, Brazil	13.xi.00	Lorini, L.M.
<i>Polietina nigra</i>	female	Morretes, PR, Brazil	5–23.i.02	Schühli, G.S.
<i>Stomoxys calcitrans</i>	female	Anita Garibaldi, RS, Brazil	26.ii.02	Lorini, L.M.

Sequences were obtained by dye terminator cycle sequencing using the ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems, Warrington, England). Sequence confirmation was accomplished by comparing complementary DNA strands and amino acid translation. The sequences of amino acids used to compare sequences were the

ones published on GenBank for *Musca domestica* (CAD – AY280689; EF-1 α – AF503149; COI – AF259518; COI and II – AF104622). Editing of nucleotide sequences, contig assembly, and consensus sequence were performed using the software Sequencher 4.0.5 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, 1991).

TABLE 2. Species used in the analysis and their respective GenBank accession number for each sequence used: CAD, EF-1 α – Elongation Factor 1, COI – Cytochrome Oxidase subunit I, tRNA-Leu and COII – tRNA Leucine and Cytochrome Oxidase subunit II.

Taxon	CAD	EF-1 α	COI	COII	TRNA-leu and COII
<i>Hylemya</i> sp	AJ605059	AJ605071	AJ617702	AJ623305	AJ627903
<i>Scathophaga stercoraria</i>	AJ605051	AJ605063	AJ617694	AJ623297	AJ627895
<i>Biopyrellia bipuncta</i>	AJ605052	AJ605064	AJ617695	AJ623298	AJ627896
<i>Helina lasiophthalma</i>	AJ605055	AJ605067	AJ617698	AJ623301	AJ627899
<i>Hydrotaea</i> sp	AJ605049	AJ605061	AJ617692	AJ623295	AJ627893
<i>Morellia ochricornis</i>	AJ605054	AJ605066	AJ617697	AJ623300	AJ627898
<i>Morellia xanthoptera</i>	AJ605053	AJ605065	AJ617696	AJ623299	AJ627897
<i>Musca domestica</i>	AY280689	AF503149	AF259518	AF104622	AF104622
<i>Ophyra albuquerquei</i>	AJ605058	AJ605070	AJ617701	AJ623304	AJ627902
<i>Phaonia tuguriorum</i>	AJ605057	AJ605069	AJ617700	AJ623303	AJ627901
<i>Philornis blanchardi</i>	AJ605056	AJ605068	AJ617699	AJ623302	AJ627900
<i>Polietina nigra</i>	AJ605048	AJ605060	AJ617691	AJ623294	AJ627892
<i>Stomoxys calcitrans</i>	AJ605050	AJ605062	AJ617693	AJ623296	AJ627894

TABLE 3. Primers used for each gene, size of the amplified piece and the number and percentage of the parsimony-informative sites for the combined tree.

Primer	gene	size (bases)	PI
TY-J-1460/C1-N-2191	Cytochrome oxidase subunit I	694	167 (24%)
2792/C2-N-3389	Cytochrome oxidase subunit I and II	607	303 (45%)
EF4/EF6 EF2/EF5	Elongation Factor - 1 α	1036	145 (14%)
60/364	CAD	724	268 (37%)

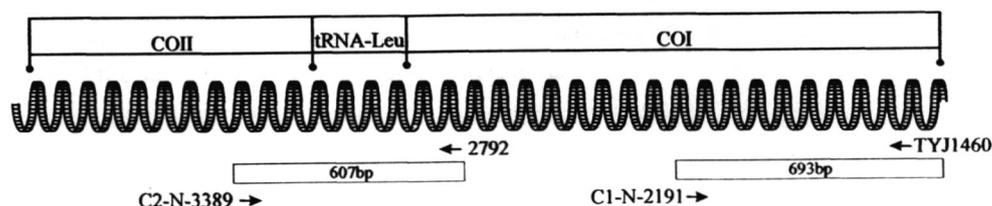


FIGURE 1. Diagram indicating the position of the sequences for Cytochrome Oxidase subunit I (COI) and II (COII), their respective primer sets and size. tRNA-Leu - tRNA Leucine.

Phylogenetic Analysis

The phylogenetic dataset consists of four partitions comprising DNA sequences for CAD, EF-1 α , COI and COII. Nucleotide alignments for each of the genes were inferred manually using the Genetic Data Environment (GDE 2.2, Smith et al. 1994). The alignment file is available from <http://zoo.bio.ufpr.br/diptera/diptera-c/guilherme.html>. The alignment was unambiguous for all genes except for COI (C2N3389/2792) where *Helina lasiophthalma* presented an indel of three bases in the last 20 bases. The alignment of EF-1 α lacks the regions EF2/EF5 (379bp) for the taxa *Biopyrellia bipuncta*, *Phaonia tugurorum* and *Scathophaga stercoraria* and the region EF4/EF6 (656bp) for *Ophyra albuquerquei*. These regions were coded as missing data. The tRNA-Leu coding region was excluded from the alignment due to its small size and subjective alignment.

To assess character congruence among the partitions CAD, COI, COII, EF-1 α , incongruence length difference (ILD, Farris et al. 1994) tests were carried out as implemented by PAUP* version 4.0b10 (Swofford 2001). The analysis was performed with 100 replicas with random addition sequence, starting trees for branch swapping obtained by stepwise addition procedure, 10 random addition replicates per ILD replicate and swap TBR (tree bisection-reconnection).

Unweighted parsimony (MP) analyses were carried out in PAUP* version 4.0b10 (Swofford 2001) using the heuristic search option and 1000 replicate random addition searches with tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping. In all cases, the following settings were used: all characters of type unordered, steepest descent option not in effect, MaxTrees unlimited (auto-increased by 100), branches collapsed if maximum branch length is zero, and MulTrees option in effect. We estimated branch support for MP trees via nonparametric bootstrap analysis (Felsenstein 1985) and Bremer support (Bremer 1988, 1994). Bootstrap analyses were performed with 1000 replicate searches with simple addition sequences and TBR branch swapping. We calculated Bremer and partitioned Bremer support values (Baker & DeSalle 1997) for each node for the topology from the combined data using the program TreeRot. V2 (Sorenson 1999) in conjunction with PAUP*. We also implemented successive weighting (SWP) (Farris 1969) using the rescaled consistency index (RC) as an a posteriori weight for each character. This procedure attempts to reduce the effects of homoplasy in the analysis by giving less consistent characters proportionately lower weight. SWP was implemented in the following manner: first the data were re-weighted based on their RC values from initial MP analyses, then a new MP analysis was performed on the weighted data, and the process was repeated until it yielded the same tree(s) on consecutive iterations.

Results and discussion

Based on the results from ILD tests, the hypothesis of congruence was rejected ($\alpha < 0.05$) for comparisons between all partitions. The same result was found in comparisons

between the sets of mitochondrial and nuclear genes. Since the ILD test confounds incongruence due to conflicting signals with incongruence due to homoplasy (Dolphin et al. 2000), we included all data partitions in the combined analysis. The decision of combining data minimizes sampling error and maximizes the explanatory power of the data (Kluge 1989; Kluge & Wolf 1993). The opportunity for stochastic errors in this approach is lower than when the data are separately analyzed. Even when the data sets are homogeneous these stochastic errors can lead to different topologies under separated analysis (Johnson and Soltis 1998).

The combined data matrix comprises 2989 nucleotides, of which 438 are uninformative variable positions (14.7% of total) and 716 (24% of total) are parsimony-informative sites. The number of the parsimony-informative (PI) sites for each gene relative to the combined tree is presented in Table 3. If considered together COI (TYJI460/C1-N-2191) and COI (2797/C2-N-3389) resulted in a set with 941bp and 235 PI (25%) sites. COII alone represents a set with 288bp and 68 PI (23.6%). Parsimony analysis of the combined data resulted in a single phylogenetic tree (Fig. 2, length =2732 steps, consistency index =0.57, retention index =0.37). The tree obtained by successive weighting was identical in topology to that found under equal weighting (Fig. 2).

The most parsimonious tree shows evidence for two major clades: one composed largely of genera from the Muscinae, including the species of *Hydrotaea* and *Ophyra*; and a second clade with two genera from the Phaoniinae forming a group with *Philornis* (Reinwardtiini sensu Carvalho et al. 1993). Assuming that *O. albuquerquei* is representative of the genus *Ophyra*, then this finding contradicts the older hypotheses in the taxonomic literature that place *Ophyra* in the Phaoniinae (Malloch 1923; Séguy 1937; Emden 1943). This idea was already rejected by numerous authors (Albuquerque 1958; Hennig 1965; Pont 1972, 1973, 1977, 1980; Pamplona & Couri 1989; Carvalho et al. 1993; Carvalho & Couri 2002), but has never been rigorously tested for *Ophyra* through quantitative phylogenetic analysis.

Our molecular data place *O. albuquerquei* within the Muscinae with high bootstrap and Bremer support. Hennig (1965) defended the monophyly of the subfamily based on characters of the ovipositor. Carvalho (1989), Couri and Carvalho (1997) and Carvalho and Couri (2002) also recognized characters of the ovipositor associated with egg shape and the presence of setulae on the anepimeron as synapomorphies of Muscinae. In addition, our analysis suggests that *Hydrotaea* is the sister group to all sampled Muscinae. *Hydrotaea* was considered monophyletic by Hennig (1965) and as probably monophyletic by Carvalho and Couri (2002) based on characters of the fore femur. However, these hypotheses of monophyly still need rigorous quantitative tests. Our data place *Polietina* as a basal Muscinae genus. Couri and Carvalho (1997) placed *Polietina* in the Muscini based on characters of the male terminalia.

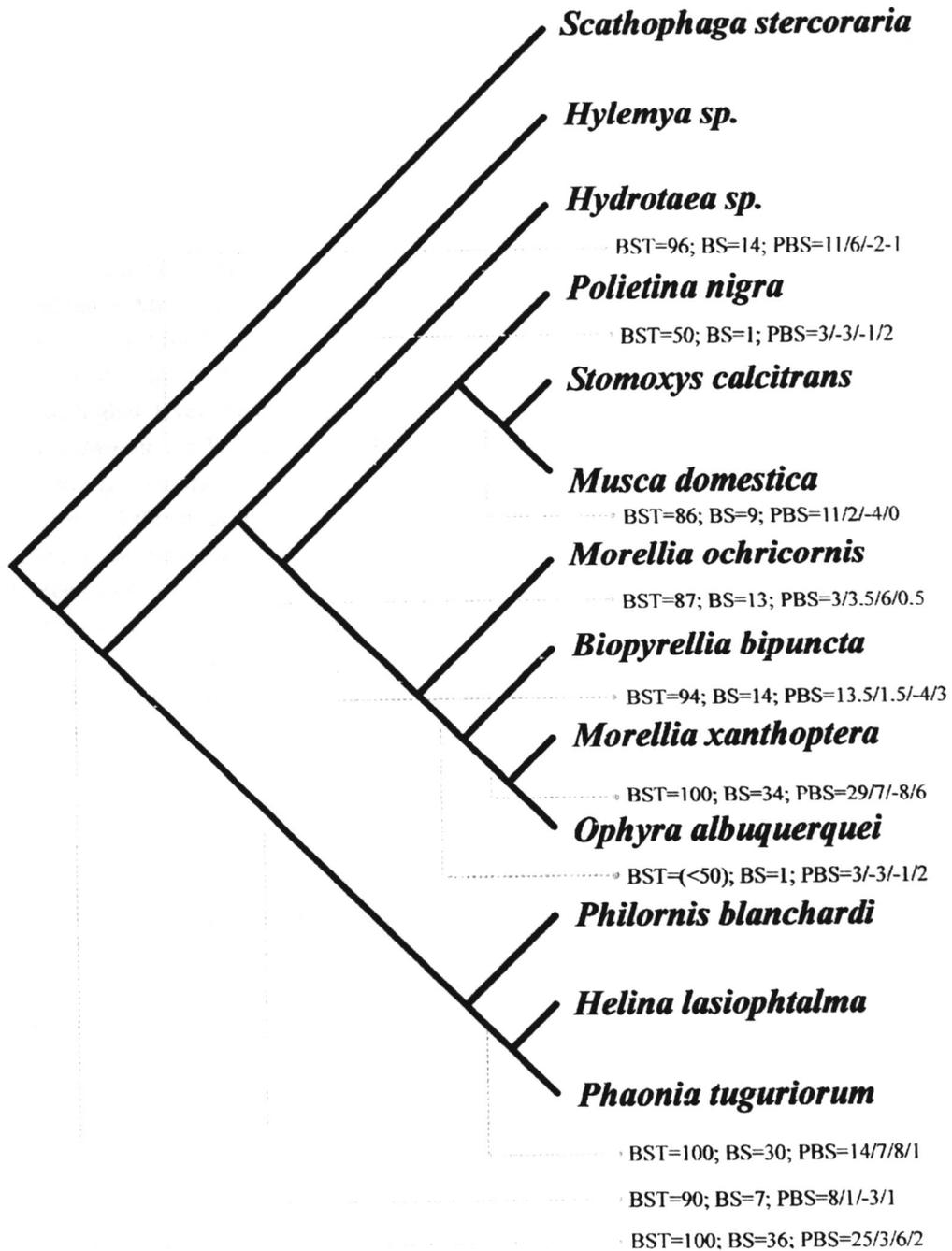


FIGURE 2. Most Parsimonious phylogenetic tree: length =2732 steps, consistency index =0.57, retention index =0.37. BST – Bootstrap values (1000 replications), BS – Bremer Support values and PBS – Partitioned Bremer Support values for the partitions CAD, EF1-∞, COI (TY-J-1460/C1-N-2191) and COI (2792/C2-N-3389).

Traditionally, the Muscinae have been divided into two tribes – Muscini and Stomoxyini (Carvalho 1989; Carvalho et al. 1993; Couri & Carvalho 2002). In our analysis, the sampled Muscini were unusually divided by the placement of *Stomoxys* (Stomoxyini). In future studies, it will be necessary to add sequences from other Stomoxyini, especially *Haematobia* Latreille and *Neivamyia* Pinto and Fonseca to adequately assess the monophyly and interrelationships of Stomoxyini and Muscini. Similarly, the paraphyly of the two sampled species of *Morellia* Robineau-Desvoidy indicate that a revision of the genus is needed (see Carvalho & Couri 2002).

Our molecular data support *Ophyra albuquerquei* as sister to *Morellia xanthoptera* Pamplona in Muscinae. Interestingly, the nuclear protein encoding gene CAD showed the highest support for this clade, followed by the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase II (COII; PBS, Fig. 2). Both CAD and COII are considered useful in molecular phylogenetics for higher level relationships at – and above – the family level in holometabolous insects (Moulton & Wiegmann 2004; Caterino et al. 2000). Data from the COI gene, however, strongly contradicts this position for *Ophyra*. This conflict among genes may be due to marked differences in rate between the two mtCO genes (Simon et al. 1994). COII is generally considered to be a faster evolving gene that may be more suited for examination of species level relationships (Caterino et al. 2000; Simon et al. 1994). Clearly, further sampling of both species and genera is necessary to fully explore the resolving power of various genes for muscid phylogeny.

Finally, the partitioned Bremer support for the EF-1 α data partition is low or negative on our tree. This nuclear gene is considered informative at lower taxonomic levels due to its extreme conservation in coding positions and its rapid evolution in third position sites (Cho et al. 1995). This pattern of high variability in 3rd positions only is also true for muscid genera. Eighty-five percent of the informative sites from EF-1 α were in the third position (105 of 124). These results suggest that 3rd positions of EF-1 α may evolve too rapidly to reliably recover relationships for the older divergences within the Muscidae.

Conclusion

A single most parsimonious tree based on DNA sequences from mitochondrial and nuclear genes supports the taxonomic validity of *Ophyra albuquerquei* as a lineage within the subfamily Muscinae. These data contradict a hypothesis of a close relationship between *Ophyra* and *Hydrotaea*. While promising, the current molecular data are clearly limited in their resolving power for muscid phylogeny. Additional sequences from many additional taxa are required to fully specify a phylogenetic classification for the family.

Acknowledgements

We would like to thank Lisete M. Lorini and Adrian C. Pont for the species provided. Thanks to Márcio Pie, Silvio Shigueo Nihei, Gustavo Graciolli and Elaine G. Soares for valuable suggestions and discussion of the manuscript. Thanks also to Hilary Hill, Shaun Winterton, and Kevin Moulton, and especially Brian Cassel, of the NCSU Insect Molecular Systematics Lab, for technical advice and help in the sequencing lab. Thanks as well to the two anonymous reviewers who greatly improved the paper with their comments. This project was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Programa de Doutorado com Estágio no Exterior – PDEE/BEX0143/02-2), and grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processes number 140700/2001-3 (GSS) and 304.148/2002-4 (CJBC), and the US National Science Foundation (DEB-0098745) (BMW and J. Thorne). This is contribution number 1478 of the Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

References

- Albuquerque, D.O. (1958) Sobre *Ophyra* R.-D., 1830 na América do Sul, com descrição de uma espécie nova (Diptera-Muscidae). *Boletim do Museu Nacional. Nova série Zoologia*, 181, 1–13.
- Aldrich, J.M. (1928) New Diptera or two-winged flies from South America. *Proceedings of the United States National Museum*, 74(art.1), 1–25.
- Baker, R.H. & DeSalle, R. (1997) Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. *Systematic Biology*, 46, 654–673.
- Bremer, K. (1984) Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10, 295–304.
- Bremer, K. (1988) The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, 42, 795–803.
- Brown, J.M., Pellmyr, O., Thompson, J.N. & Harrison, R.G. (1994) Mitochondrial DNA phylogeny of the Proxidae (Lepidoptera: Incurvarioidea) indicates rapid ecological diversification of Yucca Moths. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 795–809.
- Carvalho, C.J.B. de (1989) Classificação de Muscidae (Diptera): uma proposta através da análise cladística. *Revista Brasileira de Zoologia*, 6, 627–648.
- Carvalho, C.J.B. de & Couri, M.S. (2002) Part I. Basal groups. In: Carvalho, C.J.B. de (Ed.), *Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region*, Editora Universidade Federal do Paraná, Curitiba, pp.17–132.
- Carvalho, C.J.B. de; Couri, M.S.; Pont, A.C.; Pamplona, D. & Lopes, S.M. (1993) Part II. Muscidae. In: Carvalho, C.J.B. de (Ed.), *A catalogue of the Fanniidae and Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region*, Sociedade Brasileira de Entomologia, São Paulo, pp. 1–201.
- Caterino, M.S., Cho, S. & Sperling, F.A.H. (2000) The Current State Of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology*, 45: 1–54.
- Cho, S., Mitchel, A., Regier, J.C., Mitter, C., Poole, R.W., Friedlander, T.P. & Zhao, S. (1995) A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor-1a recovers morphology-based tree for heliotine moths. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 650–656.

- Collins, K.P. & Wiegmann, B.M. (2002) Phylogenetic relationships and placement of the Empidoidea (Diptera: Brachycera) based on 28s rDNA and EF1- α sequences. *Insect Systematics and Evolution*, 33, 421–444.
- Couri, M.S. & Carvalho, C.J.B. de (1997) Revision of *Polietina* Schnabl & Dziedzicki (Diptera, Muscidae) and considerations on its new systematic position. *Revista Brasileira de Zoologia*, 14, 225–281.
- Dolphin, K., Belshaw, R., Ormer, C.D.L., & Quicke, D. (2000) Noise and incongruence: interpreting results of the incongruence length difference test. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17, 401–406.
- Emden, F.I. van (1943) Keys to the Muscidae of the Ethiopian Region: *Phaonia*-group. *Annals and Magazine of Natural History*, 62, 73–101.
- Farris, J.S. (1969) A successive approximations approach to character weighting. *Systematic Zoology*, 18, 374–385.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., & Bult, C. (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10, 315–320.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Hecker, K.H. & Roux, K.H. (1996) High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in “Touchdown” and “StepDown” PCR. *BioTechniques*, 20, 478–485.
- Hennig, W. (1965) *Vorarbeiten zu einem phylogenetischen System der Muscidae (Diptera: Cyclorhapha)*. Stuttgartar Beiträge zur Naturkunde, Stuttgart, 141, 1–100.
- Johnson, L.A. & Soltis, D.E. (1998) Assessing congruence: empirical examples from molecular data. In: Soltis, P.S., Soltis, D.E., & Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular systematics of plants. Vol. II*. Chapman and Hall, New York, pp. 297–343.
- Kawasaki, E.S. (1990) Amplification of RNA. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, pp. 21–27.
- Kluge, A.G. (1989) A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis for relationships among Epicrates (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology*, 38, 1–25.
- Kluge, A.G. & Wolf, A.J. (1993) Cladistics: what’s in a word? *Cladistics*, 9, 183–199.
- Macquart, J. (1835) *Histoire Naturelle des Insectes. Diptères*. Paris. 1–703.
- Malloch, J.R. (1923) Exotic Muscaridae (Diptera). *IX Annals and Magazine of Natural History*, (9) 11, 664–675.
- Meier, R. & Wiegmann, B.M. (2002) A phylogenetic analysis of Coelopidae (Diptera) based on morphological and DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 393–407.
- Moulton, J.K. & Wiegmann, B.M. (2004) Evolution and phylogenetic utility of CAD (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 363–378.
- Pamplona, D.M. & Couri, M.S. (1989) Revisão das espécies neotropicais de *Ophyra* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Muscidae, Azeliinae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84, Suppl. 4, 419–429.
- Pinto, C. & Fonseca, F. da (1930) Novo genero e nova especie de mosca hematophaga da sub-familia Stomoxydinae, hospedadora intermediaria da *Dermatobia hominis*. *Revista medico-cirurgica do Brasil*, 38, 241–247.
- Pont, A.C. (1972) Family Muscidae. In: *A catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 97, 111 pp.
- Pont, A.C. (1973) Studies on Australian Muscidae (Diptera). IV. A revision of the subfamilies Muscinae and Stomoxyinae. *Australian Journal of Zoology, supplementary series*. 21, 129–296.
- Pont, A.C. (1977) Family Muscidae. In: Delfinado, M.D. and Hardy, D.E. (Eds.), *A catalogue of the Diptera of the Oriental Region. Vol. III. Suborder Cyclorhapha (excluding Division Aschiza)*. The University Press of Hawaii, Honolulu, 834 pp.

- Pont, A.C. (1980) Family Muscidae. In: Crosskey, R.W. (Ed.), *Catalogue of Diptera of the Afrotropical Region*. British Museum (Natural History), London, 1437 pp.
- Pont, A.C. (1986) Family Muscidae. In: Sóos, A.S. and Papp, L. (Eds.), *Catalogue of the Palaearctic Diptera. Vol. II*. Hungarian Natural History Museum, Budapest, 311 pp.
- Pont, A.C. (1989) Family Muscidae. In: Evenhuis, N. (Ed.), *Catalog of the Diptera of Australasia and Oceania Regions*. Special Publications of the Bernice Pauahi Bishop Museum, 86, 1155 pp.
- Robineau-Desvoidy, A.J.B. (1830) Essai sur les Myodaires. *Mémoires présentés par divers Savants à l'Académie des Sciences de l'Institut de France*, 2: 813 pp.
- Séguy, E. (1923) Diptères Anthomyidae. In: *Faune de France*. Les Presses Universitaires de France, Paris 6, 393 pp.
- Séguy, E. (1937) Diptera, Family Muscidae. In: Wytzman, P., *Genera Insectorum*. Bruxelles, fasc. 205, 604 pp.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.
- Skidmore, P. (1985) The biology of the Muscidae of the world. *Series Entomologica*, 29, 1–550.
- Smith, S.W., Overbeek, R., Woese, C.R., Gilbert, W. & Gillevet, P.M., (1994) The genetic data environment and expandable GUI for multiple sequence analysis. *Computer Applications Biosciences*, 10, 671–675.
- Sorenson, M.D. (1999) *TreeRot*, version 2. Boston University, Boston, MA.
- Swofford, D.L., (2001) *PAUP**. *Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Vockeroth, J.R. (1996) Key to genera of Muscidae (Diptera) of Mexico, Central America, and the West Indies. *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, 18, 280–288.
- Wulp, F.M. van der (1896) Group Anthomyiinae. [Part] In: Godman, F.D. & Salvin, O. (Eds.), *Biologia Centrali-Americana. Zoologia-Insecta-Diptera*. London, 2 (part 131), pp. 313–320.

- Pont, A.C. (1980) Family Muscidae. In: Crosskey, R.W. (Ed.), *Catalogue of Diptera of the Afrotropical Region*. British Museum (Natural History), London, 1437 pp.
- Pont, A.C. (1986) Family Muscidae. In: Sóos, A.S. and Papp, L. (Eds.), *Catalogue of the Palearctic Diptera. Vol. 11*. Hungarian Natural History Museum, Budapest, 311 pp.
- Pont, A.C. (1989) Family Muscidae. In: Evenhuis, N. (Ed.), *Catalog of the Diptera of Australasia and Oceania Regions*. Special Publications of the Bernice Pauahi Bishop Museum, 86, 1155 pp.
- Robineau-Desvoidy, A.J.B. (1830) Essai sur les Myodaires. *Mémoires présentés par divers Savants à l'Académie des Sciences de l'Institut de France*, 2: 813 pp.
- Séguy, E. (1923) Diptères Anthomyidae. In: *Faune de France*. Les Presses Universitaires de France, Paris 6, 393 pp.
- Séguy, E. (1937) Diptera, Family Muscidae. In: Wytzman, P., *Genera Insectorum*. Bruxelles, fasc. 205, 604 pp.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.
- Skidmore, P. (1985) The biology of the Muscidae of the world. *Series Entomologica*, 29, 1–550.
- Smith, S.W., Overbeek, R., Woese, C.R., Gilbert, W. & Gillevet, P.M., (1994) The genetic data environment and expandable GUI for multiple sequence analysis. *Computer Applications Bio-science*, 10, 671–675.
- Sorenson, M.D. (1999) *TreeRot*, version 2. Boston University, Boston, MA.
- Swofford, D.L., (2001) *PAUP**. *Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Vockeroth, J.R. (1996) Key to genera of Muscidae (Diptera) of Mexico, Central America, and the West Indies. *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, 18, 280–288.
- Wulp, F.M. van der (1896) Group Anthomyinae. [Part] In: Godman, F.D. & Salvin, O. (Eds.), *Biologia Centrali-Americana. Zoologia-Insecta-Diptera*. London, 2 (part 131), pp. 313–320.