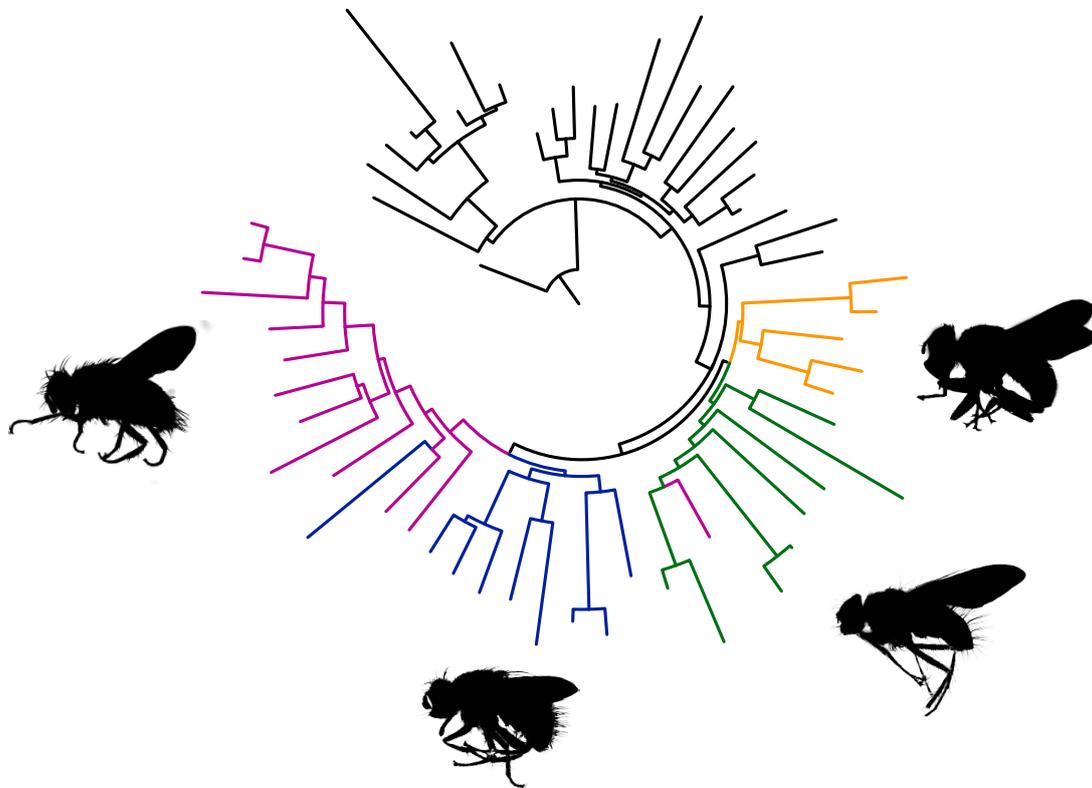


Departamento de Zoologia
Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo

Letícia Chiara Baldassio de Paula

Filogenia molecular de Tachinidae (Diptera, Brachycera, Calyptratae) baseado em sequenciamento de nova geração, com enfoque nos limites e relações subfamiliares

Molecular Phylogeny of Tachinidae (Diptera, Brachycera, Calyptratae) based on next-generation sequencing, focusing on subfamilies boundaries and relationships



São Paulo
2021

Resumo

Tachinidae é uma das maiores famílias da ordem Diptera. Elas são encontradas em praticamente todos os ambientes terrestres pelo mundo, incluindo desertos, florestas, pastagens, montanhas e tundra. Apresentamos aqui uma análise filogenômica dessa família utilizando dados transcriptômicos. A análise é baseada em 36 espécies do grupo interno que compõem os taquinídeos, e 23 espécies do grupo externo, representando as outras famílias de Oestroidea. Três matrizes foram montadas: 100% de cobertura (92 genes codificadores de proteínas de cópia única), 75% de cobertura (1304 genes codificadores de proteínas de cópia única) e 50% de cobertura (1890 genes codificadores de proteínas de cópia única). De modo geral, as topologias são bem resolvidas, com alto suporte nos nós e com poucas alterações entre as três árvores obtidas com variação de cobertura e com diferentes métodos de análise (máxima verossimilhança, máxima parcimônia). A maioria dos nós na análise de Máxima Verossimilhança possui 100% de suporte de *ultrafast bootstrap*. As análises de Máxima Parcimônia também possuem estabilidade de 100% de jackknife ou bootstrap em quase todos os nós. Entretanto, a árvore de máxima parcimônia também apresenta mais variação em suas análises de suporte por Bremer, variando entre 125 e 18442. Esse estudo recuperou as quatro subfamílias de Tachinidae com o seguinte relacionamento: Phasiinae + Dexiinae e Tachininae + Exoristinae. Importante ressaltar alguns resultados interessantes obtidos no estudo. A tribo Myiophasiini (Tachininae) formou uma linhagem separada, aparecendo como grupo-irmão de todos os outros Tachinidae. A tribo Neotropical Iceliini (previamente em Tachininae) é recuperada dentro de Exoristinae, irmão de *Winthemia*. Por fim, Masyphyini (previamente em Exoristinae) é recuperado dentro de Dexiinae, próximo de Dexiini. De modo geral, nossos resultados são congruentes com estudos recentes envolvendo a família Tachinidae. Espera-se que esses resultados possam formar uma base para estudos futuros sobre a filogenia de Tachinidae.

Abstract

The Tachinidae is one of the largest families of Diptera. They are found in nearly all terrestrial environments throughout the world, including deserts, forests, grasslands, mountains, and tundra. A phylogenomic analyses of Tachinidae using transcriptomic data is presented here. The analyses are based on 36 species for the ingroup, composing the tachinids, and 23 species for the outgroup, representing the other Oestroidea families. Were constructed three datasets: 100% coverage (92 single-copy protein-coding genes), 75% coverage (1304 single-copy protein-coding genes), and 50% coverage (1890 single-copy protein-coding genes). Overall, the obtained topologies are well resolved, with strong node support and small changes among the trees obtained with variation of coverage and different approaches (maximum likelihood, maximum parsimony). Most nodes in Maximum Likelihood analyses have 100% ultrafast bootstrap support. The Maximum Parsimony analyses also show stability with 100% support with jackknife and bootstrap in almost every node. However, the maximum parsimony tree presents more variation with Bremer support ranging from 125 to 18442. The analyses recovered the four tachinid subfamilies with the following relationship: Phasiinae + Dexiinae and Tachininae + Exoristinae. Interestingly, the tribe Myiophasiini (Tachininae) forms a different lineage, a clade sister to all the remaining Tachinidae. The Neotropical tribe Iceliini (former Tachininae) is recovered within Exoristinae, sister to *Winthemia*. Also, Masyphyini (former Exoristinae) is recovered within Dexiinae, close to Dexiini. In general, results presented herein are congruent with recent studies that include tachinids. Hopefully, these results can be a scaffold for future studies with Tachinidae phylogeny.

Introdução Geral



Tachinidae é uma das maiores famílias em número de espécies da ordem Diptera, com aproximadamente 8.500 espécies descritas (O'Hara, 2013). A diversidade da família é muito grande, principalmente na região neotropical, que possui 3.032 espécies em 775 gêneros e 57 tribos (O'Hara & Henderson, 2020). Tachinidae é apresentada como um grupo verdadeiro a partir de oito apomorfias não homoplásticas: plastrão dorsal do ovo ausente, membrana do ovo sem coloração, ovolarviparidade, mandíbulas reduzidas no primeiro instar larval, labro fortemente desenvolvido no primeiro instar, subescutelo fortemente convexo, ovissaco da fêmea muito longo e geralmente espiralado quando cheio, e ovissaco da fêmea envelopado por uma rede traqueal bem desenvolvida (Cerretti *et al.*, 2014). É caracterizado por suas larvas serem endoparasitóides de artrópodes, em sua maioria insetos. Dessa forma, atuam como reguladores de populações de grandes grupos de Coleoptera, Hemiptera e Lepidoptera, e, por isso, são extremamente importantes para controle biológico de pragas agrícolas (Stireman *et al.*, 2006).

As subfamílias de Tachinidae tem um longo histórico de mudanças e incertezas nas classificações. Crosskey (1976) propôs cinco subfamílias, baseando-se nas características de quetotaxia e pruiniosidade: Phasiinae, Dufouriinae, Proseninae, Tachininae e Goniinae. Herting (1984), por sua vez, propôs quatro subfamílias utilizando prioritariamente aspectos biológicos e adaptações como critério: Exoristinae, Tachininae, Phasiinae e Dexiinae. Wood (1987), baseado em caracteres morfológicos como quetotaxia, morfologia dos ovos, além de comportamento de oviposição e relação parasita-hospedeiro, sugeriu as mesmas quatro subfamílias. Atualmente, essa classificação em quatro subfamílias é a mais amplamente aceita (Herting, 1984; Wood, 1987; O'Hara & Wood, 2004; Cerretti *et al.*, 2014), com aproximadamente 50 tribos (O'Hara & Wood, 2004), porém um estudo recente (Santis, 2016) demonstra que talvez uma quinta subfamília possa ser reconhecida.

Apesar da monofilia e composição de Tachinidae estar relativamente estável, questões sobre sua origem e relações dentro de Oestroidea não estão. Em particular a identidade do grupo-irmão de Tachinidae permanece como uma incerteza, incluindo Sarcophagidae (Pape, 1992; Rognes, 1997), "Calliphoridae" (Wiegmann *et al.*, 2011), Mesembrinellidae (Marinho *et al.*, 2012), Oestridae (Zhang *et al.*, 2016), e Rhinophoridae + Polleniinae (Kutty *et al.*, 2010) e Polleniinae (Nelson *et al.*, 2012; Singh & Wells, 2013; Winkler *et al.*, 2015; Cerretti *et al.*, 2017; Blaschke *et al.*, 2018; Cerretti *et al.*, 2019; Kutty *et al.*, 2019; Stireman *et al.*, 2019; Buenaventura *et al.*, 2020).

Devido à grande quantidade de homoplasias e reversões morfológicas, a classificação de subgrupos de Tachinidae mostrou-se muito complexa. Assim, alguns pesquisadores começaram a utilizar dados moleculares para tentar definir e detalhar melhor essas relações. Stireman (2002) e Tachi & Shima (2010) apresentaram os primeiros estudos moleculares sobre Tachinidae, com enfoque na subfamília Exoristinae. Stireman (2002) utilizou dois genes (28S rDNA e EFI) recuperando somente Exoristinae como monofilético. A classificação encontrada das subfamílias foi “Tachinidae” + “Phasiinae” e “Dexiinae” + Exoristinae. Por outro lado, Tachi & Shima (2010) usaram quatro genes (16S, 18S, 28S rDNA e *White*). Eles recuperaram Tachinidae e Exoristinae como monofiléticos e o relacionamento das subfamílias como a seguinte: “Dexiinae” + (“Phasiinae” + (“Tachininae” + Exoristinae)). Ambos os estudos encontraram Sarcophagidae como grupo irmão de Tachinidae. Tanto Stireman (2002), quanto Tachi & Shima (2010) obtiveram uma amostragem taxonômica muito baixa para as outras subfamílias que não eram o enfoque do estudo.

Cerretti *et al.* (2014) apresentaram a primeira análise morfológica da família Tachinidae, com amostragem de 492 espécies. Esse estudo mostrou algumas relações diferentes do que previamente obtido. Phasiinae e Exoristinae foram recuperados como monofiléticos. Em contrapartida, Tachininae foi recuperado como polifilético com a linhagem Myiophasiini + Palpostomatini como grupo-irmão de todos os tachinídeos restantes. Dexiinae também foi encontrado como polifilético com Eutherini dentro de Exoristinae. A relação das subfamílias é recuperada como “Dexiinae” + Phasiinae e Exoristinae + “Tachininae”.

Blaschke *et al.* (2018) apresentaram uma análise filogenética detalhada focada na subfamília Phasiinae utilizando quatro genes nucleares codificadores de proteína. Eles confirmaram as relações subfamiliares de Cerretti *et al.* (2014), apresentando Phasiinae + Dexiinae e Exoristinae + Tachininae, com todos monofiléticos. Blaschke *et al.* (2018) recuperaram Polleniidae como grupo-irmão de Tachinidae.

Stireman *et al.* (2019) conduziram a análise molecular mais detalhada da família até o momento. Eles usaram quatro genes (28S rDNA, CAD, MAC, MCS) com uma amostragem de 504 terminais. A família e as subfamílias Phasiinae e Exoristinae foram recuperados como monofiléticas. Tachininae mais uma vez é recuperada como polifilética com as linhagens Myiophasiini + Macquartini como grupo-irmão de todos os outros tachinídeos. Polleniidae também é recuperado como grupo-irmão de Tachinidae.

Recentemente, Kutty *et al.* (2019) apresentaram a primeira hipótese filogenômica para Calyptratae baseado em dados de transcriptomas. Amostraram 40 espécies de Calyptratae de 14 diferentes famílias e 1 espécie de *Drosophila melanogaster* como grupo externo. Tachinidae foi obtida como monofilética e o seguinte relacionamento entre subfamílias (“Dexiinae” + Phasiinae) + (“Tachininae” + Exoristinae). O grupo-irmão de Tachinidae também foi recuperado como Polleniidae. Kutty *et al.* (2019) afirmaram também que a relação entre as subfamílias de Tachinidae é ainda controversa, principalmente, devido ao fato de Dexiinae e Tachininae possivelmente não serem monofiléticas. Até o momento, não há nenhum estudo publicado com sequenciamento de nova geração para a família Tachinidae.

Os estudos com transcriptomas abriram caminho para estudar informações genéticas e funcionais armazenadas em qualquer organismo em escala e velocidade sem precedentes (Haas *et al.*, 2013). Sendo o transcriptoma somente uma fração do genoma, os dados de RNA-Seq podem prover um caminho muito mais rápido e relativamente barato, ao alcance de qualquer laboratório com recursos razoáveis (Haas *et al.*, 2013).

De acordo com Hittinger *et al.* (2010), transcriptomas oferecem fontes alternativas de sequência de ortólogos que são mais fáceis de amostrar do que genomas completos por três motivos. Primeiro, depois do processamento de RNA, transcriptomas são tipicamente muito menores do que um genoma. Segundo, transcriptomas contêm poucas regiões de sequências simples e elementos repetitivos. E terceiro, a grande abundância e desigualdade de transcritos (que variam em mais de cinco ordens de magnitude) significa que mesmo sequências de baixa cobertura devem fornecer uma profundidade de algumas centenas de loci simplesmente por sequenciar transcritos em proporção à sua representação na biblioteca.

Apesar da recente disseminação de estudos filogenéticos moleculares em Diptera, em sua maioria com sequenciamento tradicional ou genoma mitocondrial, ainda não há trabalhos com NGS especificamente para Tachinidae. O enfoque principal desse projeto é analisar sequências de transcriptomas e genes ortólogos para compreender as relações entre as subfamílias de Tachinidae.

Essa dissertação possui um capítulo em formato de artigo científico. Já está escrito na língua inglesa, porém a revista científica para submissão ainda não foi escolhida.

Conclusão Geral



Nós obtivemos uma filogenia muito bem suportada baseada em dados transcriptômicos e genes ortólogos. Encontramos um alto suporte para a monofilia de Tachinidae e para Polleniidae como seu grupo-irmão. Nossas análises recuperaram Phasiinae como monofilética, Dexiinae como parafilética, e Exoristinae e Tachininae como polifiléticas. As tribos Masyphyini e Iceliini são recuperadas com relações diferentes do que encontrado anteriormente na literatura. Um estudo mais detalhado deve ser feito com essas tribos para confirmar suas posições filogenéticas dentro das subfamílias. A quinta linhagem de Tachinidae é um resultado que foi encontrado algumas vezes recentemente, incluindo nesse estudo. O aumento de amostragem para as tribos dessa linhagem pode nos dar uma resposta definitiva para sua posição na família, e no futuro, a possível criação de uma nova subfamília.

Nossos resultados são muito semelhantes aos estudos recentes, que amostraram e/ou tem enfoque em Tachinidae. No entanto, um aumento da amostragem e uma ampliação nos tipos de dados usados nas análises (e.g., morfologia, elementos ultra conservados, fisiologia) seria o próximo passo para resolver as questões que ainda estão em aberto. Com isso, nós teremos um entendimento filogenético de Tachinidae nos níveis de subfamília e tribos. Certamente, esse entendimento irá contribuir para a compreensão de questões futuras, como diversidade histórica, origem do parasitismo e até uma possível mudança na classificação interna da família.

Referências

- Blaschke J.D., Stireman J.O., O'Hara J.E., Cerretti P., Moulton J.K. 2018. Molecular phylogenetics and piercer evolution in the bug-killing flies (Diptera: Tachinidae: Phasiinae): Phasiine phylogenetics and piercer evolution. *Systematic Entomology*. 43:218–238.
- Buenaventura E., Lloyd M.W., Perilla López J.M., González V.L., Thomas-Cabianca A., Dikow T. 2020. Protein-encoding ultraconserved elements provide a new phylogenomic perspective of Oestroidea flies (Diptera: Calyptratae). *Syst Entomol*. <https://doi.org/10.1111/syen.12443>.
- Cerretti P., O'Hara J.E., Wood D.M., Shima H., Inclan D.J., Stireman J.O. 2014. Signal through the noise? Phylogeny of the Tachinidae (Diptera) as inferred from morphological evidence: Phylogeny of Tachinidae. *Syst Entomol*. 39:335–353.
- Cerretti P., Stireman J.O., Pape T., O'Hara J.E., Marinho M.A.T., Rognes K., Grimaldi D.A. 2017. First fossil of an oestroid fly (Diptera: Calyptratae: Oestroidea) and the dating of oestroid divergences. *PLoS ONE*. 12: e0182101.
- Cerretti P., Stireman J.O., Badano D., Gisondi S., Rognes K., Giudice G.L., Pape T. 2019. Reclustering the cluster flies (Diptera: Oestroidea, Polleniidae). *Syst Entomol*. 44:957–972.
- Crosskey R.W. 1976. A taxonomic conspectus of the Tachinidae (Diptera) of the Oriental Region. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology*. 26:357.
- Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., MacManes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., LeDuc R.D., Friedman N., Regev A. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc*. 8:1494–1512.
- Herting B. 1984. Catalogue of Palearctic Tachinidae (Diptera). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde*. 369:228.
- Hittinger C.T., Johnston M., Tossberg J.T., Rokas A. 2010. Leveraging skewed transcript abundance by RNA-Seq to increase the genomic depth of the tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:1476–1481.
- Kutty S.N., Pape T., Wiegmann B.M., Meier R. 2010. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily

- Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Systematic Entomology*. 35:614–635.
- Kutty S.N., Meusemann K., Bayless K.M., Marinho M.A.T., Pont A.C., Zhou X., Misof B., Wiegmann B.M., Yeates D., Cerretti P., Meier R., Pape T. 2019. Phylogenomic analysis of Calyptratae: resolving the phylogenetic relationships within a major radiation of Diptera. *Cladistics*. 35, 605-622.
- Marinho M.A.T., Junqueira A.C.M., Paulo D.F., Esposito M.C., Villet M.H., Azeredo-Espin A.M.L. 2012. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: Insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 65:840–854.
- Nelson L.A., Lambkin C.L., Batterham P., Wallman J.F., Dowton M., Whiting M.F., Yeates D.K., Cameron S.L. 2012. Beyond barcoding: A mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Gene*. 511:131–142.
- O Hara J. 2013. History of tachinid classification (Diptera, Tachinidae). *ZK*. 316:1–34.
- O'Hara J.E., Henderson S.J. 2020. World Genera of the Tachinidae (Diptera) and their regional occurrence. Version 11.0. PDF document, 90pp. Available from: http://www.nadsdiptera.org/Tach/WorldTachs/Genera/Gentach_ver11.pdf (accessed on 9 March 2021).
- O'Hara J.E., Wood D.M. 2004. Catalogue of the Tachinidae (Diptera) of America north of Mexico. Gainesville, Fla: Associated Publishers.
- Pape T. 1992. Phylogeny of the Tachinidae Family-Group (Diptera: Calyptratae). *Tijdschrift voor Entomologie*. 135:43–86.
- Rognes K. 1997. The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are Not a Monophyletic Group1. *Cladistics*. 13:27–66.
- Santis M.D. 2016. Análise cladística da tribo Dufouriini (Diptera, Tachinidae). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Singh B., Wells J.D. 2013. Molecular Systematics of the Calliphoridae (Diptera: Oestroidea): Evidence from One Mitochondrial and Three Nuclear Genes. *J Med Entomol*. 50:15–23.

- Stireman J.O. 2002. Phylogenetic relationships of tachinid flies in subfamily Exoristinae (Tachinidae: Diptera) based on 28S rDNA and elongation factor-1 α : Phylogeny of Exoristinae (Tachinidae). *Systematic Entomology*. 27:409–435.
- Stireman J.O., O'Hara J.E., Wood D.M. 2006. TACHINIDAE: Evolution, Behavior, and Ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 51:525–555.
- Stireman J.O., Cerretti P., O'Hara J.E., Blaschke J.D., Moulton J.K. 2019. Molecular phylogeny and evolution of world Tachinidae (Diptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 139:106358.
- Tachi T., Shima H. 2010. Molecular phylogeny of the subfamily Exoristinae (Diptera, Tachinidae), with discussions on the evolutionary history of female oviposition strategy. *Systematic Entomology*. 35:148–163.
- Wiegmann B.M., Trautwein M.D., Winkler I.S., Barr N.B., Kim J.-W., Lambkin C., Bertone M.A., Cassel B.K., Bayless K.M., Heimberg A.M., Wheeler B.M., Peterson K.J., Pape T., Sinclair B.J., Skevington J.H., Blagoderov V., Caravas J., Kutty S.N., Schmidt-Ott U., Kampmeier G.E., Thompson F.C., Grimaldi D.A., Beckenbach A.T., Courtney G.W., Friedrich M., Meier R., Yeates D.K. 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108:5690–5695.
- Winkler I.S., Blaschke J.D., Davis D.J., Stireman J.O., O'Hara J.E., Cerretti P., Moulton J.K. 2015. Explosive radiation or uninformative genes? Origin and early diversification of tachinid flies (Diptera: Tachinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 88:38–54.
- Wood D.M. 1987. Tachinidae. In: McAlpine J.F., editor. *Manual of Nearctic Diptera*. Biosystematics Research Centre, Ottawa, Ontario. p. 1193–1269.
- Zhang D., Yan L., Zhang M., Chu H., Cao J., Li K., Hu D., Pape T. 2016. Phylogenetic inference of calyptrates, with the first mitogenomes for Gasterophilinae (Diptera: Oestridae) and Paramacronychiinae (Diptera: Sarcophagidae). *Int. J. Biol. Sci.* 12:489–504.