

GISELE ANTONIAZZI CARDOSO

**“EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO HÁBITO
ALIMENTAR NA FAMÍLIA CALLIPHORIDAE”**

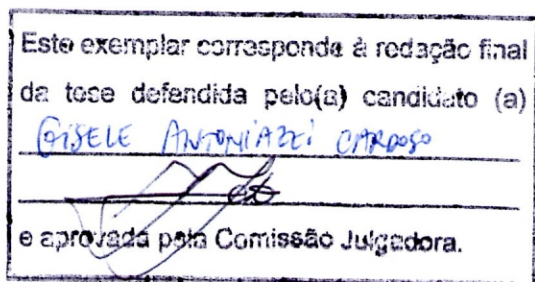
**CAMPINAS
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



GISELE ANTONIAZZI CARDOSO

**“EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO HÁBITO
ALIMENTAR NA FAMÍLIA CALLIPHORIDAE”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin
Co-Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Teixeira Torres

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C179e Cardoso, Gisele Antoniazzi, 1987-
Expressão de genes relacionados ao hábito alimentar
na família Calliphoridae / Gisele Antoniazzi Cardoso. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Ana Maria Lima de Azeredo Espin.
Coorientador: Tatiana Teixeira Torres.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Expressão gênica - Evolução. 2. Reação em
cadeia da polimerase em tempo real. 3. Expressão
gênica diferencial. 4. Parasitismo. I. Azeredo-Espin,
Ana Maria Lima de, 1955-. II. Torres, Tatiana Teixeira.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Expression of genes related to feeding habit in the Calliphoridae family

Palavras-chave em Inglês:

Gene expression - Evolution
Real-time polymerase chain reaction
Differential gene expression
Parasitism

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Ana Maria Lima de Azeredo Espin [Orientador]
Paulo Arruda
Maria Cristina Arias

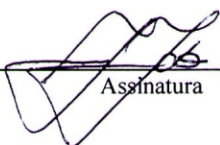
Data da defesa: 04-12-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 4 de Dezembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

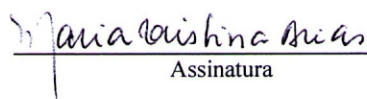
Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin
(Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Arruda


Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Arias


Assinatura

Prof. Dr Marcelo Menossi Teixeira

Assinatura

Profa. Dra. Flávia Fuchs de Jesus

Assinatura

DEDICATÓRIA

**"I walk beside you
Whatever you are
Whatever it takes
No matter how far
Through all that may come
And all that may go
I walk beside you
I walk beside you"**

(Dream Theater)

Aos meus pais Valdimir e Cecília e à minha irmã Andréia
pelo amor incondicional

DEDICATÓRIA

**“You're my religion, you're my reason to live.
You are the heaven in my hell
We've been together for a long long time
and I just can't live without you”**

(Ozzy Osbourne)

Ao Carlos Eduardo por todo
o amor e dedicação

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Ana Maria pela oportunidade de me inserir na carreira científica. Pela confiança depositada desde a iniciação científica, pela amizade, pelo carinho e dedicação. Sua participação foi imprescindível para meu crescimento durante esses poucos anos desde que entrei no laboratório.

Agradeço à Tatiana que me acompanha desde minha entrada no laboratório. Muito obrigada, pelo carinho, incentivo e paciência. Pelas diversas discussões que fizeram com que eu sempre aprendesse um pouquinho mais e que fizeram novas ideias aparecerem durante a realização de todo o projeto (e obrigada pelos últimos empurrãozinhos!).

Agradeço aos queridos amigos de fora do laboratório de genética animal. Ao Tutty por me ajudar a entender (quase) tudo de PCR em tempo real, sem essa mãozinha, tudo teria sido mais difícil. Ju, obrigada pelas risadas, almoços (fofocas) e, principalmente, por sua presença em todos os momentos durante esses anos. Bru, obrigada pelos momentos de descontração, pelos interlabs, e pela sua companhia na hora de ir embora!

Agradeço aos meus amigos (e grupo de laboratório da graduação) Adriana, Bena, William e Leandro que sempre me apoiaram e incentivaram.

Agradeço a todos do laboratório de genética animal, Marco, Mari, Pablo, Norma, Renato, Luana, Daniel, Gabriel e Alberto. Em especial, agradeço ao Marco pelas dicas, sugestões, apoio, incentivo e, principalmente, pelas calorosas discussões sobre evolução (música e quadrinhos) e não menos importante nossa colaboração. Lu, obrigada por toda ajuda, não sei o que seria de mim sem você!

Agradeço à Salete pela ajuda com a criação das mosquinhas e à Lê pelo apoio técnico. Também, agradeço à ALMA do laboratório, Rô, pelo apoio técnico, carinho e dedicação a todos do laboratório.

Agradeço à minha queridíssima família (incluindo o Abel), ao meu noivo Eduardo e seus pais pelo amor, carinho, dedicação, apoio e incentivo. Muito obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos. Em especial, à minha irmã por sempre estar por perto para me ouvir e dar um empurrãozinho extra sempre que necessário. Du, o que seria do meu mestrado sem você? Não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim durante esses anos.

Agradeço a todas as mosquinhas e larvinhas que involuntariamente participaram do projeto!

Por fim, agradeço à FAPESP e CNPq pela bolsa e financiamento imprescindíveis para a realização deste projeto.

Com muito carinho e satisfação agradeço a todos.

RESUMO

Os estudos da base molecular do comportamento são difíceis de serem realizados uma vez que um comportamento pode ser moldado por diversos fatores (incluindo fatores genéticos). Vários trabalhos ligaram genes a comportamentos específicos. Com bases nesses estudos, nós usamos espécies da família Calliphoridae como modelo para o estudo da evolução do hábito de parasitismo. Espécies muito próximas de califorídeos exibem comportamentos alimentares diferentes como o hábito necrófago ou parasita. Ainda não se sabe como o hábito de parasitismo surgiu em Calliphoridae, no entanto, existem diversas estratégias para tentarmos entender a evolução do hábito de parasitismo. Uma delas envolve a análise da expressão de genes candidatos relacionando as diferenças de expressão observadas com os diferentes hábitos alimentares. Assim, nós utilizamos a técnica de PCR em tempo real, que mede a expressão do gene de interesse em relação a um gene de referência. O uso do gene de referência tem como objetivo retirar uma parte da variação experimental. Portanto, esse gene deve não deve variar sua expressão nas diferentes espécies que foram estudadas. Então, primeiramente selecionamos e validamos genes de referência para obtermos uma quantificação mais precisa dos níveis de expressão dos genes candidatos. Após essa etapa, selecionamos genes candidatos e os separamos em quatro categorias: a) genes diretamente relacionados ao comportamento alimentar, b) genes relacionados ao metabolismo de substâncias tóxicas, c) genes relacionados a respostas imunológicas e; d) genes diretamente ligados ao hábito de parasitismo. A expressão de oito genes candidatos foi analisada em espécies dos gêneros *Chrysomya* e *Cochliomyia*. Além disso, foi possível inferir como a expressão desses genes evolui dentro da família Calliphoridae. Nós observamos uma grande conservação nos níveis de expressão gênica em larvas e em adultos evidenciamos diferenças de expressão correlacionadas com a divergência entre as espécies. O gene que se destacou em nossas análises por sua possível relação com o hábito alimentar deve ser estudado detalhadamente para dar continuidade ao projeto.

ABSTRACT

Studies involving the molecular basis of behavior are difficult to perform because behavior is shaped by several factors (including genetic factors). Several studies have linked genes to specific behaviors. Based in these studies, we used species of the family Calliphoridae to study the evolution of parasitism. Closely related species of this family exhibit different feeding behaviors (obligate parasites and saprophagous species). It is unclear how parasitism arose in Calliphoridae, however, it is possible to observe in their evolutionary history that this habit appears in three separate occasions. One approach to initiate this study is to examine the expression of candidate genes. For this purpose, we used real time PCR, but gene expression is measured relative to a reference gene. The use of a reference gene is to remove a part of the experimental variation. Therefore, this gene is expected not to vary its expression in the different species studied. Thus, we first selected and validated reference genes to obtain a more accurate quantification of gene expression levels. After this step, we selected candidate genes and separated them into four categories: a) genes directly related to feeding behavior, b) genes related to metabolism of toxic substances, c) genes related to immune responses and d) genes directly linked to parasitism. We analyzed the expression of eight candidate genes in species of *Chrysomya* and *Cochliomyia* genera. Moreover, it was possible to infer how the expression of these genes is evolving within family Calliphoridae. We observed a wide conservation in gene expression levels in larvae and in adults there was evidence of neutral evolution (genes differentially expressed among species). The gene *Mvl* may be involved in the different feeding habits and paved the way to continue the study of the evolution of parasitism.

Sumário

FICHA CATALOGRÁFICA	II
BANCA EXAMINADORA	III
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	X
PARTE I	
INTRODUÇÃO.....	11
BASES MOLECULARES DO COMPORTAMENTO.....	12
APRENDIZAGEM E MEMÓRIA	12
COMPORTAMENTO DE CORTEJO	13
COMPORTAMENTO E PREFERÊNCIA ALIMENTAR.....	14
A FAMÍLIA CALLIPHORIDAE.....	16
EVOLUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	20
HIPÓTESES	23
PARTE II	
SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS FUNCIONAIS NA FAMÍLIA CALLIPHORIDAE.....	25
RESUMO	26
ABSTRACT.....	27
INTRODUCTION	28
MATERIALS AND METHODS	29
RESULTS.....	34
DISCUSSION	42
ACKNOWLEDGEMENTS.....	48
DISCLOSURE.....	48
REFERENCES	48
PARTE III	
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO HÁBITO ALIMENTAR NA FAMÍLIA CALLIPHORIDAE	52
RESUMO	53
ABSTRACT.....	55
LITERATURE CITED	61
PARTE IV	
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	78
ANEXO 1	79
ANEXO 2	81
ANEXO 3	83

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em quatro partes. A primeira parte é composta por uma introdução geral que está dividida em três seções: a primeira descreve a base molecular de alguns fenótipos complexos como comportamentos e preferências alimentares; a segunda apresenta aspectos biológicos e a distribuição geográfica de espécies da família Calliphoridae e; por último uma revisão bibliográfica sobre a evolução da expressão gênica.

A segunda parte está apresentada em forma de artigo e descreve a seleção e validação de genes de referência para a normalização de dados de PCR em tempo real para estudos funcionais em califorídeos. Este trabalho foi aceito para publicação no periódico “Journal of Insect Science”.

A terceira parte constitui o manuscrito que será submetido como nota ao periódico “Genetics”. Neste trabalho, foi analisada a expressão de oito genes, previamente descritos em outras espécies, em califorídeos filogeneticamente próximos, buscando relacionar os perfis de expressão com os diferentes hábitos alimentares presentes na família Calliphoridae. Além disso, utilizando os dados de expressão e as distâncias genéticas das espécies estudadas foi possível inferir atuação de diferentes processos evolutivos na expressão dos genes analisados.

Finalmente, quarta parte inclui uma discussão e conclusões gerais do projeto e algumas perspectivas para a continuação do estudo da evolução do parasitismo na família Calliphoridae.

PARTE I

Introdução

Bases moleculares do comportamento

Um comportamento, de modo geral, é a resposta de um organismo a uma determinada situação após sua percepção e comparação com experiências anteriores. Isto é, o comportamento depende do modo como cada organismo processa as informações geradas no meio em que vive. Por isso, nós observamos comportamentos diferentes em resposta a um mesmo estímulo. Os diversos comportamentos que podemos observar na natureza são fenótipos complexos que podem ser moldados de acordo com as condições ambientais em que um organismo vive. Por causa dessa flexibilidade, a interação entre comportamento e evolução torna-se bastante complexa (Slater & Halliday 1994).

A genética do comportamento estuda as bases moleculares envolvidas na modulação tanto de comportamentos simples (por exemplo, o comportamento de agregação que ocorre tanto em fêmeas e machos adultos por estímulo de feromônios; Amrein 2004) de como comportamentos complexos (como por exemplo, o comportamento de cortejo; Ryner *et al.* 1996). Uma grande dificuldade inerente a este tipo de estudo é que diversos genes e fatores ambientais internos e externos a um organismo podem estar envolvidos na expressão de um determinado comportamento. (Sokolowski 2001). Apesar destas limitações, estudos realizados previamente descreveram com sucesso a base genética de comportamentos, principalmente em espécies modelo, como a mosca-do-vinagre *Drosophila melanogaster*. Alguns destes estudos demonstraram que locos únicos no genoma são capazes de determinar comportamentos complexos que serão exemplificados a seguir.

Aprendizagem e memória

A mosca-do-vinagre, *Drosophila*, assim como outros organismos, é capaz de aprender com experiências anteriores (Sokolowski 2001). Em outras palavras, as moscas são capazes de

memorizar experiências anteriores e usá-las como modelo para responder a um estímulo (aprendizado condicional). *Dunce (Dnc)* foi o primeiro gene identificado relacionado a um tipo de comportamento. Dudai e colaboradores (1976) utilizaram um ensaio em que moscas adultas foram estimuladas com um odor. A partir do momento em que as moscas percebiam esse estímulo e se aproximavam dele recebiam um choque. Após receberem um determinado número de choques, as moscas evitavam o local onde o odor estava presente. Ou seja, baseando-se em experiências anteriores, as moscas passavam a interpretar o estímulo olfatório de forma diferente. Mutantes para o gene *Dunce* não são capazes de aprender e sempre eram atraídos pelo odor e recebiam o choque.

Posteriormente, estudos mostraram que os mutantes para *Dnc* apresentam menores quantidade da proteína cíclica cAMP que modula a plasticidade de estruturas sinápticas e funcionais. Com isso, acredita-se que essa proteína esteja relacionada com a memória e aprendizado (Zhong & Wu 1991; Zhong *et al.* 1992). Diversos mutantes já foram utilizados para isolar outros genes relacionados a esse comportamento, possibilitando um melhor entendimento do funcionamento do sistema nervoso.

Comportamento de cortejo

O comportamento de cortejo é modulado por diferentes regiões do sistema nervoso central uma vez que apresenta diversas etapas, como orientação, toque, vibração das asas (canto) e cópula (Greenspan & Ferveur 2000). Além disso, a vibração das asas pelo macho, também conhecida por “canção do amor” é específica de cada espécie e, provavelmente muito importante para o reconhecimento da espécie (Ritchie *et al.* 1999).

Um dos genes mais estudados em *Drosophila*, o gene *Fruitless (Fru)* determina o comportamento de cortejo. Os machos mutantes não são capazes de distinguir machos e

fêmeas, sendo muito comum observar fileiras de machos cortejando uns aos outros (Ryner *et al.* 1996).

Comportamento e preferência alimentar

Adquirir energia é essencial para a manutenção da vida. Quando um organismo vai em busca de alimento são necessárias várias decisões: Qual tipo de alimento? Onde procurá-lo? Quanto tempo deve ser gasto na busca desse alimento? Em qual quantidade consumi-lo?

Diversos estudos tentaram responder algumas dessas perguntas utilizando mutantes de diversos genes. Dois genes já bem estudados, o *Neuropeptide F* (*Npf*) e seu receptor *Npr1*, atuam na modulação da resposta aversiva a determinados alimentos que possam conter substâncias nocivas. Experimentos foram realizados com larvas de *D. melanogaster* mutantes, nas quais o gene *Npr1* foi silenciado por um RNA fita dupla. Ao comparar larvas selvagens com mutantes, foi possível verificar que a adição de quinino na alimentação das larvas selvagens provoca uma resposta aversiva, enquanto as larvas mutantes continuavam a se alimentar. Além disso, foi observado que larvas em longos períodos de jejum se alimentavam do meio contendo quinino assim como as larvas mutantes (Wu *et al.* 2005a; Wu *et al.* 2005b). Isto é, esses comportamentos refletem não só no tipo de alimento que as larvas escolhem como refletem o estado nutricional em que os indivíduos se encontram. Isso mostra a importância dos genes *Npf* e *Npr1* na modulação do comportamento alimentar.

O estudo desses genes foi fundamental para entender a manifestação de diferentes hábitos em moscas. No entanto, estes genes foram estudados em uma única espécie. A adoção de uma abordagem filogenética permite a identificação de genes e/ou processos envolvidos na

expressão de hábitos distintos em diferentes espécies. Um exemplo recente desta abordagem também envolveu a mosca *D. melanogaster* e outras moscas desse mesmo grupo.

A mosca especialista, *Drosophila sechellia*, é endêmica do arquipélago Seychelles onde é comum encontrar a fruta da planta *Morinda citrifolia* (morinda) que é essencial para sua alimentação e reprodução. Outras espécies filogeneticamente próximas, *Drosophila simulans* e *D. melanogaster*, são cosmopolitas e têm hábitos generalistas. Vários estudos buscaram as diferenças entre essas espécies e os componentes de *M. citrifolia* que poderiam estar relacionados com a preferência da *D. sechellia* pela fruta. A morinda contém ácidos graxos (ácido octanóico e ácido hexanóico) que para a maioria das espécies de *Drosophila* são tóxicos. No entanto, *D. sechellia* não só tem forte preferência pela fruta como é resistente a tais ácidos graxos (R'Kha *et al.* 1991; Legal *et al.* 1992; Legal *et al.* 1994; Farine *et al.* 1996). Nestes estudos, destacaram-se genes que estão relacionados com a preferência alimentar em *D. sechellia* e *D. simulans* (Matsuo *et al.* 2007; Dworkin & Jones 2009). Vários dos genes estudados tinham expressão menor em *D. sechellia* em relação a *D. simulans*. Posteriormente, foi observado que uma parte desses genes era induzida pelos componentes da morinda e outra parte havia perdido sua função (pseudogenes). Isso indica que a redução da expressão desses genes, provavelmente, foi essencial para a evolução do hábito alimentar ou, em outras palavras, na evolução da especialização.

Assim como no grupo *Drosophila*, dentro da família Calliphoridae podemos observar espécies muito próximas que exibem hábitos alimentares distintos. Essa é uma das características que despertou o interesse para a realização deste trabalho.

A família Calliphoridae

Estima-se que na família Calliphoridae possam ser encontradas mais de 1.000 espécies (Shewell 1987). Dentro dessa família há uma grande diversidade de hábitos alimentares, sendo os mais comuns: a) detritos e material em decomposição (necrofagia); b) tecido vivo de hospedeiro invertebrado como minhocas, por exemplo, ou larvas da mesma espécie (canibalismo), c) tecido vivo de hospedeiro vertebrado, (parasitismo obrigatório) e d) sangue (Zumpt 1965). Dentro desse contexto, as espécies da família podem ser necrófagas se alimentando apenas de material em decomposição, parasitas obrigatórias que dependem de tecido vivo para seu desenvolvimento ou parasitas facultativos apresentando um comportamento preferencial necrófago, mas podendo se alimentar de ambos tecidos, vivo ou em decomposição.

Na história evolutiva de Calliphoridae (Figura 1) as espécies da subfamília Chrysomyinae, em sua maioria, apresentam o hábito necrófago, porém é observado que em duas ocasiões independentes aparece o parasitismo obrigatório. Stevens (2006) discute duas hipóteses para o surgimento do parasitismo obrigatório. Uma delas é a de que o ancestral comum dessas espécies exibia o hábito de parasitismo obrigatório que foi perdido pelas espécies não parasitas (Stevens & Wallman 2006) e a segunda, formulada por Zumpt (1965) e Erzinçlioglu (1989) postula que as espécies inicialmente apresentavam o hábito necrófago, podendo parasitar animais debilitados, dando origem a progressão do hábito de parasitismo. Acredita-se que a hipótese mais parcimoniosa envolveria um ancestral comum necrófago.

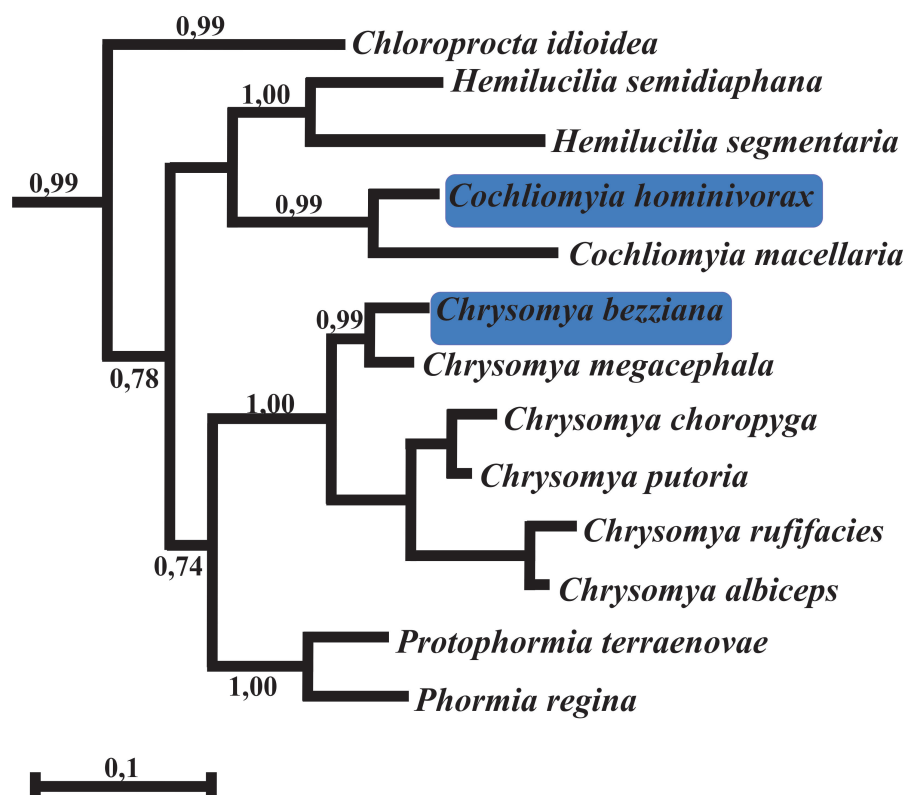


Figura 1. Filogenia da família Calliphoridae enfatizando as relações entre as espécies dos gêneros *Chrysomya* e *Cochliomyia*. Na linhagem apresentada, o hábito de parasitismo obrigatório aparece em duas ocasiões independentes (espécies destacadas em azul). Adaptado de (Marinho *et al.* 2012).

As espécies necrófagas e parasitas causam um quadro de infestação denominado miíase. Este quadro se refere a toda afecção causada por dípteros que em algum momento de seu ciclo de vida se alimentam de tecido vivo ou morto de um hospedeiro vertebrado vivo (Zumpt 1965). No caso da família Calliphoridae são as larvas que causam miíase.

As espécies do gênero *Chrysomya* (subfamília Chrysomyinae) inicialmente eram restritas ao Velho Mundo (África, Ásia, e partes da Europa), no entanto três delas, *C. albiceps*, *C. putoria* e *C. megacephala*, foram introduzidas na América do Sul (Guimarães & Papavero 1999). Das espécies introduzidas uma, *C. albiceps*, se destaca por poder apresentar parasitismo facultativo e, por suas larvas serem mais agressivas, podem se comportar como canibais quando em condições de escassez de alimento (Omar 1995). A espécie *C.*

bezziana, ainda restrita ao velho mundo, tem grande importância econômica e veterinária por ser parasita obrigatória, causando miíase primária (Guimarães & Papavero 1999).

O gênero *Cochliomyia* (subfamília Chrysomyinae) era distribuído em toda a América desde regiões no sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, porém, atualmente, a espécie *Co. hominivorax* restringe-se a América do Sul após a implementação da técnica de liberação de insetos estéreis (SIT, “Sterile Insect Technique”) como método de erradicação nos Estados Unidos, México e toda América Central (Guimarães & Papavero 1999). *Co. hominivorax*, conhecida popularmente como mosca da bicheira, é ectoparasita obrigatória e causadora de miíase primária (Guimarães & Papavero 1999). Outra espécie do gênero, *Co. macellaria* está distribuída em toda a América tropical e alimenta-se de material em decomposição e também pode causar miíase secundária (Guimarães & Papavero 1999).

Os califorídeos têm uma grande importância econômica, veterinária, sanitária e forense. Estima-se que, anualmente, no Brasil são gastos de 150 milhões (Grisi *et al.* 2002) a 1,77 bilhões de dólares (Vargas-Téran *et al.* 2005) em decorrência das infestações causadas por larvas de *Co. hominivorax*. Esse prejuízo refere-se à mortalidade e diminuição da produtividade dos animais, assim como gastos com a prevenção e controle dessas infestações. O animal infestado apresenta perda de apetite, diminuição dos índices de fertilidade e no ganho de peso e produção de leite. Desde os recém-nascidos até os animais de idades mais avançadas estão predispostos a sofrerem com as miíases. Bezerros apresentam grandes riscos de serem infestados enquanto as bordas do cordão umbilical não cicatrizarem e não tiverem a dentição completa. Os adultos geralmente são infestados por lesões em cercas de arame farpado, castração, descornamento, feridas causadas por carrapatos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) e larvas da mosca do

berne *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae), e as fêmeas após o parto (Gillman 1992; Sereno *et al.* 1996). No Brasil, são utilizados inseticidas à base de organofosforados para o controle tanto de miíases como de carrapatos devido ao seu baixo custo e boa atuação (Tellam & Bowles 1997). No entanto, já se sabe que linhagens de larvas resistentes ao inseticida estão sendo selecionadas, dificultando ainda mais o tratamento dos animais infestados (de Carvalho *et al.* 2006; Carvalho 2007). Deve-se levar em consideração também que os resíduos dos inseticidas organofosforados podem contaminar a carne, o leite e o meio ambiente sendo prejudicial à saúde animal (Carvalho 2007). Uma alternativa ao uso de inseticidas é a utilização da técnica de liberação de insetos estéreis. No entanto, existem algumas controvérsias com relação ao potencial desta técnica na América do Sul e Caribe (Lyra *et al.* 2009; Torres & Azeredo-Espin 2009).

Além disso, as espécies necrófagas são potenciais vetores de patógenos para a espécie humana uma vez que entram em contato com matéria orgânica em decomposição e posteriormente com alimentos prestes a serem consumidos possuindo interesse para a saúde pública (Lessinger *et al.* 2000).

As larvas dessas espécies também são utilizadas em análises forenses como a estimativa do intervalo *post-mortem* (tempo entre a morte e a descoberta do corpo; Catts & Goff 1992). Logo após a exposição de um corpo a um ambiente favorável, diversas espécies de insetos podem aparecer durante a progressão da decomposição. Normalmente, algumas horas após a morte, fêmeas de califorídeos são as primeiras a ovipor no cadáver, sendo possível estimar o intervalo *post-mortem* pelo tempo de desenvolvimento das larvas presentes encontradas no local (Catts & Goff 1992).

Neste cenário, é possível entender um pouco mais sobre a biologia da família Calliphoridae, mostrando as características que a tornam ideal como modelo para o estudo da evolução do hábito de parasitismo.

Evolução da expressão gênica

Os diferentes padrões de expressão gênica são responsáveis por uma grande parte das diferenças fenotípicas entre as espécies (King & Wilson 1975; Enard *et al.* 2002). Essas diferenças podem ser resultantes do aparecimento de mutações em regiões codificadoras, regulatórias ou ainda de mudanças na estrutura da cromatina (Enard *et al.* 2002; Wray *et al.* 2003). Houve um crescente número de trabalhos realizados para tentar entender a evolução da expressão gênica, alguns deles mostrando como diferentes fenótipos de indivíduos muito próximos estão relacionados com as diferenças de expressão gênica.

Mutações que surgem durante a história evolutiva de uma espécie e atuam diretamente no valor adaptativo estão sujeitas à pressão de seleção. Quando uma mutação reduz o valor adaptativo, o fenótipo gerado por essa variação é removido pela ação da seleção purificadora, assim como o genótipo subjacente. No entanto, quando uma mutação é benéfica, ou seja, aumenta o valor adaptativo, o genótipo aumenta de frequência pela ação da seleção positiva.

Vários trabalhos já evidenciaram a ação da seleção na evolução da expressão gênica em diversos organismos (King & Wilson 1975; Rifkin *et al.* 2003; Lemos *et al.* 2005; Whitehead & Crawford 2006; Ometto *et al.* 2011). Um dos exemplos mais notáveis são os estudos realizados com os tentilhões de Darwin. Os tentilhões formam um grupo de espécies que apresentam uma grande diversidade no tamanho e forma de seus bicos. Essas

diferenças foram correlacionadas com a dieta de cada espécie. Por exemplo, os tentilhões que se alimentam de sementes têm um bico alto e largo, enquanto os que se alimentam de néctar apresentam um bico mais longo e pontiagudo (Bowman 1961). Em estudos funcionais, Abzhanov e colaboradores (2004; 2006) mostraram que a expressão de dois genes, *Calmodulin (CaM)* e *Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)*, está relacionada com a altura e o comprimento do bico dos tentilhões, respectivamente. O modo como esses genes são regulados proporciona a diversidade morfológica sobre qual a seleção natural atuará (Abzhanov *et al.* 2004). Isto é, a expressão diferencial reflete diretamente nos valores adaptativos das diferentes espécies de tentilhões.

O trabalho com os tentilhões mostrou, através da abordagem de genes candidatos, o envolvimento de dois genes no formato dos bicos. Atualmente, dados de expressão global têm sido utilizados para demonstrar a ação da seleção; o cálculo das variações intraespecíficas (polimorfismo) e interespecíficas (divergência) permite inferir os tipos de seleção operando nas regiões regulatórias.

A seleção positiva pode ser identificada quando a variação da expressão gênica intraespecífica é baixa e a variação interespecífica é grande. Por outro lado, os genes sob seleção purificadora apresentam uma baixa variação tanto intraespecífica como interespecífica. E por último, a seleção balanceadora é caracterizada por uma grande variação intraespecífica e baixa variação interespecífica (Nuzhdin *et al.* 2004; Hodgins-Davis & Townsend 2009).

Uma fração muito pequena da expressão gênica evolui adaptativamente, mas é possível identificar esses genes que são alvo de grande interesse para entender diferenças nos

fenótipos morfológicos, metabólicos e comportamentais entre espécies e, particularmente, para estudar processos envolvidos na especiação.

Vários autores mostraram uma forte ação da seleção purificadora na expressão global entre espécies ou indivíduos muito próximos e a presença de variações não adaptativas, isto é, o acúmulo de variações neutras (Khaitovich *et al.* 2005; Whitehead & Crawford 2006; Brawand *et al.* 2011).

A teoria neutra proposta por Kimura (1983) pressupõe que a maior parte da evolução molecular ocorre pela fixação de mutações neutras (ou aproximadamente neutras), principalmente por deriva genética. Também considera que mutações adaptativas são extremamente raras, sendo a maior parte das mutações não neutras deletérias e, portanto, removidas pela ação da seleção purificadora. Além disso, essas variações se acumulam proporcionalmente ao tempo. A teoria neutra geralmente é utilizada como hipótese nula para a identificação de variações adaptativas.

Até o momento, grande parte dos estudos evolutivos deu grande ênfase somente para as regiões codificadoras no DNA, mas agora, com o crescente número de trabalhos envolvendo dados de expressão gênica, será possível relacionar as variações observadas com diferentes fenótipos e mostrar os mecanismos evolutivos envolvidos.

Alguns autores sugerem que a expressão gênica, em escala global, evolui em grande parte neutramente. Isto é, a divergência da expressão gênica está linearmente relacionada com o tempo de divergência do organismo. Já foram realizados estudos em primatas, comparando os perfis de expressão de órgãos diferentes de humanos e chimpanzés (Khaitovich *et al.* 2005), entre populações de peixes e durante o desenvolvimento de *D. melanogaster*,

Drosophila simulans e *Drosophila yakuba* (Rifkin *et al.* 2003). Nesse último estudo, a variação da expressão de aproximadamente 13 mil genes regulados durante o desenvolvimento foi analisada com dados de microarranjo. Dos genes estudados, 6.742 apresentam uma diferença de expressão durante o desenvolvimento. Destes, 4.549 genes estão sob forte ação da seleção purificadora, enquanto apenas 464 genes evoluem sob um modelo neutro. Além disso, foi observado que a evolução da expressão está relacionada à função gênica. Novamente, foi evidenciado que a expressão gênica evolui predominantemente sob a ação da seleção purificadora. Porém isso não significa que outras forças evolutivas não possam atuar em conjunto.

Hipóteses

Os diferentes hábitos (fenótipos) presentes na família Calliphoridae (necrófago ou biontófago) podem estar ligados a diferenças em regiões codificadoras e/ou regiões regulatórias. Enquanto variações em regiões codificadoras podem alterar a função de um produto gênico, as diferenças regulatórias por sua vez, resultam em variações nos níveis de expressão. Como primeiro passo, nós buscamos por variações na expressão de genes candidatos em fêmeas, machos e larvas de quatro espécies de califorídeos.

Com os dados de expressão nós testamos duas hipóteses:

1) Seleção purificadora

Os genes com expressão conservada entre as espécies estariam evoluindo sob um modelo de seleção purificadora no qual variações nos níveis de expressão são deletérias e, portanto, seriam eliminadas.

2) Seleção positiva e Evolução neutra

Os genes diferencialmente expressos entre as espécies estudadas seguiriam um modelo de evolução neutra ou de seleção positiva. Neste caso:

a) a diferença observada poderia ser proporcional ao tempo de divergência entre as espécies estudadas, indicando evolução neutra dos níveis de expressão;

b) a diferença observada poderia ter uma correlação com a preferência alimentar, ou seja, a espécie parasita (*Co. hominivorax*) apresenta perfis de expressão diferentes de todas as espécies necrófagas. Assim a expressão gênica estaria relacionada ao hábito alimentar e, possivelmente, essa variação seria adaptativa.

PARTE II

Seleção e validação de genes de referência para estudos funcionais na família Calliphoridae

Resumo

Artigo: Cardoso, G.A., Mاتيولli, C.C., Azeredo-Espin, A.M.L., Torres, T.T. **Selection and validation of reference genes for functional studies in the Calliphoridae family.**

Artigo aceito para publicação no periódico Journal Of Insect Science.

A família Calliphoridae apresenta uma série de características interessantes para o estudo do comportamento alimentar. Na história evolutiva dessa família, o aparecimento do parasitismo obrigatório em pelo menos três ocasiões independentes ainda não é totalmente compreendido. Uma estratégia para o estudo do parasitismo e do comportamento alimentar envolve a análise da expressão de genes candidatos através da técnica de PCR em tempo real, relacionando os diferentes perfis de expressão com os diferentes hábitos presentes em Calliphoridae. No entanto, antes que esse estudo pudesse ser iniciado, foi necessário um investimento no estabelecimento dos pré-requisitos necessários para a realização dos experimentos envolvendo a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR ou PCR em tempo real). A técnica de PCR em tempo real é uma das mais utilizadas para estudos de expressão gênica, sendo possível quantificar os níveis de expressão em relação a um controle endógeno. Um dos grandes desafios dessa técnica é a seleção de genes de referência para a normalização dos dados, uma vez que esses genes devem apresentar o mesmo perfil de expressão nas diferentes espécies deste estudo. Vários genes frequentemente utilizados podem ter variações em sua expressão dependendo das condições experimentais de cada estudo. Para contornar esse problema, é necessário validar um conjunto de genes para cada condição. Nós selecionamos dez genes de referência e testamos seis : *Actin*, *α -tub*, *Gapdh*, *GstD1*, *Rp49* e *Rps17* em três espécies de califorídeos: *C. albiceps*, *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* em dois estágios diferentes: fêmeas adultas e larvas. Como resultado, nós identificamos que os genes *Actin*, *Gapdh* e *Rp49* foram os mais estáveis em nossos dados e poderão ser usados em estudos funcionais na família Calliphoridae.

Selection and validation of reference genes for functional studies in the Calliphoridae family

Gisele Antoniazzi Cardoso^{1,2a}, Cleverson Carlos Mاتيولli^{1,2b}, Ana Maria Lima de Azeredo-Espin^{1,2c}, Tatiana Teixeira Torres^{1,3d*}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

²Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

³Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

Correspondence: ^agisele.antoni@cbmeg.unicamp.br, ^bmatioli@unicamp.br, ^cazeredo@unicamp.br, ^dttorres@ib.usp.br, * Corresponding author

Keywords: BestKeeper, *Cochliomyia*, *Chrysomya*, gene expression, geNorm, NormFinder

Abstract

The genera *Cochliomyia* and *Chrysomya* contain both obligate and saprophagous flies, which allow the comparison of different feeding habits between closely related species. Among the different strategies to tackle this question is the comparison of the expression levels of candidate genes involved in feeding behavior by using the qPCR technique. To ensure an accurate measure of the levels of gene expression, it is necessary to normalize the amount of the target gene with the amount of a reference gene with a stable expression across the compared species. Since there is no universal gene that can be used as a reference in functional studies, candidate genes for qPCR data normalization were selected and validated in three Calliphoridae species, *Cochliomyia hominivorax*, *Cochliomyia macellaria* and *Chrysomya albiceps*. The expression stability of six genes (*Actin*, *Gapdh*, *Rp49*, *Rps17*, *α -tubulin* and *GstD1*) was evaluated among species within the same life stage

and between life stages within each species. The expression levels of *Actin*, *Gapdh* and *Rp49* were the most stable among the selected genes. These genes can be used as reliable reference genes for functional studies in Calliphoridae using similar experimental settings.

Introduction

The Calliphoridae family contains flies of economic, veterinary and sanitary importance. Flies of this family feed in different sources such as living tissues of a vertebrate host (obligate parasites) and decaying organic matter (saprophagous behavior). These infestations, known as myiasis, are caused by Calliphoridae species in the larval stage (Zumpt, 1965). The evolutionary origins of the parasitic behavior in the Calliphoridae family are unknown. However, given the evolutionary history of this family, it has probably appeared in at least three independent events (Stevens & Wallman, 2006). It has been proposed that this division between feeding behaviors reflect the progressive evolution of parasitism in Calliphoridae (Stevens, 2003).

An interesting approach to tackle this biological question is the comparison of the expression of genes related to feeding behavior in closely related species, correlating their expression levels with the different feeding behaviors. Within Calliphoridae, the genera *Cochliomyia* and *Chrysomya* contain both obligate and saprophagous flies, which allows the comparison of the different feeding habits between closely related species.

Due to its high sensitivity for the detection of PCR products with a fluorescence reporter, the quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) has become the gold standard method for measuring mRNA levels (Wong & Medrano, 2005, VanGuilder et al., 2008),

and, therefore, an appropriate technique to compare expression levels between the different Calliphoridae species.

To ensure an accurate measure of the level of gene expression, it is compulsory to normalize the amount of the target gene with the amount of a reference gene. The normalization step is important to reduce the experimental variability caused by several factors, such as the initial amount of total RNA, the integrity of the RNA and the efficiency of the reverse transcriptase (Wong & Medrano, 2005).

Since there is no universal gene that can be used as reference in functional studies and as a part of an effort to understand the evolution of the parasitic behavior in Calliphoridae, 10 candidate genes were selected for qPCR data normalization. The expression stability was evaluated for six genes in three different species of the Calliphoridae family, *Cochliomyia hominivorax* (parasite), *Cochliomyia macellaria* (saprophagous) and *Chysomya albiceps* (saprophagous). Here, we provide genes with a stable expression level among different Calliphoridae species and between two different life-stages within each species. To our knowledge, this is the first cross-species validation study of reference genes for qPCR experiments in an evolutionary framework. We also provide a set of candidate genes (and primers to amplify them) that can be tested in different experimental settings. These are important resources for functional studies in the Calliphoridae family.

Materials and Methods

Fly collection and maintenance

Co. macellaria and *C. albiceps* were collected respectively in Campinas and Sorocaba, both in São Paulo state, Brazil. Adult flies were captured using a hand net and decaying meat or

fish as bait. *Co. hominivorax* larvae were collected directly from wounds of infested animals in cattle breeding farms in Caiapônia, Goiás, Brazil. Larvae of the three species were reared at $30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. *Co. hominivorax* larvae were maintained in a medium consisting of fresh ground beef supplemented with blood and water (2:1). *Co. macellaria* and *C. albiceps* larvae were fed on rats donated by the São Leopoldo Mandic College in Campinas, São Paulo, Brazil. These rats were euthanized with a lethal dose of anesthetic (1 mL of 50% chloral hydrate) before they were donated to us. Mature larvae of the three species were allowed to pupate in sawdust. Adults were maintained in cages (34 x 50 x 26) at 25°C and fed with a diet composed of dried milk, sugar and yeast ferment.

Reference gene selection and Primer design

Candidate reference genes were selected from previous studies in insects. These candidates were selected from functional studies using qPCR, where they were used as reference genes or from studies validating the stability of mRNA levels across different samples, where they showed a stable mRNA level. Actin was used as an endogenous control in a study to compare mRNA levels of genes involved in host specialization in *Drosophila melanogaster*, *Drosophila sechellia* and *Drosophila simulans* (Dworkin & Jones, 2009). The genes α -tub, Gapdh, GstD1, Rp49, RpL13A and RpS18 were selected from a validation study in heads of the honeybee, *Apis mellifera*, with a bacterial challenge (Scharlaken et al., 2008). Finally, the stability of α -tub, Gapdh, Rp49 and Efl α 100E in qPCR experiments was evaluated in brains of nymphs and adults of the locust, *Schistocerca gregaria* (Van Hiel et al., 2009). Two additional housekeeping genes were selected, RpS17 and SdhA. The sequences of the candidate genes were recovered from the Flybase and the GeneBank databases.

The sequences from the transcriptome of *Co. hominivorax* (Carvalho et al., 2010) were aligned against the sequences of *D. melanogaster* using the program tblastx (Altschul et al., 1990) to search for possible orthologs of the genes *Actin*, α -tub, *Ef1 α 100E*, *Gapdh*, *GstD1*, *RpL13A*, *Rp49*, *RpS17*, *RpS18* and *SdhA*.

The mapped reads were used to perform a global alignment using the ClustalW program (Chenna et al., 2003) against the sequences of the 12 *Drosophila* species with whole genome sequences (Clark et al., 2007). The alignments were used to identify conserved regions, where primer pairs for each candidate gene were designed using Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

Amplification of the selected genes

A PCR was performed using genomic DNA of five Calliphoridae species, *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*, to test the primers designed for the selected candidate genes.

PCR amplifications were performed in a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a 20 μ L final volume. All reactions contained $MgCl_2$ in a final concentration of 2.0 mM, 0.6 mM of primers, dNTPs in a final concentration of 200 μ M and 1 unit of Taq DNA polymerase (Fermentas) with 5-30 ng of DNA. After an initial denaturing step of 3 min at 94 °C, 35 cycles were performed, each consisting of 50s at 94 °C, 30s at 60 °C and 30s at 72 °C. A final extension at 72 °C for 5 min was performed.

RNA isolation and cDNA synthesis

The main motivation for this study is the investigation of the feeding habit in Calliphoridae. The larval stages were initially chosen as the different feeding habits are exhibited during

this stage. However, adult females are responsible for choosing the oviposition sites and, consequently, can play a major role in the evolution of feeding behavior (once the eggs hatch the larvae have to feed on any resource the female has chosen). Hence, larvae and adult female samples were chosen for the evaluation of the reference genes.

Total RNA was extracted of adult females and third instar larvae of the three species studied from two different generations. Three separate individuals of each generation were used, resulting in a total of six biological replicates. The Trizol reagent (Invitrogen) was used according to the manufacturer's protocol to extract total RNA. The RNA integrity was confirmed through agarose gel electrophoresis.

All samples were treated with Turbo DNase (Ambion) to avoid DNA contamination. The Turbo DNase inactivation was performed by heating the samples at 75°C for 10 min. To avoid RNA degradation when heated, EDTA was added to a final concentration of 2.5 mM. The RNA was quantified using the Qubit fluorometer (Invitrogen) with the Qubit RNA assay kit (Invitrogen) according to manufacturer's protocol.

PCRs were performed in a 20 µL final volume using 1 µL of each treated sample. *Rp49* primer pairs were used in a final concentration of 0.4 mM and an annealing temperature of 60 °C in the same conditions previously described to check if any of the samples were still contaminated with DNA after the Turbo DNase treatment.

The cDNA synthesis were performed using 0.4 µg of total RNA with the First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) according to the manufacturer's protocol. After the cDNA synthesis all samples were diluted 10 times for the qPCR assays.

mRNA levels quantification

qPCRs were performed in a 12.5 µL reaction volume following the manufacturer's instructions for SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). In each reaction, 1.5 µL of the cDNA sample was used and the primers were in a final concentration of 0.4 µM. The qPCRs were run in technical replicates to assess the intra-assay variation on an ABI 7500 PCR Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the following cycling conditions: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C and 40 cycles consisting of 15 min at 95 °C and 60s at 60 °C. To check for possible non-specific amplification and primer-dimer formation, after the 40 cycles, samples were submitted to a dissociation step consisting in the increase of temperature from 60 °C to 95 °C (increase of 1 °C per minute for 35 min) to obtain the dissociation curve. PCR efficiencies were calculated using the equation $E = 10^{1/\text{slope}}$. To measure the expression stability of the selected genes the ΔCt method (Vandesompele et al., 2002) was used to calculate the calibrated data. A control sample (a *Co. hominivorax* larva sample) with *Rp49* primers was used in each qPCR run to account for inter-run variations. The inter-run variation in the Ct of the control sample was used to correct all raw Cts values. For each gene, 3-fold serial dilutions (six dilutions) of cDNA samples were used to construct a standard curve from Ct measures against the log of template quantity.

Gene stability analysis

The softwares geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004) and BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) were used to establish suitable reference genes for qPCR data normalization. These three programs have different statistical approaches that

can be used to measure how stable a gene expression is between distinct conditions or among different species and developmental stages.

Results

Selection and amplification of the candidate genes

Ten candidate genes (Table 1) were selected from previous studies in insects: honeybee (*Apis mellifera*, (Scharlaken et al., 2008), fruit fly *Drosophila melanogaster*, (Dworkin & Jones, 2009) and locust (*Schistocerca gregaria*, (Van Hiel et al., 2009). Using the sequence information from the *Co. hominivorax* transcriptome (Carvalho et al., 2010) it was possible to search for orthologs of these candidate genes and design specific primer pairs for *Co. hominivorax* (Table 1).

The primers were designed using the sequence information from *Co. hominivorax*, consequently, all primers pairs were specific to this species. To show the utility of the designed primers for a wider range of species, the selected genes were amplified from genomic DNA of five Calliphoridae species (*C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *Co. hominivorax*, and *Co. macellaria*). Samples of *C. megacephala* and *C. putoria* were not used in qPCR as colonies of these species were not maintained and it was not possible to obtain RNA.

The genes *Actin*, *Efl α 100E*, *Gapdh*, *GstD1*, *RpL13A*, *Rp49*, *RpS17* and *RpS18* were amplified from genomic DNA in all five species. *SdhA* was amplified in only two species, *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* while *α -tub* was only amplified in *Co. hominivorax*.

Table 1- Candidate reference genes.

Symbol	Gene name	Flybase ID	Function	Accession no ¹	Primer sequence (5' --> 3') ²	Amplicon size (bp)
<i>Actin</i>	Actin 5C	FBgn0000042	Cytokinesis	HQ910450	F: GCCATGTATGTTGCCATCC R: CGACCAGCCAAATCCAAAC	158
<i>α-tub</i>	α-Tubulin at 84B	FBgn0003884	Protein Polymerization	HQ910451	F: GATTTTGACCACTCACAC R: AACGATTCAAGTTGGTG	128
<i>Eflalpha100E</i>	Elongation factor α 100E	FBgn0000557	Translation	HQ910452	F: ACAATCAGCTTGAGAGG R: ATTGATATTGCTTTGTGG	117
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	FBgn0001092	Glycolysis	HQ910453	F: GTCAGTGACACCCACTCCTC R: TTGATCAAGTCGATGACACG	128
<i>GstD1</i>	Glutathione S transferase D1	FBgn0001149	Glutathione transferase activity	HQ910454	F: AAAATCAACCTGCCGATCC R: GCCAATAAAGCTAAATCGGCTA	150
<i>RpL13A</i>	Ribosomal protein L13A	FBgn0037351	Translation	HQ910455	F: CGAAGAATTGAACCTCTC R: AAGTGGGAATGGACCAC	105
<i>Rp49</i>	Ribosomal protein L32	FBgn0002626	Translation	HQ910458	F: GCACCAAGCACTTCATCC R: AGTGGGAAGCATGTGACG	169
<i>RpS17</i>	Ribosomal protein S17	FBgn0005533	Translation	HQ910456	F: TCGTGTAAGAACCAAGAC R: GCAGATACGCTTGTTG	100
<i>RpS18</i>	Ribosomal protein S18	FBgn0010411	Translation	HQ910457	F: TGA CTTCCTCTA ACTTGG R: ACCAGTAGTCTTGGTGTG	129
<i>SdhA</i>	Succinate dehydrogenase A	FBgn0261439	Electron transpot chain	HQ910459	F: AAGATGATTGGAAATGG R: AAGGGCATAACCATAATTC	133

¹ Genbank accession number of *Co hominivorax* sequence used for primer design² Primer sequences (F: forward; R: reverse)

Quantitative PCR

Gene expression analyses were performed in three species, *C. albiceps*, *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*.

The PCR efficiency ranged from 88 to 97% (Table 2). The gene with the lowest efficiency was *GstD1* (88%) in *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*. The melting/dissociation curve showed that all qPCRs generated a single specific product (data not shown). The coefficient of determination, R^2 , from standard curves generated for each gene ranged from 0.988 to 0.997, confirming that there were no inhibition contaminants present in the cDNA samples.

The expression of *Ef1 α 100E*, *RpL13A*, *RpS18* and, *SdhA* was not detected in any of the three species, probably due to low mRNA levels. The amplification product for the gene *α -tub* was only detected in *Co. hominivorax* and *GstD1* had low PCR efficiency in *C. albiceps*. Therefore, the suitable genes for comparing gene expression among the three different species were *Actin*, *Gapdh*, *Rp49* and *RpS17*.

The Ct values (calibrated Cts, see Methods) in all samples ranged from 8.94 (*Actin* in *Co. macellaria* larvae) to 28.09 (*GstD1* in *Co. macellaria* larvae). The gene with the lowest variation in all dataset was *Rp49* and the one with the highest variation was *GstD1* (Figure 1a). Comparing the Cts within each life stage, *Rp49* had the lowest while *RpS17* the highest variation (Figure 1b). Among larval samples, the gene with the lowest variation was *Rp49* and the gene with the highest variation was *RpS17* (Figure 1b).

Cts between life-stages within species were also compared. In *C. albiceps* and *Co. macellaria*, the gene with the lowest variation was *Rp49* and the highest was *RpS17* (Figure 1c). In *Co. hominivorax*, *Rp49* had the lowest variation and *GtsD1* the highest (Figure 1c).

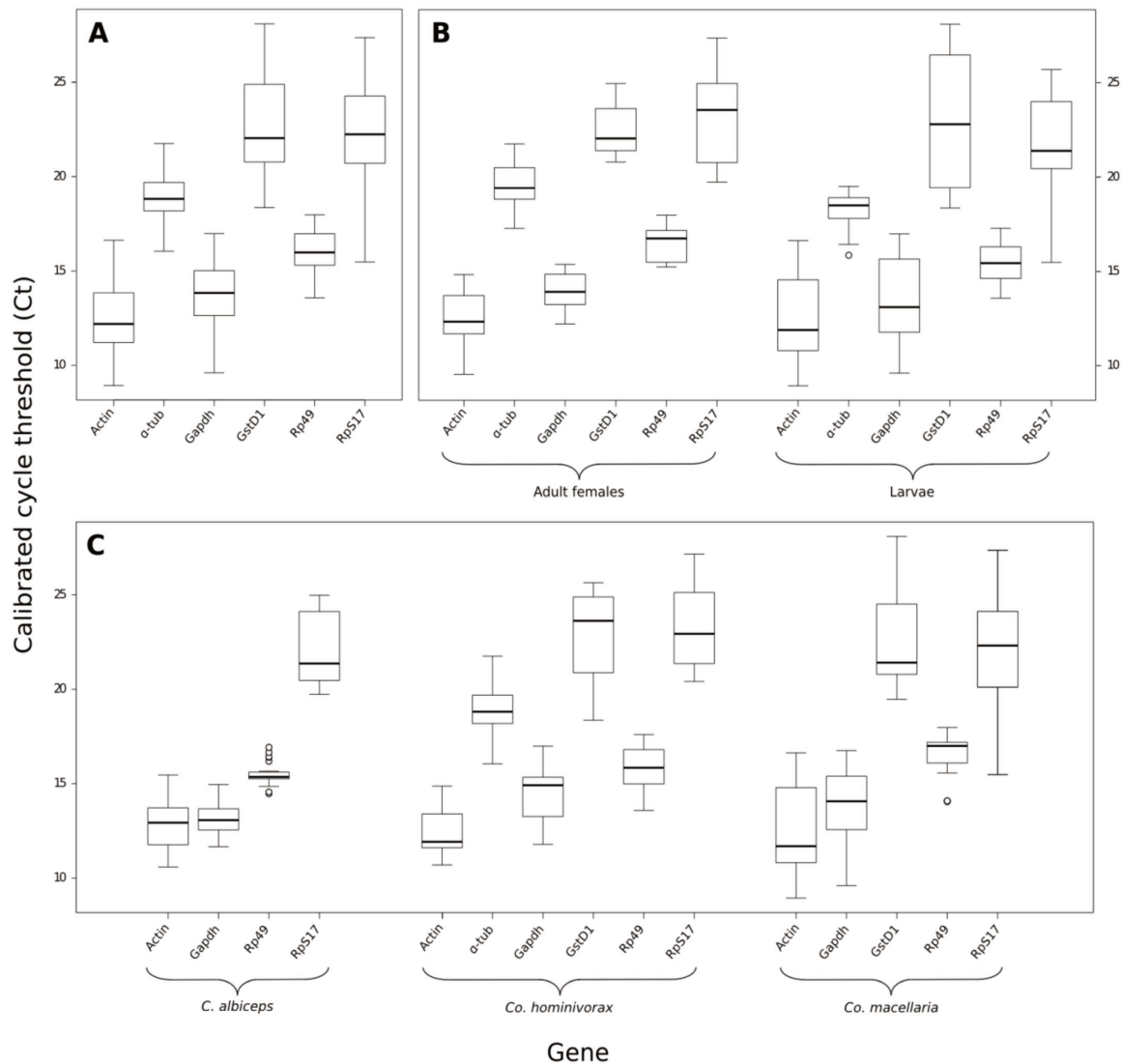
Table 2 - Reaction efficiency and expression of the reference genes

Gene	Species	Slope	Efficiency (%)	Stage	Average Ct	Average calibrated Ct ¹
<i>Actin</i>	<i>C. albiceps</i>	-3,46	95%	Larva	14.99	13.46
				Adult female	15.81	12.24
	<i>Co. hominivorax</i>	-3,39	97%	Larva	14.85	12.16
				Adult female	14.46	12.50
	<i>Co. macellaria</i>	-3,45	95%	Larva	15.58	12.23
				Adult female	14.06	13.29
<i>α-tub</i>	<i>Co. hominivorax</i>	-3,57	91%	Larva	20.03	19.58
				Adult female	20.96	18.21
<i>Gapdh</i>	<i>C. albiceps</i>	-3,57	91%	Larva	15.70	13.08
				Adult female	15.63	13.11
	<i>Co. hominivorax</i>	-3,61	89%	Larva	16.82	14.76
				Adult female	17.31	14.23
	<i>Co. macellaria</i>	-3,6	90%	Larva	16.14	14.19
				Adult female	16.69	13.59
<i>GstD1</i>	<i>Co. hominivorax</i>	-3,66	88%	Larva	23.87	23.59
				Adult female	25.81	21.96
	<i>Co. macellaria</i>	-3,65	88%	Larva	26.65	21.37
				Adult female	23.66	23.98
<i>Rps17</i>	<i>C. albiceps</i>	-3,52	92%	Larva	25.23	21.88
				Adult female	23.36	22.75
	<i>Co. hominivorax</i>	-3,6	90%	Larva	24.37	24.25
				Adult female	26.73	22.22
	<i>Co. macellaria</i>	-3,52	92%	Larva	22.28	23.60
				Adult female	25.47	20.58
<i>Rp49</i>	<i>C. albiceps</i>	-3,55	91%	Larva	18.65	15.40
				Adult female	17.95	15.59
	<i>Co. hominivorax</i>	-3,55	91%	Larva	17.82	16.75
				Adult female	17.76	14.76
	<i>Co. macellaria</i>	-3,55	91%	Larva	18.52	17.26
				Adult female	20.32	15.98

¹ We used a control sample (*Co. hominivorax* larva with *Rp49* primers) in each qPCR run to correct raw Cts for inter-run variation

The Ct difference between gene-specific replicates was used to calculate the intra-run variation. The mean intra-run variation was 0.21. The variation was higher than 1 (higher than 2-fold) in a single observation – a *C. albiceps* sample amplified using primers for the *Rp49* gene, for which the variation was 1.41.

Figure 1- Distribution of the expression levels of the candidate reference genes in different datasets. The distribution of Cts (after inter-run calibration) for each gene is represented using box plots. The bold line indicates the median. The lower hinge gives the 25% and the upper hinge the 75%. Whiskers (dashed lines) extend to the maximum and minimum sizes. The outliers are marked with circles. (A) Ct distribution in the whole dataset, (B) Ct distribution among species within each life stage and (C) Ct distribution between life stages within species.



Comparison among species within the same life stage

The expression stability of the candidate reference genes was evaluated among the different species within each life stage to select reference genes for qPCR experiments for the comparison of different species.

The suitable reference genes for normalization were ranked based on their expression stability (M) in a combined dataset of the three species *Co. hominivorax*, *Co. macellaria* and *C. albiceps* using geNorm (Table 3). *Gapdh* and *Rp49* were the two most stable genes in samples of adult females.

By analyzing the gene expression stability using NormFinder in adult females, a similar result as geNorm was observed (Table 3). The best combination of two genes was *Rp49* and *Gapdh* with a stability value of 0.332. The software geNorm ranked *RpS17* as the least stable gene while NormFinder ranked *Actin* as the least stable. Using Bestkeeper, *Gapdh* was the candidate reference gene with the least variation, with a standard deviation of 0.74, which represents a change in gene expression lower than 2-fold (standard deviation smaller than 1, (Wong & Medrano, 2005). *Gapdh* was followed by *Rp49* with a standard deviation of 0.78. The variation in the expression of the other candidate reference genes was greater than two-fold. The pair-wise correlation between genes and the correlation between each gene and the BestKeeper index was also calculated (Table 3). The best correlation between the BestKeeper index and the candidate reference gene in females was obtained for *Gapdh* ($r = 0.805$, $p = 0.001$).

In larvae, geNorm ranked *Gapdh* and *Actin* ($M = 0.917$) as the best reference genes with higher stability values (Table 3). Based on the intra and inter-group variation in

NormFinder, *Actin* (0.461) and *Gapdh* (0.553) were identified as the most expression-stable and *RpS17* (0.868) as the least stable.

The analysis of BestKeeper results revealed that only *Rp49* had an acceptable variation in gene expression (standard deviation of 0.84), but it was ranked in third according to its correlation with the BestKeeper index (Table 3). Even though the variation in their expression exceeded two-fold, *Actin* and *Gapdh* had the highest correlation with the BestKeeper index. Hence, there was a consensus among the three different algorithms suggesting the same two genes with the highest expression stability among larval samples of different species.

The results for larvae were similar to those found for adult females. The suitable genes for normalization given by the three programs were *Gapdh*, *Actin* and *Rp49*.

It was not possible to determine the expression levels of *GstD1* in *C. albiceps*. Hence, the tests were repeated without the *C. albiceps* samples to validate the stability of this gene between *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* (Table 3). Regardless of the algorithm, *GstD1* was among the least stable in both larval and adult female samples. Only *RpS17* had a worse performance than *GstD1*.

Comparison between life stages within species

The stability of the candidate reference genes between larvae and adult females within each species was also tested. Genes with the highest stability values between stages can be used as good reference genes in developmental studies aiming at the comparison of gene expression among different stages of Calliphoridae flies.

Table 3 - Stability ranking of the reference genes by GeNorm, NormFinder and BestKeeper

Rank	geNorm (M ¹)							NormFinder (Stability value ⁵)							BestKeeper (BestKeeper index ⁶)						
	Among species ²		Including <i>GstDI</i> ³		Within species ⁴			Among species ²		Including <i>GstDI</i> ³		Within species ⁴			Among species ²		Including <i>GstDI</i> ³		Within species ⁴		
	Larvae	Females	Larvae	Females	Calb	Chom	Cmac	Larvae	Females	Larvae	Females	Calb	Chom	Cmac	Larvae	Females	Larvae	Females	Calb	Chom	Cmac
1	<i>Actin</i> (0.917)	<i>Rp49</i> (0.755)	<i>Actin</i> (1.009)	<i>Rp49</i> (0.886)	<i>Rp49</i> (0.640)	<i>Actin</i> (1.197)	<i>Actin</i> (1.239)	<i>Actin</i> (0.461)	<i>Gapdh</i> (0.262)	<i>Actin</i> (0.175)	<i>Gapdh</i> (0.108)	<i>Gapdh</i> (0.114)	<i>Gapdh</i> (0.380)	<i>Gapdh</i> (0.183)	<i>Actin</i> (0.952)	<i>Gapdh</i> (0.805)*	<i>Actin</i> (0.969)	<i>Gapdh</i> (0.895)*	<i>Gapdh</i> (0.918)*	<i>GstDI</i> (0.956)*	<i>Gapdh</i> (0.966)*
2	<i>Gapdh</i> (0.917)	<i>Gapdh</i> (0.755)	<i>Gapdh</i> (1.009)	<i>Gapdh</i> (0.886)	<i>Gapdh</i> (0.640)	<i>Gapdh</i> (1.197)	<i>Gapdh</i> (1.239)	<i>Gapdh</i> (0.553)	<i>Rp49</i> (0.472)	<i>Gapdh</i> (0.438)	<i>Rp49</i> (0.536)	<i>Rp49</i> (0.290)	<i>Rp49</i> (0.441)	<i>Actin</i> (0.669)	<i>Gapdh</i> (0.932)*	<i>RpS17</i> (0.775)*	<i>Gapdh</i> (0.962)*	<i>RpS17</i> (0.711)*	<i>Actin</i> (0.833)*	<i>Gapdh</i> (0.919)*	<i>Actin</i> (0.912)*
3	<i>Rp49</i> (1.419)	<i>Actin</i> (1.414)	<i>Rp49</i> (1.589)	<i>Actin</i> (1.181)	<i>Actin</i> (0.903)	<i>Rp49</i> (1.413)	<i>Rp49</i> (1.624)	<i>Rp49</i> (0.593)	<i>RpS17</i> (0.931)	<i>Rp49</i> (0.751)	<i>Actin</i> (0.596)	<i>Actin</i> (0.605)	<i>α-tub</i> (0.463)	<i>Rp49</i> (0.708)	<i>Rp49</i> (0.737)*	<i>Rp49</i> (0.557)*	<i>GstDI</i> (0.932)*	<i>Actin</i> (0.680)*	<i>Rp49</i> (0.769)*	<i>Rp49</i> (0.739)*	<i>GstDI</i> (0.748)*
4	<i>RpS17</i> (1.983)	<i>RpS17</i> (1.876)	<i>GstDI</i> (1.933)	<i>GstDI</i> (1.420)	<i>RpS17</i> (1.394)	<i>α-tub</i> (1.502)	<i>GstDI</i> (2.007)	<i>RpS17</i> (0.868)	<i>Actin</i> (0.976)	<i>GstDI</i> (1.004)	<i>RpS17</i> (0.693)	<i>RpS17</i> (0.733)	<i>GstDI</i> (0.525)	<i>GstDI</i> (1.411)	<i>RpS17</i> (0.597)*	<i>Actin</i> (0.371)	<i>Rp49</i> (0.753)*	<i>GstDI</i> (0.386)	<i>RpS17</i> (0.683)*	<i>Actin</i> (0.625)*	<i>Rp49</i> (0.721)*
5			<i>RpS17</i> (2,391)	<i>RpS17</i> (1.775)		<i>GstDI</i> (1.657)	<i>RpS17</i> (2.568)			<i>RpS17</i> (1.084)	<i>GstDI</i> (0.700)		<i>Actin</i> (0.598)	<i>RpS17</i> (1.528)			<i>RpS17</i> (0.514)	<i>Rp49</i> (0.114)		<i>α-tub</i> (0.591)*	<i>RpS17</i> (0.555)
6						<i>RpS17</i> (1.850)							<i>RpS17</i> (0.644)							<i>RpS17</i> (0.568)	

Calb, *C.albiceps*; Chom, *Co. hominivorax*; Cmac, *Co. macellaria*.¹ Gene stability measure as calculated by geNorm² Stability of gene expression among the three different species within each life stage³ Stability of gene expression in *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* including *GstD1*⁴ Stability of gene expression between the two life stages within each species⁵ Stability value as calculated by Normfinder⁶ Stability index as calculated by Bestkeeper. In bold, genes with a standard deviation lower than 1.

* p< 0.05

In *C. albiceps*, there was a consensus between NormFinder, geNorm and BestKeeper results allowing the identification of two good candidates, *Gapdh* and *Rp49* (Table 3).

In BestKeeper both had a variation lower than 2-fold (standard deviations of 0.42 for *Rp49* and 0.67 for *Gapdh*). *Actin* was ranked in second (Table 3) but it had a higher variation (standard deviation of 1.08). *RpS17* was the least expression-stable gene regardless of the algorithm employed.

In *Co. hominivorax*, *Actin* and *Gapdh* are the best choices, as based in the geNorm results (Table 3), while NormFinder ranked *Gapdh* and *Rp49* as the most expression stable genes. BestKeeper ranked the genes differently; *GstD1* and *Gapdh* had the best correlation with the BestKeeper index (Table 3), but only *Rp49* and *Actin* had an acceptable level of variation (standard deviations of 1.01 and 1.05, respectively).

Finally, comparing different stages in *Co. macellaria*, the best reference genes according to geNorm and NormFinder results were *Actin* and *Gapdh* (Table 3). With BestKeeper, *Gapdh* and *Rp49* had the best correlations with BestKeeper index, but once again, only *Rp49* had a variation in gene expression lower than 2-fold (standard deviation of 0.75).

Discussion

Although qPCR is widely used, there is no consensus as to which gene or gene set should be used for data normalization and the selection of genes that are expressed in the same levels across all samples and different conditions of a study is still one of the challenges of this technique (Bustin, 2000, Bustin, 2002). Differences in mRNA levels were observed in several housekeeping genes originally considered stable in their expression levels (Radonic

et al., 2004, Bustin, 2002). Therefore, using non-validated reference genes for normalization may result in an erroneous expression data interpretation. Thus, it is recommended to validate a set of candidate reference genes for each qPCR experiment (Bustin et al., 2010). The validation of reference genes is a difficult task, as the amount of the reference gene itself requires normalization for an accurate measure. An alternative is to use a combined set of candidate reference genes and their pair-wise variation in gene expression to evaluate the expression stability of each reference gene (Kubista et al., 2006, Nolan et al., 2006).

Recently, with the growing concern of an accurate normalization for qPCR data, there was an increase in the number of validation studies (Mallona et al., 2010). In insects there are only a limited number of efforts. Reference genes for qPCR were validated in honeybees, *A. mellifera* (Scharlaken et al., 2008, Lourenço et al., 2008), ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus microplus* (Nijhof et al., 2009), in the locust *S. gregaria* (Van Hiel et al., 2009) and in the psocid, *Liposcelis bostsrychophila* (Jiang et al., 2010). In Diptera, reference genes were validated in the fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Shen et al., 2010) and in the blowfly *Lucilia cuprina* (Bagnall & Kotze, 2010).

Here, we describe the first effort of a cross-species validation of reference genes for evolutionary studies using qPCR. This cross-species approach presents some challenges for the selection of reference genes. First, it is necessary to design primers in conserved regions of orthologous genes. For non-model species, as in our case, conserved regions can be found by comparing divergent species. *Co. hominivorax* sequences were aligned to different species of *Drosophila*. Even using this strategy, not all primers designed recovered the desired product; *SdhA* was amplified only in two species, *Co. hominivorax*

and *Co. macellaria*, α -tub was amplified only in *Co. hominivorax*, while primers for *GstD1* had a low efficiency of amplification in *C. albiceps*. A second challenge is the selection of genes with a stable expression across the different species. The divergence in the gene expression levels is correlated with the sequence divergence between species (Nuzhdin et al., 2004, Castillo-Davis et al., 2004, Lemos et al., 2005). For housekeeping genes there is, in general, a higher conservation in both regulatory and coding regions (Hurst et al., 2002, Farre et al., 2007). Hence, 10 housekeeping genes commonly used in previous studies in insects (Scharlaken et al., 2008, Van Hiel et al., 2009, Dworkin & Jones, 2009) were selected and primer pairs for these genes were designed based on the sequence information from the *Co. hominivorax* transcriptome (Carvalho et al., 2010).

To evaluate the gene expression stability of the selected genes among different species, the most widely used programs were employed. Each program has its own statistical approach and each calculate a value for the expression stability of each gene. The excel-based program geNorm (Vandesompele et al., 2002) uses the pair-wise variation of every reference gene as the standard deviation of the expression values and calculates a stability value. By using the geNorm algorithm *Gapdh*, *Rp49* and *Actin* were identified as the most stable candidate genes in this experimental setting.

Similarly, BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) calculates an index (BestKeeper index) using the geometric mean of each candidate reference gene. The pair-wise correlation is calculated with the BestKeeper index compared to each individual. The genes with best ranking among our data were *Actin* and *Gapdh*.

NormFinder (Andersen et al., 2004), on the other hand, estimates the expression stabilities according to the intra- and inter-group expression variation suggesting the most expression-stable genes. With NormFinder's algorithm, *Gapdh*, *Rp49* and *Actin* had the best stability values among the selected genes, both within and among the different species and development stages

Several studies in insects demonstrated that *Actin*, *Rp49* and *Gapdh* are stably expressed and, therefore, are good reference genes in experiments where normalization is required. Scharlaken *et al.* 2008 compared the expression stability of 6 reference genes, *Actin*, α -*tub*, *Gapdh*, *Rpl13A*, *RpS18*, and *Ubq* (UbiQuitin family member; ubq-1), between honeybees with and without a bacterial challenge. *Actin* and *Gapdh* were one of the best reference genes suggested by these authors. *RpL13A* and *RpS18* had higher expression stability values in the honeybee study, but we could not detect the expression of these genes in our samples (data not shown).

In the locust, *S. gregaria* (Van Hiel et al., 2009), the authors compared the gene expression stability of nine candidate reference genes in the brain of nymphs and adults. *Actin*, *Ef1 α 100E*, *Gapdh* and *Rp49* were selected in this study and were also identified as stable reference genes to be used for accurate normalization.

Nijhof *et al.*, 2009 studied the stability of gene expression of nine candidate genes: *Actb* (beta actin), *Btub* (beta tubulin), *Ef1 α 100E*, *Gapdh*, *GstD1*, *H3F3A* (H3 histone family 3A), *PPIA* (Cyclophilin), *RpL4* (Ribosomal protein L4) and *Tbp* (TATA box binding protein) among life-stages of two species, *R. appendiculatus* and *R. microplus*. *Gapdh* was among the most expression-stable genes in the comparison using the combined data of both

species. In line with our results, *GstD1* was the least expression-stable gene in this study. However, in not all validation studies there was a good performance of *Gapdh*. In the fruit-fly, *B. dorsalis*, the expression stability of 10 genes, including *Actin*, α -*tub*, *Gapdh* and *Efl α 100E*, was analyzed in different tissues of adult male and female (Shen et al., 2010). *Actin* had a good performance as a reference gene, but not *Gapdh*.

Recently, Bagnall & Koteze (2010) evaluated the stability of reference genes in different life stages of a closely related species in the Calliphoridae family, *L. cuprina*. Three of the 11 genes tested (*Actin*, *Gapdh* and *GstD1*) overlapped with the genes we selected. One of our most expression stable genes, *Gapdh*, was ranked by geNorm and NormFinder as the worst reference gene in the *L. cuprina* study with M values ranging from 0.121 to 0.643 and NormFinder stability values ranging from 0.195 to 0.724 (Bagnall & Kotze, 2010). The authors hypothesized that as *Gapdh* is involved in metabolism, the individuals could be in different energetic status during sampling. Combined, these results highlight the requirement of validation studies for each experimental setting. Although *Gapdh* had a good performance in ours and some other studies, it was also among the least stable genes in some experimental settings.

Commonly used reference genes are involved in essential biological functions, such as cellular transport, translation, structural constitution and metabolism as they are thought to have a stable expression. However, several studies demonstrated that such housekeeping genes could also vary according to experimental settings (Nijhof et al., 2009, Vandesompele et al., 2002, Bagnall & Kotze, 2010, Huitorel & Pantaloni, 1985, Chang et

al., 1998, Axtner & Sommer, 2009). This expression variation probably results from the involvement of these genes in additional cellular functions (Jain et al., 2006).

The genes *RpS17* and *GstD1* were the least stable genes in our study. *RpS17* is involved in translation and encodes a protein related to lipid droplets formation (Cermelli et al., 2006). This lipid component is important for energy storage and utilization (Arrese & Soulages, 2010). Furthermore, lipids play important roles in multiple metabolic functions during insect development (Arrese & Soulages, 2010). The large variation of the expression of this gene may be related to individual differences in lipid storage between life-stages, but also may reflect different lipid requirements among the studied species.

GstD1 encodes a glutathione-S-transferase involved in detoxification metabolism. This gene is regulated when an insect is exposed to a variety of organic compounds (Chahine & O'Donnell, 2011). The compared species have different feeding preferences and were fed in different media. While we did not formally test the differences in gene expression of *GstD1* among the different species, this was an interesting observation and further experiments should be performed to test the association of *GstD1* with the feeding habit.

Although several commonly used reference genes displayed a stable expression in many studies, reference genes must be validated for each experimental setting. Here, the expression stability of six candidate reference genes was tested aiming at future functional studies in the Calliphoridae family. In our analyses, *Actin*, *Rp49* and *Gapdh* had a stable expression level among different Calliphoridae species and between two different life-stages within each species. Hence, they can be used as reliable reference genes for functional studies in Calliphoridae using similar experimental settings. These reference

genes will be critical in studies involving behavior, development and other biological processes in Calliphoridae species and will be an important resource for other validation studies in Calliphoridae and other insects.

Acknowledgements

We are very grateful to Maria Salette Couto for maintaining the screwworm colonies and to Rosângela A. Rodrigues for valuable technical assistance. This work was supported by grants to TTT from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant 2008/58106-0) and from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 477335/2009-8). GAC was supported by a fellowship from FAPESP (2009/13463-3).

Disclosure

GAC carried out all experiments and data analysis. CCM helped with qPCR experiments. AMLAE contributed materials and analysis tools and helped in the project supervision. TTT conceived of the study, supervised the project and coordinated all activities. GAC and TTT designed the experiments and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman, DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64: 5245-50.

- Arrese EL, Soulages JL. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* 55: 207-25.
- Axtner J, Sommer S. 2009. Validation of internal reference genes for quantitative real-time PCR in a non-model organism, the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis*. *BMC Research Notes* 2: 264.
- Bagnall NH, Kotze AC. 2010. Evaluation of reference genes for real-time PCR quantification of gene expression in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Medical Veterinary Entomology* 24: 176-81.
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-93.
- Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR RT-PCR.: trends and problems. *Journal Molecular Endocrinology* 29: 23-39.
- Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S. 2010. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology* 11: 74.
- Carvalho RA, Azeredo-Espin AML, Torres TT. 2010. Deep sequencing of New World screw-worm transcripts to discover genes involved in insecticide resistance. *BMC Genomics* 11: 695.
- Castillo-Davis CI, Hartl DL, Achaz G. 2004. cis-Regulatory and protein evolution in orthologous and duplicate genes. *Genome Research* 14: 1530-6.
- Cermelli S, Guo Y, Gross SP, Welte MA. 2006. The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Current Biology* 16: 1783-95.
- Chahine S, O'donnell MJ. 2011. Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* 214: 462-8.
- Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW, Tsay HJ. 1998. Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncology Reports* 5: 469-71.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 31: 3497-500.
- Clark AG, Eisen MB, Smith, DR, Bergman CM, Oliver B, *et al.* 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450: 203-18.
- Dworkin I, Jones CD. 2009. Genetic changes accompanying the evolution of host specialization in *Drosophila sechellia*. *Genetics* 181: 721-36.
- Farre D, Bellora N, Mularoni L, Messegue X, Alba MM. 2007. Housekeeping genes tend to show reduced upstream sequence conservation. *Genome Biology* 8: R140.
- Huitorel P, Pantaloni D. 1985. Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Europe of Journal Biochemistry* 150: 265-9.
- Hurst LD, Williams EJ, Pal C. 2002. Natural selection promotes the conservation of linkage of co-expressed genes. *Trends in Genetics* 18: 604-6.
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 646-51.
- Jiang HB, Liu YH, Tang PA, Zhou AW, Wang JJ. 2010. Validation of endogenous reference genes for insecticide-induced and developmental expression profiling of *Liposcelis bostrychophila* Psocoptera: Liposcelididae. *Molecular Biology Reports* 37: 1019-29.

- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N 2006 The real-time polymerase chain reaction *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95-125
- Lemos B, Bettencourt BR, Meiklejohn CD, Hartl DL 2005 Evolution of proteins and gene expression levels are coupled in *Drosophila* and are independently associated with mRNA abundance, protein length, and number of protein-protein interactions *Molecular Biology and Evolution* 22: 1345-54
- Lourenço A, Mackert A, Cristino A, Simões, Z. 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidology* 39: 372-385.
- Mallona I, Lischewski, S, Weiss, J, Hause, B and Egea-Cortines, M. 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology* 10: 4.
- Nijhof AM, Balk JA, Postigo M, Jongejan F. 2009. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Molecular Biology* 10: 112.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1: 1559-82
- Nuzhdin SV, Wayne ML, Harmon KL, McIntyre LM. 2004. Common pattern of evolution of gene expression level and protein sequence in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1308-17.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians, TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26: 509-15.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 856-62.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365-86.
- Scharlaken B, Graaf D, Goossens K, Brunain M, Peelman L, Jacobs F. 2008. Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *Journal of Insect Science* 8: 1536-2442.
- Shen GM, Jiang HB, Wang XN, Wang JJ. 2010. Evaluation of endogenous references for gene expression profiling in different tissues of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*, Diptera: Tephritidae. *BMC Molecular Biology* 11: 76.
- Stevens JR. 2003. The evolution of myiasis in blowflies Calliphoridae. *International Journal of Parasitology* 33: 1105-13.
- Stevens JR, Wallman JF. 2006. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds part I: phylogenetic analyses. *Trends in Parasitology* 22: 129-36.
- Van Hiel MB, Van Wielendaele P, Temmerman L, Van Soest S, Vuerinckx K, Huybrechts R, Broeck JV, Simonet G. 2009. Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. *BMC Molecular Biology* 10: 56.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3; RESEARCH0034.
- Vanguilder, HD, Vrana, KE and Freeman, WM. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44: 619-26.
- Wong ML, Medrano, JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation *Biotechniques* 39: 75-85.
- Zumpt F. 1965. *Myiasis in man and animals in the Old World*, Butterworths, London.

PARTE III

Expressão de genes relacionados ao hábito alimentar na família Calliphoridae

Resumo

Artigo: Cardoso, G.A., Marinho, M.A.T., C.C., Azeredo-Espin, A.M.L., Torres, T.T.
Survey of species-specific expression levels of genes involved in feeding habit in the Calliphoridae family.

Artigo que será submetido ao periódico Genetics.

Espécies muito próximas da família Calliphoridae apresentam comportamentos alimentares muito distintos como alimentação em tecido de um hospedeiro vivo (parasitismo obrigatório) e alimentação em matéria orgânica em decomposição. As origens evolutivas do hábito de parasitismo na família Calliphoridae ainda são desconhecidas. No entanto, o que torna essa família ideal para o estudo da evolução do comportamento alimentar é o aparecimento do parasitismo obrigatório em pelo menos três ocasiões independentes. Os insetos compreendem o meio através de quimiorreceptores responsáveis pela percepção de sinais gustatórios e olfatórios. Os genes responsáveis pela transdução desses sinais podem ser os principais envolvidos na existência de comportamentos alimentares distintos. Além disso, genes envolvidos em desintoxicação, secreção de antimicrobianos e imunossupressores, podem ter um papel fundamental na determinação de hábitos alimentares de califorídeos. Assim, nós selecionamos e analisamos a expressão de oito genes candidatos em espécies necrófagas e parasitas de califorídeos. Também mostramos como a expressão desses genes evolui entre espécies dos gêneros *Chrysomya* e *Cochliomyia*. Em larvas, observamos uma alta conservação da expressão gênica, mostrando uma forte atuação da seleção purificadora. Em adultos, grande parte dos genes teve uma diferença de expressão entre espécies, sem uma associação significativa com a preferência alimentar. Um único gene, *Malvolio*, teve uma diferença de expressão gênica associada ao hábito alimentar em todas as nossas análises. Esse gene se destacou em nossas análises e deverá ser estudado detalhadamente para estabelecermos sua relação com o hábito alimentar.

Evolution of expression levels of genes involved in the feeding habit of Calliphoridae species.

Gisele Antoniazzi Cardoso^{1,2}, Marco Antônio Tonus Marinho^{1,2}, Ana Maria Lima Azeredo-Espin^{1,2}, Tatiana Teixeira Torres^{1,3§}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

²Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

³Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

§Corresponding author

Tatiana Teixeira Torres
Depto. Genética e Biologia Evolutiva
Instituto de Biociências, USP
Rua do Matão, 277 sala 225
05508-090
São Paulo, SP, Brasil

Fax: +55-11-30917553

Email addresses:

GAC: gisele.antoni@cbmeg.unicamp.com.br

MATM: mmarinho@unicamp.br

AMLAE: azeredo@unicamp.br

TTT: tttorres@ib.usp.br

Abstract We compared the gene expression divergence of eight candidate genes among four Calliphoridae species with two contrasting feeding preferences. Our results indicated genes under purifying selective constraint on their expression and revealed one gene, *Mvl* that may be associated with the feeding preference of these species.

The different patterns of gene expression are responsible for a large proportion of the phenotypic differences between species (ENARD *et al.* 2002). Many authors discussed how phenotypic differences among closely related individuals are connected with differences in gene expression in primates, fruitflies, fish and mice (NUZHDIN *et al.* 2004; LEMOS *et al.* 2005; WHITEHEAD and CRAWFORD 2006; WARNEFORS and EYRE-WALKER 2012).

In this article, we engaged in an intriguing biological question to link gene expression of candidate genes to the evolutionary history of the Calliphoridae family. Flies of this family have different feeding habits; saprophagous species feed on decaying organic matter and obligate parasites feed on living tissues of warm-blooded vertebrates. Both feeding habits are exhibited during the larval stage. Calliphoridae species are known as myiasis causing flies. This term was described by Zumpt (1965) to characterize the infestation caused by dipterous larvae which, in at least one period of their life cycle, feed on living or dead tissues of a vertebrate host. In the evolutionary history of this family, the obligate parasitism appears in at least three independent occasions (STEVENS and WALLMAN 2006). In the most parsimonious scenario, the saprophagous lifestyle was the ancestral state in Calliphoridae and it was followed by the appearance of opportunistic infestation of living tissues and obligate parasitism (ZUMPT 1965; ERZINÇLIOĞLU 1989).

Two Calliphoridae genera *Chrysomya* and *Cochliomyia*, contain both obligate parasites and saprophagous species, which allow the comparison of different feeding habits between

closely related species.

We used a candidate gene approach as a first step to study the evolution of the feeding habit in Calliphoridae. Messenger RNA levels of eight candidate genes (Table 1) were measured in larvae, adult females and adult males of three saprophagous species: *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala*, *Cochliomyia macellaria* and one obligate parasite *Cochliomyia hominivorax* using qPCR. Candidate genes were chosen by their possible involvement in the feeding habit based on information from previous studies and Gene Ontology terms (BOND and SANG 1968; ORGAD *et al.* 1998; WERNER *et al.* 2000; FITZPATRICK and SOKOLOWSKI 2004; LAYALLE *et al.* 2005; WU *et al.* 2005; DWORKIN and JONES 2009).

Genes differently expressed among species or between feeding habits were identified by using two-way ANOVA .

The candidate genes investigated here were classified into three groups according to the patterns of expression divergence among the different species in each stage: (i) genes with conserved expression levels among all species; (ii) genes with different expression levels in at least one comparison and (iii) genes with different expression levels in which the strongest factor was the feeding preference.

Table 1- Candidate genes potentially involved in feeding habit. The candidate genes were selected from previous studies in Diptera (BOND and SANG 1968; ORGAD *et al.* 1998; WERNER *et al.* 2000; FITZPATRICK and SOKOLOWSKI 2004; LAYALLE *et al.* 2005; WU *et al.* 2005; DWORKIN and JONES 2009). To expand our search, we also used the terms of the Gene Ontology database (GO).

Gene	Symbol	GO ID	GO term	Primer
<i>Cyp6g1</i>	<i>Cyp6g1</i>	0019329	“Ammonia oxidation”	F: GAGCCCGATAAATTCGAACC R: ATCATGCCAAAACGTTCAACC
<i>Foraging</i>	<i>For</i>	0030536	“Larval feeding behavior”	F: CAAAGACCTGGCGGAAG R: TTCTCCTCCTGCGTGTCC

<i>Glutamate desidrogenase</i>	<i>Gdh</i>	0019676	“Ammonia assimilation cycle”	F: CATTCCGGTGGTGCTAAGG R: CCGGGTCCAATGAAACC
<i>Jonah65Aiv</i>	<i>Jon65Aiv</i>	0004252	“Serine-type endopeptidase activity”	F: ACTGCTGCTCATTGTACTGATG R: TTGCTATTCCAGCCAGAGTG
<i>Malvolio</i>	<i>Mvl</i>	0050916	“Sensory perception of sweet taste”	F: TGGGGTGTGGGTATTTTAGC R: TAAAACACGACGCCAACG
<i>Pgrp-sc2</i>	<i>Pgrp-sc2</i>	0006955	“Immune response”	F: CGTGGCTGGAATGTTATGG R: TTGACCACGAGCAACAGC
<i>Rps6-p70-proteinkinase</i>	<i>Ds6k</i>	0030536	“Larval feeding behavior”	F: TCACCAAGACGTACACCAAG R: TGTACATCCATCATTTTCGTC
<i>Smooth</i>	<i>Sm</i>	0008343	“Adult feeding behavior”	F: TTCTTATTGCCCGATCATACAC R: AATCTTGCTCGGTGGTTG

Primers were designed using PRIMER3 (ROZEN and SKALETSKY 2000) in conserved regions of the transcripts, identified by alignments of *Drosophila* (www.flybase.org) and *Co. hominivorax* (CARVALHO *et al.* 2010) sequences. To measure mRNA levels of the candidates, RNA was extracted from 10 individuals of cohorts. These individuals were pooled into four RNA samples, each containing five individuals from a single cohort (four biological replicates). All RNA samples were treated with Turbo DNase (Ambiom) to remove residual genomic DNA. Reverse transcription was performed using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) according to manufacturer's conditions. cDNA was used as the template in qPCRs in a ABI 7500 PCR Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA), using the reaction and cycling parameters described in Cardoso *et al.* (2012). Each sample was run in duplicate. mRNA levels were calculated using the MNE (Mean Normalized Expression) formula according to (MULLER *et al.* 2002). This formula relates the mean of the reference and target genes *Ct*s including efficiencies values: $MNE = \frac{(E_{reference})^{Ct_{reference}}}{(E_{target})^{Ct_{target}}}$. All expression data were normalized using the mean of the reference genes *Gapdh* and *Rp49* previously validated (Cardoso *et al.* 2012).

The expression of two candidate genes (*Cyp6g1* and *Gdh*) was conserved in all comparisons. *Gdh* is involved in the production of ammonia, a high toxic and immunosuppressive substance secreted by *Lucilia cuprina* larvae in the infestation site (Diptera: Calliphoridae). Ammonia causes inhibition of bacterial growth by alterations in pH (TARGOWSKI *et al.* 1984; GUERRINI *et al.* 1988). *Cyp6g1* belongs to the P450 family and is involved in the metabolism of toxic substances (PORTER and COON 1991). Although these genes were considered potential candidate genes as they are directly involved in the response of the larvae to the wound microenvironment, we did not observe differences in gene expression.

Interestingly, other five genes (*Ds6k*, *For*, *Jon65aiv*, *Pgrp-sc2* and *Sm*) observed a high conservation on gene expression levels in larvae of the four species. The conservation on

gene expression suggests that regulatory variation on these genes is constrained by purifying selection. This observation is consistent with previous results. Recently, some authors demonstrated the pervasive role of purifying selection in gene expression of various organisms such as mammals and flies (NUZHDIIN *et al.* 2004; BRAWAND *et al.* 2011).

These same five candidates were differently expressed between species in adult stage. *Sm* gene, involved in chemoreception, had a difference in gene expression among species in both adult females and males ($p = 0.01$). A second gene, *For* showed no differences in gene expression among species in the larval stage. In other words, we

, encodes a cGMP-dependent protein kinase (PKG), which participates in the modulation of the division of labor in social species and foraging behavior in *Drosophila melanogaster* (FITZPATRICK and SOKOLOWSKI 2004; BEN-SHAHAR 2005). This gene was differentially expressed between species in adult females ($p = 0.0003$), but not in males or larvae. This difference between sexes and stages requires the presence of different regulatory modules and the action of different selection regimens in each module. We observed this pattern in other three genes: *Ds6K*, *Jon65aiv* and *Pgrp-sc2*, i. e., there was a difference in gene expression among species in one sex but not in the other. *Ds6k* was differently expressed among species only in adult males ($p = 0.01$). This gene is involved in food choice by acting together with neuropeptides to modulate aversive behavior (WU *et al.* 2005). *Pgrp-sc2* was differently expressed among species in females ($p = 0.002$). *Pgrp-sc2* is involved in immune responses (LEMAITRE *et al.* 1997; WERNER *et al.* 2000).

Jon65aiv had a difference in females associated with feeding behavior ($p = 0.009$). In adult males, there was a difference among species ($p = 0.006$). This gene belongs to a large

family of serine proteases (ROSS *et al.* 2003). The enzymatic activity of these proteins allows the parasitic larvae to move in the wound during feeding (wound formation process), facilitating the acquisition of nutrients (MUHARSINI *et al.* 2000).

With the measures of gene expression divergence, we tested the hypothesis that the evolution of expression of these seven genes (in each stage/sex) was predominantly neutral, i.e. the regulatory variation accumulates in the absence of selective pressure. In this case, the gene expression divergence accumulates linearly with the divergence time. Pairwise nucleotide sequence distances were calculated between species using the sequence information of four genetic markers (COI, 16S, 28S and ITS2). These genetic distances were correlated with the pairwise gene expression divergence. The only two genes with a positive and significant correlation with genetic distance were *Jon65aiv* and *Ds6k* ($p=0.006$, $r^2=0.39$) in adult males (Figure 1).

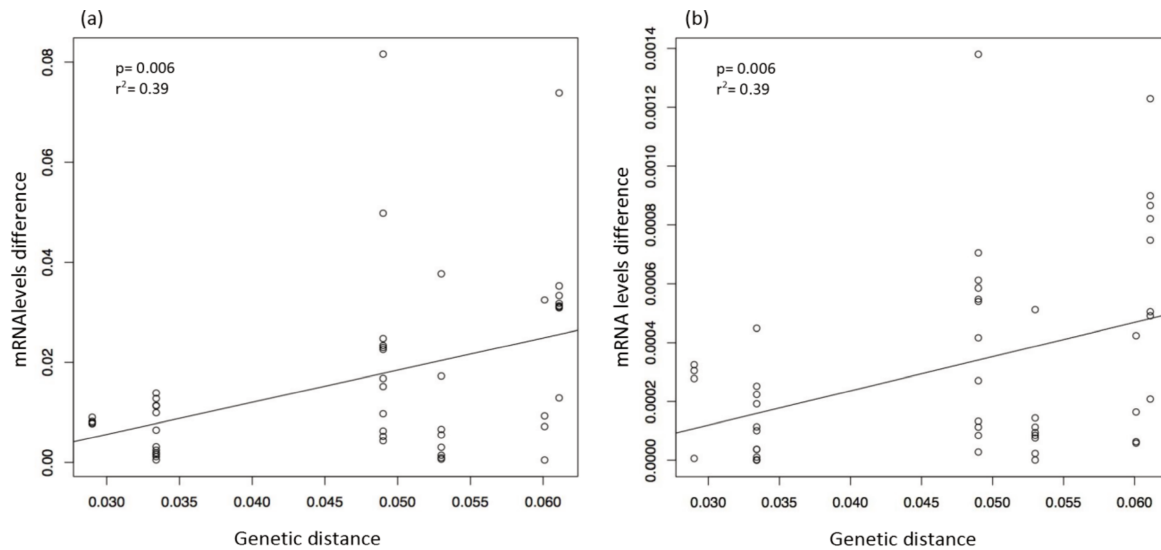


Figure 1 Differences in gene expression between species may result from the accumulation of mutations throughout its evolutionary history. In other words, as in coding regions, we can observe the neutral evolution of gene expression. To test this hypothesis, we performed Pearson's correlation to establish a correlation between the difference in mRNA levels and the genetic distance of the species studied. Differences in mRNA levels were calculated using the square difference of the MNE between each pair of species. Pair-wise genetic distances among given species were based on a published concatenated dataset of COI, 16S, 28S and ITS2 sequences (MARINHO *et al.* 2012) and estimated using the Maximum Composite Likelihood method (with

the TN93+G distance) in MEGA 5 (TAMURA *et al.* 2011). Two genes in adult stage had a positive and significant correlation with the genetic distances (a) *Jon65aiv* and (b) *Ds6k*.

Together, our observations suggest that most changes in expression level in the candidate genes are not purely evolving under a neutral model of evolution. These findings are in line with several studies that showed that gene expression is, in large part, subject to selection (RIFKIN *et al.* 2003; NUZHIDIN *et al.* 2004; OMETTO *et al.* 2011).

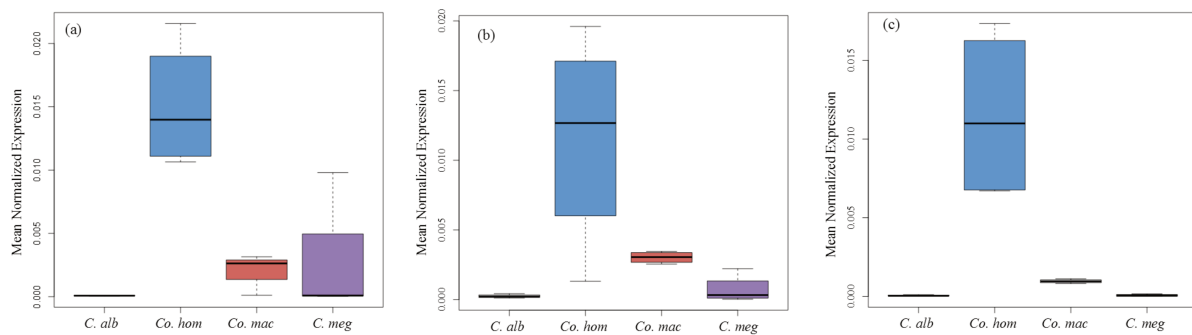


Figure 2 mRNA levels of *Malvolio* in (a) adult females, (b) males and (c) larvae. The three boxplots show that the obligate parasite, *Co. hominivorax*, has a specific pattern of expression while saprophagous species have a similar pattern among them. The highest expression difference observed was between *C. albiceps* and *Co. hominivorax* in larvae. This gene was, approximately, 277 times more expressed in the obligate parasite. The smallest difference was among saprophagous species. *C. megacephala* had 1.2 times higher expression than *Co. macellaria*.

Among our candidates, we found one gene, *Malvolio* (Figure 2), with a difference in gene expression between habits in all comparisons (females $p = 0.00003$; males $p = 0.0007$ and Larvae $p = 0.00002$). *Mvl* is involved in the gustatory signal transduction via metal-ion transport into neurons (ORGAD *et al.* 1998). The gustatory signals are essential to animals for food nutritional evaluation (MELCHER and PANKRATZ 2005). In other words, genes connected to gustatory pathways as *Mvl* may be involved in food preference. *Mvl* had a higher expression in the obligate parasite compared to saprophagous species. A more extensive analysis of the patterns of gene expression of this gene is required to test if the regulatory changes are adaptive, but, clearly, this is an interesting candidate for such study.

We thank members of the laboratory Rosângela A. Rodrigues for technical and Maria Salete Couto for maintaining fly stocks. We especially thank Professor Cláudio José Von Zuben, PhD (UNESP, campus Rio Claro campus) for providing *C. megacephala* stocks and Professor Ana Cláudia Lessinger, PhD (UFSCar, Sorocaba campus) for providing *Co. macellaria* stocks. This work was supported by grants to TTT from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant 2008/58106-0) and from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 477335/2009-8), and by grant to AMLAE from Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP, grant 2009/51723-7). GAC was supported by a fellowship from FAPESP (2009/13463-3).

Literature Cited

- BEN-SHAHAR, Y., 2005 The foraging gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **191**: 987-994.
- BOND, P. A., and J. H. SANG, 1968 Glutamate dehydrogenase of *Drosophila* larvae. *J Insect Physiol* **14**: 341-359.
- BRAWAND, D., M. SOUMILLON, A. NECSULEA, P. JULIEN, G. CSARDI *et al.*, 2011 The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature* **478**: 343-348.
- Cardoso, G., Marinho, M.A.T., Azeredo-Espin, A.M.L., Torres, T.T. Selection and validation of reference genes for functional studies in the Calliphoridae family. Accepted for publication in the *Journal of Insect Science*.
- CARVALHO, R. A., A. M. AZEREDO-ESPIN and T. T. TORRES, 2010 Deep sequencing of New World screw-worm transcripts to discover genes involved in insecticide resistance. *BMC Genomics* **11**: 695.
- DWORKIN, I., and C. D. JONES, 2009 Genetic changes accompanying the evolution of host specialization in *Drosophila sechellia*. *Genetics* **181**: 721-736.
- ENARD, W., P. KHAITOVICH, J. KLOSE, S. ZOLLNER, F. HEISSIG *et al.*, 2002 Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* **296**: 340-343.
- ERZINÇLIOĞLU, Y. Z., 1989 The origin of parasitism in blowflies. *Brit. J. Ent. Nat. Hist.* **2**: 125-127.
- FITZPATRICK, M. J., and M. B. SOKOLOWSKI, 2004 In Search of Food: Exploring the Evolutionary Link Between cGMP-Dependent Protein Kinase (PKG) and Behaviour. *Integr Comp Biol* **44**: 28-36.
- GUERRINI, V. H., G. M. MURPHY and M. BROADMEADOW, 1988 The role of pH in the infestation of sheep by *Lucilia cuprina* larvae. *Int J Parasitol* **18**: 407-409.
- LAYALLE, S., E. COESSENS, A. GHYSEN and C. DAMBLY-CHAUDIERE, 2005 Smooth, a hnRNP encoding gene, controls axonal navigation in *Drosophila*. *Genes Cells* **10**: 119-125.
- LEMAITRE, B., J. M. REICHHART and J. A. HOFFMANN, 1997 *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14614-14619.
- LEMONS, B., C. D. MEIKLEJOHN, M. CACERES and D. L. HARTL, 2005 Rates of divergence in gene expression profiles of primates, mice, and flies: stabilizing selection and variability among functional categories. *Evolution* **59**: 126-137.
- MELCHER, C., and M. J. PANKRATZ, 2005 Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain. *PLoS Biol* **3**: e305.

- MUHARSINI, S., SUKARSIH, G. RIDING, S. PARTOUTOMO, S. HAMILTON *et al.*, 2000 Identification and characterisation of the excreted/secreted serine proteases of larvae of the old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. *Int J Parasitol* **30**: 705-714.
- NUZHIDIN, S. V., M. L. WAYNE, K. L. HARMON and L. M. MCINTYRE, 2004 Common pattern of evolution of gene expression level and protein sequence in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* **21**: 1308-1317.
- OMETTO, L., D. SHOEMAKER, K. G. ROSS and L. KELLER, 2011 Evolution of gene expression in fire ants: the effects of developmental stage, caste, and species. *Mol Biol Evol* **28**: 1381-1392.
- ORGAD, S., H. NELSON, D. SEGAL and N. NELSON, 1998 Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant *malvolio*. *J Exp Biol* **201**: 115-120.
- PORTER, T. D., and M. J. COON, 1991 Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* **266**: 13469-13472.
- RIFKIN, S. A., J. KIM and K. P. WHITE, 2003 Evolution of gene expression in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Nat Genet* **33**: 138-144.
- ROSS, J., H. JIANG, M. R. KANOST and Y. WANG, 2003 Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene* **304**: 117-131.
- ROZEN, S., and H. SKALETSKY, 2000 Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-386.
- TARGOWSKI, S. P., W. KLUCINSKI, S. BABIKER and B. J. NONNECKE, 1984 Effect of ammonia on in vivo and in vitro immune responses. *Infect Immun* **43**: 289-293.
- WARNEFORS, M., and A. EYRE-WALKER, 2012 A selection index for gene expression evolution and its application to the divergence between humans and chimpanzees. *PLoS One* **7**: e34935.
- WERNER, T., G. LIU, D. KANG, S. EKENGREN, H. STEINER *et al.*, 2000 A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13772-13777.
- WHITEHEAD, A., and D. L. CRAWFORD, 2006 Neutral and adaptive variation in gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5425-5430.
- WU, Q., Y. ZHANG, J. XU and P. SHEN, 2005 Regulation of hunger-driven behaviors by neural ribosomal S6 kinase in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13289-13294.
- ZUMPT, F., 1965 *Myiasis in man and animals in the Old World*. London.

PARTE IV

Discussão geral e Conclusões

O comportamento alimentar está relacionado ao modo como cada organismo percebe o ambiente e responde a ele. Genes relacionados ao hábito alimentar envolvidos em vias de transdução de sinal podem ser os responsáveis pela percepção do ambiente e a plasticidade das diversas repostas às variações desse ambiente. Além disso, genes envolvidos em desintoxicação, secreção de antimicrobianos e imunossupressores, podem ter um papel fundamental na determinação de hábitos. Os diferentes perfis de expressão gênica entre espécies próximas podem ser resultado do conjunto de genes que cada indivíduo apresenta, do meio em que vivem e como respondem a esse meio. Mas também podem ser causados por diferenças nas sequências de DNA em regiões regulatórias, mudando o sítio de ligação de reguladores, por exemplo (Tirosch *et al.* 2009).

Como ponto de partida para o estudo da evolução do hábito alimentar em Calliphoridae nós testamos a hipótese de que variações regulatórias dos genes candidatos estão relacionadas aos diferentes hábitos alimentares nesta família. Para isso, nós analisamos a expressão dos genes candidatos via PCR em tempo real em três espécies necrófagas (*C. albiceps*, *C. megacephala* e *Co. macellaria*) e uma espécie parasita (*Co. hominivorax*). No entanto, esta técnica mede a expressão gênica em relação a um gene de referência. O gene de referência não deve variar sua expressão entre as diferentes espécies estudadas. Assim, antes da análise dos genes candidatos, nós selecionamos e validamos um conjunto de genes de referência para uma medida mais confiável da expressão gênica (como descrito na parte II). Como resultado, dois dos genes mais estáveis em nossas análises, *Gapdh* e *Rp49*, foram utilizados para a normalização dos nossos dados de PCR em tempo real.

Após a seleção dos genes candidatos, desenhamos “primers” específicos para *Co. hominivorax* utilizando dados do transcriptoma dessa espécie (Carvalho *et al.* 2010). Dessa

forma foi possível analisar a expressão de oito genes nas quatro espécies de interesse (Anexo 3). Para observarmos se as diferenças de expressão estão relacionadas ao hábito alimentar ou a espécie, utilizamos a análise de variância (ANOVA) com dois fatores, hábito e espécie. Além disso, nós investigamos como a expressão desses genes evolui entre as espécies dos dois gêneros estudados. A expressão dos genes poderia seguir um modelo de evolução neutra no qual a divergência de expressão acumula proporcionalmente ao tempo de divergência, isto é, quanto maior o tempo de divergência entre as espécies, maior a divergência de expressão. Adicionalmente, a seleção positiva pode atuar na evolução da expressão gênica. Nesses dois casos, seria observada uma diferença de expressão entre as espécies. Por outro lado, a ação da seleção purificadora nas regiões regulatórias seria identificada pela conservação da expressão entre as diferentes espécies, considerando que mutações alterando os níveis de expressão fossem deletérias (esta etapa está descrita na parte III).

As espécies parasitas precisam se proteger das respostas imunológicas do hospedeiro e de sua microbiota. O gene *Glutamina desidrogenase* (*Gdh*) é um candidato como atuante nessas respostas. Segundo Guerrini (1997), larvas ectoparasitas de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) excretam amônia no sítio de infestação. A amônia é uma substância altamente tóxica e imunossupressora, podendo levar o hospedeiro à morte (Targowski *et al.* 1984; Guerrini 1988). A glutamina desidrogenase é uma enzima que pode estar relacionada com a produção de amônia através do processo de desaminação. Essa substância nos sítios de infestação alteram o pH do meio, inibindo o crescimento bacteriano (Guerrini 1988). Em nossas análises, foi possível observar que esse gene teve sua expressão conservada em todas as comparações (Figura 2). Provavelmente, o *Gdh* tem uma função essencial para

todas as espécies. É importante ressaltar que se esse gene está relacionado com a produção de amônia nas quatro espécies estudadas, esse produto deve ser essencial para a sobrevivência nos diferentes substratos em que se desenvolvem. Assim, deve haver uma pressão seletiva na expressão desse gene, ou seja, variações regulatórias que alteram os níveis de expressão desse gene são provavelmente deletérias. Possivelmente, essa foi a razão de não encontramos uma diferença significativa no nível de expressão entre as espécies (Anexo 1). A conservação do nível de expressão, como observamos, seria esperada sob um modelo de seleção purificadora.

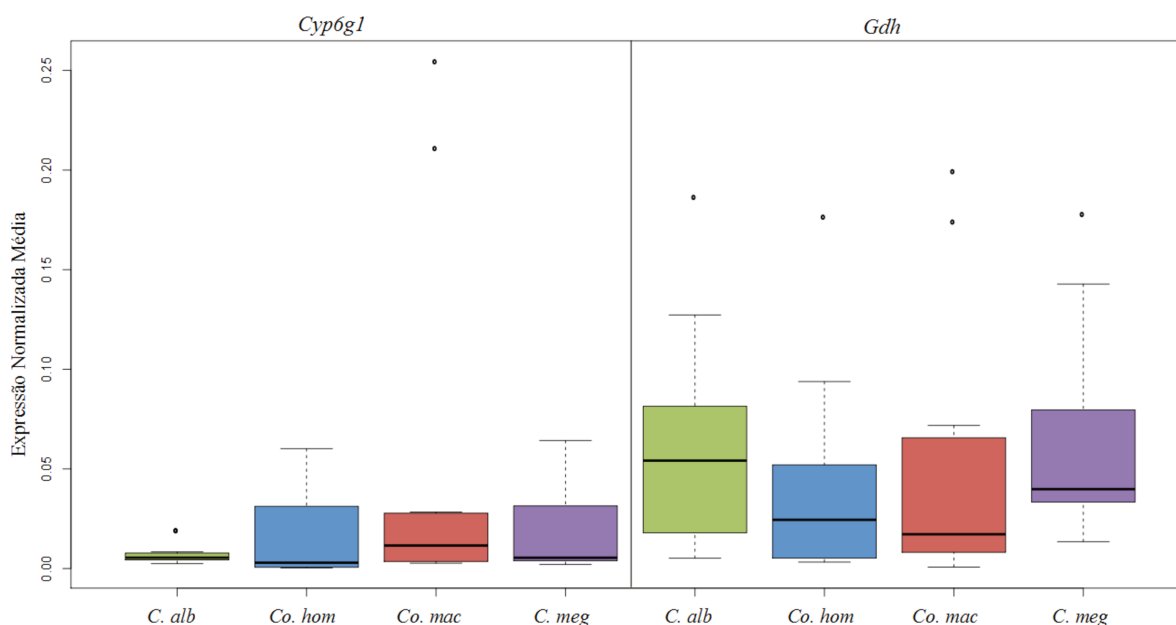


Figura 2. Expressão dos genes *Cyp6g1* e *Gdh*. Analisando os dados de expressão dos dois genes é possível observar a sobreposição dos dados. Por isso, não há diferenças significativas na expressão desses genes em nossas análises.

Os genes relacionados à desintoxicação podem proteger o parasita de substâncias nocivas presentes em excreções e secreções do hospedeiro (Porter & Coon 1991; Dworkin & Jones 2009). Por esse motivo, foram selecionados alguns genes da família do citocromo P450. Entretanto, dos quatro genes selecionados, foi possível realizar a análise da expressão de

apenas um gene, o *Cyp6g1*, uma vez que os “primers” desenhados para os outros três genes não tiveram uma boa eficiência em nossos ensaios de PCR em tempo real as espécies de interesse. É possível que as regiões de hibridização dos “primers” sejam divergentes, uma vez que a única sequência conhecida era de *Co. hominivorax*. No entanto, com os dados do *Cyp6g1*, testamos a hipótese de que para cada tipo de substrato as espécies parasitas e as espécies necrófagas entram em contato com substâncias diferentes que exigem respostas diferentes desse gene. No entanto, assim como o *Gdh* esse gene teve uma expressão conservada em todas as análises (Figura 2; Anexo 1)

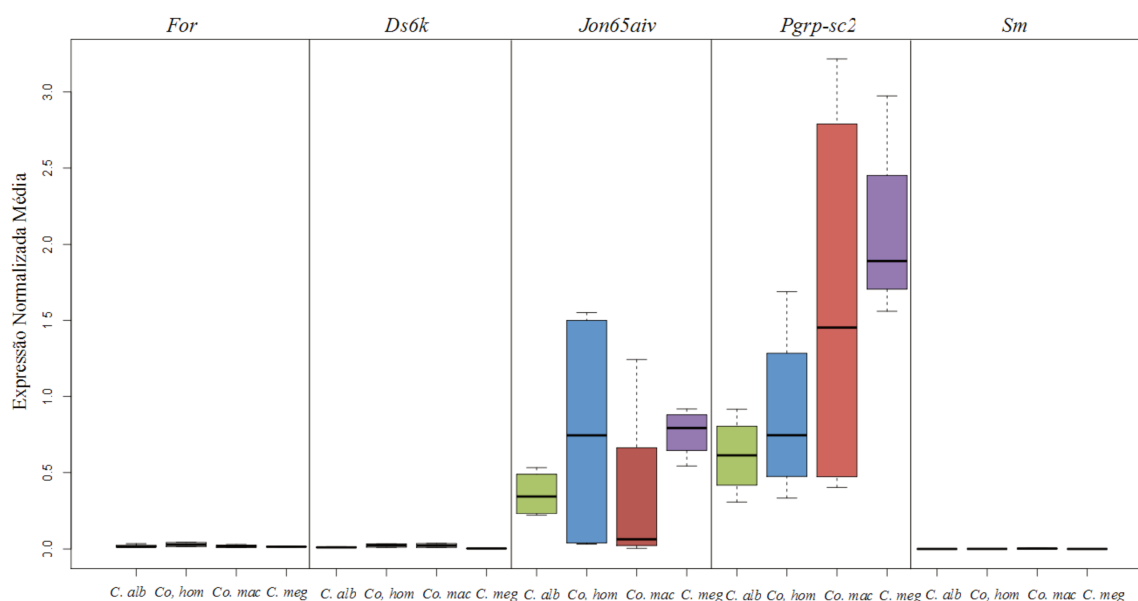


Figura 3. Expressão dos genes *For*, *Jon65aiv*, *Pgrp-sc2*, *Ds6k* e *Sm* em larvas. Em larvas, sete genes tiveram expressão conservada entre as espécies estudadas. Os genes *Jon65aiv* e *Pgrp-sc2* tiveram uma variância intraespecífica maior em relação aos outros genes, no entanto, os dados de expressão se sobrepõem e não observamos diferenças significativas na expressão desses genes.

A expressão de outros cinco genes (*Ds6k*, *For*, *Jon65aiv*, *Pgrp-sc2* e *Sm*; Anexo 1) não variou entre as diferentes espécies estudadas no estágio larval. Ou seja, incluindo os genes descritos anteriormente, a expressão de sete candidatos foi conservada nas larvas, indicando

que alterações nos níveis de expressão desses genes estão sob forte ação da seleção purificadora. Provavelmente, os produtos nos níveis adequados de cada candidato selecionado sejam essenciais para a sobrevivência das larvas nos diferentes substratos (tecido vivo ou tecido em decomposição).

Outros trabalhos, utilizando uma abordagem de expressão gênica global também observaram a ação predominante da seleção purificadora na evolução da expressão gênica (Lemos *et al.* 2005; Brawand *et al.* 2011). Como exemplo, podemos citar o trabalho de Brawand e colaboradores (2011) que utilizaram o transcriptoma de seis tecidos (cérebro, cerebelo, coração, rim, fígado e testículos) de nove espécies de mamíferos, entre eles: primatas, marsupial, roedor e monotremado. Como resultado eles observaram a ação da predominate da seleção purificadora na expressão gênica em roedores. Nos tecidos neurais foi observada uma taxa de evolução ainda lenta e acredita-se que isso seja resultado de uma atuação maior da seleção purificadora nesses tecidos.

O gene *Sm* é expresso nos neurônios responsáveis pela quimiorrecepção e os mutantes desse gene não são capazes de se alimentar, morrendo precocemente (Layalle *et al.* 2005). Apesar de esse gene ser potencialmente interessante para o estudo do hábito alimentar, observamos uma diferença na expressão gênica mas não associada com hábito alimentar (Anexo 1 e 2).

O gene *For*, por sua vez, codifica uma proteína quinase dependente de GMP cíclico (PKG) que participa da modulação da divisão de trabalho em algumas espécies sociais, como *Apis mellifera*, e do comportamento forrageiro em larvas e moscas adultas de *D. melanogaster* (Ben-Shahar *et al.* 2002; Ben-Shahar 2005; Scharlaken *et al.* 2008). Esse gene foi diferencialmente expresso entre espécies em fêmeas adultas, mas esse mesmo padrão não

foi observado em machos nem em larvas (Figura 4; Anexo 1).

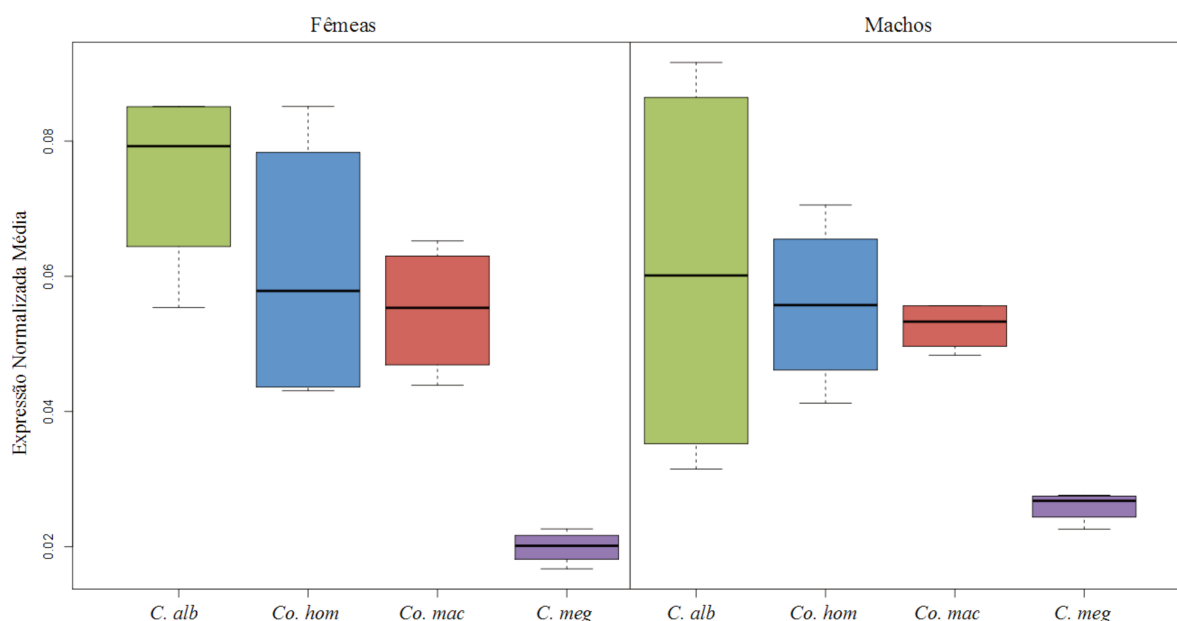


Figura 4. Expressão do *For* em fêmeas e machos adultos. O gene *For* foi diferencialmente expresso entre espécies somente em fêmeas adultas. No entanto, em machos houve uma diferença que não foi significativa devido a grande variância dos nossos dados.

Esse contraste entre sexos e estágios também foi observada para outros três genes: *Ds6K*, *Jon65aiv* e *Pgrp-sc2* (Anexo 2). Nos genes *Ds6K* e *Jon65aiv*, a expressão foi conservada em larvas e fêmeas e diferente entre as espécies nas amostras de machos adultos. E, no *Pgrp-sc2* foi conservada em machos e larvas e diferente entre espécies de fêmeas adultas.

Ao observar diferenças na expressão somente em um dos estágios ou um dos sexos, podemos inferir que mudanças regulatórias ocorreram em regiões do gene que afetam a expressão somente nesses indivíduos. Isso requer a atuação de diferentes proteínas regulatórias ou a existência de diferentes módulos regulatórios, ou seja, essas mudanças poderiam ser do tipo *trans* ou do tipo *cis*, respectivamente.

No caso de mudanças do tipo *trans*, diferentes fatores de transcrição (ou ativadores)

atuariam nos diferentes estágios/sexos e a variação entre as diferentes espécies teria ocorrido no gene que codifica o fator envolvido na regulação somente no estágio/sexo que apresenta a diferença na expressão, por exemplo, em machos no gene *Ds6k*. Dessa forma o nível de expressão em fêmeas e larvas se manteria.

Já no caso de mudanças do tipo *cis*, a diferença entre as espécies estaria no próprio gene. Para explicar a conservação do nível de expressão em um estágio e uma variação em outro, podemos inferir a atuação de diferentes módulos regulatórios na regulação da expressão desses genes. Assim, poderíamos explicar a diferença na expressão através de mutações em somente um dos módulos regulatórios que regulam a expressão somente no estágio ou sexo.

Uma de nossas hipóteses é a presença de variações regulatórias que evoluem neutramente, portanto acumularam linearmente ao tempo de divergência das espécies. Uma maneira de testarmos essa hipótese é relacionar o tempo de divergência e a diferença de expressão entre as espécies. No entanto, até o momento não temos informações do tempo de divergência entre espécies da família Calliphoridae, por isso nós utilizamos a distância genética entre as espécies calculada com quatro marcadores, sendo dois do genoma mitocondrial (COI e 16S) e dois do genoma nuclear (18S e ITS2). Assim, foi possível observar que o nível de expressão dos genes *Ds6k* e *Jon65aiv*, em machos, evolui neutramente (Figura 5). Nossos resultados corroboram com (Whitehead & Crawford 2006) que analisaram a variação da expressão gênica entre população de peixes (*Fundulus heteroclitus*) e inferiram a presença de variações não adaptativas (neutras) correlacionando a distância genética calculada com microssatélites e as variações de expressões entre as diferentes populações.

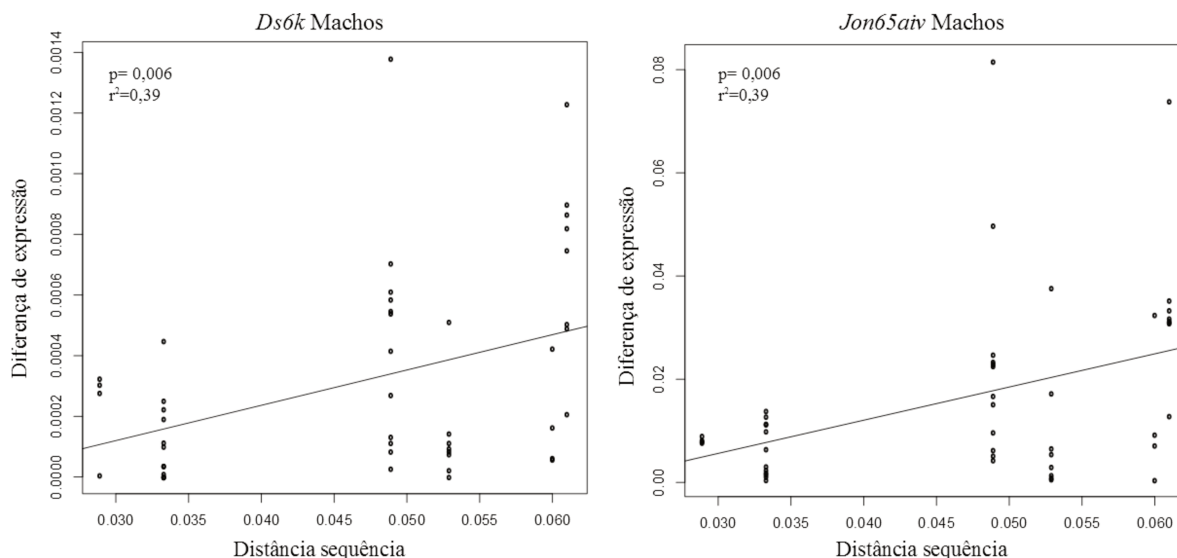


Figura 5. Correlação da diferença de expressão e distância genética. As diferenças de expressão dos genes *Jon65aiv* e *Ds6k*, em machos, têm correlação significativa com as distâncias genéticas entre as espécies estudada a partir dos dados concatenados das sequências dos marcadores COI, 16S, 28S e ITS2.

Finalmente, o gene *Malvolio*, foi aquele em que encontramos as maiores diferenças no nível de expressão (Figura 6). Esse gene foi estudado em *D. melanogaster* e *A. mellifera* (ortólogo *Ammvl*), é expresso no sistema nervoso central e está envolvido com a via de transdução de sinal gustatório, aumentando a resposta ao estímulo desses insetos aos açúcares. Utilizando mutantes de *D. melanogaster* para o gene *Mvl* em estudos prévios, foi observada uma resposta anormal quanto ao gosto, uma vez que as moscas escolhiam aleatoriamente entre um meio contentando sacarose e um meio contendo apenas ágar sem qualquer valor nutritivo (Orgad *et al.* 1998). Os sinais gustatórios têm grande importância na avaliação nutritiva dos alimentos para os animais, assim eles são capazes de responder às suas necessidades metabólicas podendo se desenvolver e dar continuidade ao seu ciclo de vida (Melcher & Pankratz 2005). Isto é, genes responsáveis pelo sinal de transdução gustatório como o *Mvl* podem estar ligados à preferência alimentar. Para esse gene foi observado, nos dois estágios e gêneros estudados, que a diferença de expressão possivelmente está associada ao hábito alimentar (Anexo 1). Também é possível que esse

gene esteja sob seleção positiva.

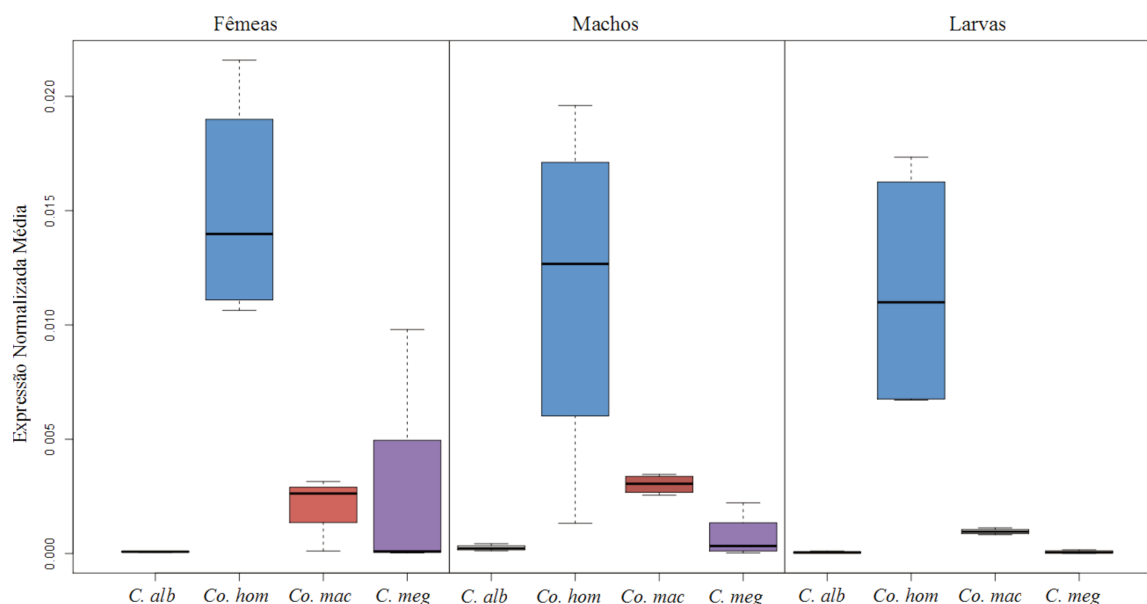


Figura 6. Expressão do gene *Mvl*. O gene *Mvl* foi diferencialmente expresso entre hábitos alimentares em fêmeas, machos e larvas. É possível observar que nos três casos a espécie parasita apresenta uma expressão diferente de todas as espécies necrófagas. Além disso, esse foi o gene com as maiores diferenças nos níveis de expressão. Por exemplo, o *Mvl* foi, aproximadamente, 277 vezes mais expresso em *Co. Hominivorax* em relação a *C. Albiceps*.

Mesmo sendo prematuro afirmar que o gene *Mvl* está ligado ao hábito necrófago ou parasita na família Calliphoridae, nossos resultados abriram o caminho para investigarmos detalhadamente a relação desse gene com os diferentes hábitos alimentares de califorídeos. No início deste projeto, ainda não havia nenhuma informação sobre genes envolvidos no hábito alimentar em califorídeos. Este projeto não só abriu as portas para estudarmos a evolução do hábito de parasitismo como foi essencial para fornecer as bases para estudos funcionais em Calliphoridae. Este foi o primeiro e fundamental passo para a investigação da evolução do hábito de parasitismo. Agora, para dar continuidade a este estudo, nosso grupo realizará a análise da expressão global dessas espécies incluindo *C. bezziana* (parasita restrita ao velho mundo). Com isso, será possível identificar novos genes

candidatos e procurar por padrões específicos das espécies parasitas *Co. hominivorax* e *C. bezziana*. Para entendermos melhor a relação do gene *Mvl* ao comportamento alimentar será necessário realizar ensaios de preferência alimentar (estimulação da escolha alimentar, por exemplo), analisando como a expressão do *Mvl* é modulada em situações diferentes.

Referências

- Abzhanov, A., W. P. Kuo, C. Hartmann, B. R. Grant, P. R. Grant, and C. J. Tabin. 2006. The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches. *Nature* 442 (7102):563-567.
- Abzhanov, A., M. Protas, B. R. Grant, P. R. Grant, and C. J. Tabin. 2004. Bmp4 and morphological variation of beaks in Darwin's finches. *Science* 305 (5689):1462-1465.
- Amrein, H. 2004. Pheromone perception and behavior in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 14 (4):435-442.
- Ben-Shahar, Y. 2005. The foraging gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191 (11):987-994.
- Ben-Shahar, Y., A. Robichon, M. B. Sokolowski, and G. E. Robinson. 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* 296 (5568):741-744.
- Bowman, R. I. 1961. Morphological differentiation and adaptation in the Galapagos finches. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 58:202-213.
- Brawand, D., M. Soumillon, A. Necsulea, P. Julien, G. Csardi, P. Harrigan, M. Weier, A. Liechti, A. Aximu-Petri, M. Kircher, F. W. Albert, U. Zeller, P. Khaitovich, F. Grutzner, S. Bergmann, R. Nielsen, S. Paabo, and H. Kaessmann. 2011. The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature* 478 (7369):343-348.
- Carvalho, R. A. 2007. Isolamento e caracterização do gene da esterase relacionado à resistência a inseticidas organofosforados na mosca praga da pecuária *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), Universidade de Campinas.
- Carvalho, R. A., A. M. Azeredo-Espin, and T. T. Torres. 2010. Deep sequencing of New World screw-worm transcripts to discover genes involved in insecticide resistance. *BMC Genomics* 11:695.
- Catts, E. P., and M. L. Goff. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annu Rev Entomol* 37:253-272.
- Chan, Y. B., and E. A. Kravitz. 2007. Specific subgroups of FruM neurons control sexually dimorphic patterns of aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (49):19577-19582.

- de Carvalho, R. A., T. T. Torres, and A. M. de Azeredo-Espin. 2006. A survey of mutations in the *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and the molecular identification of mutant alleles. *Vet Parasitol* 140 (3-4):344-351.
- Dudai, Y., Y. N. Jan, D. Byers, W. G. Quinn, and S. Benzer. 1976. dunce, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (5):1684-1688.
- Dworkin, I., and C. D. Jones. 2009. Genetic changes accompanying the evolution of host specialization in *Drosophila sechellia*. *Genetics* 181 (2):721-736.
- Enard, W., P. Khaitovich, J. Klose, S. Zollner, F. Heissig, P. Giavalisco, K. Nieselt-Struwe, E. Muchmore, A. Varki, R. Ravid, G. M. Doxiadis, R. E. Bontrop, and S. Paabo. 2002. Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* 296 (5566):340-343.
- Erzinçlioglu, Y. Z. 1989. The origin of parasitism in blowflies. *Brit. J. Ent. Nat. Hist.* 2:125-127.
- Farine, J. P., V. Raghavan, V. Raghavan, and V. Raghavan. 1996. Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. *Phytochemistry* 41 (721:736).
- Gillman, H. 1992. The new world screwworm eradication program, North Africa 1988-1992: Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 192.
- Greenspan, R. J., and J. F. Ferveur. 2000. Courtship in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 34:205-232.
- Grisi, L., C. L. Massard, G. E. Moya, and J. B. Pereira. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora veterinária* 21 (125):8-10.
- Guerrini, V. H. 1988. Ammonia toxicity and alkalosis in sheep infested by *Lucilia cuprina* larvae. *Int J Parasitol* 18 (1):79-81.
- Guerrini, V. H. 1997. Excretion of ammonia by *Lucilia cuprina* larvae suppresses immunity in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 56 (3-4):311-317.
- Guimarães, J., and N. Papavero. 1999. *Myiasis in man and animals in the neotropical region- Bibliographic database*: São Paulo: Plêiade.
- Hodgins-Davis, A., and J. P. Townsend. 2009. Evolving gene expression: from G to E to GxE. *Trends Ecol Evol* 24 (12):649-658.
- Khaitovich, P., I. Hellmann, W. Enard, K. Nowick, M. Leinweber, H. Franz, G. Weiss, M. Lachmann, and S. Paabo. 2005. Parallel patterns of evolution in the genomes and transcriptomes of humans and chimpanzees. *Science* 309 (5742):1850-1854.
- Kimura, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence* Cambridge, New York: Cambridge Univ. Press.
- King, M. C., and A. C. Wilson. 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 188 (4184):107-116.
- Layalle, S., E. Coessens, A. Ghysen, and C. Dambly-Chaudiere. 2005. Smooth, a hnRNP encoding gene, controls axonal navigation in *Drosophila*. *Genes Cells* 10 (2):119-125.

- Legal, L., B. Chappe, and J. M. Jallon. 1994. Molecular basis of *Morinda citrifolia* (L.): toxicity on *Drosophila*. *J Chem Ecol* 20:1931-1943.
- Legal, L., J. R. David, and J. M. Jallon. 1992. Toxicity and attraction effects produced by *Morinda citrifolia* fruits on the *Drosophila melanogaster* complex of species. *Chemoecology* 3:125-129.
- Lemos, B., C. D. Meiklejohn, M. Caceres, and D. L. Hartl. 2005. Rates of divergence in gene expression profiles of primates, mice, and flies: stabilizing selection and variability among functional categories. *Evolution* 59 (1):126-137.
- Lessinger, A. C., A. C. Martins Junqueira, T. A. Lemos, E. L. Kemper, F. R. da Silva, A. L. Vettore, P. Arruda, and A. M. Azeredo-Espin. 2000. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Mol Biol* 9 (5):521-529.
- Lyra, M. L., L. B. Klaczko, and A. M. Azeredo-Espin. 2009. Complex patterns of genetic variability in populations of the New World screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Med Vet Entomol* 23 Suppl 1:32-42.
- Marinho, M. A., A. C. Junqueira, D. F. Paulo, M. C. Esposito, M. H. Villet, and A. M. Azeredo-Espin. 2012. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: Insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Mol Phylogenet Evol*.
- Matsuo, T., S. Sugaya, J. Yasukawa, T. Aigaki, and Y. Fuyama. 2007. Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*. *PLoS Biol* 5 (5):e118.
- Melcher, C., and M. J. Pankratz. 2005. Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain. *PLoS Biol* 3 (9):e305.
- Nuzhdin, S. V., M. L. Wayne, K. L. Harmon, and L. M. McIntyre. 2004. Common pattern of evolution of gene expression level and protein sequence in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 21 (7):1308-1317.
- Omar, A. H. 1995. Cannibalism and predation behaviour of the blowfly, *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) larvae (Diptera: Calliphoridae). *J Egypt Soc Parasitol* 25 (3):729-743.
- Ometto, L., D. Shoemaker, K. G. Ross, and L. Keller. 2011. Evolution of gene expression in fire ants: the effects of developmental stage, caste, and species. *Mol Biol Evol* 28 (4):1381-1392.
- Orgad, S., H. Nelson, D. Segal, and N. Nelson. 1998. Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant *malvolio*. *J Exp Biol* 201 (Pt 1):115-120.
- Porter, T. D., and M. J. Coon. 1991. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 266 (21):13469-13472.

- R'Kha, S., P. Capy, and J. R. David. 1991. Host-plant specialization in the *Drosophila melanogaster* species complex: a physiological, behavioral, and genetical analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (5):1835-1839.
- Rifkin, S. A., J. Kim, and K. P. White. 2003. Evolution of gene expression in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Nat Genet* 33 (2):138-144.
- Ritchie, M. G., E. J. Halsey, and J. M. Gleason. 1999. *Drosophila* song as a species-specific mating signal and the behavioural importance of Kyriacou & Hall cycles in *D. melanogaster* song. *Anim Behav* 58 (3):649-657.
- Ryner, L. C., S. F. Goodwin, D. H. Castrillon, A. Anand, A. Villella, B. S. Baker, J. C. Hall, B. J. Taylor, and S. A. Wasserman. 1996. Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the fruitless gene. *Cell* 87 (6):1079-1089.
- Scharlaken, B., D. C. de Graaf, K. Goossens, L. J. Peelman, and F. J. Jacobs. 2008. Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge. *Dev Comp Immunol* 32 (8):883-889.
- Sereno, J. R. B., J. B. Catto, and F. T. P. S. Sereno. 1996. Prevenção de miíases umbilicais em bezerros criados extensivamente, no Pantanal, através da utilização de ivermectin. *Comunicado técnico – Embrapa Pantanal* 16:1-5.
- Shewell, G. 1987. Calliphoridae. pp. 1133-1186. In McAlpine, J.F. *Manual of Nearctic Diptera*. Research Branch, Agriculture Canada, Monograph 28.
- Slater, P. J. B., and T. R. Halliday. 1994. *Behaviour and Evolution*: Cambridge University Press.
- Sokolowski, M. B. 2001. *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nat Rev Genet* 2 (11):879-890.
- Stevens, J. R., and J. F. Wallman. 2006. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part I): phylogenetic analyses. *Trends Parasitol* 22 (3):129-136.
- Targowski, S. P., W. Klucinski, S. Babiker, and B. J. Nonnecke. 1984. Effect of ammonia on in vivo and in vitro immune responses. *Infect Immun* 43 (1):289-293.
- Tellam, R. L., and V. M. Bowles. 1997. Control of blowfly strike in sheep: current strategies and future prospects. *Int J Parasitol* 27 (3):261-273.
- Tirosh, I., N. Barkai, and K. J. Verstrepen. 2009. Promoter architecture and the evolvability of gene expression. *J Biol* 8 (11):95.
- Torres, T. T., and A. M. Azeredo-Espin. 2009. Population genetics of New World screwworm from the Caribbean: insights from microsatellite data. *Med Vet Entomol* 23 Suppl 1:23-31.
- Vargas-Téran, M., H. C. Hofmann, and N. E. Tweddle. 2005. Impact of Screwworm eradication programmes using insect sterile technique. pp. 629-650. In Dyck, V.A., Hendrichs, J., and Robinson, A.S. (Eds) *Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

- Whitehead, A., and D. L. Crawford. 2006. Neutral and adaptive variation in gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (14):5425-5430.
- Wray, G. A., M. W. Hahn, E. Abouheif, J. P. Balhoff, M. Pizer, M. V. Rockman, and L. A. Romano. 2003. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 20 (9):1377-1419.
- Wu, Q., Y. Zhang, J. Xu, and P. Shen. 2005a. Regulation of hunger-driven behaviors by neural ribosomal S6 kinase in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (37):13289-13294.
- Wu, Q., Z. Zhao, and P. Shen. 2005b. Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y- and insulin-like systems. *Nat Neurosci* 8 (10):1350-1355.
- Zhong, Y., V. Budnik, and C. F. Wu. 1992. Synaptic plasticity in *Drosophila* memory and hyperexcitable mutants: role of cAMP cascade. *J Neurosci* 12 (2):644-651.
- Zhong, Y., and C. F. Wu. 1991. Altered synaptic plasticity in *Drosophila* memory mutants with a defective cyclic AMP cascade. *Science* 251 (4990):198-201.
- Zumpt, F. 1965. *Myiasis in man and animals in the Old World*: London: Butterworths.

ANEXOS

Anexo 1

Teste ANOVA com dois fatores, hábito e espécie.

Gene	Estágio	Fator	gl	SQ	MSQ	F	p valor
<i>Cyp6g2</i>	Fêmeas adultas	Hábito	1	0.00038364	0.00038364	5.822	0,03
		Espécie	2	0.00010122	0.00005061	0.768	0,49
	Larvas	Hábito	1	0.02186200	0.02186150	4.653	0,05
		Espécie	2	0.00369900	0.00184950	0.394	0,68
	Machos adultos	Hábito	1	0.00018397	0.00018397	4.620	0,05
		Espécie	2	0.00000945	0.00000473	0.119	0,89
<i>For</i>	Fêmeas adultas	Hábito	1	0.00036990	0.00036985	2.023	0,18
		Espécie	2	0.00617030	0.00308514	16.875	0,0003*
	Larvas	Hábito	1	0.00028310	0.00028310	3.256	0,10
		Espécie	2	0.00070889	0.00035444	4.076	0,04
	Machos adultos	Hábito	1	0.00026170	0.00026171	0.972	0,34
		Espécie	2	0.00266390	0.00133195	4.945	0,03
<i>Gdh</i>	Fêmeas adultas	Hábito	1	0.00002000	0.00001970	0.004	0,95
		Espécie	2	0.00256700	0.00128330	0.229	0,80
	Larvas	Hábito	1	0.00017600	0.00017618	0.063	0,81
		Espécie	2	0.00602100	0.00301037	1.076	0,37
	Machos adultos	Hábito	1	0.00071665	0.00071665	3.517	0,09
		Espécie	2	0.00092320	0.00046160	2.265	0,15
<i>Jon65aiv</i>	Fêmeas adultas	Hábito	1	0,0950650	0,0950650	11,596	0,01*
		Espécie	2	0,0547380	0,0273690	3,339	0,07
	Larvas	Hábito	1	0,3638000	0,3637600	1,045	0,38
		Espécie	2	0,1908000	0,0953800	0,274	0,47
	Machos adultos	Hábito	1	0,0319320	0,0319320	9,637	0,03
		Espécie	2	0,0615630	0,0307820	9,290	0,01*
<i>Mvl</i>	Fêmeas adultas	Hábito	1	0.09734600	0.09734600	9.719	0,00003*
		Espécie	1	0.06873600	0.03436800	3.431	0,60

	Larvas	Hábito	1	0.00037269	0.00037269	48.307	0,00002*
		Espécie	1	0.00000217	0.00000108	0.140	0,87
	Machos adultos	Hábito	1	0.00031396	0.00031396	20.563	0,0007*
		Espécie	1	0.00001764	0.00000882	0.578	0,58
<i>Pgrp</i>	Fêmeas adultas	Hábito	1	0.00411180	0.00411180	5.194	0,04
		Espécie	2	0.01784750	0.00892370	11.272	0,002*
	Larvas	Hábito	1	0.94600000	0.94602000	1.400	0,26
		Espécie	2	4.51220000	2.25612000	3.339	0,07
	Machos adultos	Hábito	1	0.00296560	0.00296560	4.985	0,05
		Espécie	2	0.00662020	0.00331010	5.564	0,02*
<i>Ds6k</i>	Fêmeas adultas	Hábito	1	0.00166460	0.00166463	5.822	0,03
		Espécie	2	0.00030900	0.00015452	0.540	0,06
	Larvas	Hábito	1	0.00037610	0.00037610	3.749	0,08
		Espécie	2	0.00002806	0.00001403	0.140	0,87
	Machos adultos	Hábito	1	0.00063351	0.00063351	7.831	0,02
		Espécie	2	0.00111552	0.00055776	6.894	0,01
<i>Smooth</i>	Fêmeas adultas	Hábito	1	0.00000031	0.00000031	0.003	0,96
		Espécie	2	0.00161037	0.00080518	6.471	0,01*
	Larvas	Hábito	1	0.00000075	0.00000075	0.387	0,55
		Espécie	2	0.00001959	0.00000980	5.037	0,03
	Machos adultos	Hábito	1	0.00003264	0.00003264	0.280	0,61
		Espécie	2	0.00288753	0.00144377	12.381	0,001*

gl, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; MSQ, média da soma dos quadrados

* Valores significativos: $p < 0,01$.

Anexo 2

Diferença da expressão gênica entre espécies (p-valores obtidos pelo teste Tukey HSD).			
Gene	Estágio	Espécies	P-valor
<i>For</i>	Fêmeas	<i>C. hominivorax</i> - <i>C. albiceps</i>	0.09
		<i>C. macellaria</i> - <i>C. albiceps</i>	0.22
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. albiceps</i>	0.0005*
		<i>C. macellariamac</i> - <i>C.hominivorax</i>	0.95
		<i>C. megacepahla</i> - <i>C. hominivorax</i>	0.04
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. macellaria</i>	0.01*
<i>Jon65aiv</i>	Machos	<i>C. hominivorax</i> - <i>C. albiceps</i>	0.22
		<i>C. macellaria</i> - <i>C. albiceps</i>	0.01*
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. albiceps</i>	0.20
		<i>C. macellariamac</i> - <i>C.hominivorax</i>	0.25
		<i>C. megacepahla</i> - <i>C. hominivorax</i>	1.00
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. macellaria</i>	0.29
<i>Mvl</i>	Fêmeas	<i>C. hominivorax</i> - <i>C. albiceps</i>	0.13
		<i>C. macellaria</i> - <i>C. albiceps</i>	0.004*
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. albiceps</i>	0.13
	Machos	<i>C. macellariamac</i> - <i>C.hominivorax</i>	0.16
		<i>C. megacepahla</i> - <i>C. hominivorax</i>	0.01*
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. macellaria</i>	0.16
<i>Pgrp-sc2</i>	Fêmeas	<i>C. hominivorax</i> - <i>C. albiceps</i>	0.25
		<i>C. macellaria</i> - <i>C. albiceps</i>	0.58
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. albiceps</i>	0.003*
		<i>C. macellariamac</i> - <i>C.hominivorax</i>	0.91
		<i>C. megacepahla</i> - <i>C. hominivorax</i>	0.10
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. macellaria</i>	0.03
	Machos	<i>C. hominivorax</i> - <i>C. albiceps</i>	0.58
		<i>C. macellaria</i> - <i>C. albiceps</i>	0.88
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. albiceps</i>	0.03
		<i>C. macellariamac</i> - <i>C.hominivorax</i>	0.94
		<i>C. megacepahla</i> - <i>C. hominivorax</i>	0.29
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. macellaria</i>	0.12
<i>Ds6k</i>	Machos	<i>C. hominivorax</i> - <i>C. albiceps</i>	0.23
		<i>C. macellaria</i> - <i>C. albiceps</i>	0.02
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. albiceps</i>	0.11
		<i>C. macellariamac</i> - <i>C.hominivorax</i>	0.42
		<i>C. megacepahla</i> - <i>C. hominivorax</i>	0.97
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. macellaria</i>	0.69
<i>Sm</i>	Fêmeas	<i>C. hominivorax</i> - <i>C. albiceps</i>	0.84
		<i>C. macellaria</i> - <i>C. albiceps</i>	0.06
		<i>C. megacephala</i> - <i>C. albiceps</i>	0.98

	<i>C. macellariamac</i> - <i>C.hominivorax</i>	0.22
	<i>C. megacepahla</i> - <i>C. hominivorax</i>	0.62
	<i>C. megacephala</i> - <i>C. macellaria</i>	0.03
	<i>C. hominivorax</i> - <i>C. albiceps</i>	0.61
	<i>C. macellaria</i> - <i>C. albiceps</i>	0.01*
Machos	<i>C. megacephala</i> - <i>C. albiceps</i>	0.98
	<i>C. macellariamac</i> - <i>C.hominivorax</i>	0.06
	<i>C. megacepahla</i> - <i>C. hominivorax</i>	0.40
	<i>C. megacephala</i> - <i>C. macellaria</i>	0.004*

* Valores significativos: $p < 0,01$.

Anexo 3

Níveis de RNA mensageiro dos genes candidatos.

Species	Life Stage/sex	Gene	Replicata	MNE (<i>Rp49</i>)	MNE (<i>Gapdh</i>)	MNE
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	1	0,00081	0,00052	0,00066
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	2	0,00071	0,00049	0,00060
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	3	0,00073	0,00019	0,00046
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	4	0,00157	0,00038	0,00098
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	1	0,02848	0,02551	0,02700
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	2	0,03770	0,01896	0,02833
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	3	0,00411	0,00195	0,00303
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	4	0,00397	0,00245	0,00321
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	1	0,02507	0,01361	0,01934
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	2	0,00660	0,00339	0,00499
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	3	0,00636	0,00224	0,00430
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	4	0,00358	0,00134	0,00246
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	1	0,00539	0,00222	0,00381
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	2	0,00705	0,00352	0,00528
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	3	0,00598	0,00222	0,00410
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Cyp6gl</i>	4	0,00300	0,00105	0,00203
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	1	0,01727	0,00418	0,01072
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	2	0,08465	0,01880	0,05172
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	3	0,08452	0,03585	0,06018
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	4	0,07243	0,03627	0,05435
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	1	0,15789	0,35147	0,25468
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	2	0,16684	0,25539	0,21112
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	3	0,00723	0,00293	0,00508
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	4	0,00644	0,00274	0,00459
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	1	0,00278	0,00323	0,00300
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	2	0,00349	0,00524	0,00436
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	3	0,01264	0,00406	0,00835
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	4	0,02960	0,00895	0,01927
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	1	0,02166	0,00437	0,01301
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	2	0,09460	0,03125	0,06293
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	3	0,09401	0,03451	0,06426
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Cyp6gl</i>	4	0,07787	0,02189	0,04988
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	1	0,00412	0,00159	0,00285
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	2	0,00046	0,00020	0,00033
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	3	0,00488	0,00110	0,00299
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	4	0,01686	0,00340	0,01013
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	1	0,04040	0,01408	0,02724

<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	2	0,02486	0,01116	0,01801
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	3	0,00390	0,00148	0,00269
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	4	0,00474	0,00299	0,00387
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	1	0,01013	0,00423	0,00718
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	2	0,01006	0,00370	0,00688
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	3	0,00769	0,00232	0,00501
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	4	0,00877	0,00305	0,00591
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	1	0,00852	0,00262	0,00557
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	2	0,00911	0,00286	0,00598
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	3	0,00791	0,00262	0,00527
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Cyp6gl</i>	4	0,00494	0,00178	0,00336
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	1	0,10285	0,06726	0,08505
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	2	0,09130	0,05558	0,07344
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	3	0,13475	0,03548	0,08512
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	4	0,08726	0,02348	0,05537
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	1	0,08221	0,06083	0,07152
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	2	0,11185	0,05839	0,08512
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	3	0,05810	0,02803	0,04307
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	4	0,05980	0,02851	0,04416
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	1	0,08256	0,04790	0,06523
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	2	0,07519	0,04634	0,06076
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	3	0,06725	0,02051	0,04388
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	4	0,07420	0,02562	0,04991
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	1	0,02723	0,01418	0,02070
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	2	0,02255	0,01660	0,01958
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	3	0,02553	0,00794	0,01673
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Ds6k</i>	4	0,03430	0,01091	0,02260
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	1	0,02445	0,00654	0,01549
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	2	0,01788	0,00454	0,01121
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	3	0,01287	0,00462	0,00874
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	4	0,01369	0,00554	0,00962
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	1	0,02353	0,04089	0,03221
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	2	0,02436	0,04094	0,03265
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	3	0,01409	0,00625	0,01017
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	4	0,01970	0,00675	0,01323
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	1	0,02717	0,03928	0,03323
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	2	0,02283	0,04779	0,03531
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	3	0,01581	0,00478	0,01029
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	4	0,01583	0,00460	0,01021
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	1	0,00604	0,00155	0,00379
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	2	0,00401	0,00191	0,00296

<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	3	0,00404	0,00108	0,00256
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Ds6k</i>	4	0,00787	0,00174	0,00480
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	1	0,13815	0,04509	0,09162
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	2	0,11454	0,04798	0,08126
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	3	0,05156	0,01144	0,03150
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	4	0,06495	0,01300	0,03898
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	1	0,09069	0,03022	0,06046
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	2	0,10033	0,04076	0,07054
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	3	0,06223	0,02025	0,04124
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	4	0,06609	0,03595	0,05102
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	1	0,07825	0,03298	0,05562
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	2	0,06516	0,03150	0,04833
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	3	0,08946	0,02184	0,05565
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	4	0,07478	0,02717	0,05097
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	1	0,04085	0,01439	0,02762
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	2	0,03775	0,01699	0,02737
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	3	0,03413	0,01101	0,02257
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Ds6k</i>	4	0,04069	0,01173	0,02621
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>For</i>	1	0,00630	0,00391	0,00510
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>For</i>	2	0,00432	0,00217	0,00324
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>For</i>	3	0,04451	0,01172	0,02811
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>For</i>	4	0,26317	0,09019	0,17668
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>For</i>	1	0,00087	0,00064	0,00075
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>For</i>	2	0,00757	0,00429	0,00593
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>For</i>	3	0,02468	0,01191	0,01829
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>For</i>	4	0,30920	0,08982	0,19951
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>For</i>	1	0,00656	0,00381	0,00519
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>For</i>	2	0,01083	0,00659	0,00871
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>For</i>	3	0,09832	0,02998	0,06415
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>For</i>	4	0,09264	0,03751	0,06508
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>For</i>	1	0,02531	0,01318	0,01924
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>For</i>	2	0,05681	0,04181	0,04931
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>For</i>	3	0,06078	0,01889	0,03984
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>For</i>	4	0,29164	0,06440	0,17802
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>For</i>	1	0,14810	0,03958	0,09384
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>For</i>	2	0,03119	0,05241	0,04180
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>For</i>	3	0,09174	0,03295	0,06234
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>For</i>	4	0,02818	0,01344	0,02081
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>For</i>	1	0,04346	0,07553	0,05949
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>For</i>	2	0,03604	0,07545	0,05574
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>For</i>	3	0,24137	0,10708	0,17423

<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>For</i>	4	0,10675	0,03686	0,07181
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>For</i>	1	0,10407	0,15046	0,12727
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>For</i>	2	0,15613	0,03968	0,09790
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>For</i>	3	0,28664	0,08658	0,18661
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>For</i>	4	0,04153	0,01118	0,02635
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>For</i>	1	0,22734	0,05823	0,14279
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>For</i>	2	0,05391	0,02575	0,03983
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>For</i>	3	0,17371	0,04623	0,10997
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>For</i>	4	0,06425	0,02044	0,04234
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>For</i>	1	0,00544	0,00187	0,00366
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>For</i>	2	0,00759	0,00309	0,00534
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>For</i>	3	0,03224	0,00715	0,01970
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>For</i>	4	0,05526	0,01106	0,03316
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>For</i>	1	0,01554	0,00518	0,01036
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>For</i>	2	0,02177	0,01053	0,01615
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>For</i>	3	0,02340	0,00761	0,01550
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>For</i>	4	0,00645	0,00351	0,00498
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>For</i>	1	0,07724	0,03255	0,05490
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>For</i>	2	0,01336	0,00554	0,00945
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>For</i>	3	0,08595	0,02099	0,05347
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>For</i>	4	0,04161	0,01512	0,02836
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>For</i>	1	0,05155	0,01816	0,03485
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>For</i>	2	0,01861	0,00838	0,01349
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>For</i>	3	0,04811	0,01552	0,03181
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>For</i>	4	0,05938	0,01712	0,03825
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	1	0,00227	0,00146	0,00187
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	2	0,00683	0,00466	0,00575
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	3	0,00689	0,00182	0,00436
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	4	0,00507	0,00123	0,00315
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	1	0,15156	0,11087	0,13122
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	2	0,53839	0,26522	0,40180
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	3	0,37937	0,17987	0,27962
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	4	0,42129	0,25970	0,34050
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	1	0,07427	0,03354	0,05391
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	2	0,12674	0,06502	0,09588
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	3	0,43095	0,15204	0,29149
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	4	0,41125	0,15332	0,28228
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	1	0,42242	0,17417	0,29829
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	2	0,10223	0,04499	0,07361
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	3	0,15083	0,05608	0,10345
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Gdh</i>	4	0,13207	0,03546	0,08376

<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	1	0,85763	0,20767	0,53265
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	2	0,72934	0,16197	0,44566
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	3	0,30904	0,13107	0,22005
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	4	0,32446	0,16250	0,24348
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	1	0,96160	2,14059	1,55110
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	2	1,14360	1,75063	1,44711
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	3	0,04449	0,01801	0,03125
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	4	0,06325	0,02693	0,04509
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	1	1,06994	1,41538	1,24266
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	2	0,00364	0,00546	0,00455
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	3	0,12676	0,04071	0,08374
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	4	0,06154	0,01861	0,04007
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	1	1,24367	0,25086	0,74726
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	2	0,81681	0,26985	0,54333
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	3	1,34242	0,49284	0,91763
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Gdh</i>	4	1,31335	0,36915	0,84125
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	1	0,00396	0,00153	0,00275
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	2	0,01036	0,00452	0,00744
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	3	0,01746	0,00395	0,01070
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	4	0,02121	0,00428	0,01274
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	1	0,30371	0,10966	0,20669
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	2	0,17871	0,08020	0,12945
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	3	0,45034	0,17138	0,31086
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	4	0,24450	0,15395	0,19922
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	1	0,11136	0,04653	0,07895
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	2	0,22366	0,08227	0,15297
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	3	0,53155	0,16015	0,34585
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	4	0,38860	0,13510	0,26185
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	1	0,18894	0,05803	0,12349
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	2	0,15258	0,04791	0,10025
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	3	0,22454	0,07436	0,14945
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Gdh</i>	4	0,13072	0,04700	0,08886
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00007	0,00004	0,00006
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	2	0,00012	0,00008	0,00010
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00009	0,00002	0,00005
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00016	0,00004	0,00010
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	1	0,02277	0,02039	0,02158
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	2	0,02184	0,01098	0,01641
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	3	0,01539	0,00770	0,01155
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	4	0,01392	0,00736	0,01064
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00396	0,00233	0,00315

<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	2	0,00013	0,00009	0,00011
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00409	0,00121	0,00265
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00404	0,00115	0,00260
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00004	0,00002	0,00003
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	2	0,01290	0,00671	0,00980
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00010	0,00004	0,00007
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00016	0,00005	0,00011
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00005	0,00001	0,00003
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	2	0,00005	0,00001	0,00003
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00016	0,00005	0,00011
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00006	0,00003	0,00005
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00941	0,02094	0,01517
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	2	0,01245	0,02222	0,01734
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00973	0,00370	0,00671
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00995	0,00367	0,00681
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00084	0,00112	0,00098
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	2	0,00072	0,00153	0,00112
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00146	0,00041	0,00093
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00124	0,00040	0,00082
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00001	0,00000	0,00001
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	2	0,00004	0,00001	0,00002
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00013	0,00004	0,00008
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00025	0,00006	0,00016
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00064	0,00022	0,00043
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	2	0,00035	0,00016	0,00025
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00019	0,00004	0,00012
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00033	0,00006	0,00020
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	1	0,02908	0,01013	0,01960
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	2	0,00190	0,00075	0,00132
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	3	0,02282	0,00642	0,01462
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	4	0,01419	0,00725	0,01072
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00375	0,00134	0,00255
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	2	0,00524	0,00168	0,00346
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00526	0,00131	0,00329
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00443	0,00120	0,00281
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	1	0,00004	0,00001	0,00003
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	2	0,00322	0,00121	0,00222
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	3	0,00072	0,00021	0,00047
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Jon65aiv</i>	4	0,00029	0,00008	0,00019
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	1	0,00042	0,00026	0,00034
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	2	0,00069	0,00046	0,00058

<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	3	0,00092	0,00022	0,00057
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	4	0,00061	0,00017	0,00039
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	1	0,00662	0,00507	0,00584
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	2	0,00197	0,00112	0,00154
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	3	0,00201	0,00088	0,00145
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	4	0,00206	0,00104	0,00155
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	1	0,01195	0,00649	0,00922
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	2	0,01261	0,00674	0,00968
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	3	0,06573	0,01731	0,04152
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	4	0,06858	0,02099	0,04479
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	1	0,21715	0,10816	0,16266
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	2	0,09702	0,04505	0,07104
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	3	0,15065	0,04214	0,09640
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Mvl</i>	4	0,05800	0,01842	0,03821
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	1	1,11602	0,27657	0,69630
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	2	1,51455	0,31801	0,91628
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	3	0,46019	0,15597	0,30808
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	4	0,77366	0,28627	0,52996
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	1	0,57560	1,18369	0,87965
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	2	1,20913	2,16664	1,68789
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	3	0,50524	0,16338	0,33431
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	4	0,86335	0,36547	0,61441
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	1	2,78721	3,64592	3,21657
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	2	1,99316	2,73302	2,36309
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	3	0,63988	0,16789	0,40388
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	4	0,86422	0,21856	0,54139
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	1	3,23650	0,62144	1,92897
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	2	2,41886	0,70000	1,55943
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	3	4,65001	1,29786	2,97394
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Mvl</i>	4	3,07321	0,62577	1,84949
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	1	0,05885	0,02467	0,04176
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	2	0,00205	0,00084	0,00144
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	3	0,00583	0,00126	0,00354
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	4	0,00257	0,00047	0,00152
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	1	0,00346	0,00143	0,00244
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	2	0,00161	0,00081	0,00121
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	3	0,00270	0,00088	0,00179
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	4	0,00901	0,00486	0,00693
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	1	0,01329	0,00540	0,00935
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	2	0,00772	0,00333	0,00552
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	3	0,09918	0,02690	0,06304

<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	4	0,03278	0,00803	0,02041
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	1	0,07636	0,02386	0,05011
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	2	0,05543	0,01725	0,03634
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	3	0,18834	0,04783	0,11808
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Mvl</i>	4	0,09702	0,02957	0,06329
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,02389	0,01580	0,01984
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,03006	0,02036	0,02521
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,07843	0,02246	0,05044
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,08574	0,02178	0,05376
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,09165	0,08208	0,08686
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,11349	0,05706	0,08528
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,04556	0,02429	0,03493
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,05800	0,03286	0,04543
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,06664	0,03800	0,05232
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,06341	0,04008	0,05175
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,05588	0,01551	0,03569
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,07295	0,02031	0,04663
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,03942	0,02145	0,03043
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,03972	0,01996	0,02984
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,04829	0,01589	0,03209
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,07558	0,01808	0,04683
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,02339	0,00614	0,01476
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,02296	0,00566	0,01431
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,01822	0,00618	0,01220
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,02113	0,04656	0,03385
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,02849	0,05826	0,04337
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,02737	0,04947	0,03842
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,02297	0,00923	0,01610
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,02281	0,00910	0,01595
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,02665	0,03065	0,02865
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,00903	0,03528	0,02215
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,01745	0,00503	0,01124
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,01393	0,00470	0,00932
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,02482	0,00587	0,01534
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,02113	0,00724	0,01419
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,02111	0,00484	0,01298
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,02883	0,00751	0,01817
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,02775	0,01036	0,01906
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,04823	0,02014	0,03418
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,03395	0,00770	0,02083
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,02776	0,00879	0,01827

<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,07642	0,02825	0,05234
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,07848	0,03746	0,05797
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,07360	0,02349	0,04855
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,05779	0,02947	0,04363
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,07870	0,04022	0,05946
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,06933	0,02587	0,04760
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,07667	0,02719	0,05193
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,03321	0,01793	0,02557
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	1	0,05770	0,02192	0,03981
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	2	0,06598	0,02369	0,04484
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	3	0,05656	0,01659	0,03658
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Pgrp-sc2</i>	4	0,05335	0,01656	0,03496
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Sm</i>	1	0,01578	0,00989	0,01284
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Sm</i>	2	0,01975	0,01335	0,01655
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Sm</i>	3	0,04147	0,01009	0,02578
<i>C. albiceps</i>	Adult females	<i>Sm</i>	4	0,03752	0,01019	0,02385
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Sm</i>	1	0,01341	0,01028	0,01184
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Sm</i>	2	0,02234	0,01268	0,01751
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Sm</i>	3	0,05291	0,02308	0,03799
<i>Co. hominivorax</i>	Adult females	<i>Sm</i>	4	0,04884	0,02470	0,03677
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Sm</i>	1	0,03991	0,01568	0,02779
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Sm</i>	2	0,04402	0,01936	0,03169
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Sm</i>	3	0,09019	0,02162	0,05591
<i>Co. macellaria</i>	Adult females	<i>Sm</i>	4	0,08445	0,02585	0,05515
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Sm</i>	1	0,01363	0,00679	0,01021
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Sm</i>	2	0,01346	0,00625	0,00986
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Sm</i>	3	0,03533	0,00988	0,02260
<i>C. megacephala</i>	Adult females	<i>Sm</i>	4	0,03638	0,01155	0,02397
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Sm</i>	1	0,00030	0,00007	0,00018
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Sm</i>	2	0,00032	0,00007	0,00019
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Sm</i>	3	0,00033	0,00011	0,00022
<i>C. albiceps</i>	Larvae	<i>Sm</i>	4	0,00039	0,00015	0,00027
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Sm</i>	1	0,00058	0,00119	0,00089
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Sm</i>	2	0,00077	0,00131	0,00104
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Sm</i>	3	0,00054	0,00017	0,00035
<i>Co. hominivorax</i>	Larvae	<i>Sm</i>	4	0,00046	0,00019	0,00033
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Sm</i>	1	0,00503	0,00665	0,00584
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Sm</i>	2	0,00315	0,00647	0,00481
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Sm</i>	3	0,00085	0,00022	0,00053
<i>Co. macellaria</i>	Larvae	<i>Sm</i>	4	0,00105	0,00027	0,00066
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Sm</i>	1	0,00048	0,00009	0,00029

<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Sm</i>	2	0,00025	0,00007	0,00016
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Sm</i>	3	0,00054	0,00013	0,00034
<i>C. megacephala</i>	Larvae	<i>Sm</i>	4	0,00058	0,00012	0,00035
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Sm</i>	1	0,02348	0,00985	0,01666
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Sm</i>	2	0,03150	0,01285	0,02217
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Sm</i>	3	0,05116	0,01105	0,03110
<i>C. albiceps</i>	Adult males	<i>Sm</i>	4	0,04893	0,00889	0,02891
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Sm</i>	1	0,05399	0,02228	0,03813
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Sm</i>	2	0,03411	0,01717	0,02564
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Sm</i>	3	0,07006	0,02276	0,04641
<i>Co. hominivorax</i>	Adult males	<i>Sm</i>	4	0,05171	0,02788	0,03979
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Sm</i>	1	0,06343	0,02580	0,04462
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Sm</i>	2	0,05433	0,02342	0,03887
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Sm</i>	3	0,10066	0,02731	0,06399
<i>Co. macellaria</i>	Adult males	<i>Sm</i>	4	0,12334	0,03023	0,07679
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Sm</i>	1	0,02138	0,00668	0,01403
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Sm</i>	2	0,02892	0,00900	0,01896
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Sm</i>	3	0,04136	0,01255	0,02695
<i>C. megacephala</i>	Adult males	<i>Sm</i>	4	0,04182	0,01274	0,02728
