



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Biociências

Amanda de Faria Santos

Filogeografia comparada de *Nasutitermes corniger*, *N. ephratae* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* (Isoptera: Termitidae: Syntermitinae): efeitos da biogeografia neotropical nos padrões populacionais

São José do Rio Preto
2022

Amanda de Faria Santos

Filogeografia comparada de *Nasutitermes corniger*, *N. ephratae* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* (Isoptera: Termitidae: Syntermitinae): efeitos da biogeografia neotropical nos padrões populacionais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, como requisito para a obtenção de título de Doutora em Biociências.
Financiadora: CAPES.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Coletto Morales
Coorientadora: Profa. Dra. Eliana Marques Cancelllo

São José do Rio Preto
2022

S237f

Santos, Amanda de Faria

Filogeografia comparada de *Nasutitermes corniger*, *N. ephratae* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* (Isoptera: Termitidae: Syntermitinae) : efeitos da biogeografia neotropical nos padrões populacionais / Amanda de Faria Santos. -- São José do Rio Preto, 2022
146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Adriana Coletto Morales

Coorientadora: Eliana Marques Cancellato

1. Biologia. 2. Genética. 3. Térmita. I. Título.

Amanda de Faria Santos

Filogeografia comparada de *Nasutitermes corniger*, *N. ephratae* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* (Isoptera: Termitidae: Syntermitinae): efeitos da biogeografia neotropical nos padrões populacionais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, como requisito para a obtenção de título de Doutora em Biociências.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Adriana Coletto Morales
UNESP – São José do Rio Preto/UNESP – Jaboticabal

Prof. Dr. Fernando Barbosa Noll
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Tiago Fernandes Carrijo
Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. Maurício Martins da Rocha
Museu de Zoologia da USP

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini
Universidade Estadual de Campinas

São José do Rio Preto
24 de fevereiro de 2022

A todas as vidas (humanas ou não) ceifadas pelo negacionismo à ciência.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora, professora Adriana, por todos os direcionamentos, orientações e suporte (científico e pessoal) ao longo desses 11 anos de parceria. Entrego essa tese com a certeza de que encerro um ciclo acadêmico ao lado de uma parceira que permanecerá pela minha vida. Um agradecimento enorme, também, à minha coorientadora, professora Eliana, pelas conversas sempre muito assertivas e divertidas, que agregaram muito conhecimento a várias boas risadas. Agradeço também à professora Janete Desidério, junto à equipe do Laboratório de Genética de Bactérias da FCAV/UNESP, por ceder o espaço e os equipamentos necessários para os procedimentos laboratoriais desse trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço também a todos os meus amigos que passaram pelo Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE): Abner (*in memoriam*), Fabiana, Gabriela, Juliana, Ludmila, Maria Cecília, Nara (sempre salvadora!), Rafael, Rullian e Thais, com os quais compartilhei bons cafés, artigos e ótimas conversas. Também deixo um *obrigada* de tamanho imenso às minhas amigas Andrezza, Cilene, Emily, Gabriela (“Prima”), Gabriele (“Tostex”), Mariana e Rafaella, que me ajudaram a passar por esses anos de forma mais leve com boas cervejas, viagens incríveis, risadas infinitas e muito apoio.

Toda a minha gratidão à minha família, aos meus pais Laura e Admilson, meus irmãos Alan e Ana Laura e minha sobrinha Nina, pelo amor incondicional e por simplesmente estarem presentes (*as vezes é só disso que a gente precisa, né?*). Agradeço, também, aos meus sogros Rose e Marcos por todo o apoio e cuidado ao longo desses últimos anos.

Por último, um *obrigada* de tamanho imensurável ao meu companheiro de vida, Rullian, por todo o amor, cuidado, atenção e suporte. Passar pelos momentos ruins teria sido muito mais difícil sem você. Obrigada por acreditar tanto em mim, por cuidar da gente, por me oferecer colo, por ser meu parceiro (mesmo!) de todas as horas e por compartilhar comigo a delícia de participar do crescimento do Enzo (meu amor todinho).

*Aquele que não conhece a verdade é simplesmente um ignorante,
mas aquele que a conhece e diz que é mentira, este é um criminoso.*

(BRECHT, 1991, p. 124)

— Ou um *genocida*, como chamamos no Brasil em 2020 e 2021.

RESUMO

A região Neotropical abriga uma das faunas de cupins mais ricas do mundo, onde estão descritas 615 espécies viventes, divididas em cinco famílias. Termitidae, a mais diversa, abrange 437 espécies neotropicais, incluindo os gêneros *Nasutitermes* e *Silvestritermes*. *Nasutitermes corniger* e *N. ephratae* (Termitidae: Nasutitermitinae), assim como os outros representantes da subfamília, são caracterizadas pela presença de um tubo frontal cônico, chamado de *nasus*, localizado na região anterior da cabeça dos soldados. Ambas são espécies neotropicais e de grande amplitude geográfica, com distribuições muito semelhantes. *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri*, assim como os outros Syntermitinae, são caracterizadas pela presença de um grande poro no ápice do tubo frontal, localizado na região dorsal da cabeça de seus soldados, além de um par de mandíbulas fortes e funcionais. Essas espécies também apresentam ampla distribuição neotropical, habitando predominantemente áreas de vegetação aberta e florestas tropicais. Considerando as características de *N. corniger*, *N. ephratae*, *S. euamignathus* e *S. heyeri*, este trabalho teve como objetivo principal avaliar se essas espécies foram, ao longo do tempo, afetadas de forma semelhante pelos eventos históricos e biogeográficos que ocorreram na região Neotropical, resultando em padrões filogeográficos similares entre si. Para isso, foram utilizados os marcadores mitocondriais 16S rRNA e COII para a realização de análises genéticas, demográficas, filogenéticas e filogeográficas. *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* foram analisadas aqui como uma única unidade evolutiva, visto que os dados genéticos obtidos para essas espécies sustentam a hipótese de sinonímia entre elas. Os resultados também mostraram que *N. corniger* e *N. ephratae* apresentam grandes semelhanças em relação às suas histórias demográficas e rotas de dispersão. Os resultados gerados para *Silvestritermes* também evidenciaram semelhanças em relação aos padrões demográficos e filogeográficos observados para as espécies de *Nasutitermes*. Considerando as comparações feitas, foi possível inferir que os fatores históricos da biogeografia da região Neotropical levaram a padrões convergentes em *Nasutitermes* e *Silvestritermes*, mesmo diante de diferenças consistentes em relação aos seus aspectos biológicos.

Palavras-chave: Cupins. Rota de dispersão. História demográfica. Filogeografia comparativa.

ABSTRACT

Termites are eusocial insects of infraorder Isoptera (Blattaria), composed by 2970 living species. The Neotropical region harbors one of the richest termites' fauna, where are described 615 species of termites into five families. Termitidae, the most diverse, harbors 437 neotropical species, including the genera *Nasutitermes* and *Silvestritermes*. *Nasutitermes corniger* and *N. ephratae* (Termitidae: Nasutitermitinae) are characterized by the presence of a conical frontal tube, called *nasus*, located in the anterior region of the soldiers' heads. Both are neotropical species with a wide geographic range and present very similar distributions, including much of Central and South America. *Silvestritermes euamignathus* and *S. heyeri* are characterized by the presence of a large pore at the apex of the frontal tube, located in the dorsal region of the soldiers' head, in addition to a pair of strong and functional jaws. These species also have a wide Neotropical distribution, predominantly inhabiting areas of open vegetation and tropical forests. Considering the characteristics of *N. corniger*, *N. ephratae*, *S. euamignathus*, and *S. heyeri* this study aimed to evaluate if these species were, along the time, similarly affected by the historical and biogeographic events that occurred in the Neotropical region, resulting in phylogeographical patterns similar to each other. For this purpose, we used the mitochondrial molecular markers 16S rRNA and COII for carrying out genetic, demographic, phylogenetic and phylogeographic analyzes. The results showed that *N. corniger* and *N. ephratae* present have great similarities in terms of their demographic histories and dispersal routes. *Silvestritermes euamignathus* and *S. heyeri* were analyzed as a single evolutionary unit; the results generated for these species also showed similarities in relation to the demographic and phylogeographic patterns observed for the *Nasutitermes* species. Considering the comparisons made, it was possible to infer that the biogeographic history of the Neotropical region led to convergent patterns in the two pairs of species, even in the face of consistent differences in relation to their biological aspects.

Keywords: Termites. Dispersal route. Demographic history. Comparative phylogeography.

SUMÁRIO

PRÓLOGO	11
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO 1	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUCTION	21
METHODS	22
RESULTS	26
DISCUSSION	29
CONCLUSIONS.....	34
REFERENCES	34
CAPÍTULO 2	52
RESUMO.....	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	57
3 RESULTADOS.....	66
4 DISCUSSÃO	78
4.1 <i>Nasutitermes corniger</i>	78
4.2 Padrões populacionais em <i>N. corniger</i> e <i>N. ephratae</i>: espécies biologicamente semelhantes respondem de forma similar à biogeografia da região?	85
5 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE.....	98
CAPÍTULO 3	100
RESUMO.....	100
1 INTRODUÇÃO	101
2 MATERIAL E MÉTODOS	105
3 RESULTADOS.....	112
4 DISCUSSÃO	123
5 CONCLUSÃO	128
REFERÊNCIAS.....	130
APÊNDICE.....	135

DISCUSSÃO GERAL	138
CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
REFERÊNCIAS.....	143

PRÓLOGO

A estrutura dessa tese está elaborada de acordo com o que estabelece a *Instrução Normativa nº 06 do Programa de Pós-Graduação em Biociências (IBILCE/UNESP) de 19/04/2013, alterada em 20/12/2016*. Conforme previsto nesse documento, consta nessa tese um manuscrito referente aos resultados obtidos durante o curso de doutorado que foi submetido à publicação em revista indexada. Esse manuscrito compõe o Capítulo 1 da tese, o qual está formatado de acordo com as normas específicas da revista à qual o manuscrito foi submetido. Os Capítulos 2 e 3 estão formatados de acordo com as normas da ABNT vigentes.

Dito isso, vale esclarecer que o Capítulo 1 aborda questões filogeográficas de *Nasutitermes ephratae*; o Capítulo 2, por sua vez, aborda questões de *N. corniger* e, ainda, compara os dados obtidos para essa espécie aos padrões genéticos observados em *N. ephratae*. Por fim, o Capítulo 3 apresenta e discute aspectos filogeográficos de *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri*. A tese ainda consta de uma seção de Introdução Geral e uma de Discussão Geral, que abordam questões que são pertinentes ao três capítulos.

As espécies que foram objeto desse estudo foram escolhidas devido ao fato de (i) apresentarem ampla distribuição; (ii) já terem sido estudadas do ponto de vista genético, o que facilita o acesso à padronização das técnicas moleculares; e (iii) de terem uma boa amostragem já coletada e depositada em coleções entomológicas, o que viabilizou (financeiramente e metodologicamente) um estudo que compreende uma área de distribuição tão extensa como a região Neotropical. Além disso, diante dos objetivos principais desse estudo, consideramos a importância de serem contemplados pares de espécies que apresentam semelhanças *dentro* dos pares e diferenças *entre* os pares.

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos biológicos e diversidade de cupins

Os cupins são insetos eussociais da infraordem Isoptera, composta por 2970 espécies viventes e 201 espécies fósseis (CONSTANTINO, 2020). Também são conhecidos como “baratas sociais” devido a classificação atual de Isoptera como um grupo dentro da ordem Blattaria, que, junto a Mantodea, compõe o grupo Dictyoptera, reconhecidamente monofilético (INWARD et al., 2007a,b; KLASS; MEIER, 2006; BECCALONI; EGGLETON, 2013; ENGEL, 2011; KRISHNA et al., 2013). Isoptera abriga as famílias Archotermopsidae, Hodotermitidae, Kalotermitidae, Mastotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae, Stolotermitidae, Stylotermitidae e Termitidae. Algumas reconstruções filogenéticas ajudaram a esclarecer as relações entre essas famílias e a estabelecer os grupos basais – em todas elas, Mastotermitidae foi recuperado como grupo irmão das demais famílias de Isoptera (INWARD et al., 2007; LEGENDRE et al., 2008; ENGEL; GRIMALDI; KRISHNA, 2009; BOURGUIGNON et al., 2014).

Os cupins vivem em colônias com indivíduos organizados em um sistema de castas bastante complexo, considerando as diferenças taxonômicas entre os grupos de Isoptera. Os soldados (casta mais utilizada para a identificação das espécies) são responsáveis pela defesa da colônia e apresentam, na maioria das vezes, diferenças conspicuas em relação aos operários, com características morfológicas marcantes adaptadas para a defesa. Os operários são responsáveis por tarefas como a manutenção e limpeza do ninho e alimentação do rei e rainha, que, por sua vez, são o par reprodutor da colônia (WILSON, 1971). Apresentam sobreposição de gerações e cuidado cooperativo com a prole, além de comportamentos de grupo complexos e coordenados para construção de ninho e forrageamento (LEGENDRE et al., 2008).

Mais conhecidos como pragas de madeira e outros materiais celulósicos, embora a maioria das espécies não seja xilófaga, os cupins desempenham importantes papéis no ecossistema, como o de “super decompositores” e auxiliares no balanço Carbono-Nitrogênio do solo (HIGASHI; ABE, 1997). Os cupins estão entre os mais abundantes artrópodes terrestres de ecossistemas tropicais (BLACK; OKWAKOL, 1997; JOUQUET et al., 2011) e representam cerca de 10% da biomassa animal dos trópicos (BIGNELL, 2006). Além disso, participam do processo de ciclagem de nutrientes e formação e

aeração do solo, sendo considerados “engenheiros do ecossistema” (LAWTON, 1994; LAVELLE et al., 1997).

Os cupinzeiros, em particular, são estruturas rígidas construídas para abrigar e proteger as colônias. Junto à morfologia dos soldados, as características dos ninhos são frequentemente utilizadas para auxiliar na identificação taxonômica dos cupins. Em algumas regiões, os cupinzeiros dominam a paisagem local devido à elevada densidade de ninhos presentes. Cada cupinzeiro constitui um microambiente particular, podendo envolver incontáveis números de espécies termitófilas ou termitariófilas, como vermes (planárias terrestres e lesmas), outros artrópodes (formigas, abelhas, vespas, miriápodes, aranhas, opiliões, escorpiões, hemípteros, coleópteros, etc.) e pequenos vertebrados (sapos, cobras, lagartos, roedores e aves) (REDFORD, 1984). Alguns ninhos construídos por cupins são como “catedrais de barro”, que podem chegar a seis ou sete metros de altura em espécies africanas do gênero *Macrotermes*, o que corresponde a aproximadamente 600 vezes o tamanho do seu operário (THERAULAZ et al., 1998).

A região Neotropical, área que abriga os biomas e as espécies contempladas neste trabalho, é a terceira em número de espécies conhecidas de cupins, logo depois das regiões Etiópica e Oriental. Nessa região estão descritas, atualmente, 615 espécies que se dividem em cinco famílias: Termitidae, Stolotermitidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae e Serritermitidae. Dentre elas, Termitidae abriga 71% de toda a termitofauna neotropical, com 437 espécies descritas. Entre seus representantes há uma grande diversidade de estratégias de defesa, de construção de ninhos, de hábitos alimentares e de estratégias reprodutivas (DONOVAN; EGGLETON; BIGNELL, et al., 2001; BOURGUIGNON et al., 2011). Considerados cupins “superiores” em uma classificação tradicional, os representantes de Termitidae hospedam uma microbiota intestinal composta por bactérias simbiotes responsáveis pela digestão da celulose – diferentemente dos indivíduos das outras famílias, que hospedam protistas flagelados como simbiotes intestinais. Nesse trabalho, contemplamos questões filogeográficas de quatro espécies de cupins da família Termitidae: *Nasutitermes ephratae* e *N. corniger*, da subfamília Nasutitermitinae, e *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri*, Syntermitinae, cujas características serão apresentadas nos respectivos capítulos.

De modo geral, os cupins podem ser utilizados como organismos modelos bastante promissores para o desenvolvimento de estudos populacionais, biogeográficos e filogeográficos. Isso se deve a características como a grande riqueza, diversidade, abundância e amplitude geográfica de suas espécies. Além disso, sua amostragem não é

excessivamente dificultosa na maioria dos grupos e é independente de sazonalidade (CONSTANTINO, 2005). Diante disso, os estudos com cupins têm grande potencial para fornecer importantes contribuições para a compreensão de questões biogeográficas complexas.

Ferramentas moleculares para genética de populações e filogeografia

A genética de populações busca analisar os padrões de variações genéticas em populações naturais, a fim de que os processos responsáveis por essa variabilidade sejam compreendidos. Atualmente, há diversas ferramentas moleculares capazes de avaliar tais variações em todos os níveis taxonômicos. Junto aos avanços nos modelos genéticos populacionais e nas análises de dados, essas técnicas proporcionam métodos poderosos para inferir a composição genética das colônias e sistemas de reprodução, determinar níveis de endogamia, estimar distâncias de dispersão, caracterizar o grau de diferenciação nas várias escalas espaciais e reconstruir padrões históricos de distribuição (VARGO; HUSSENER, 2011).

Dentre essas ferramentas, o DNA mitocondrial (mtDNA) passou a fazer parte de vários estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e filogeográficas e o entendimento de diversos aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos, inclusive de cupins (LI et al., 2009; JENKINS et al., 2007; AUSTIN et al., 2008; KUTNIK et al., 2004; TRIPODI et al., 2006; PARK et al., 2006; BOURGUIGNON et al., 2010; SANTOS et al., 2017). Trabalhos envolvendo todo o genoma mitocondrial também tem sido realizados e vem sendo bastante eficientes no esclarecimento de relações filogenéticas, origens geográficas de táxons e dispersão global de grupos de cupins (BOURGUIGNON et al., 2014; 2016).

O mtDNA possui características peculiares essenciais para estudos populacionais e filogeográficos, tais como herança materna, ritmo rápido de evolução e alto polimorfismo intraespecífico. Dentre os poucos genes que essa molécula apresenta (37, no total), 13 genes codificam proteínas, 22 codificam RNAs transportadores e dois codificam subunidades ribossômicas. Possui uma região não codificadora rica em adenina e timina nos invertebrados, que parece exercer o controle da replicação e transcrição do mtDNA. O conteúdo gênico é bem conservado, assim como a ordem em que os genes estão organizados (AVISE et al., 1987). O mtDNA de invertebrados bilaterais possui uma taxa de substituições nucleotídicas muito alta, cerca de oito vezes maior que o DNA

nuclear (LYNCH; KOSKELLA; SCHAACK, 2006). Além dessas características, o genoma mitocondrial apresenta múltiplas cópias dentro de uma mesma célula, o que aumenta a facilidade de acesso à informação genética.

Em estudos genéticos populacionais, detectar e quantificar a distribuição da variação genética auxilia no esclarecimento de processos ecológicos e evolutivos. No caso de insetos sociais, a distribuição a nível populacional da variabilidade genética está intimamente relacionada à composição genética da colônia – e não do indivíduo (BANKHEAD-DRONNET et al., 2015). Assim, populações de insetos sociais estão hierarquicamente estruturadas, com indivíduos formando colônias e colônias compondo populações (ROSS, 2001).

A filogeografia, aliada à genética de populações, permite uma ampla compreensão dos fatores envolvidos na evolução a nível intraespecífico. A partir dos padrões obtidos nas análises genéticas populacionais, é possível que se compreendam as inter-relações e os padrões de distribuição geográfica de diferentes agrupamentos genéticos (AVISE et al., 1987). Assim, a filogeografia é capaz de fornecer uma ampla compreensão da história evolutiva da espécie e de esclarecer os processos responsáveis pelo surgimento dos padrões de variação genética. Dados gerados por esses estudos também contribuem para a determinação de medidas que visem à conservação das biotas e biomas, permitindo o direcionamento de maiores esforços para a proteção de áreas que retêm variantes genéticas mais raras e criando zonas de conservação intraespecíficas (AVISE, 2000). Além disso, relacionar a história geográfica de uma região aos padrões populacionais das espécies, bem como mensurar o grau de distanciamento entre diferentes populações, são questões essenciais para a compreensão de uma história biogeográfica ampla e complexa.

A regionalização da região Neotropical

A região Neotropical compreende uma ampla área geográfica que vai do centro-sul do México até o centro-sul da Argentina. É conhecida por sua notável diversidade, resultado da heterogeneidade de habitats e da complexa história geológica da região. Esses fatores, aliados a processos históricos como vicariância, dispersão e extinção, também teriam sido responsáveis pela formação dos padrões de distribuição geográfica das espécies encontradas na região Neotropical (CARVALHO; COURI, 2010). Quanto aos biomas, as florestas estão entre os mais comuns dessa região, mas também são encontrados extensos biomas de vegetação aberta, como a diagonal de formações abertas

secas da América do Sul. Além disso, a região Neotropical também abriga áreas formadas por extensas cadeias de montanhas, como a Cordilheira dos Andes no oeste da América do Sul, regiões vulcânicas e insulares na América Central (MORRONE, 2014).

Essa grande diversidade de áreas foi objeto de vários estudos que buscaram regionalizar a região Neotropical com base em diferentes aspectos (RAPOPORT, 1968; OSÉS; PÉREZ-HERNÁNDEZ, 1998; 2005; COX, 2001; PÉREZ-HERNÁNDEZ; LEW, 2001; MORRONE, 2002; 2010). Foram levantadas propostas de regionalização a partir de caracteres fitogeográficos, zoogeográficos, biogeográficos e ecorregionais ao longo de 150 anos, o que levou a esquemas conflituosos de delimitações geográficas da região. Morrone (2014), buscando propor uma regionalização menos subjetiva e com definições mais claras, estabeleceu um novo esquema baseado em táxons terrestres, padronizando as nomenclaturas das regiões de acordo com as normas do ICAN (*International Code of Area Nomenclature*).

A regionalização biogeográfica proposta por Morrone (2014) seguiu um sistema hierárquico que categoriza as áreas geográficas basicamente em quatro níveis: sub-regiões, domínios, províncias e distritos. De acordo com esse esquema, a região Neotropical é composta por três sub-regiões e duas zonas de transição (Mexicana e Sul-americana). A sub-região das Antilhas compreende sete províncias, abrangendo todos os territórios insulares a leste da América Central e norte da América do Sul. A sub-região brasileira é dividida em quatro domínios: Mesoamericano (com cinco províncias), Pacífico (com 12 províncias), Boreal brasileiro (com seis províncias) e Sul brasileiro (com quatro províncias). Por fim, a sub-região Chacoana abriga os domínios Sudeste amazônico (com apenas uma província), Chaco (com quatro províncias) e Paraná (com três províncias) (Figura 1; MORRONE, 2014, p. 24).

Figura 1 – Regionalização da região Neotropical proposta por Morrone (2014) com base nas informações sobre táxons terrestres.



Fonte: Elaborado por Santos (2022); adaptado de Morrone (2014, p. 24). *Shapefile*: Löwenberg-Neto (2014). Sistema de coordenadas: WGS 1984.

Para a definição das unidades biogeográficas amostradas no presente estudo, foram considerados os domínios Mesoamericano, Pacífico, Boreal brasileiro, Sul brasileiro, Chaco e Paraná e a sub-região Antilhana – tratada como “domínio” para o delineamento das análises e comparações – de acordo com a proposta de Morrone (2014). Esse mesmo esquema de regionalização foi utilizado para os três capítulos que serão apresentados a seguir.

OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo principal avaliar a hipótese de que os pares de espécies de *Nasutitermes* e *Silvestritermes* [(*N. corniger* e *N. ephratae*) e (*S. euamignathus* e *S. heyeri*)] foram afetados de formas distintas pelos eventos históricos e biogeográficos dos biomas onde ocorrem, considerando as diferenças biológicas, comportamentais e ecológicas que existem entre os pares. Sendo assim, os objetivos específicos foram:

- a) Encontrar e comparar as variantes genéticas populacionais das quatro espécies, através dos marcadores mitocondriais 16S rRNA e COII;
- b) Determinar níveis de distância genética e o grau de estruturação das populações amostradas;
- c) Estimar o tempo de divergência das populações e inferir possíveis eventos geográficos e geológicos associados aos padrões encontrados;
- d) Verificar de que maneira os eventos históricos, como isolamento ou vicariância, influenciaram na estrutura genética das populações estudadas;
- e) Traçar os padrões filogeográficos de *N. corniger*, *N. ephratae*, *S. euamignathus* e *S. heyeri* individualmente;
- f) Analisar se os padrões filogeográficos de *N. corniger* e *N. ephratae* são semelhantes;
- g) Avaliar se os padrões filogeográficos de *S. euamignathus* e *S. heyeri* são diferentes dos padrões encontrados para *N. corniger* e *N. ephratae*;
- h) Sugerir as possíveis causas dos padrões divergentes ou semelhantes entre as quatro espécies;
- i) Avaliar os graus de similaridade genética entre *S. euamignathus* e *S. heyeri*, contribuindo para o esclarecimento da possível sinonímia entre as espécies;
- j) Levantar inferências que contribuam para a compreensão da história biogeográfica da região Neotropical.

CAPÍTULO 1

Phylogeography of *Nasutitermes ephratae* (Termitidae: Nasutitermitinae) in Neotropical region

Amanda de Faria Santos, Eliana Marques Canello, Adriana Coletto Morales

Esse capítulo consta de um manuscrito submetido a *Scientific Reports* em janeiro de 2022 e está formatado de acordo com as normas específicas da revista, disponíveis em <https://www.nature.com/srep/author-instructions/submission-guidelines> (acesso em dezembro de 2021).

Phylogeography of *Nasutitermes ephratae* (Termitidae: Nasutitermitinae) in Neotropical region

Amanda de Faria Santos^{1*}, Eliana Marques Cancellato², Adriana Coletto Morales^{1,3*}

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Câmpus São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), São Paulo, SP, Brazil.

³ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Jaboticabal, SP, Brazil.

*Corresponding author: amanda.santos@unesp.br; adriana.morales@unesp.br.

ABSTRACT

The neotropical region ranks third in the number of termites with five different families. Of these, Termitidae is the most diverse and includes the species *Nasutitermes ephratae* and is common in the neotropics. To date, only one study has been published about phylogeographic issues in neotropical termites (*N. corniger*). Here, we aimed to investigate and analyze the population genetic patterns of *N. ephratae* and then evaluated the phylogeographical processes involved in the evolutionary history of the species. We used the mitochondrial genes 16S rRNA and COII as molecular markers, which were sequenced for 128 samples of *N. ephratae*. We estimated the genetic diversity and divergence time as well as the demographic and genetic structure analyses. We also produced ancestral area reconstruction and a haplotype network. The results showed high genetic variability, recent demographic expansion, and strong genetic structure. We also inferred a dispersal route for the species that occurred in both directions between South and Central America. The results emphasize a temporary separation between the South and Central America population that affected the origin of the current Central America populations. These were formed from different phylogeographic histories.

Keywords: termites, dispersal route, genetic structure, demographic history, mtDNA.

INTRODUCTION

The neotropics host a large diversity of species and habitats that arose from the complex geological history associated with environmental and climatic changes. Evolutionary features such as vicariance, dispersion, and extinction shaped the geographical distribution patterns of the species found in this region [1].

The Neotropical termite fauna ranks third in the number of species with 612 living species following Oriental (1154 species) and Ethiopian (757 species). Of the five neotropical termite families, Termitidae is the most diverse with 437 species described. Termitidae includes the subfamily Nasutitermitinae with 171 species described in the neotropical region including 67 in the genus *Nasutitermes* corresponding to almost 40% of the number of species of the subfamily [2].

Like the other Nasutitermitinae, the soldiers of this genus are characterized by a conic-shaped frontal projection where the opening of an exocrine gland is located at the top. This gland produces substances used for defense against predators [3].

Nasutitermes ephratae was described by Holmgren [4] using alates and workers collected in Ephrata, Suriname. Banks [5] described the soldiers of *N. creolina* collected in Panama. Later Snyder [6] synonymized *N. creolina* with *N. ephratae*. The nests of this species are arboreal and show a light to dark brown coloration and a leathery surface as if they were enveloped. Internally, the nests are reinforced around the royal camera that harbors the queen and the king in the center of the nest (closer to the trunk or branch of the tree) [7].

Nasutitermes ephratae is recovered close to *N. corniger* in various phylogenetic studies [8, 9, 10, 11]. Both species are very common in the neotropics including most of Central and South America, e.g., Brazil, Bolivia, Colombia, Ecuador, French Guiana, Guyana, Peru, Suriname, and Venezuela [2, 6, 12, 13, 14, 15].

To date, only one phylogeographic study has been done on neotropical termites. This was performed with *N. corniger* [15]. The results showed high variability and strong genetic structure for the populations sampled. These were divided in haplogroups along its occurrence area associated with South American biomes. The authors also proposed a dispersal route for *N. corniger*, which would have left Central America towards South America where the populations dispersed toward the eastern regions.

Phylogeographic and biogeographic studies can help explain how the species responded to geological and climatic changes in the past. This highlights the importance

of phylogeographic studies that show a variety of taxonomic groups including insects that have population and evolutionary dynamics different from other taxa [16]. Thus, the association of various phylogeographic patterns can explain the evolutionary history of neotropical biota.

The main aim of this study was to explain the phylogeographical and historical processes that gave rise to population patterns of *N. ephratae* in the neotropics. Thus, we used the mitochondrial molecular markers 16S rRNA and the subunit II of the cytochrome oxidase (COII). It is important to highlight that the mitochondrial DNA (mtDNA) have been extensively used for the investigation of phylogeographic issues as well as other evolutionary questions of a large variety of species including termites [15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23].

We performed demographic analyses, estimates of variability and genetic structure, analyses of divergence time, and ancestral area reconstruction. We also performed a haplotype network and proposed a dispersal route for the species. The biogeographic units defined for the analyses are according to the Neotropical regionalization in dominions proposed by Morrone [24] as follows (considering the areas that were sampled): Antillean subregion (ANT) and Mesoamerican dominion (MES) in Central America; Pacific dominion (PAC) in Central and South America; Boreal Brazilian dominion (BOR), Chacoan dominion (CHA), Parana dominion (PAR), and south Brazilian dominion (SOU) in South America.

METHODS

Sampling

The samples of *N. ephratae* (Table 1; Figure 1) analyzed here came from the Isoptera collections of the *Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo* (MZUSP) and the University of Florida (UF). The samples were collected in different campaigns and stored in 96% ethanol (MZUSP) and in 85% ethanol (UF) to better preservation of the DNA. Extracted DNA are stored in the Molecular Collection of the *Laboratório de Biologia Evolutiva* (LaBE) of the *Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias*, UNESP (Jaboticabal, SP, Brazil). In addition to these samples, 12 nucleotide sequences of *N. ephratae* obtained in GenBank (public access) were included in the analyses, totaling 128 samples analyzed.

Laboratory procedures

The total DNA was extracted from the head of an individual per colony following Liu & Beckenbach [25] protocol, which includes phenol-chloroform for the extraction and 100% and 70% ethanol for the DNA washing. The amplification of the 16S rRNA and COII (gene regions of mtDNA) was performed by PCR following the conditions described in Table 2. The PCR reaction, with 25 μ L of final volume, was composed by 3 μ L of each primer (forward and reverse) at 5 pmol/ μ L, 12.5 μ L of PCR Master Mix (Promega), 3.5 μ L of nuclease free water, and 3 μ L of target DNA at 20 ng/ μ L. The PCR product was purified using the Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) according to the manufacturer's instructions, followed by Sanger sequencing in ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) automatic sequencer.

Data analysis

Genetic diversity and neutrality tests

The nucleotide sequences were read in Chromas Lite v. 2.6.5 (Technelysium Ltd., 2005). The sequences of 16S were aligned using Mafft v. 7 [29, 30] and the sequences of COII were aligned using Geneious v. 7.1.9 (<https://www.geneious.com>) by ClustalW, both followed by inspection by eye. Geneious also was used to concatenate the 16S and COII sequences of the samples in which both regions could be sequenced.

To quantify the genetic diversity, the following parameters were estimated using DnaSP v. 6 [31]: number of polymorphic sites (*S*), nucleotide diversity (π), average number of nucleotide differences (*k*), and haplotype diversity (*H_d*). In addition to these parameters, the value of θ -W per sequence was estimated using Arlequin v. 3.5.1.2 [32]. This software also was used to perform the Fu's *F_s* [33] and Tajima's *D* [34] neutrality tests – these tests were performed for the entire sample set and, separately, for each Neotropical dominion sampled. The other neutrality tests Fu and Li's *F^{*}* and *D^{*}* and Achaz *Y^{*}* [35] were performed using DnaSP v. 6 [31].

The nucleotide composition of the sequences and the pairwise genetic distances (among individuals, among dominions and within dominions) were estimated using MEGA-X [36]. The genetic distances and the neutrality tests were estimated for both the concatenated sequences (16S+COII) and the single genes (16S or COII). Only the single genes were considered to estimate the genetic diversity indexes.

Haplotype network

The haplotype network was generated with the concatenated sequences (16S+COII) using TCS v. 1.21 [37], that uses parsimony method to establish the relationship among the haplotypes, with 95% of connection limit. The haplogroups were defined based on the shape of the network, considering the distance among the haplotypes and among the tips and central haplotypes of the group. The network was colored using tcsBU [38] considering the frequency of the haplotype in each Neotropical dominion sampled.

The map showing the distribution of the samples, colored according to the observed haplogroups, was created using QGIS v. 3.6.3 [39] based on the datum WGS 1984 and on the shapefile of the Neotropical region developed by Löwenberg-Neto [40], considering the regionalization proposed by Morrone [24].

Genetic structure and Mantel test

The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was performed using Arlequin v. 3.5.1.2 [32] to assess the possibility of genetic structure among the sampled populations. Using the concatenated sequences, tree constructions were defined for this analysis: (i) an AMOVA was performed considering the haplogroups of the haplotype network; (ii) the second AMOVA was performed separating the samples in seven groups according to their Neotropical dominion (ANT, BOR, CHA, MES, PAC, PAC, and SOU); (iii) the third AMOVA was also performed considering the dominions as groups, but regrouping them into two major groups: Central America (ANT, MES, and northern PAC) and South America (BOR, CHA, southern PAC, PAR, and SOU). The F indexes, calculated by AMOVA, range from 0 to 1 and indicate high differentiation above 0.25 and moderately high differentiation between 0.15 e 0.25 [41].

Also to evaluate the inference of genetic structure, we performed an analysis of DNA clustering using the package rhierBAPS [42, 43] implemented in R v. 4.0.1 [44]. The results were obtained for both the concatenated sequences and the single genes. The graphs showing the geographical distribution of each genetic cluster (considering the concatenated sequences results) were obtained using Microsoft Excel (2008).

The Mantel test was performed using the package vegan [45], implemented in R v. 4.0.1, considering the Pearson's correlation as method with a number of permutation

equal to 10000. We inputted the concatenated sequences and the geographical coordinates of each sample to perform this analysis.

Analysis of divergence time and ancestral area reconstruction

We estimated the divergence time among the samples of *N. ephratae* using an analysis of Bayesian inference. The tree was generated in BEAST v. 2.6.3 [46] using strict clock and chain length equal to 100 million. Two partitions were included in the analysis, the first containing the 16S sequences and the second containing the COII sequences. The tree models (Fossilized Birth Death Model) [47] and the clock models for both partitions were linked, but different substitution models were applied – TrN+G for the 16S and TrN+I+G for the COII partition [48]. The selection of the best-fit model of nucleotide substitution was done based on the results of jModelTest [49] considering the lower values of BIC.

The Bayesian inference was calibrated with the ages of four fossil records: *Valditermes brenanae* [50], 136.4 to 130 million of years ago (My); *Nanotermes isaace* [51], 56 to 47.8 My; *Nasutitermes electrinus* [52], 23.03 to 15.97 My; and *Atlantitermes caribea* [53], 20.44 to 13.82 My. Besides the fossil records, the origin dates estimated by Bourguignon [54] for Termitidae (46-66 My), Nasutitermitinae (19.4-26.2 My), and *Nasutitermes* (16.4-22.6 My) were also included to better fitting the calibration of the analysis. As outgroups, we included the species *Mastotermes darwiniensis* (Mastotermitidae), *Amitermes dentatus* (Termitidae: Termitinae), *Atlantitermes snyderi* (Termitidae: Nasutitermitinae), and *Nasutitermes longinasus* (Termitidae: Nasutitermitinae).

The MCMC trace files generated by Bayesian inference were viewed and analyzed using Tracer v. 1.7.1 [55] to check the values of Effective Sample Size (ESS > 200). The trees were resampled using the BEAUti v. 2.6.3 application “Full To Extant Tree Combiner” [46] to remove the fossil taxa of the topology, keeping only the extant species. The best tree was annotated by TreeAnnotator v. 2.6.3 [56] with 10% burn-in, and it was viewed and draw using FigTree v. 1.4.4 [57]. The colors of the branches are corresponding to the colors of the haplogroups (points on the map – Fig. 1).

A second Bayesian inference was performed considering the haplotypes (a single sequence per haplotype in each partition), following the same models and procedures described for the first Bayesian analysis, except the nucleotide substitution model for the

16S partition – TrN+I+G was selected as the best-fit model for 16S in this analysis. The best tree (with values of ESS > 200) were obtained with a chain length equal to 90 million.

The haplotype tree topology, as well as the divergence times estimated by this analysis, were used for the ancestral area reconstruction analysis, which was performed using the package BioGeoBEARS [58] in R v. 4.0.1 [44]. We defined seven occurrence areas for this analysis, according to the Neotropical dominions which were sampled (ANT, BOR, CHA, MES, PAC, PAR and SOU). We tested the models DEC, DIVALIKE and BAYAREALIKE with and without j (i.e. six models tested). The best-fit model was selected based on the lower values and higher weights of AIC and AICc.

RESULTS

Genetic diversity and demographic inferences

We obtained 123 nucleotide sequences for 16S [396 base pairs (bp)] and 108 for COII (742 bp) within the samples, totaling 103 specimens with both mtDNA genes sequenced. The nucleotide composition of the concatenated sequences corresponds to 40.27% of adenine (A), 25.35% of thymine (T), 21.20% of cytosine (C), and 13.19% of guanine (G). The mean genetic distance among the samples was 0.011 for the concatenated sequences, 0.007 for the 16S sequences, and 0.015 for COII sequences. After estimating the genetic distances among and within the dominions, higher values were obtained for the BOR-MES and BOR-PAC pairwise comparisons (Table 3). The mean genetic distance within dominions was 0.008.

We found 66 haplotypes considering the concatenated sequences: 41 haplotypes ($H_d = 0.890$) for 16S and 53 haplotypes ($H_d = 0.932$) for COII (Table 4a), indicating high genetic variability for the populations sampled. High values also were found for the number of polymorphic sites (S) of both mtDNA genes (24 for 16S and 87 for COII). The COII synonym sites showed the higher value of nucleotide diversity (π), which was 200 times higher than the value observed for the non-synonym sites (Table 4.a).

Regarding to the neutrality tests performed with the whole sample set (Table 4b), none of the Tajima's D values were significant. Values of F_u and Li's D^* and F^* for 16S were also not significant. This means that there is not enough evidence to infer between demographic expansion or population bottlenecks from these indices. The negative and significant values of F_u 's F_s , i.e., the most sensitive among the neutrality tests performed [59], suggest demographic expansion for the populations, which is also suggested from

the negative value of Achaz Y^* considering the concatenated sequences (Table 4b). Regarding the neutrality tests performed per dominion, the negative and significant values of Fu's F_s also indicate demographic expansion for all the dominions despite the non-significant Fu's F_s for ANT (considering COII). The other tests performed for this dominion showed negative and significant values. Only the values of Tajima's D for SOU (COII) and CHA (16S+COII) were significantly negative.

Haplotype network

We generated a haplotype network to reconstruct the relations among the 66 haplotypes found for *N. ephratae* (Figure 2). We observed four haplogroups (Hg) composed, in general, by haplotypes close each other and originated from a more frequent central haplotype. Haplotypes that were very distant from the central haplotype of the haplogroup (i.e., that present many mutational steps) were not grouped. The star shape of the haplogroups suggests recent demographic expansion events for the populations analyzed.

The network also showed a clear geographic differentiation among South American populations composed of haplogroup 1 and Central American populations composed mostly of haplogroups 2 and 4 (Figure 2; Table 5). The haplogroup 3 is formed mainly by populations located in northern South America (BOR) and in the Antillean islands. Haplogroup 3 also includes haplotypes from eastern Brazil (PAR – Espírito Santo, Brazil), which are intermediaries between this haplogroup and the haplogroup 1. The geographical distribution of the haplogroups is also showed in Figure 1.

Population structure and isolation by distance

The inference of population structure in *N. ephratae* was verified from the results of the AMOVA (Table 6) and rhierBAPS (Figure 3). Regarding the AMOVA among haplogroups (Table 6.a), the F_{ST} value was significantly very high (0.547; $p=0.000$) suggesting a consistent differentiation among the haplogroups established in the network (Figure 2). A high F_{ST} was also observed in the AMOVA among dominions (Table 6.b) indicating strong genetic structure among the dominions sampled. In the AMOVA among continents (Table 6.c), the high F_{CT} also suggest structuration among the population located in different continents while a moderate structure that be observed among the dominions within continents, as showed by F_{SC} (0,227). The F_{ST} (within dominions) for this AMOVA was also high, which suggests that there are a great number of genetic

variants within a dominion despite the genetic structure among dominions and among continents.

The rhierBAPS results (Figure 3) showed five genetic clusters (represented by different colors) for the *N. ephratae* samples (Figure 3a,c) except for the result for the 16S sequences that were grouped in four clusters (Figure 3b). The samples of cluster 2 (orange) are absent in the 16S analysis and can be found joining to the cluster 3 (yellow) in this analysis. Clusters 1 (blue), 3 (yellow), 4 (green), and 5 (red) remained consistent because most samples in these groups remained within the same cluster in the three analyses. Except for cluster 1, all other clusters were regrouped in subclusters by the analysis (represented by the different shades of the respective colors).

Relating the results of clustering analysis with the concatenated sequences (Figure 3a) and the geographic distributions of the populations sampled, it is possible to observe that the samples of the cluster 1 are distributed in South America (Figure 4); the samples of cluster 2 are distributed in northern South America (Venezuela and Colombia in southern portion of PAC) and Central America (MES dominion). Cluster 3 includes only samples from Central America (MES and northern portion of PAC), and cluster 4 includes samples from BOR, ANT, and mainly from PAC (northern and southern portions) and MES. Cluster 5 includes samples from BOR and southern portion of PAC. These results also suggest strong genetic differentiation among the populations located in South and Central America.

Mantel's test was performed to verify the existence of isolation by distance and resulted in a significantly positive r value (0.1197; $p = 0.0005$), thus indicating that there is a positive correlation between the genetic distance and the geographic distance, i.e., the genetic distances increase as geographic distance between samples increase. This can be also observed in the genetic distance matrices among the individuals (Supplementary Tables S1, S2, and S3). This in turn showed higher values in the pairwise comparisons among samples from more distant localities each other.

Divergence time

The divergence times of the *N. ephratae* populations were estimated from a Bayesian inference (BI) analysis (Figure 5). According to the tree obtained, three important cladogenetic events seem to have given rise to the *N. ephratae* populations analyzed. The first event (8.98 My) separated the green clade (that includes samples from Central America and northern South America) from the other clades – the most ancestral

node of this clade was dated to 3.66 by the analysis (814-H58 was treated as outlier). The second event (4.54 My) separated the blue + red clade from the yellow clade, which most external node was dated to 3.76 My. The last one includes only specimens distributed in Central America. The third event (3.04 My) caused the divergence among the blue clade (formed by South American populations) from the red clade (formed by samples from northern South America and Antillean islands) whose most ancestral nodes were dated to 2.4 My. The clade formed by the 1078-H65 to 790-H47 samples (within the blue clade) must also be highlighted because it includes, exclusively, all the samples from the east coast of Brazil (Paraíba and Espírio Santo states).

Ancestral area reconstruction

Aiming to reconstruct the ancestral ranges of the populations, we considered a Bayesian inference generated using the haplotypes of the 16S and COII sequences (Figure 6; Supplementary Fig. S1). We did not use all individuals as was done for the divergence time estimation. The best-fit model selected, DEC+*j*, presented AIC and AICc equal to 211.7 and 212.4 with weights equal to 0.85 and 0.84, respectively. The results showed that the common ancestor of all the clades was distributed in MES and PAC dominions and were dispersed posteriorly to the other areas (Figure 6; Supplementary Fig. S2). Most of the haplogroups observed in the haplotype network were also recovered in the BI performed for this analysis.

DISCUSSION

Data on the genetic diversity obtained for the *N. ephratae* populations showed high genetic variability for the species as evidenced by the large number of haplotypes in relation to the total number of samples as well as by the high haplotype diversity. The nucleotide diversity observed for the COII sequences was greater than the nucleotide diversity found for the 16S. Furthermore, the π value obtained for the COII synonyms sites was higher than the π value for the non-synonym sites (Table 3a). This is because synonym substitutions can produce deleterious modifications in the protein structures; hence, they tend to not settle in the populations. Non-synonym substitutions rarely produce important changes in the gene expression, and thus they suffer low selective pressure and, therefore, tend to be retained and increase the nucleotide diversity indexes for these sites in the populations.

The high genetic variability observed for *N. ephratae* seems not to be widely shared among the populations because the AMOVA results (Table 5) showed strong genetic structure for the species. That is, there are a lot of genetic variants that are exclusive of one or few regions suggesting low or moderated gene flow among distant populations. This limitation in gene flow may have occurred due to isolation by distance as confirmed by Mantel's test. The clustering analysis results also corroborated the population structure inference because five clusters with a distribution limited to adjacent dominions were recovered. Cluster 1 shows a larger geographic distribution and occurs in all sampled South American dominions. High genetic variability with haplotypes little shared among distant geographic regions was also observed in *N. corniger* [15].

Regarding to the demographic history of the *N. ephratae* populations, the neutrality tests (Table 3b,c), specifically Fu's F_s , indicated demographic expansion for the species (considering the whole sample set) and particularly for each neotropical dominion sampled. This also can be inferred from the star shape of the haplogroups in the haplotype network, thus suggesting that a lot of descendent haplotypes had recently risen from the ancestor haplotypes located in the center of the haplogroups.

The haplotype network (Figure 2) showed four haplogroups presenting clear differences about the geographical distribution of the haplotypes. Haplogroup 1 is entirely composed of haplotypes from the South America dominions while haplogroups 2 and 4 are mostly formed by Central American haplotypes. Some haplotypes included in haplogroup 4 can also be found in northern South America (Venezuela and Trinidad and Tobago), but were not often observed at latitudes below this. Haplogroup 3 is composed of haplotypes from northern South America (Trinidad and Tobago and French Guiana) and from the Antillean islands (Dominica and Guadeloupe).

These groups were also recovered by the clustering analysis (Figure 3a) and by the BI (Figure 5) except for a few differences among the three analyses. In general, the results of these three analyses are linked as following: haplogroup 1 corresponds to cluster 1 and to the blue clade; haplogroup 2 corresponds to cluster 3 and to the yellow clade; haplogroup 3 corresponds to cluster 5 and to the red clade; and haplogroup 4 corresponds to cluster 4 and to the green clade. These colors were used to reference the groups in Figures 1, 3, and 5.

The BI analysis (Figure 4) shows that a few nodes of the tree presented posterior probabilities above 0.50 possibly due to the difficulties of the algorithm, implemented in BEAST, in solving datasets containing very similar sequences [60]. Despite this, the

cladogenetic relationship among the haplogroups can be observed in the BI performed with the haplotypes for the ancestral area reconstruction. In general, the larger clades of this tree include haplotypes from the same haplogroup (Figure 5). This suggests a relationship among the haplotypes and the ancestral area reconstructed. We inferred dispersal events occurred based on the ancestral ranges and then proposed a dispersal route for the *N. ephratae* populations (Figure 7).

The ancestral populations distributed in MES and PAC (“1”; Figure 7a) suffered a temporary separation that split the populations of South America (southern PAC) from the Central American (northern PAC + MES) populations (“2”; Figure 7b). The ancestor of the haplogroups 1, 2, and 3 occurred in MES during this separation (“3”; Figure 7c). This leads to the origin of haplogroup 2 that was restricted to Central America (northern PAC + MES). After the reconnection of the *N. ephratae* populations (indicated with an asterisk in Figure 7), the Mesoamerican ancestor dispersed to the South American portion of PAC (“5”; Figure 7e) from where there was a new dispersion to SOU (“6”, Figure 7f) and to ANT-BOR (“7”, Figure 7f). This last dispersion gave rise to haplogroup 3 composed mainly of French Guiana and Antillean populations. The ancestral populations of the haplogroup 1 that had arisen in SOU were widely dispersed to CHA and PAR (Atlantic Forest *lato sensu*) reaching to BOR and southern PAC (“8”, Figure 7.f), but remaining limited to South America.

Still during the temporary separation between the South and Central America *N. ephratae* populations, the South American ancestor of the haplogroup 4 arose in southern PAC (“4”; Figure 7d). After the populations’ reconnection, there was a dispersal from southern PAC to northern PAC and to MES originating as the late ancestor of haplogroup 4 and clade H25-A59, which were restricted to these dominions (“5”; Figure 7e).

Based on the dispersal route proposed, we inferred that the *N. ephratae* populations currently distributed in Central America arose from distinct dispersal events. This becomes clearer when we also observe the geographic distribution of haplogroups 2 and 4 (Figure 1) whose occurrence areas overlap, but who have different genetic groups. That is, even though these haplogroups are distributed in the same area, the results are from different evolutionary events. The ancestors of these haplogroups possibly diverged during a temporary split among the ancestral *N. ephratae* populations from South and Central American between the late Pliocene and early Pleistocene (around 5.06 and 2.78 My; Figure 6 and 7). Haplogroup 2 originated from populations that were restricted to Central America during this split while the haplogroup 4 originated after the reconnection

perhaps arising from populations that were dispersed from the northern South America (southern PAC) to Central America (northern PAC + MES). The same direction of dispersion (South America to Central America) was also identified for the ant species *Neoponera villosa* [16] dated from 0.46 to 0.28 My; earlier dispersions have been observed for *N. ephratae*.

Haplogroup 1 is exclusively South American and arose from a Mesoamerican ancestor that dispersed to the northern South America and then to the SOU dominion. Therefore, the dispersal events of the *N. ephratae* populations among Central and South America occurred in both directions, thus shaping the genetic and phylogeographic patterns observed here.

Although the causes responsible for the temporary split between the South and Central American *N. ephratae* population are not clear, some hypotheses can be raised. A population isolation caused by the geographic distance between the populations may have led to this split: The occurrence of isolation by distance was suggested by the Mantel's test. The loss of distribution area could also have caused this effect in the populations. In this way, the reconnection of the populations could have occurred due to the demographic expansion that was detected by the neutrality tests and can be suggested from the star shape of the haplogroups in the haplotype network.

Geological and/or geographic factors could also help to explain this split. Following this approach, it is possible that the separation is related to the tertiary's tectonic and paleogeographical reorganization movements (in the late Pliocene), which led to the emergence of barriers and changes in dispersal routes in South America [61]. Specifically, this split between the *N. ephratae* populations may have been caused by the momentaneous effects of the elevation of the Panama isthmus. These effects would have lasted between 4.6 and 2.6 My [62] – a date close to the one estimated for the separations detected (5.06 to 2.78 My). Moreover, the early Quaternary climate changes (early Pleistocene) was characterized by temperature and dryness oscillations in the continents and also impacted the adaptability and the migration of species and populations [61].

Although dispersion by water (inside flotsam carried by ocean or river currents or ferried by vessels) helps to explain dispersion patterns for termite species [54, 63, 64], it is more likely that the paths taken by the populations of *N. ephratae* were overland (except for the Antillean samples, as will be discussed below), which makes the PAC dominion an obligatory passage for the dispersal of populations between South and Central

America. This dominion harbor peculiarly haplotypes from all haplogroups and present a higher value of intra-dominion genetic distance (Table 3.b). These features help to infer the PAC intermediary position for the *N. ephratae* dispersions.

The dispersal route traced for the populations analyzed here are very similar to the dispersal route observed for *N. corniger* species [15] including the dispersion from Central to South America, the eastward dispersion on South America lands, and the late occupation of Atlantic Forest. Nevertheless, the dispersal from South to Central America and the temporary split among the population have not yet been detected for *N. corniger* unlike *N. ephratae*.

Crews and Esposito [65] also studied dispersal routes and identified that South America is most probably the origin of most of the Caribbean arthropod fauna including *N. ephratae*, *N. corniger*, and other species of the genus *Nasutitermes*. These data contradict the inferences raised by Santos et al. [15] although there are some important methodological differences among the studies. Crews and Esposito [65] analyzed 18 species of *Nasutitermes* using the same mtDNA genes used here as molecular markers (16S + COII). The dispersal route proposed herein is according to the inferences made by Crews and Esposito [65] because the *N. ephratae* Antillean populations arose from a South America ancestor according to the ancestral area reconstruction. Specifically, for these island populations, it is possible that the dispersion from northern South America to the Antilles occurred via flotsam or floating wood carried to the islands by oceanic currents. This kind of dispersion has already been detected for Caribbean termite species [64]. Most of the islands' termite specimens analyzed here belongs to haplogroup 3 together with samples from French Guiana (BOR dominion) and Trinidad and Tobago (located in the transition between BOR and PAC). This data suggests high genetic similarity among populations of these areas – although a larger sampling can better clarify the relations among the two dominions.

Regarding the BOR dominion, we found that the samples from this area have haplotypes typically found in other areas, which stayed distant from each other in the haplotype network (except for the haplotypes from French Guiana). This distance was also observed in BI. Some authors argue that the Amazonian biota (composed of parts of BOR and SOU dominions and the southeastern Amazon dominion – the latter was not sampled herein) have unnatural biogeographic origins [66, 67, 68, 69, 70]. As a speculation, this hypothesis could help clarify the existence of haplotypes that are genetically distant from each other in Amazonian localities that are geographically close

to each other. However, we point that it is necessary to include a greater sampling of this region to clearly detect the genetic population patterns and the evolutionary events involving *N. ephratae* in this dominion.

In general, there are many questions to be explored about the phylogeographic processes of the South American and Neotropical species especially for termites whose studies are still new. Better sampling of *N. ephratae* and/or including new molecular markers in future studies, as well as addressing phylogeographic issues of other species, can help solidify the inferences made in this work and can expand the understanding of the evolutionary history of the group and of the neotropics.

CONCLUSIONS

This study covered a great part of the occurrence area of *N. ephratae* in the neotropics. It was possible to make important inferences about the general panorama of the evolutionary history of the species in this region although a broader sampling, especially from central-eastern South America, could better clarify some phylogeographic patterns. Our data also showed similarities on the population and dispersal patterns among *N. ephratae* and *N. corniger*. Here, it is possible to speculate that both species responded similarly to the biogeographic processes that have occurred in the neotropics although new comparative studies may better answer this question. In summary, this study offers important contributions to the understanding of biogeographic and phylogeographic issues in the neotropics especially evolutionary studies of termites and other insects.

DATA AVAILABILITY

DNA sequences: Genbank accessions numbers OL830473 - OL830583 (16S) and OL830584 - OL830683 (COII).

REFERENCES

1. Carvalho, C. J. B. & Couri, M. S. Biogeografia de Muscidae (Insecta: Isoptera) da América do Sul. in *Biogeografia da América do Sul: padrões & processos* (eds. Carvalho, C. J. B. & Almeida, E. A. B.) 277-298 (Roca, São Paulo, Brazil, 2010).

2. Constantino, R. *On-line termite database* <http://164.41.140.9/catal/> (2020).
3. Eisner, T., Kriston, I. & Aneshansley, D. J. Defensive behavior of a termite (*Nasutitermes exitiosus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **1**, 83-125 (1976).
4. Holmgren, N. Versuch einer Monographie der amerikanischen Eutermes-Arten. *Jahrb. Hamburg. Wiss. Anst.* **27**, 235-243 (1910).
5. Banks, N. The termites of Panama and British Guiana. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **38**, 659-667 (1918).
6. Snyder, T. E. Catalog of the termites (Isoptera) of the world. *Smithsonian Misc. Collect.* **2**, 1-490 (1949).
7. Thorne, B. L. Differences in nest architecture between the neotropical arboreal termites *Nasutitermes corniger* and *Nasutitermes ephratae* (Isoptera: Termitidae). *Psyche (Camb Mass)*. **87**, 235-244 (1980).
8. Miura, T., Roisin, Y. & Matsumoto, T. Molecular Phylogeny and Biogeography of Nasute Termite Genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific Tropics. *Mol. Phylogenet. Evol.* **17**, 1-10 (2000).
9. Scheffrahn, R. H., Krecek, J., Szalanski, A. L. & Austin, J. W. Synonymy of neotropical arboreal termites *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with evidence from morphology, genetics, and biogeography. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **98**, 273-281 (2005).
10. Scheffrahn, R. H., Krecek, J., Szalanski, A. L., Austin, J. W. & Roisin, Y. Synonymy of two arboreal termites (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae): *Nasutitermes corniger* from the neotropics and *N. polygynus* from New Guinea. *Fla. Entomol.* **88**, 28-33 (2005).
11. Roy, V., Constantino, R., Chassany, V., Giusti-Miller, S., Diouf, M., Mora, P. & Harry, M. Species delimitation and phylogeny in the genus *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) in French Guiana. *Mol. Ecol.* **23**, 902-920 (2014).
12. Snyder, T. E. Termites collected on the Mulford biological exploration to the Amazon Basin, 1921-1922. *Proc. U. S. Natl. Mus.* **68**, 1-76 (1926).
13. Araujo, R. L. *Catálogo dos Isoptera do novo mundo* (ed. Araujo, R. L.) 1-92 (Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1977).
14. Torales, G. J. & Armua, A. C. Contribución al conocimiento de las termitas de Argentina (Provincia de Corrientes). *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). Primera Parte. *Facena*. **6**, 203-222 (1986).

15. Santos, A. F., Carrijo, T. F., Canello, E. M. & Morales, A. C. Phylogeography of *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) in the Neotropical Region. *BMC Evol. Biol.* **17**, 1-12 (2017).
16. Mendoza-Ramírez, M., Gutiérrez-Rodríguez, J., Poteaux, C., Ornelas-García, P. & Zaldívar-Riverón, A. Late Pleistocene genetic diversification and demographic expansion in the widely distributed neotropical ant *Neoponera villosa* (Ponerinae). *Mitochondrial DNA part A*. **30**, 296-306 (2019).
17. Li, H. F., Ye, W., Su, N. Y. & Kanzaki, N. Phylogeography of *Coptotermes gestroi* and *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Taiwan. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **102**, 684-693 (2009).
18. Jenkins, T. M. *et al.* Phylogeography illuminates maternal origins of exotic *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **42**, 612-621 (2007).
19. Austin, J. W., Szalanski, A. L., McKern, J. A. & Gold, R. E. Molecular phylogeography of the subterranean termite *Reticulitermes tibialis* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Agric. Urban Entomol.* **25**, 63-79 (2008).
20. Kutnik, M., Uva, P., Brinkworth, L. & Bagnères, A. G Phylogeography of two European *Reticulitermes* (Isoptera) species: the iberian refugium. *Mol. Ecol.* **13**, 3099-3113 (2004).
21. Tripodi, A. D. *et al.* Phylogeography of *Reticulitermes* Termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in California inferred from mitochondrial DNA sequences. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **99**, 697-706 (2006).
22. Park, Y. C., Kitade, O., Schwarz, M., Kim, J. P. & Kim, W. Intraspecific molecular phylogeny, genetic variation and phylogeography of *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Mol. Cells.* **21**, 89-103 (2006).
23. Bourguignon, T. *et al.* Towards a revision of the Neotropical soldierless termites (Isoptera:Termitidae): redescription of the genus *Anoplotermes* and description of *Longustitermes*, gen. nov. *Invertebr. Syst.* **24**, 357-370 (2010).
24. Morrone, J. J. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*. **3782**, 1-110 (2014)
25. Liu, H. & Beckenbach, A. T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol. Phylogenet. and Evol.* **1**, 41-52 (1992).

26. Kambhampati, S. A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2017-2020 (1995).
27. Xiong, B. & Kocher, T. D. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome*. **34**, 306-311 (1991).
28. Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**, 651-701 (1994).
29. Kuraku, S., Zmasek, C. M., Nishimura, O. & Katoh, K. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 22-28; 10.1093/nar/gkt389 (2013).
30. Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* **20**, 1160-1166 (2017).
31. Rozas, J. *et al.* DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 3299-3302 (2017).
32. Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. Arlequin suite v. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* **10**, 564–567 (2010).
33. Fu, Y. X. Statistical Tests of Neutrality of Mutations against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*. **147**, 915-925 (1997).
34. Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. **123**, 585-595 (1989).
35. Achaz, G. Testing for neutrality in samples with sequencing errors. *Genetics*. **179**, 1409-1424 (2008).
36. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547-1549 (2018).
37. Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**, 1657-1659 (2000).
38. Santos, A. M., Cabezas, M. P., Tavares, A. I., Xavier, R. & Branco, M. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*. **32**, 627-628 (2016).

39. QGIS Development Team. *QGIS Geographic Information System* <http://qgis.org> (2009).
40. Löwenberg-Neto, P. Neotropical region: a shapefile of Morrone's (2014) biogeographical regionalization. *Zootaxa*. **3802**, 300-300 (2014).
41. Wright, S. Variability within and among natural populations. in *Evolution and the genetics of populations vol. 4* (ed. Wright, S.) 1-590 (University of Chicago Press, USA, 1978).
42. Cheng, L., Connor, T. R., Sirén, J., Aanensen, D. M. & Corander, J. Hierarchical and Spatially Explicit Clustering of DNA Sequences with BAPS Software. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 1224-1228 (2013).
43. Tonkin-Hill, G., Lees, J. A., Bentley, S. D., Frost, S. D. & Corander, J. RhierBAPS: An R Implementation of the Population Clustering Algorithm hierBAPS. *Wellcome Open Res.* **3**, 1-9 (2018).
44. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, <https://www.R-project.org/> (2020).
45. Oksanen, F. J. *et al.* vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7, <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (2020).
46. Bouckaert, R. *et al.* BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* **15**, e1006650; 10.1371/journal.pcbi.1006650 (2019).
47. Heath, T. A., Huelsenbeck, J. P. & Stadler, T. The fossilized birth–death process for coherent calibration of divergence-time estimates. *PNAS*. **111**, E2957-E2966 (2014).
48. Tamura, K. & Nei, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512-526 (1993).
49. Posada, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1253-1256 (2008).
50. Jarzembowski, E. A. An early Cretaceous termite from southern England (Isoptera: Hodotermitidae). *Syst. Entomol.* **6**, 91-96 (1981).
51. Engel, M. S. & Grimaldi, D. A. The termites of Early Eocene Cambay amber, with the earliest record of the Termitidae (Isoptera). *ZooKeys*. **148**, 105-123 (2011).
52. Krishna, K. New fossil species of termites of the Subfamily Nasutitermitinae from Dominican and Mexican amber (Isoptera, Termitidae). *Am. Mus. Novit.* **3176**, 1-13 (1996).

53. Krishna, K. & Grimaldi, D. Diverse Rhinotermitidae and Termitidae (Isoptera) in Dominican Amber. *Am. Mus. Novit.* **3640**, 1-48 (2009).
54. Bourguignon, T. *et al.* Mitochondrial Phylogenomics Resolves the Global Spread of Higher Termites, Ecosystem Engineers of the Tropics. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 589-597 (2016).
55. Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M. A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* **67**, 901-904 (2018).
56. Rambaut, A. & Drummond, A. J. TreeAnnotator v. 2.6.3. <http://beast.bio.ed.ac.uk> (2020).
57. Rambaut, A. FigTree: Tree Figure Drawing Tool. v. 1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk> (2018).
58. Matzke, N. J. BioGeoBEARS: BioGeography with Bayesian (and Likelihood) Evolutionary Analysis in R Scripts. R package version 0.2.1, <http://CRAN.R-project.org/package=BioGeoBEARS> (2013).
59. Ramos-Onsins, S. E. & Rozas, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 2092-2100 (2002).
60. Seal, J. N., Kellner, K., Trindl, A. & Heinze, J. Phylogeography of the parthenogen ant *Platythyrea punctata*: highly successful colonization of the West Indies by a poor disperser. *J. Biogeogr.* **38**, 868-882 (2011).
61. Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol. Ecol.* **22**, 1193-1213 (2013).
62. Mann, P., Peterson, L. & Droxler, A. *Tectonics, Circulation, and Climate in the Caribbean Gateway* (eds. Mann, P., Peterson, L. & Droxler, A) 1-100 (Joint Oceanographic Institutions, Inc., 2006).
63. Scheffrahn, R. H., Křeček, J., Chase, J. A., Maharajh, B. & Mangold, J. R. 2006. Taxonomy, biogeography, and notes on termites (Isoptera: Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Termitidae) of the Bahamas and Turks and Caicos Islands. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **99**, 463-486 (2006).
64. Janowiecki, M. A., Scheffrahn, R. H., Austin, J. W. & Szalanski, A. L. Population Structure of the Drywood Termite *Incisitermes schwarzi* (Blattodea: Kalotermitidae) in the Caribbean. *J. Agric. Urban Entomol.* **36**, 101-108 (2020).

65. Crews, S. C. & Esposito, L. A. Towards a synthesis of the Caribbean biogeography of terrestrial arthropods. *BMC Evol. Biol.* **20**, 1-27 (2020).
66. Prum, R. O. Historical relationships among avian forest areas of endemism in the Neotropics. *Acta Ornithol.* **19**, 2562-2572 (1988).
67. Amorim, D. S. Dos Amazonias. in *Introducción a la biogeografía em Latino América: teorías, conceptos, métodos y aplicaciones* (eds. Llorente-Bousquets, J. & Morrone, J. J.) 245-255 (UNAM, Mexico, 2001).
68. Cracraft, J. & Prum, R. O. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution.* **42**, 603-620 (1988).
69. Bates, J. M. Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a vicariance model for a basic diversification pattern. *Diversidade biológica e cultural da Amazônia.* 119-137 (2001).
70. Ribas, C. C., Aleixo, A., Nogueira, A. C., Miyaki, C. Y. & Cracraft, J. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proc R Soc Lond B.* **279**, 681-689 (2012).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. Dr. Rudolf Scheffrahn (University of Florida) and the Isoptera Collection team of MZUSP for assistance in obtaining samples; the Laboratory of Genetic of Bacteria (FCAV/UNESP) for providing equipment; and CAPES for the scholarship granted to AFS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

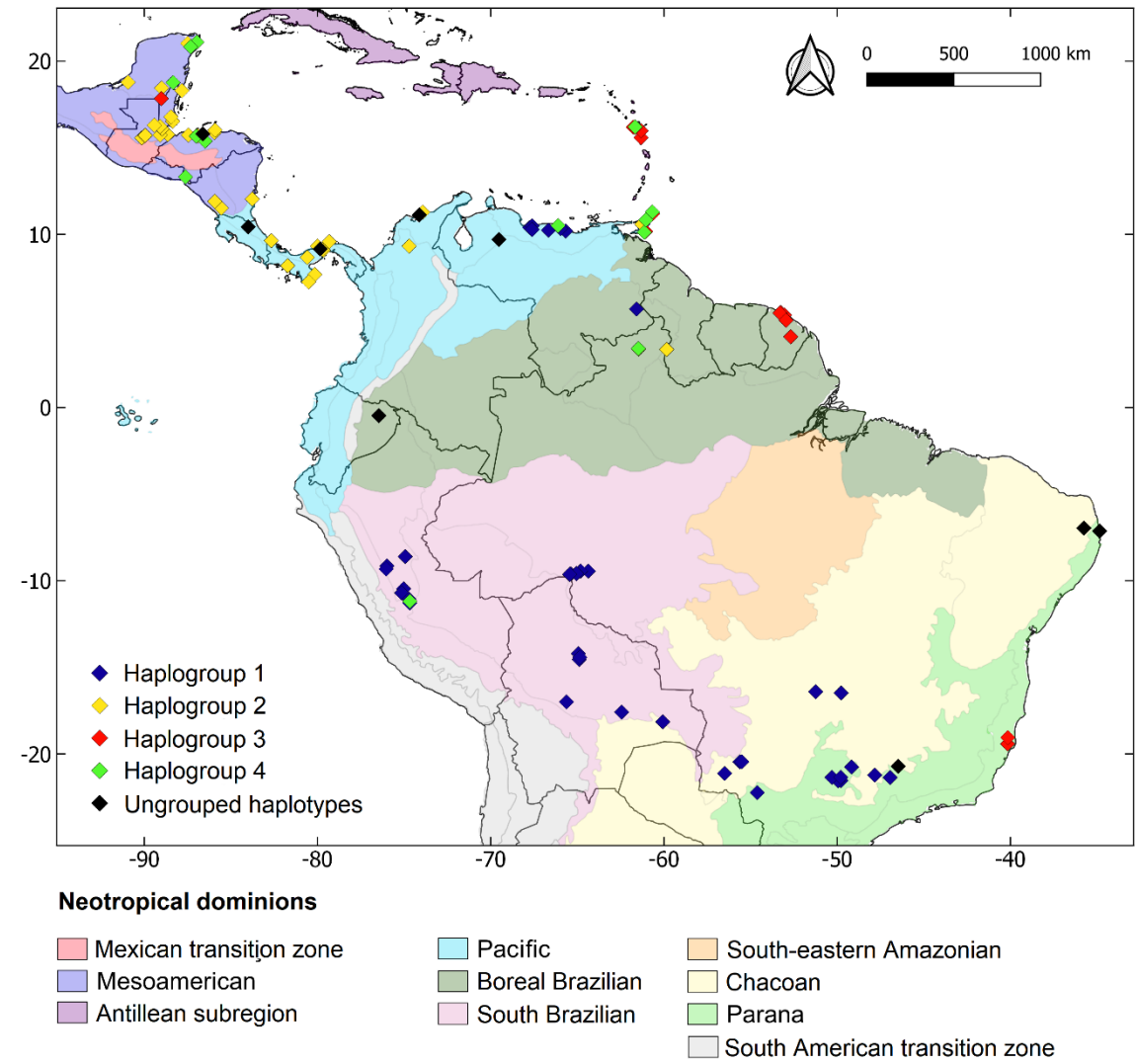
AFS performed the laboratory procedures. AFS and ACM generated, analyzed, and interpreted the results. EMC coordinated the obtention of the samples. All the authors contributed, read, and approved the final manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

The authors declare that they have no competing interests.

FIGURES

Figure 1 – Collection locations of the *N. ephratae* samples. The colors of the points are corresponding to the colors of the haplogroups (see “Haplotype network”).



Datum: WGS 1984
Source shapefile: LÖWENBERG-NETO, P. (2014). Available in: <<http://purl.org/biochartis/neo2014shp>>. Author: SANTOS, A. F. (2021)

Figure 2 – Haplotype network generated using the concatenated sequences (16S + COII) of the *N. ephratae* samples. The white dots on the branches are indicating the mutational steps between the related haplotypes.

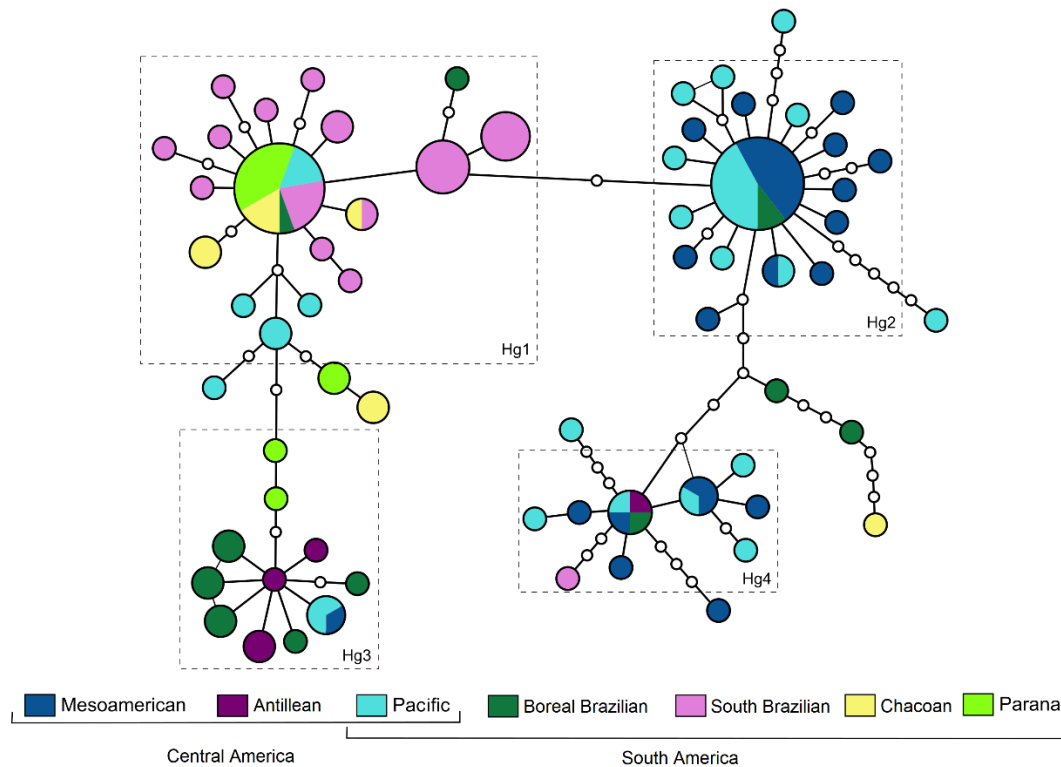


Figure 3 – Results of the analysis of clustering (rhierBAPS) performed with the concatenated sequences (a), 16S sequences (b), and COII sequences (c) of the samples of *N. ephratae*. *The colors above the line are indicating the cluster of the respective samples in the analysis with the concatenated sequences.

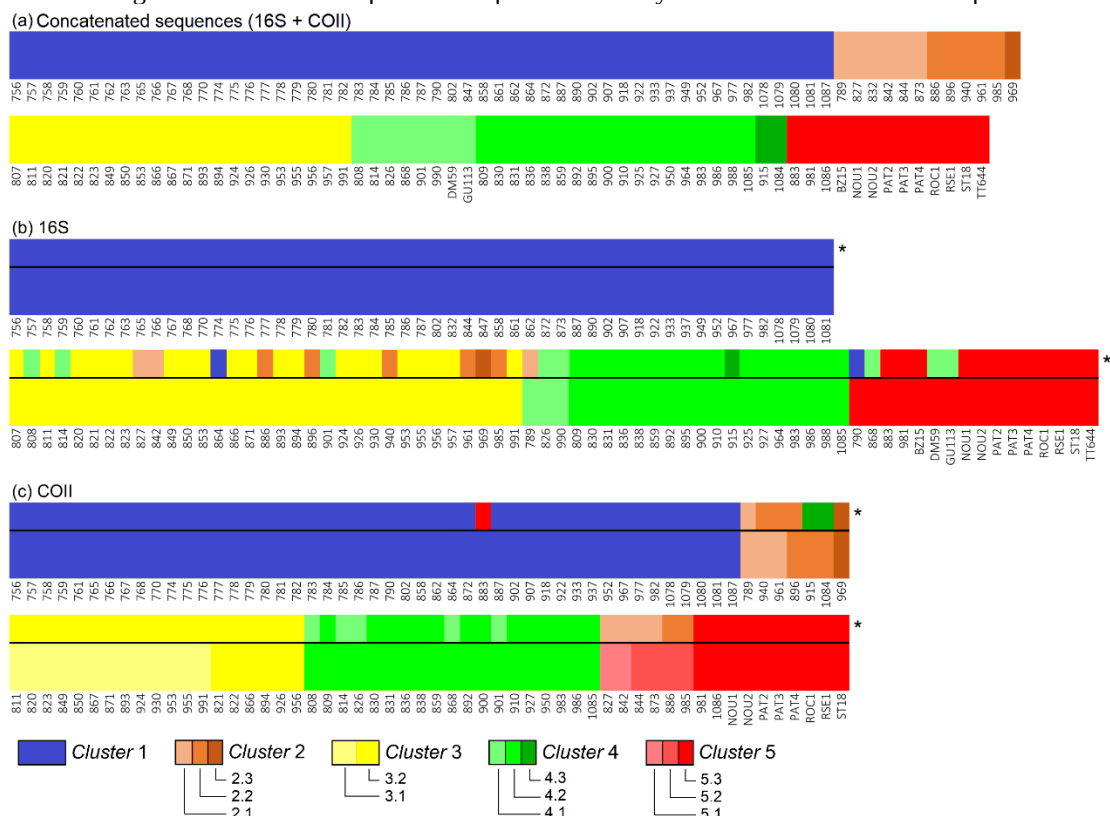


Figure 6 – Bayesian inference tree generated using the haplotypes of *N. ephratae*, associated to the results of the ancestral area reconstruction. The numbers near to the nodes correspond to the estimated divergence times in million of years (My). The “N” inside the PAC circles (close to the taxa names) are indicating that the respective haplotype was observed in the northern portion of PAC dominion, located in Central America; PAC circles without the “N” are indicating the haplotypes from southern portion of PAC dominion, located in South America. The posterior probabilities for this BI are showed in Figure S2.

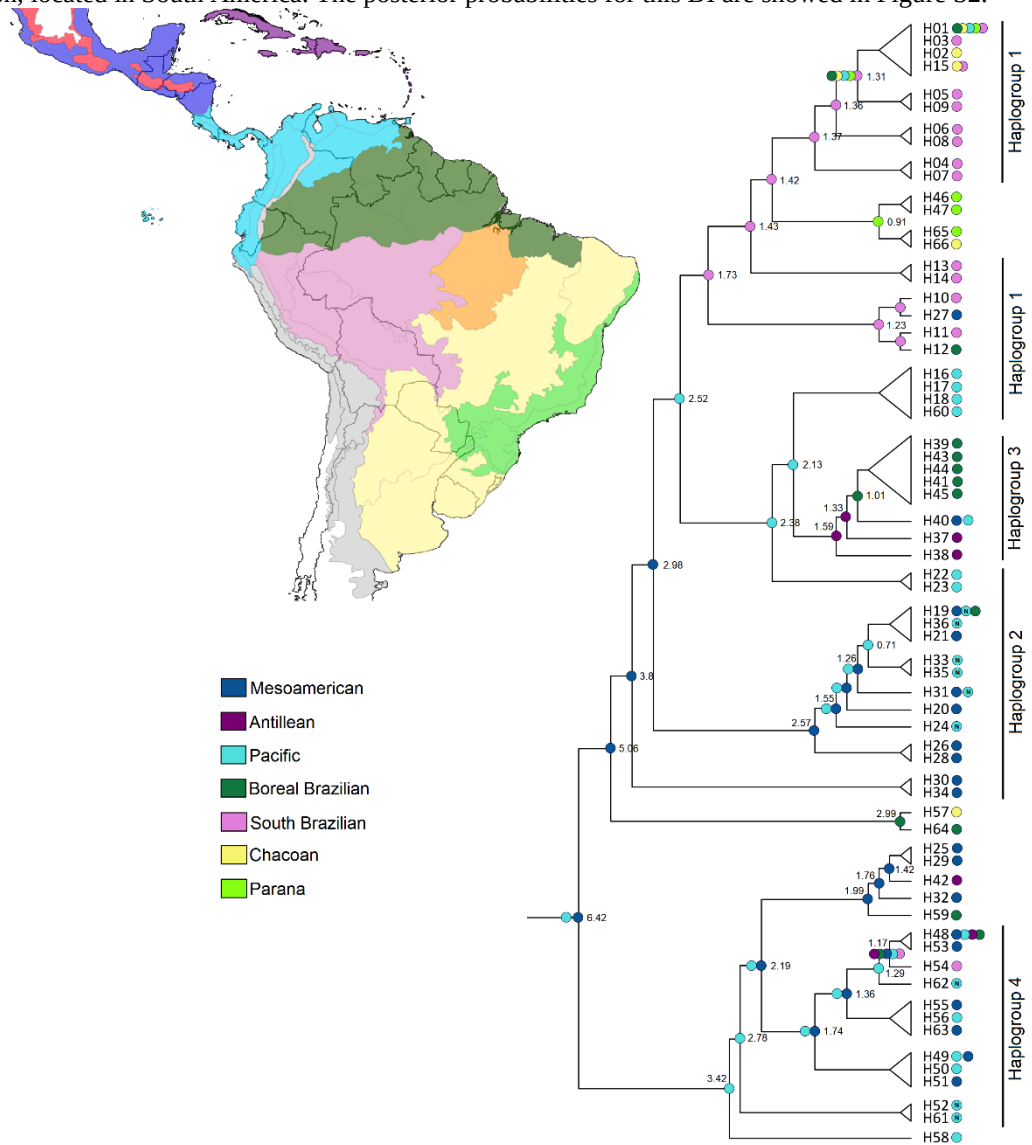
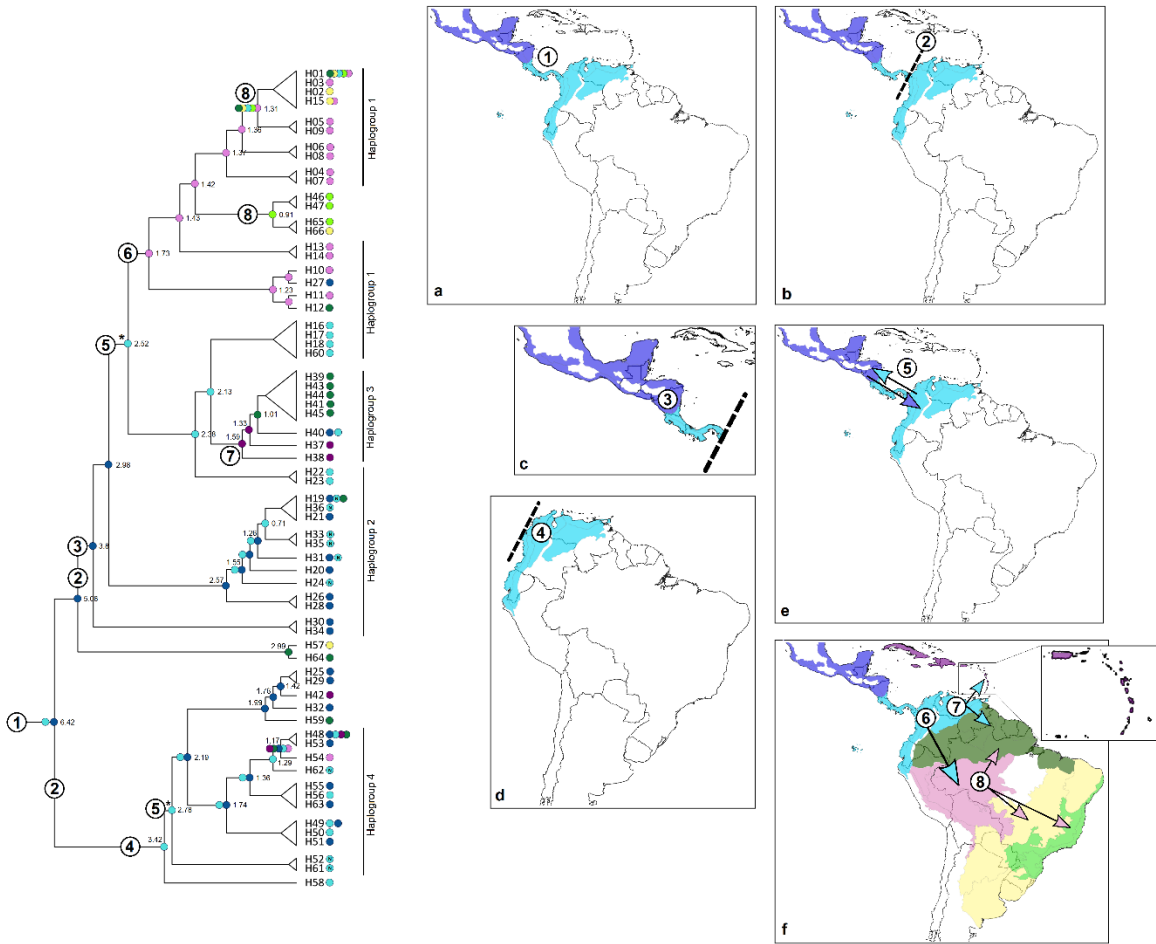


Figure 7 – Dispersal route inferred for *N. ephratae* based on the results obtained in the ancestral area reconstruction. The arrows are indication the direction of the dispersion.



TABLES

Table 1 – Samples analyzed with their respective collection location, geographical coordinates, sequencing of mtDNA regions and neotropical dominion.

Samples	Collection location, state (BR)/country	Geographical coord.		Sequencing	Neotropical dominion
		Latitude	Longitude		
756	Bonito, MS	-21.1284	-56.4957	16S/COII	CHA
757	PortoVelho, RO	-9.44788	-64.811609	16S/COII	SOU
758	PortoVelho, RO	-9.44788	-64.811609	16S/COII	SOU
759	PortoVelho, RO	-9.60887	-65.376932	16S/COII	SOU
760	PortoVelho, RO	-9.44788	-64.811609	16S	SOU
761	PortoVelho, RO	-9.44788	-64.811609	16S/COII	SOU
762	PortoVelho, RO	-9.44788	-64.811609	16S	SOU
763	PortoVelho, RO	-9.591526	-65.05023	16S	SOU
765	PortoVelho, RO	-9.579086	-65.05786	16S/COII	SOU
766	PortoVelho, RO	-9.591526	-65.05023	16S/COII	SOU
767	PortoVelho, RO	-9.642215	-65.446262	16S/COII	SOU
768	PortoVelho, RO	-9.591526	-65.05023	16S/COII	SOU
770	PortoVelho, RO	-9.632081	-65.438702	16S/COII	SOU
774	PortoVelho, RO	-9.45022	-64.36745	16S/COII	SOU
775	Arceburgo, MG	-21.365503	-46.94185	16S/COII	PAR
776	Promissão, SP	-21.545429	-49.782324	16S/COII	PAR
777	Avanhandaga, SP	-21.554946	-49.950317	16S/COII	PAR
778	Linhares, ES	-19.4225	-40.1596	16S/COII	PAR
779	Coroados, SP	-21.356732	-50.305391	16S/COII	PAR

Samples	Collection location, state (BR)/country	Geographical coord.		Sequencing	Neotropical dominion
		Latitude	Longitude		
780	Ipora, GO	-16.4124	-51.2391	16S/COII	CHA
781	Aquidauana, MS	-20.4587	-55.6164	16S/COII	CHA
782	Santa Bárbara, MG	-16.483	-49.7686	16S/COII	CHA
783	Promissão, SP	-21.356201	-49.79478	16S/COII	PAR
784	Guapiaçu, SP	-20.75824	-49.165914	16S/COII	PAR
785	Ribeirão Preto, SP	-21.22689	-47.826861	16S/COII	CHA
786	Palmeiras, MS	-20.4553	-55.5053	16S/COII	CHA
787	Dourados, MS	-22.2373	-54.6144	16S/COII	PAR
789	São João Batista, MG	-20.7176	-46.4742	16S/COII	CHA
790	Sooretama, ES	-19.0554	-40.1469	16S/COII	PAR
802	Rio Chico, Venezuela	10.32965	-65.95991	16S/COII	PAC
807	Colon, Panamá	9.12209	-79.71566	16S	PAC
808	Chiquila, México	21.02455	-87.4977	16S/COII	MES
809	Las Quebradas, Honduras	15.38002	-86.48891	16S/COII	MES
811	Alta Verapaz, Guatemala	15.56674	-90.14269	16S/COII	MES
814	Minca, Colômbia	11.1256	-74.11972	16S/COII	PAC
820	Pipeline Road, Panamá	9.12582	-79.71581	16S/COII	PAC
821	Soberania National Park, Panamá	9.08148	-79.66596	16S/COII	PAC
822	Ometepe, Nicarágua	11.51468	-85.55514	16S/COII	MES
823	Izabal, Guatemala	15.75838	-88.64599	16S/COII	MES
826	Francisco de Orellana, Equador	-0.4708	-76.45925	16S/COII	BOR
827	Minca, Colômbia	11.11327	-74.12861	16S/COII	PAC
830	Trinity Hills, Trinidad e Tobago	10.12008	-61.13279	16S/COII	PAC
831	Englishman's Bay, Trinidad e Tobago	11.28833	-60.66867	16S/COII	PAC
832	Aragua, Venezuela	10.49	-67.61	16S	PAC
836	Coyolito, Honduras	13.31492	-87.62271	16S/COII	MES
838	La Ceiba, Honduras	15.66692	-87.00109	16S/COII	MES
842	Tayrona National Park, Colômbia	11.27731	-73.92561	16S/COII	PAC
844	Maracay, Venezuela	10.27289	-67.61113	16S/COII	PAC
847	Miranda, Venezuela	10.23373	-66.66384	16S	PAC
849	Colon, Panamá	9.57705	-79.32218	16S/COII	PAC
850	Bluefields Naval Station, Nicarágua	12.03739	-83.77062	16S/COII	PAC
853	Alta Verapaz, Guatemala	15.68823	-89.98703	16S	MES
858	Henri Pittier National Park, Venezuela	10.39418	-67.75036	16S/COII	PAC
859	Grand Riviere, Trinidad e Tobago	10.83	-61.044	16S/COII	PAC
861	Bolívar, Venezuela	5.683	-61.583	16S	BOR
862	Satipo, Peru	-11.28681	-74.67691	16S/COII	SOU
864	Puerto Asese, Nicarágua	11.90023	-85.92898	16S/COII	MES
866	Lancetilla Botanical, Honduras	15.73359	-87.45594	16S/COII	MES
867	Alta Verapaz, Guatemala	15.71261	-89.94968	COII	MES
868	Ansela Frailes, Guadalupe	15.97567	-61.31552	16S/COII	ANT
871	Past Mojoriver, Belize	16.09314	-88.9702	16S/COII	MES
872	Cochabamba, Bolívia	-16.99937	-65.62736	16S/COII	SOU
873	Yacambu National Park, Venezuela	9.69985	-69.52694	16S/COII	PAC
883	Mahaut, Guadalupe	16.18723	-61.7735	16S/COII	ANT
886	Rio Blanco National Park, Belize	16.22892	-89.09382	16S/COII	MES
887	Sierrade Cochis, Bolívia	-18.14974	-60.06951	16S/COII	SOU
890	Aripo Savannah, Trinidad e Tobago	10.59667	-61.2075	16S	PAC
892	Rio Negro, Peru	-11.18987	-74.66985	16S/COII	SOU
893	Colon, Panamá	9.32286	-80.00095	16S/COII	PAC
894	Los Santos, Panamá	7.25147	-80.50834	16S/COII	PAC
895	Quintana Roo, México	21.09713	-86.96915	16S	MES
896	Pico Bonito Lodge trail, Honduras	15.68348	-86.90016	16S/COII	MES
900	Heredia, Costa Rica	10.4254	-84.0022	16S/COII	PAC
901	Maya Point, Belize	16.52775	-88.36321	16S/COII	MES
902	Tauri Menonites site, Bolívia	-17.58995	-62.44228	16S/COII	SOU
907	Bajo Pichanaqui, Peru	-11.06414	-74.71955	16S/COII	SOU
910	Quintana Roo, México	20.83018	-87.32672	16S/COII	MES
915	Heredia, Costa Rica	10.4254	-84.0022	16S/COII	PAC
918	San Javier, Bolívia	-14.54909	-64.88964	16S/COII	SOU
922	Alto Cacazu old forest, Peru	-10.70755	-75.14109	16S/COII	SOU
924	Los Santos, Panamá	7.67865	-80.15967	16S/COII	PAC
925	Laguna Bacalar, México	18.76662	-88.33867	16S	MES
926	Capiro National Park, Honduras	15.88046	-85.94997	16S/COII	MES
927	Peten, Guatemala	16.30402	-89.42172	16S/COII	MES

Samples	Collection location, state (BR)/country	Geographical coord.		Sequencing	Neotropical dominion
		Latitude	Longitude		
930	Limon, Costa Rica	9.63252	-82.67172	16S/COII	PAC
933	San Pedro, Bolívia	-14.2126	-64.94026	16S/COII	SOU
937	Pte. Bermudez, Peru	-10.46894	-75.03005	16S/COII	SOU
940	San Jose, México	18.4409	-89.00258	16S/COII	MES
949	El Coco, Venezuela	10.18912	-65.6721	16S	PAC
950	Arena Forest, Trinidad e Tobago	10.57657	-61.27255	COII	PAC
952	Campoverde, Peru	-8.60854	-74.93628	16S/COII	SOU
953	Lajas de Tole, Panamá	8.1874	-81.72511	16S/COII	PAC
955	San Jose, México	18.296	-87.83277	16S/COII	MES
956	Laguna Guaimoreto, Honduras	16.01322	-85.91839	16S/COII	MES
957	Izabal, Guatemala	15.73636	-89.091	16S	MES
961	Cockscomb National Park, Belize	16.78049	-88.45901	16S/COII	MES
964	Higuerote Beach, Venezuela	10.50282	-66.11221	16S	PAC
967	Tingo Maria Cacao, Peru	-9.32776	-76.03557	16S/COII	SOU
969	Cocle, Panamá	8.66907	-80.59178	16S/COII	PAC
977	San Pedro, Bolívia	-14.4239	-64.86053	16S/COII	SOU
981	Rushville, Trinidad e Tobago	10.16633	-61.05433	16S/COII	PAC
982	Tingo Maria, Peru	-9.14974	-75.99233	16S/COII	SOU
983	Barro Colorado Is., Panamá	9.1521	-79.8464	16S/COII	PAC
985	Chicbul, México	18.78033	-90.93848	16S/COII	MES
986	Sambo Creek, Honduras	15.79585	-86.62127	16S/COII	MES
988	Inra, Guadalupe	16.20458	-61.6666	16S	ANT
990	Francisco de Orellana, Equador	-0.4708	-76.45925	16S	BOR
991	Cienega La Batea, Colômbia	9.32242	-74.70874	16S/COII	PAC
1078	João Pessoa, PB	-7.13445	-34.84602	16S/COII	PAR
1079	João Pessoa, PB	-7.13445	-34.84602	16S/COII	PAR
1080	Areia, PB	-6.962804	-35.754688	16S/COII	CHA
1081	Areia, PB	-6.962804	-35.754688	16S/COII	CHA
1084	Amajari (ESEC Maracá), RR	3.3778	-61.46444	COII	BOR
1085	Amajari, RR	3.405	-61.47333	16S/COII	BOR
1086	Bonfim, RR	3.35111	-59.846944	COII	BOR
1087	Bonfim, RR	3.35111	-59.846944	COII	BOR
BZ15*	Rio Bravo Conservation Area, Belize	17.836799	-89.019253	16S (AY623088)	MES
DM59*	St. Andrew, Dominica	15.58	-61.320032	16S (AY623086)	ANT
GU113*	Basse-Terre, Guadalupe	16.166813	-61.664298	16S (AY623089)	ANT
NOU1*	Nouragues, Guiana Francesa	4.087108	-52.680544	16S (KF724740)/ COII (KC630996)	BOR
NOU2*	Nouragues, Guiana Francesa	4.087108	-52.680544	16S (KF724739)/ COII (KC630996)	BOR
PAT2*	Patagui, Guiana Francesa	5.48	-53.26	16S (KF724741)/ COII (KC630997)	BOR
PAT3*	Patagui, Guiana Francesa	5.48	-53.26	16S (KF724739)/ COII (KC630998)	BOR
PAT4*	Patagui, Guiana Francesa	5.48	-53.26	16S (KF724738)/ COII (KC630999)	BOR
ROC1*	Rocoucoua, Guiana Francesa	5.455818	-53.304559	16S (KF724738)/ COII (KC630995)	BOR
RSE1*	Route Saint-Élie, Guiana Francesa	5.335233	-53.035583	16S (KF724739)/ COII (KC631000)	BOR
ST18*	Petit Saut, Guiana Francesa	5.03333	-52.95	16S (KX816700)/ COII (KX816672)	BOR
TT644*	Pinfold Bay, Tobago	11.188005	-60.657997	16S (AY623087)	PAC
Total de amostras				128	
Total de sequências de 16S				123	
Total de sequências de COII				108	
Total de amostras com 16S e COII sequenciados				103	

*Nucleotide sequences obtained in GenBank. ANT: Antillean subregion; BOR: Boreal Brazilian dominion; CHA: Chacoan dominion; MES: Mesoamerican dominion; PAC: Pacific dominion; PAR: Parana dominion; SOU: South Brazilian dominion.

Table 2 – Primers and PCR conditions followed for the amplification of the 16S and COII mtDNA regions.

mtDNA region	Primers	Cycling	num. of cycles	Fragment length
16S	LR-J-13007 (F) [26] LR-N-1398 (R) [27]	94° (3') – initial denaturation	35	400 pb.
		94° (45'') – denaturation		
		46° (45'') – annealing		
		72° (45'') – extension		
		72° (7') – final extension		
COII	Modified A-tLeu (F) [8] B-tLys (R) [28]	94° (3') – initial denaturation	35	750 pb.
		94° (30'') – denaturation		
		46° (1') – annealing		
		72° (3') – extension		
		72° (10') – final extension		

Table 3 – Genetic distance values estimated (a) among the dominions and (b) within dominions.

(a) Genetic distance among the Neotropical dominions sampled						
	ANT	BOR	CHA	MES	PAC	PAR
BOR	0,011					
CHA	0,010	0,011				
MES	0,013	0,016	0,013			
PAC	0,013	0,016	0,013	0,013		
PAR	0,010	0,010	0,003	0,012	0,012	
SUL	0,010	0,011	0,004	0,012	0,012	0,003
(b) Genetic distance within the Neotropical dominions sampled						
Domínio	Distância					
ANT	0,008					
BOR	0,012					
CHA	0,005					
MES	0,012					
PAC	0,014					
PAR	0,001					
SUL	0,003					

ANT: Antillean subregion; BOR: Boreal Brazilian dominion; CHA: Chacoan dominion; MES: Mesoamerican dominion; PAC: Pacific dominion; PAR: Parana dominion; SOU: South Brazilian dominion.

Table 4 – (a) Genetic diversity indices and (b and c) neutrality tests performed for the *N. ephratae* populations.

(a) Genetic diversity							
Gene	num. of sequences	num. of sites	h (Hd) ¹	S ¹	k ¹	π^1	θ -W/seq.
16S	123	396	41 (0.890)	24	3.851	0.00972	3.793 ± 1.216
		742				0.01551	
COII	108	syn = 154.8 n.syn = 529.2 n.cod = 58	53 (0.932)	87	11.560	syn = 0.069 n.syn = 3.5e ⁻⁴	16.354 ± 4.312
(b) Neutrality tests for the whole sample set							
Gene	Fu/Li D*	Fu/Li F*	Achaz Y*	Fu's Fs		Tajima's D	
16S	-2.190 (n/s)	-2.089 (n/s)	0.02162	-26.072 (p=0.00)		-0.884 (n/s)	
COII	-5.833 (p<0.02)	-5.333 (p<0.02)	-1.65154	-24.454 (p=0.00)		-1.225 (n/s)	
16S + COII ²	-4.962 (p<0.02)	-4.584 (p<0.02)	-1.31284	-26.431 (p=0.00)		-0.915 (n/s)	

(c) Testes de neutralidade por domínio								
Gene	Test	Neotropical dominion						
		ANT	BOR	CHA	MES	PAC	PAR	SUL
16S	Fu's <i>F_s</i>	-2.370 (p=0.02)	-10.558 (p=0.000)	-12.470 (p=0.000)	-26.545 (p=0.000)	-25.996 (p=0.000)	-34.028 (p=0.000)	-28.194 (p=0.000)
	Tajima's <i>D</i>	-1.145 (n/s)	-0.349 (n/s)	-1.513 (n/s)	-0.479 (n/s)	-0.006 (n/s)	-1.128 (n/s)	-1.201 (n/s)
COII	Fu's <i>F_s</i>	2.996 (n/s)	-7.832 (p=0.002)	-4.656 (p=0.004)	-12.963 (p=0.000)	-13.563 (p=0.001)	-14.439 (p=0.000)	-26.495 (p=0.000)
	Tajima's <i>D</i>	0.000 (n/s)	0.062 (n/s)	-1.527 (n/s)	1.247 (n/s)	-0.428 (n/s)	0.336 (n/s)	-2.267 (p=0.002)
16S + COII	Fu's <i>F_s</i>	-2.370 (p=0.02)	-10.558 (p=0.000)	-4.063 (p=0.01)	-26.629 (p=0.000)	-26.022 (p=0.000)	-13.607 (p=0.000)	-28.194 (p=0.000)
	Tajima's <i>D</i>	-1.145 (n/s)	-0.349 (n/s)	-1.591 (p=0.004)	-0.647 (n/s)	-0.176 (n/s)	-0.077 (n/s)	-1.200 (n/s)

¹ h: number of haplotypes; Hd: haplotype diversity; S: number of polymorphic sites (including aligned gaps for 16S); k: average number of nucleotide difference; π : nucleotide diversity. ² For Fu and Li's *D** and *F** and for Achaz *Y**, we considered only the samples with both mitochondrial genes sequenced. Syn: synonym; n.syn: non-synonym; n.cod.: no coding site; n/s: not significant (p>0.05). Significant values are highlighted in bold. ANT: Antillean subregion; BOR: Boreal Brazilian dominion; CHA: Chacoan dominion; MES: Mesoamerican dominion; PAC: Pacific dominion; PAR: Parana dominion; SOU: South Brazilian dominion.

Table 5 – Relation among haplogroups, haplotypes, *N. ephratae* samples and its localities and dominions.

Haplogroups	Haplotypes	Samples	Locality, state (BR)/country	Dominion
Hg1	H01	756	Bonito, MS	CHA
		775	Arceburgo, MG	PAR
		776	Promissão, SP	PAR
		777	Avanhandaga, SP	PAR
		779	Coroados, SP	PAR
		782	Santa Bárbara, MG	CHA
		783	Promissão, SP	PAR
		784	Guapiaçu, SP	PAR
		785	Ribeirão Preto, SP	CHA
		787	Dourados, MS	PAR
		847	Miranda, Venezuela	PAC
		890	Aripo Savannah, Trin. e Tobago	PAC
		918	San Javier, Bolívia	SOU
		937	Pte. Bermudez, Peru	SOU
		949	El Coco, Venezuela	PAC
		952	Campoverde, Peru	SOU
		982	Tingo Maria, Peru	SOU
		1087	Bonfim, RR	BOR
	H02	781	Aquidauana, MS	CHA
		786	Palmeiras, MS	CHA
	H03	922	Alto Cacazu old forest, Peru	SOU
	H04	872	Cochabamba, Bolívia	SOU
	H05	862	Satipo, Peru	SOU
	H06	887	Sierra de Cochis, Bolívia	SOU
	H07	902	Tauri Mennonite site, Bolívia	SOU
	H08	933	San Pedro, Bolívia	SOU
	H09	761	Porto Velho, RO	SOU
		774	Porto Velho, RO	SOU
	H10	757	Porto Velho, RO	SOU
		758	Porto Velho, RO	SOU
		760	Porto Velho, RO	SOU
		762	Porto Velho, RO	SOU
		763	Porto Velho, RO	SOU
	H11	766	Porto Velho, RO	SOU
		759	Porto Velho, RO	SOU

Haplogroups	Haplotypes	Samples	Locality, state (BR)/country	Dominion
Hg2		765	Porto Velho, RO	SOU
		767	Porto Velho, RO	SOU
		768	Porto Velho, RO	SOU
		770	Porto Velho, RO	SOU
	H12	861	Bolivar, Venezuela	BOR
	H13	967	Tingo Maria Cacao, Peru	SOU
	H14	907	Bajo Pichanaqui, Peru	SOU
	H15	780	Ipora, GO	CHA
		977	San Pedro, Bolívia	SOU
		802	Rio Chico, Venezuela	PAC
	H17	858	Henri Pittier Nat. Park, Venezuela	PAC
	H18	832	Aragua, Venezuela	PAC
		844	Maracay, Venezuela	PAC
		807	Colon, Panamá	PAC
	H19	811	Alta Verapaz, Guatemala	MES
		822	Ometepe, Nicaragua	MES
		823	Izabal, Guatemala	MES
		849	Colon, Panamá	PAC
		850	Bluefields Naval St., Nicaragua	PAC
		853	Alta Verapaz, Guatemala	MES
		866	Lancetilla Botanical, Honduras	MES
		867	Alta Verapaz, Guatemala	MES
		893	Colon, Panamá	PAC
		896	Pico Bonito Lodge, Honduras	MES
		924	Los Santos, Panamá	PAC
		926	Capiro Nat. Park, Honduras	MES
		930	Limon, Costa Rica	PAC
		950	Arena Forest, Trin. e Tobago	PAC
		957	Izabal, Guatemala	MES
		969	Cocle, Panamá	PAC
		1084	Amajari, RR	BOR
		1086	Bonfim, RR	BOR
	H20	956	Laguna Guaimoreto, Honduras	MES
	H21	871	Past Mojo river, Belize	MES
	H22	842	Tayrona Nat. Park, Colômbia	PAC
	H23	827	Minca, Colômbia	PAC
	H24	894	Los Santos, Panamá	PAC
	H25	901	Maya Point, Belize	MES
	H26	886	Rio Blanco Nat. Park, Belize	MES
	H27	864	Puerto Asese, Nicaragua	MES
	H28	985	Chicbul, México	MES
	H29	808	Chiquila, México	MES
	H30	961	Cockscomb Nat. Park, Belize	MES
	H31	955	San Jose, México	MES
		991	Cienega La Batea, Colômbia	PAC
		927	Peten, Guatemala	MES
	H33	821	Soberania Nat. Park, Panamá	PAC
	H34	940	San Jose, México	MES
	H35	820	Pipeline Road, Panamá	PAC
	H36	953	Lajas de Tole, Panamá	PAC
Hg3	H37	DM59	St. Andrew, Dominica	ANT
	H38	883	Mahaut, Guadalupe	ANT
	H39	PAT2	Patagai, Guiana Francesa	BOR
	H40	981	Rushville, Trin. e Tobago	PAC
		BZ15	Rio Bravo Cons. Area, Belize	MES
		TT644	Pinfold Bay, Trin. e Tobago	PAC
	H41	PAT4	Patagai, Guiana Francesa	BOR
	H42	868	Ansela Frais, Guadalupe	ANT
		GU113	Basse-Terre, Guadalupe	ANT
		H43	Patagai, Guiana Francesa	BOR
		RSE1	Rt. Saint-Élie, Guiana Francesa	BOR
		H44	Nouragues, Guiana Francesa	BOR
		NOU2	Nouragues, Guiana Francesa	BOR
		H45	Rocoucoua, Guiana Francesa	BOR
		ST18	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR
		H46	Linhares, ES	PAR
		778		

Haplogroups	Haplotypes	Samples	Locality, state (BR)/country	Dominion
Hg4	H47	790	Sooretama, ES	PAR
	H48	836	Coyolito, Honduras	MES
		964	Higuerote Beach, Venezuela	PAC
		988	Inra, Guadalupe	ANT
		1085	Amajari, RR	BOR
	H49	831	Englishman's Bay, Trin. e Tobago	PAC
		895	Quintana Roo, México	MES
		925	Laguna Bacalar, México	MES
	H50	830	Trinity Hills, Trin. e Tobago	PAC
	H51	910	Quintana Roo, México	MES
	H52	900	Heredia, Costa Rica	PAC
	H53	809	Las Quebradas, Honduras	MES
	H54	892	Rio Negro, Peru	SOU
	H55	838	La Ceiba, Honduras	MES
	H56	859	Grand Riviere, Trin. e Tobago	PAC
n/g	H57	789	São João Batista, MG	CHA
n/g	H58	814	Minca, Colômbia	PAC
n/g	H59	826	Francisco de Orellana, Equador	BOR
n/g	H60	873	Yacaumbu Nat. Park, Venezuela	PAC
n/g	H61	915	Heredia, Costa Rica	PAC
n/g	H62	983	Barro Colorado Is., Panamá	PAC
n/g	H63	986	Sambo Creek, Honduras	MES
n/g	H64	990	Francisco de Orellana, Equador	BOR
n/g	H65	1078	João Pessoa, PB	PAR
		1079	João Pessoa, PB	PAR
n/g	H66	1080	Areia, PB	CHA
		1081	Areia, PB	CHA

n/g: not grouped. ANT: Antillean subregion; BOR: Boreal Brazilian dominion; CHA: Chacoan dominion; MES: Mesoamerican dominion; PAC: Pacific dominion; PAR: Parana dominion; SOU: South Brazilian dominion.

Table 6 – Results obtained for the Analysis of Molecular Variance (AMOVA).

(a) Among haplogroups		
Source of variation	Percentage of variation	Fixation indices
Among haplogroups	54.69%	$F_{ST} = \mathbf{0.547}$ ($p = 0.000$)
Within haplogroups	45.31%	-
(b) Among dominions		
Among dominions	31.07%	$F_{ST} = \mathbf{0.310}$ ($p = 0.000$)
Within dominions	68.93%	-
(c) Among continents		
Among continents	25.91%	$F_{CT} = \mathbf{0.259}$ ($p = 0.02$)
Among dominions within continents	16.82%	$F_{SC} = \mathbf{0.227}$ ($p = 0.000$)
Within dominions	57.27%	$F_{ST} = \mathbf{0.427}$ ($p = 0.021$)

CAPÍTULO 2

Filogeografia comparada de *Nasutitermes corniger* e *N. ephratae* (Termitidae: Nasutitermitinae) na região Neotropical

Amanda de Faria Santos, Eliana Marques Canello, Adriana Coletto Morales

RESUMO

Nasutitermes corniger e *N. ephratae* são consistentemente reconhecidas como espécies diferentes, mas são muito semelhantes em diversos aspectos. Apresentam áreas de ocorrências sobrepostas (região Neotropical) e são frequentemente recuperadas como espécies próximas em diversos estudos filogenéticos. O objetivo desse capítulo foi analisar de forma comparativa as histórias filogeográficas dessas espécies, buscando compreender se espécies próximas e com características semelhantes respondem de forma similar à biogeografia da região. Para isso, a filogeografia de *N. corniger* foi reanalisada a partir da utilização dos marcadores mitocondriais 16S e COII. Depois, esses resultados foram comparados aos dados levantados para *N. ephratae* a partir dos mesmos marcadores (apresentados no Capítulo 1). Na comparação entre as espécies, foram observadas diversas semelhanças entre os padrões filogeográficos de *N. corniger* e *N. ephratae*, apesar da existência de algumas particularidades em cada uma das espécies. Essas semelhanças incluem a identificação de expansão populacional em todos os domínios amostrados, os pontos iniciais das rotas de dispersão, a dispersão para a América do Sul pelo oeste do continente e a existência de haplogrupos exclusivos da América Central e outros da América do Sul. Por fim, foi possível sugerir que a história biogeográfica da região Neotropical levou a padrões populacionais convergentes em *N. corniger* e *N. ephratae*.

Palavras-chave: cupins, rota de dispersão, biogeografia, padrões populacionais.

1 INTRODUÇÃO

A região Neotropical é a terceira mais rica em número de espécies de cupins, abrangendo 615 espécies viventes, ficando atrás das regiões oriental (1150 espécies) e etiópica (751 espécies). Estão classificadas cinco famílias neotropicais de Isoptera: Stolotermitidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae – a mais diversa, com 437 espécies de ocorrência neotropical (CONSTANTINO, 2021). Nessa região, Termitidae abriga as subfamílias Apicotermitinae, Syntermitinae, Termitinae e Nasutitermitinae – essa última apresenta a maior diversidade do grupo, com 31 gêneros e 171 espécies descritas. Dentre estas, 67 pertencem ao gênero *Nasutitermes*, o que corresponde a quase 40% do número de espécies da subfamília (CONSTANTINO, 2021).

Nasutitermes corniger e *Nasutitermes ephratae*, assim como os outros representantes de Nasutitermitinae, são caracterizados por soldados que possuem uma projeção frontal de formato cônico, chamada de *nasus*, na região anterior da cabeça (Figura 1). Na ponta do *nasus* está localizada a abertura de uma glândula exócrina (que pode tomar grande parte da cápsula cefálica), responsável por secretar substâncias que atuam como defesa química dos indivíduos (EISNER et al., 1976).

Figura 1 – (a) Cabeça de *Nasutitermes corniger*; (b) Cabeça de *N. ephratae*.



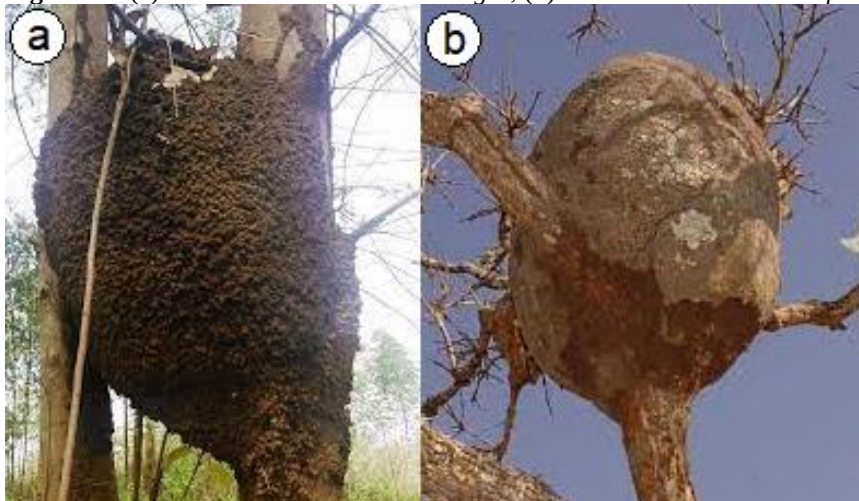
Fonte: (a) CONSTANTINO, 2021. Disponível em http://164.41.140.9/catal/esp.php?cod_esp=318 (acesso em 07/11/2021); (b) LAURENTE, 2003. Disponível em https://cb.naturalsciences.be/ants/isoptera/termitidae/nasutitermitinae/nasutitermes/220796_ephratae.htm (acesso em 10/01/2022).

Nasutitermes corniger foi originalmente descrita por Motschulsky (1855) a partir de soldados coletados no Panamá. Banks (1918) modificou a descrição fornecida por Motschulsky e adicionou a primeira descrição de alados, também do Panamá. Mais tarde, Scheffrahn et al. (2005a, 2005b) realizaram a sinonímia entre *N. corniger* e *N. costalis*, assim como de *N. corniger* e *N. polygynus*, com base em evidências morfológicas,

genéticas e biogeográficas. *Nasutitermes ephratae* foi descrita por Holmgren (1910) a partir de indivíduos alados e operários coletados no Suriname, em Ephrata. Banks (1919) incluiu a descrição dos soldados a partir de espécimes de *N. creolina* coletados no Panamá e, posteriormente, Snyder (1949) realizou a sinonímia entre *N. ephratae* e *N. creolina*. As nomenclaturas de *N. corniger* e de *N. ephratae* foram mantidas de acordo com o que estabelece o “Princípio da Prioridade” (Artigo 23 da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica de 1999), que afirma que o sinônimo mais antigo permanece como nome válido da espécie.

Nasutitermes corniger e *N. ephratae* são muito semelhantes em diversos aspectos, mas são consistentemente reconhecidas como espécies distintas, caracterizadas por diferenças genéticas (MIURA; ROISIN; MATSUMOTO, 2000; SCHEFFRAHN et al., 2005), em relação à arquitetura de seus ninhos arborícolas (THORNE, 1980), à morfologia dos alados (NICKLE; COLLINS, 1992) e à composição da secreção de defesa (HOWARD et al., 1988). Os ninhos de *N. corniger* apresentam uma superfície marrom escura grosseira (Figura 2.a), com pequenos solavancos recobrendo todo o exterior, tendem a ser mais esféricos quando pequenos e com forma elipsoidal quando maiores. Os ninhos de *N. ephratae* possuem uma coloração que pode variar entre marrom claro e escuro e apresentam uma superfície de aparência coriácea, como se estivessem envelopados (Figura 2.b). Internamente, os ninhos de ambas as espécies são fortemente reforçados em torno da câmara real (que abriga a rainha e o rei), que geralmente se localiza em posição mais central do ninho, mais próximo ao tronco da árvore ou ramo que o suporta (THORNE, 1980).

Figura 2 – (a) Ninho de *Nasutitermes corniger*; (b) Ninho de *Nasutitermes ephratae*.



Fonte: (a) Acervo pessoal; (b) Imagem gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Tiago Fernandes Carrijo.

Em diferentes reconstruções filogenéticas, *N. ephratae* e *N. corniger* aparecem como espécies proximamente relacionadas (MIURA; ROISIN; MATSUMOTO, 2000; SCHEFFRAHN et al., 2005a; 2005b; ROY et al., 2014). Suas distribuições geográficas também são muito semelhantes; ambas são espécies neotropicais e de grande amplitude, embora *N. corniger* seja a espécie do gênero com maior dominância e distribuição (SCHEFFRAHN et al., 2005b). Desde o sul do México, a distribuição dessas duas espécies inclui grande parte dos países da América Central, incluindo as Antilhas, e da América do Sul, como Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Brasil, Equador, Suriname, Bolívia e Peru (SNYDER, 1926; 1949; ARAUJO, 1977; TORALES; ARMUA, 1986; CONSTANTINO, 2018). Ambas compartilham o mesmo habitat, incluindo áreas de construção de ninhos e forrageamento. Ao longo do canal do Panamá, por exemplo, foram encontradas inúmeras colônias das duas espécies dispostas a alguns metros de distância umas das outras (HARTKE; ROSENGAUS, 2011).

Os alados de *N. corniger* e de *N. ephratae* apresentam períodos de revoada sobrepostos, que ocorrem no início da estação chuvosa (BOURGUIGNON et al., 2009). Diante disso, e considerando a proximidade filogenética entre as duas espécies, alguns autores sugeriram a ocorrência de eventos de hibridização entre elas, com base em análises químicas das secreções de defesa produzidas pelos soldados (PRESTWICH, 1983) e em análises isoenzimáticas de populações localizadas em ilhas *versus* populações de continente (COLLET; RUVOLO-TAKASUSUKI, 2003).

Apesar disso, a manutenção de suas diferenças morfológicas e genéticas indica a existência de mecanismos de isolamento reprodutivo pré ou pós-zigóticos entre as duas espécies, mesmo que, aparentemente, esse isolamento ainda não ocorra de forma completa. Embora esses mecanismos não estejam muito claros e bem definidos, a composição dos feromônios e o comportamento de corte das espécies parecem ser fatores importantes para manter a separação de *N. corniger* e *N. ephratae* e diminuir as chances de hibridização, ainda que isso possa ocasionalmente ocorrer na natureza (HARTKE; ROSENGAUS, 2011). De modo especulativo, Hartke e Rosengaus (2011) ainda levantaram a hipótese de ocorrência de evolução simpátrica ou introgressão entre as espécies, mas enfatizaram que são necessários estudos filogeográficos detalhados para a delimitação dos tempos de divergência e padrões populacionais para as espécies do gênero.

Um estudo filogeográfico realizado com populações de *N. corniger*, utilizando o marcador mitocondrial 16S como ferramenta molecular, mostrou que a espécie apresenta

alta variabilidade genética e forte estruturação populacional ao longo da região Neotropical, onde sofreu diferenciação em grandes agrupamentos haplotípicos (SANTOS et al., 2017). Os haplogrupos puderam ser associados a biomas sul-americanos e a regiões de predominância, o que, junto a outros dados, levou à identificação de uma rota de dispersão para a espécie. De acordo com os resultados, *N. corniger* teria sofrido dispersão da América Central para a América do Sul, percorrendo as áreas pelo oeste do continente. Depois, se dispersou para outras áreas à leste, chegando, por fim, à Mata Atlântica na costa leste do território brasileiro.

Questões sobre a filogeografia de *N. ephratae* foram abordadas no Capítulo 1 dessa tese, cujos resultados foram gerados com a utilização dos fragmentos 16S e COII do genoma mitocondrial. Os dados desse estudo mostraram que, assim como havia sido observado para *N. corniger*, *N. ephratae* apresenta alta variabilidade genética e estrutura populacional. Em relação à rota de dispersão, a América Central e o norte da América do Sul (domínios Mesoamericano e Pacífico) foram identificados como áreas ancestrais das populações analisadas. Também foi possível identificar que houve dispersão nos dois sentidos entre as Américas Central e do Sul. Além disso, uma separação temporária entre as populações localizadas nessas duas regiões teve um efeito importante para os padrões populacionais observados na América Central, que tiveram origem a partir de histórias filogeográficas diferentes.

O principal objetivo desse capítulo foi analisar a hipótese de que *N. corniger* e *N. ephratae* – que são espécies semelhantes em relação a aspectos biológicos, ecológicos, comportamentais e de distribuição – foram afetadas também de forma semelhante pela história biogeográfica da região Neotropical. Para isso, foi incluído o marcador mitocondrial COII para a reanálise da história filogeográfica de *N. corniger* [que havia sido analisada apenas com o uso do marcador 16S por Santos et al. (2017)], de modo que foi possível comparar os padrões genéticos e filogeográficos de ambas as espécies de forma mais sólida.

Diante disso, serão apresentados, em um primeiro momento, os resultados referentes às análises genéticas, demográficas e filogeográficas de *N. corniger*, considerando a inclusão das sequências nucleotídicas de COII, junto às de 16S. Depois, esses resultados serão discutidos em comparação aos dados obtidos por Santos et al. (2017) e, por fim, aos dados de *N. ephratae* apresentados no Capítulo 1. As unidades biogeográficas definidas para as análises estão de acordo com a regionalização em domínios da região Neotropical proposta por Morrone (2014), assim como foi feito para

N. ephratae (Capítulo 1). Santos et al. (2017) não consideraram essa regionalização para a condução das análises.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

A maior parte das amostras de *N. corniger* utilizadas neste estudo foram obtidas para o trabalho de Santos et al. (2017). As amostras foram coletadas em diferentes campanhas ao longo da distribuição de *N. corniger* no Brasil e armazenadas em etanol absoluto na coleção de Isoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), sob a curadoria da Profa. Dra. Eliana Marques Cancellato. As amostras da Paraíba foram doadas pelo Prof. Dr. Alexandre Vasconcellos, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), e as amostras da América Central e América do Sul (exceto Brasil) foram cedidas pelo Prof. Dr. Rudolf Scheffrahn, da Universidade da Flórida. Além dessas amostras obtidas para o trabalho de Santos et al. (2017), foram incluídas outras duas amostras de Roraima, provenientes da coleção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e cedidas pelo Prof. Dr. Cristian Dambros. O DNA extraído e o material testemunho dos indivíduos utilizados para as análises estão depositados na coleção molecular do Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Adicionalmente, dez sequências nucleotídicas de *N. corniger* obtidas no *GenBank*, cujo acesso é público, também foram incluídas nas análises. No total, 193 espécimes de *N. corniger* foram analisadas neste trabalho (Tabela 1; Figura 3).

Tabela 1. Amostras de *N. corniger* analisadas, locais de coleta, domínios neotropicais de origem, coordenadas geográficas e sequenciamento das regiões do mtDNA (16S e/ou COII).

Amostra (nº LaBE)	Local de coleta, estado/país	Domínio neotropical ³	Coord. Geográficas		Sequenciamento (nº <i>GenBank</i>)
			Latitude	Longitude	
91	Jaboticabal, SP	CHA	-21.25472	-48.32222	16S
92	Jaboticabal, SP	CHA	-21.25472	-48.32222	16S
93	Jaboticabal, SP	CHA	-21.25472	-48.32222	16S
164	Porto Velho, RO	SUL	-8.83823	-64.06554	16S/COII
165	Porto Velho, RO	SUL	-9.60888	-65.37693	16S/COII
168	Porto Velho, RO	SUL	-9.43718	-64.83201	16S/COII
171	Porto Velho, RO	SUL	-9.57909	-65.05786	16S/COII
175	Porto Velho, RO	SUL	-9.59471	-65.06456	16S/COII
178	Porto Velho, RO	SUL	-9.60185	-65.05691	16S/COII
181	Corumbá, MS	SUL	-19.30605	-57.05536	16S/COII
183	Corumbá, MS	SUL	-19.46908	-57.0281	16S/COII
185	Corumbá, MS	SUL	-19.4823	-56.9931	16S/COII
194	Las Terrenas, Rep. Dominicana	ANT	19.221	-69.529	16S

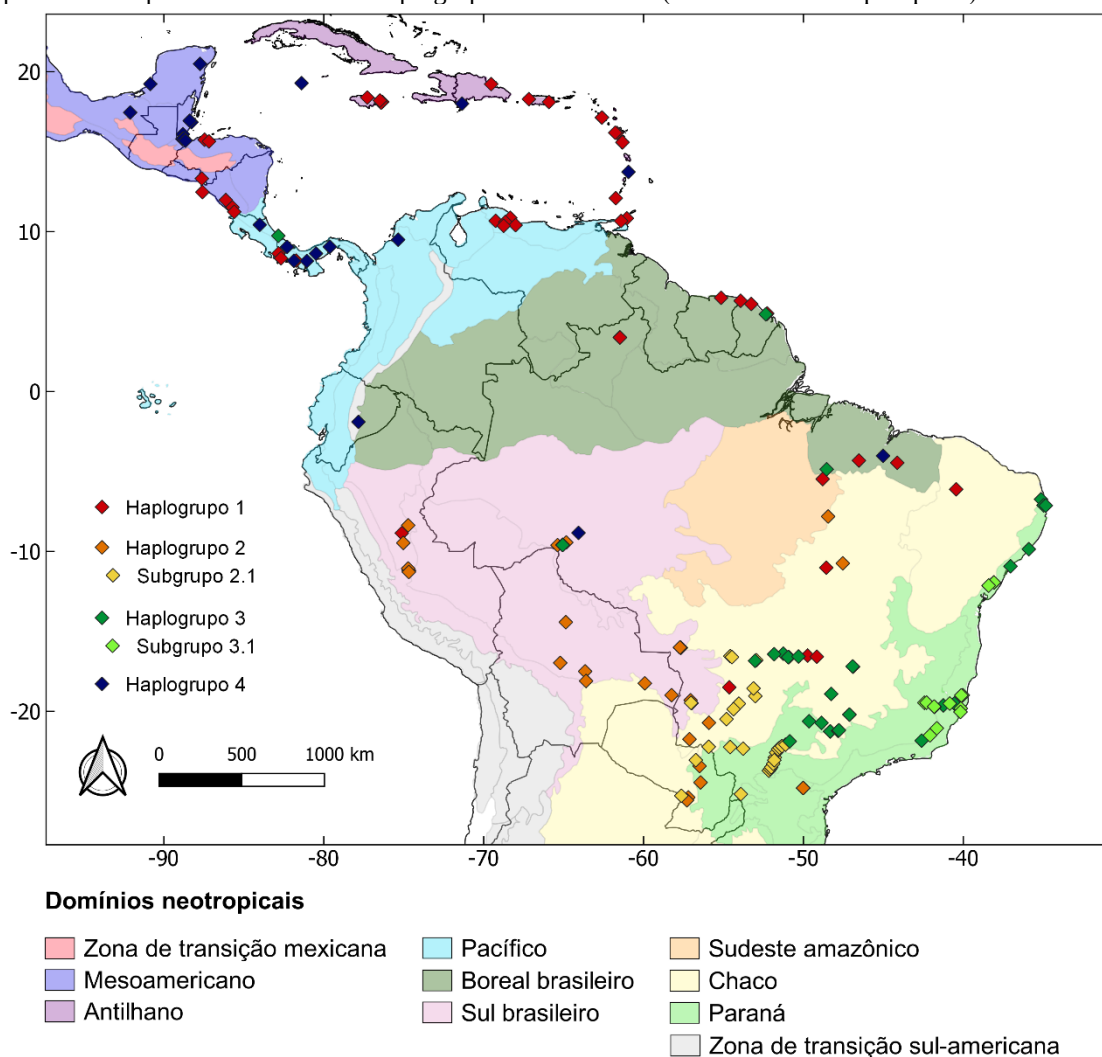
Amostra (n° LaBE)	Local de coleta, estado/país	Domínio neotropical ³	Coord. Geográficas		Sequenciamento (n° GenBank)
			Latitude	Longitude	
195	Anãso, Porto Rico	ANT	18.283	-67.167	16S
197	Salto de Agua, México	MES	17.449	-92.104	16S
198	Petit-Bourg, Guadalupe	ANT	16.167	-61.664	16S
199	Church Ground, St. Kitts-Nevis	ANT	17.13422	-62.60183	16S
200	Paramaribo, Suriname	BOR	5.86	-55.15	16S
201	St. Andrew, Dominica	ANT	15.58	-61.320032	16S
202	Arapiccos, Equador	BOR	-1.9	-77.83	16S
203	Florida, USA	ANT	26.051715	-80.431728	16S
267	Castro, PR	PAR	-24.7943	-50.01594	16S
268	Castro, PR	PAR	-24.7943	-50.01594	16S
269	Castro, PR	PAR	-24.7943	-50.01594	16S
273	Cáceres, MT	SUL	-16.0235	-57.6611	16S/COII
275	Cáceres, MT	SUL	-16.00293	-57.71705	16S/COII
277	Cáceres, MT	SUL	-16.00293	-57.71705	16S/COII
278	Cáceres, MT	SUL	-16.00293	-57.71705	16S/COII
280	João Pessoa, PB	PAR	-7.13445	-34.84602	16S
281	João Pessoa, PB	PAR	-7.13445	-34.84602	16S/COII
282	João Pessoa, PB	PAR	-7.13445	-34.84602	16S/COII
283	Uberlândia, MG	CHA	-18.9113	-48.2622	16S/COII
297	Santa Rita, PB	PAR	-7.11631	-34.9812	16S/COII
298	Santa Rita, PB	PAR	-7.11631	-34.9812	16S/COII
299	Tauá, CE	CHA	-6.1144	-40.4477	16S
300	Avelinópolis, GO	CHA	-16.5133	-49.7372	16S/COII
301	Bom Jesus das Selvas, MA	BOR	-4.3133	-46.5289	16S/COII
302	Lago Verde, MA	BOR	-4.022	-45.0164	16S/COII
303	Lago Verde, MA	BOR	-4.022	-45.0164	16S/COII
304	Codó, MA	BOR	-4.4575	-44.1329	16S/COII
306	São João do Araguaia, PA	BOR	-5.4739	-48.7946	16S
307	Abel Figueiredo, PA	BOR	-4.8625	-48.5467	16S/COII
309	Brejinho de Nazaré, TO	CHA	-11.0164	-48.5689	16S/COII
310	Ponte Alta do Tocantins, TO	CHA	-10.7436	-47.5378	16S/COII
311	Colinas do Tocantins, TO	CHA	-7.815	-48.4529	16S/COII
347	Sacramento, MG	CHA	-20.2019444	-47.122222	16S/COII
348	Sacramento, MG	CHA	-20.2019444	-47.122222	16S/COII
349	Maceió, AL	PAR	-9.8586111	-35.903888	16S/COII
350	Acaraju, SE	PAR	-10.929166	-37.0475	16S/COII
351	Tanabi, SP	CHA	-20.619777	-49.649185	16S/COII
352	Caacupé, Paraguai	CHA	-25.38044	-57.20014	16S/COII
353	Guayaibí, Paraguai	CHA	-24.44771	-56.43303	16S/COII
354	Tacuati, Paraguai	CHA	-23.42052	-56.49494	16S/COII
355	Concepción, Paraguai	CHA	-23.05027	-56.72764	16S/COII
356	Asuncion, Paraguai	CHA	-25.27856	-57.63545	16S/COII
357	Yaguarón, Paraguai	CHA	-25.56204	-57.28416	16S/COII
358	Santiago, Panamá	PAC	8.15942	-81.05536	16S/COII
359	Las Lajas, Panamá	PAC	8.17263	-81.86517	16S/COII
360	Punta Robalo, Panamá	PAC	9.0435	-82.29374	16S/COII
361	Canas Gordas, Panamá	PAC	8.63203	-82.82654	16S
362	Santa Marta, Panamá	PAC	8.33266	-82.67223	16S
363	Lajas de Tole, Panamá	PAC	8.1874	-81.72511	16S/COII
364	Los Piedras, Panamá	PAC	8.62902	-80.48495	16S/COII
365	Satipo, Peru	SUL	-11.28681	-74.67691	16S/COII
366	Rio Negro, Peru	SUL	-11.1807	-74.68987	16S/COII
367	Rio Negro, Peru	SUL	-11.18987	-74.66985	16S/COII
368	Bajo Pichanaqui, Peru	SUL	-11.06414	-74.71955	16S/COII
369	Pto. Inca, Peru	SUL	-9.46759	-75.02367	16S/COII
370	Pucallpa, Peru	SUL	-8.36714	-74.71778	16S/COII
371	Von Humbolt, Peru	SUL	-8.85449	-75.11904	16S/COII
373	Flora & Fauna Hotel, Bolívia	SUL	-17.49893	-63.65244	16S/COII
374	Villa Tunari, Bolívia	SUL	-16.97043	-65.21001	16S/COII
375	San Pedro, Bolívia	SUL	-14.4239	-64.86053	16S/COII
376	Limoncito, Bolívia	SUL	-18.24663	-59.91882	16S
377	Yacuces, Bolívia	SUL	-18.98723	-58.24453	16S/COII
378	Los Volcanes, Bolívia	SUL	-18.10037	-63.59343	16S/COII
379	Tucacas, Venezuela	PAC	10.86081	-68.3314	16S/COII
380	Churaguara, Venezuela	PAC	10.67215	-69.24857	16S/COII

Amostra (n° LaBE)	Local de coleta, estado/país	Domínio neotropical ³	Coord. Geográficas		Sequenciamento (n° GenBank)
			Latitude	Longitude	
381	San Filipi, Venezuela	PAC	10.5977	-68.64485	16S/COII
382	Yurubi, Venezuela	PAC	10.36432	-68.74982	16S/COII
383	San Sabastian, Venezuela	PAC	10.40245	-68.00039	16S
384	Windsor Forest, Jamaica	ANT	18.11114	-76.34124	16S
385	Ginger House, Jamaica	ANT	18.05814	-76.41414	16S/COII
387	Port Antonio, Jamaica	ANT	18.19923	-76.4838	16S/COII
388	St. Ann's, Jamaica	ANT	18.38411	-77.27663	16S/COII
389	Lancetilla Botan., Honduras	MES	15.74626	-87.45343	16S/COII
390	San Juan Bosque, Honduras	MES	15.6403	-87.17666	16S/COII
391	Coyolito, Honduras	MES	13.31492	-87.62271	16S
392	Santa Barbara, Honduras	MES	12.46915	-87.58688	16S/COII
393	Punta Gorda, Belize	MES	16.09112	-88.80841	16S
394	Jaguar Reef Lodge, Belize	MES	16.83997	-88.27174	16S/COII
395	Mayflower Natl Park, Belize	MES	16.93243	-88.38291	16S/COII
396	Ometepe, Nicaragua	MES	11.52188	-85.71052	16S/COII
397	Road to Cardenas, Nicaragua	MES	11.23548	-85.59799	16S
398	Lake Masaya, Nicaragua	MES	11.97336	-86.12502	16S/COII
399	San Carlos, Guatemala	MES	15.78895	-88.84182	16S/COII
400	Livingston beach, Guatemala	MES	15.82811	-88.74756	16S
401	Puerto Barrios, Guatemala	MES	15.68554	-88.64486	16S/COII
402	Champtón, Mexico	MES	19.23112	-90.84244	16S
403	Coba, Mexico	MES	20.48872	-87.73501	16S
405	St. Augustine, Trinidad e Tobago	PAC	10.664	-61.404	16S/COII
406	Grand Riviere, Trinidad e Tobago	PAC	10.83	-61.044	16S/COII
407	Florida, USA	ANT	26.06902	-80.16941	16S/COII
408	Florida, USA	ANT	26.06403	-80.17375	16S/COII
409	Treasure Cay, Bahamas	ANT	26.67635	-77.28432	16S/COII
410	Treasure Cay, Bahamas	ANT	26.67643	-77.2856	16S
411	Coconut Bay, St. Lucia	ANT	13.730644	-60.941431	16S/COII
412	Church Grounds, St. Kitts-Nevis	ANT	17.13422	-62.60183	16S
413	Crompton Point, Dominica	ANT	15.58333	-61.31667	16S
415	Yabucoa, Porto Rico	ANT	18.10167	-65.91272	16S
416	La Selva Biol. Station, Costa Rica	PAC	10.4254	-84.0022	16S/COII
417	Fountain Court, Ilhas Cayman	ANT	19.28423	-81.38697	16S
418	Enriquillo, Rep. Dominicana	ANT	18.00078	-71.3501	16S/COII
419	Jessamine Vale, Granada	ANT	12.09006	-61.73523	16S/COII
420	Highway D23, Guadalupe	ANT	16.18393	-61.7702	16S
437	Ipaba, MG	PAR	-19.4623	-42.43	16S/COII
438	Ipaba, MG	PAR	-19.4623	-42.43	16S/COII
439	Caratinga, MG	PAR	-19.4562	-42.3004	16S/COII
440	Caratinga, MG	PAR	-19.4562	-42.3004	16S/COII
442	Ipanema, MG	PAR	-19.7245	-41.8028	16S/COII
445	Penha do Capim, MG	PAR	-19.6284	-41.2483	16S/COII
446	Itapina, ES	PAR	-19.5118	-40.8472	16S/COII
447	Colatina, ES	PAR	-19.5099	-40.5591	16S/COII
448	Sooretama, ES	PAR	-18.9897	-40.038	16S/COII
449	Sooretama, ES	PAR	-18.9967	-40.1267	16S
450	Aracruz, ES	PAR	-19.821	-40.1537	16S
451	Fundão, ES	PAR	-20.0372	-40.1769	16S/COII
452	São José do Calçado, ES	PAR	-21.0575	-41.657	16S/COII
453	São José do Calçado, ES	PAR	-21.5	-42.083333	16S/COII
454	São Geraldo, MG	PAR	-21.8315	-42.6069	16S/COII
455	Ipanema, MG	PAR	-19.6985	-41.8241	16S/COII
456	Goiânia, GO	CHA	-16.5843	-49.1614	16S/COII
469	Céu Azul, PR	PAR	-25.175126	-53.913901	16S/COII
470	Ivailândia, PR	PAR	-23.710449	-52.160627	16S/COII
471	Floresta, PR	PAR	-23.598891	-52.07929	16S/COII
472	Maringá, PR	PAR	-23.497496	-52.014919	16S/COII
473	Maringá, PR	PAR	-23.497496	-52.014919	16S/COII
474	Maringá, PR	PAR	-23.279694	-51.888869	16S
475	Santa Fé, PR	PAR	-23.056231	-51.82309	16S/COII
476	Nossa Sra. das Graças, PR	PAR	-22.882321	-51.790357	16S/COII
477	Itoiroró, SP	PAR	-22.580632	-51.707383	16S/COII
478	Tarabaí, SP	PAR	-22.366206	-51.583056	16S/COII
479	Pirapozinho, SP	PAR	-22.271347	-51.484303	16S/COII

Amostra (n° LaBE)	Local de coleta, estado/país	Domínio neotropical ³	Coord. Geográficas		Sequenciamento (n° GenBank)
			Latitude	Longitude	
480	Presidente Prudente, SP	PAR	-22.173129	-51.344981	16S/COII
481	Martinópolis, SP	PAR	-22.081654	-51.12027	16S/COII
482	Osvaldo Cruz, SP	PAR	-21.874343	-50.8583	16S/COII
483	Olímpia, SP	CHA	-20.72184	-48.869361	16S/COII
487	Entre Rios, BA	PAR	-11.9419444	-38.08444	16S/COII
490	Entre Rios, BA	PAR	-11.9419444	-38.08444	16S/COII
492	Entre Rios, BA	PAR	-11.9419444	-38.08444	16S/COII
499	Alagoinhas, BA	PAR	-12.13555	-38.419166	16S/COII
501	Alagoinhas, BA	PAR	-12.13555	-38.419166	16S/COII
502	Entre Rios, BA	PAR	-11.9419444	-38.08444	16S/COII
511	Colatina, ES	PAR	-19.5099	-40.5591	16S/COII
512	Sooretama, ES	PAR	-18.9897	-40.038	16S/COII
513	Ribeirão Preto, SP	CHA	-21.225277	-47.827222	16S/COII
515	Ribeirão Preto, SP	CHA	-21.178055	-47.78	16S/COII
583	Ivolândia, GO	CHA	-16.6101	-50.9525	16S/COII
584	Paracatu, MG	CHA	-17.2108	-46.8956	16S/COII
585	Araguainha, MT	CHA	-16.7994	-52.9446	16S/COII
586	Firminópolis, GO	CHA	-16.5697	-50.3082	16S/COII
587	Paracatu, MG	CHA	-16.8409	-53.027	16S/COII
588	Paraíso das Águas, MS	CHA	-19.0462	-53.0096	16S/COII
589	Ivolândia, GO	CHA	-16.6068	-50.9086	16S/COII
590	Pedra Preta, MT	CHA	-16.6068	-54.4709	16S/COII
591	Paracatu, MG	CHA	-17.1896	-46.9226	16S/COII
592	Piranhas, GO	CHA	-16.4256	-51.8316	16S/COII
593	Coxim, MS	CHA	-18.495	-54.6354	16S/COII
594	Campo Grande, MS	CHA	-20.4877	-54.8131	16S/COII
595	Antônio João, MS	CHA	-22.2159	-55.9236	16S/COII
596	Perdido, MS	CHA	-21.7419	-57.1254	16S/COII
597	Camapuã, MS	CHA	-19.5211	-54.0406	16S/COII
598	Bandeirantes, MS	CHA	-19.8639	-54.3688	16S/COII
599	Costa Rica, MS	CHA	-18.5641	-53.121	16S/COII
600	Pedra Preta, MT	CHA	-16.549	-54.5748	16S/COII
601	Dourados, MS	CHA	-22.2334	-54.5815	16S
602	Ivinheima, MS	CHA	-22.3337	-53.7695	16S/COII
603	Anastácio, MS	CHA	-20.7137	-55.9087	16S/COII
604	Diorama, GO	CHA	-16.3947	-51.2571	16S/COII
605	João Pessoa, PB	PAR	-7.13445	-34.84602	16S/COII
606	Mamanguape, PB	PAR	-6.7416	-35.1405	16S/COII
1088 ¹	Amajari, RR	BOR	3.386944	-61.4825	16S/COII
1089 ¹	Amajari, RR	BOR	3.37777	-61.4733	16S/COII
ATK ²	Canal zone, Panamá	PAC	9.050243	-79.618957	COII (DQ530631)
AWA ²	Awala-Yalimapo, Guiana Francesa	BOR	5.673499	-53.928741	16S (KF724731)
					COII (KC630989)
BEL ²	Bellevue, Guiana Francesa	BOR	5.473123	-53.263368	16S (KF724732)
					COII (KC630989)
BUJ ²	Florida, USA	ANT	26.06016	-80.112934	16S (JQ429136)
CAS ²	Colosó, Colômbia	PAC	9.493527	-75.347001	16S (MH090906)
					COII (MH090846)
ILM ²	Ilet la Mère, Guiana Francesa	BOR	4.853058	-52.284224	16S (KF724733)
					COII (KC630989)
MAT ²	Matoury, Guiana Francesa	BOR	4.831788	-52.353811	COII (KC630989)
MIL ²	Canal Zone, Panamá	PAC	9.050243	-79.618957	16S (AB037344)
					COII (AB037327)
MON ²	Montjoly, Guiana Francesa	BOR	4.881949	-52.264792	16S (KF724734)
					COII (KC630989)
ZHA ²	Cahuita National Park, Costa Rica	PAC	9.73566	-82.838242	COII (HM208257)
Total de amostras					193
Total de amostras com 16S e COII sequenciados					150
Total de sequências de 16S					190
Total de sequências de COII					153

¹ Amostras obtidas para esse trabalho, não incluídas em Santos et al. (2017); ² Sequências obtidas no GenBank; ³ Domínios neotropicais regionalizados por Morrone (2014). ANT = Antilhano; BOR = Boreal; CHA = Chaco; MES = Mesoamericano; PAC = Pacífico; PAR = Paraná; SUL = Sul brasileiro.

Figura 3 – Pontos de coleta de todas as amostras de *N. corniger* utilizadas nesse trabalho. As cores dos pontos correspondem às cores dos haplogrupos estabelecidos (ver item “Rede haplotípica”).



Sistema de coordenadas: WGS 1984.

Fonte *shapefile*: LÖWENBERG-NETO, P. (2014). Disponível em <<http://purl.org/biochartis/neo2014shp>>. Elaboração: SANTOS, A. F. (2021)

Procedimentos laboratoriais

O DNA total foi extraído a partir da cabeça de um indivíduo por colônia de acordo com a metodologia de Liu e Beckenbach (1992), que utiliza fenol-clorofórmio para a extração e etanol 100% e 70% para lavagem do DNA. A amplificação das regiões 16S rRNA e COII do mtDNA foram realizadas através de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) de acordo com as condições descritas na Tabela 2. A reação de PCR, com volume final de 25 μ L, foi composta por 3 μ L de cada *primer* (*Foward* e *Reverse*) a 5 pmol/ μ L, 12.5 μ L de PCR *Master Mix* (Promega), de 2.5 a 3.5 μ L de *Nuclease Free Water* e de 3 μ L a 4 μ L de DNA com concentração média de 20 ng/ μ L. A checagem da amplificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1%, com a utilização de um controle

negativo para monitoramento de contaminação. O produto de PCR cuja amplificação foi confirmada foi purificado com a utilização do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, seguido de sequenciamento tipo *Sanger* através do sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi submetida às mesmas condições descritas para a amplificação dos fragmentos.

Tabela 2 – *Primers e condições de PCR utilizadas para amplificação dos genes 16S rRNA e COII.*

Região	Primers	Ciclagem	nº de ciclos	Tamanho aprox. do fragmento
16S	LR-J-13007 (F) ¹ LR-N-1398 (R) ²	94º por 3' - desnaturação inicial	35	400 pb.
		94º por 45" - desnaturação		
		46º por 45" - anelamento		
		72º por 45" - extensão		
		72º por 7' - extensão final		
COII	Modified A-tLeu (F) ³ B-tLys (R) ⁴	94º por 3' - desnaturação inicial	35	750 pb.
		94º por 30" - desnaturação		
		46º por 1' - anelamento		
		72º por 3' - extensão		
		72º por 10' - extensão final		

¹ KAMBHAMPATI, 1995; ² XIONG; KOCHER, 1991; ³ MIURA et al., 2000; ⁴ SIMON et al., 1994.

Análise dos dados

Alinhamento das sequências, diversidade genética e testes de neutralidade

Todas as sequências nucleotídicas foram lidas através do *software* Chromas Lite v. 2.6.5 (Technelysium Ltd., 2005). As sequências de 16S rRNA foram alinhadas através do Mafft v. 7 (KURAKU et al., 2013; KATOH; ROZEWICKI; YAMADA, 2017) e as de COII foram alinhadas através do Geneious v. 7.1.9 (<https://www.geneious.com>) pelo método ClustalW, seguido de inspeção visual. O Geneious v. 7.1.9 também foi utilizado para concatenar as sequências de 16S e COII das amostras em que ambas as regiões puderam ser sequenciadas.

Para quantificar a diversidade genética entre as sequências de DNA, os seguintes parâmetros foram estimados através do *software* Arlequin v. 3.5.1.2 (EXCOFFIER, 2010): número de sítios polimórficos (S), diversidade nucleotídica (π), número médio de diferenças nucleotídicas (k) e diversidade haplotípica (Hd). O mesmo programa foi utilizado para a realização dos testes de neutralidade F_s de Fu (FU, 1997) e D Tajima (TAJIMA, 1989) – esses testes foram realizados para todo o conjunto de amostras e, separadamente, para cada domínio neotropical amostrado. Além desses parâmetros, o valor de θ -W por sequência foi estimado através do *software* DnaSP v. 6 (ROZAS et al.,

2017), onde também foram calculados os valores dos testes de neutralidade F^* e D^* de Fu e Li (FU; LI, 1993) e Achaz Y^* (ACHAZ, 2008).

A porcentagem média de cada nucleotídeo na composição das sequências e as distâncias genéticas par a par (entre indivíduos, entre domínios e dentro dos domínios) foram estimadas através do *software* MEGA-X (KUMAR et al., 2018). Os cálculos dos valores de distância e dos testes de neutralidade foram realizados considerando as sequências concatenadas e, também, cada um dos genes individualmente. Para os parâmetros de diversidade genética, somente as sequências de cada um dos genes em separado foram consideradas.

Rede de haplótipos

A rede de haplótipos foi gerada com as sequências concatenadas através do programa TCS v. 1.21 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000), que utiliza o método de parcimônia para estabelecer o relacionamento entre os haplótipos, com limite de conexão igual a 95%. Os haplogrupos foram definidos com base no formato da rede, avaliando-se a distância entre os haplótipos e entre os haplótipos derivados e o central do grupo. A rede foi colorida através do *software* tcsBU (SANTOS et al., 2016) considerando a frequência do haplótipo em cada domínio neotropical amostrado. O mapa de distribuição (Figura 3), contendo todos os pontos de coleta coloridos de acordo com os haplogrupos observados, foi elaborado através do programa QGIS v. 3.6.3 (QGIS Development Team, 2018) com base no sistema de coordenadas WGS 1984 e no *shapefile* desenvolvido por Löwenberg-Neto (2014), que considerou a regionalização proposta por Morrone (2014).

Estrutura genética populacional e teste de Mantel

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para avaliar a existência de estrutura genética nas populações analisadas através do programa Arlequin v. 3.5.1.2 (EXCOFFIER, 2010). A partir das sequências concatenadas, três construções foram definidas para essa análise: (i) uma AMOVA foi realizada considerando os haplogrupos estabelecidos na rede haplotípica; (ii) a segunda AMOVA foi realizada separando as amostras em grupos de acordo com seu domínio de procedência (Antilhano, Boreal, Chaco, Mesoamericano, Pacífico, Paraná e Sul brasileiro); (iii) na terceira AMOVA, as amostras foram separadas em dois grupos, América Central e América do Sul, de acordo com seu continente de procedência. Os índices F , calculados pela AMOVA, variam entre

0 e 1 e indicam alta diferenciação a partir de 0,25 e diferenciação moderada entre 0,15 e 0,25 (WRIGHT, 1978, p. 85).

Ainda para avaliar a inferência de estrutura populacional, foi realizada uma análise de *clustering* através da ferramenta rhierBAPS (CHENG et al., 2013; TONKIN-HILL et al., 2018), implementada no R v. 4.0.1 (R Core Team, 2020), que identifica agrupamentos genéticos (“*clusters*”) entre as amostras. Os resultados foram gerados para as sequências concatenadas (análise A) e para cada um dos genes separadamente (16S – análise B; COII – análise C). Para verificação da distribuição geográfica predominante de cada um dos *clusters* da análise com os genes concatenados, gráficos de pizza foram elaborados através do Microsoft Excel® v. 2102, com as informações de frequência das amostras e seus respectivos domínios de procedência por *cluster*.

O teste de Mantel, que avalia a possibilidade de isolamento por distância entre as populações amostradas, foi realizado através do pacote vegan (OKSANEN et al., 2020), implementado no R v. 4.0.1 (R Core Team, 2020), utilizando como método a correlação de Pearson (onde *r* é o coeficiente de correlação), com número de permutações igual a 10000. Para essa análise, foram consideradas as sequências concatenadas e as coordenadas geográficas de cada um dos espécimes amostrados.

Análise de tempo de divergência e reconstrução de área ancestral

Uma análise de inferência Bayesiana foi utilizada para estimar os tempos de divergência entre as amostras de *N. corniger*. A árvore foi gerada através do programa BEAST v. 2.6.3 (BOUCKAERT et al., 2019), com a utilização de relógio molecular estrito e *chain length* igual a 100 milhões. Duas partições foram incluídas na análise, uma contendo as sequências de 16S e outra contendo as sequências de COII. Os modelos para a árvore (*Fossilized Birth Death Model*) (HEATH et al., 2014) e para o relógio molecular das duas partições foram conectados, mas diferentes modelos de substituição nucleotídica foram aplicados – HKY+G (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985) para o 16S e TrN+G para o COII (TAMURA; NEI, 1993). Os testes de melhor modelo foram gerados pelo programa jModelTest (POSADA, 2008) e os modelos foram selecionados com base nos menores valores de BIC.

A análise Bayesiana foi calibrada a partir da datação de quatro registros fósseis, gerando quatro pontos de calibração – um em Isoptera, com um fóssil de *Valditermes brenanae* (JARZEMBOWSKI, 1981), datado entre 136,4 a 130 milhões de anos (Ma); outro em Termitidae, com um fóssil de *Nanotermes isaacae* (ENGEL; GRIMALDI,

2011), datado entre 56 a 47,8 Ma; e outros dois pontos em Nasutitermitinae, com um fóssil de *Nasutitermes electrinus* (KRISHNA, 1996), datado entre 23,03 a 15,97 Ma, e um fóssil de *Atlantitermes caribea* (KRISHNA; GRIMALDI, 2009), datado entre 20,44 a 13,82 Ma. Além dos registros fósseis, as datas de origem estimadas por Bourguignon (2016) para os grupos Termitidae (46 a 66 Ma), Nasutitermitinae (19,4 a 26,2 Ma) e *Nasutitermes* (16,4 a 22,6 Ma) também foram utilizadas para ajustar a calibração da análise. Como grupos externos, foram utilizadas as espécies *Mastotermes darwiniensis* (Mastotermitidae), *Amitermes dentatus* (Termitidae: Termitinae), *Atlantitermes snyderi* (Termitidae: Nasutitermitinae) e *Nasutitermes longinasus* (Termitidae: Nasutitermitinae).

Os parâmetros gerados pela análise Bayesiana foram analisados no Tracer v. 1.7.1 (RAMBAUT et al., 2018) para verificação dos valores de *Effective Sample Size* (ESS > 200). As árvores obtidas na análise foram reamostradas através da ferramenta *Full To Extant Tree Combiner*, implementada no BEAUti v. 2.6.3 (BOUCKAERT et al., 2019), para retirada dos táxons fósseis da topologia final, mantendo apenas as espécies existentes. A melhor árvore foi anotada através da ferramenta TreeAnnotator v. 2.6.3 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2020), com *burn-in* de 10%, e desenhada com a utilização do programa FigTree v. 1.4.4 (RAMBAUT, 2018). As cores utilizadas para colorir os ramos da árvore correspondem às cores dos haplogrupos estabelecidos (pontos do mapa – Figura 3).

Uma segunda análise de inferência Bayesiana foi realizada considerando os haplótipos observados na rede haplotípica (uma única sequência nucleotídica por haplótipo), seguindo os mesmos modelos, parâmetros e procedimentos descritos acima. A melhor árvore, com todos os valores de ESS acima de 200, foi obtida com *chain length* igual a 90 milhões.

A topologia da árvore gerada com os haplótipos, assim como as datas estimadas, foram utilizadas para a análise de reconstrução de área ancestral, que foi realizada através do pacote BioGeoBEARS (MATZKE, 2013), implementado no R v. 4.0.1 (R Core Team, 2020). Sete áreas de ocorrência foram definidas para essa análise, de acordo com os domínios neotropicais amostrados: Antilhano, Boreal, Chaco, Mesoamericano, Pacífico, Paraná e Sul brasileiro. Foram testados os modelos DEC, DIVALIKE e BAYAREALIKE, com e sem o parâmetro livre *j*, que avalia dispersão por saltos, totalizando seis modelos a serem avaliados. O melhor modelo foi selecionado com base nos menores valores e maiores pesos de AIC e de AICc.

3 RESULTADOS

Diversidade genética e inferências demográficas

Foram obtidas 190 sequências para o fragmento 16S [404 pares de base (pb)] e 153 sequências para o COII (750 pb), totalizando 150 espécimes com ambos os fragmentos sequenciados (1154 pb). Em relação à composição nucleotídica das sequências concatenadas, 40,1% das sequências de 16S e COII corresponde à base adenina (A), 25,1% à timina (T), 21,5% à citosina (C) e 13,2% corresponde à guanina (G). A distância genética média entre todas as amostras foi de 0,006 para as sequências concatenadas, para as sequências de 16S e para as sequências de COII. Na estimativa de distância genética entre os domínios neotropicais amostrados, o maior valor obtido foi para a análise entre os domínios Sul brasileiro e Paraná (Tabela 3.a). O Chaco apresentou o maior valor de distância genética na estimativa dentro de cada um dos domínios (Tabela 3.b).

Tabela 3 – Valores de distância genética estimados entre (a) e dentro (b) dos domínios neotropicais amostrados.

(a) Entre domínios						
	ANT	BOR	CHA	MES	PAC	PAR
BOR	0.004					
CHA	0.007	0.006				
MES	0.004	0.003	0.006			
PAC	0.005	0.003	0.006	0.003		
PAR	0.007	0.006	0.007	0.005	0.006	
SUL	0.007	0.005	0.007	0.005	0.006	0.008
(b) Dentro dos domínios						
	ANT				0.005	
	BOR				0.003	
	CHA				0.007	
	MES				0.002	
	PAC				0.003	
	PAR				0.005	
	SUL				0.005	

ANT = Antilhano; BOR = Boreal; CHA = Chaco; MES = Mesoamericano; PAC = Pacífico; PAR = Paraná; SUL = Sul brasileiro.

Foram encontrados 61 haplótipos para as sequências concatenadas – 46 haplótipos ($H_d = 0,936$) para o 16S e 48 haplótipos ($H_d = 0,937$) para o fragmento de COII (Tabela 4.a), valores que indicam alta variabilidade genética para as populações. Valores altos também foram observados para o número de sítios polimórficos (S) de ambos os genes

(40 para 16S e 70 para COII). O maior valor de diversidade nucleotídica (π) foi observado para os sítios sinônimos do fragmento de COII, que foi cerca de 40 vezes maior do que o valor observado para os sítios não sinônimos (Tabela 4.a).

Todos os testes de neutralidade realizados para todo o conjunto de amostras (Tabela 4.b) resultaram em valores negativos e significantes, o que indica expansão populacional para as populações. O mesmo pode ser inferido a partir dos valores negativos de Achaz Y^* . Para os testes de neutralidade realizados por domínio amostrado (Tabela 4.c), valores negativos e significantes de F_s de F_u , considerando as sequências concatenadas, indicam expansão populacional para os domínios Antilhano, Chaco, Paraná e Sul brasileiro – para esse último, o valor de D de Tajima também foi negativo e significativo.

Tabela 4 – Valores de diversidade genética (a) e dos testes de neutralidade (b e c) calculados para as populações de *N. corniger* amostradas.

Populações de <i>N. concoloratus</i> estudadas.								
(a) Diversidade genética								
Fragmento	nº total de sequências	nº de sítios	h (Hd) ¹	S ¹	k ¹	π ¹	θ-W/seq.	
16S	190	404	46 (0.937)	40	2.753	0.0060	7.588	
		750				0.0068		
COII	153	sin: 135 n.sin: 417 n.cod: 69	48 (0.937)	70	4.244	sin: 0.0122 n.sin: 0.0003	12.508	
(b) Testes de neutralidade								
Fragmento	D* de Fu e Li	F* de Fu e Li	Achaz Y*	Fs de Fu	D de Tajima			
16S	-3.232 (p<0.05)	-3.242 (p<0.02)	-1.553	-26.472 (p=0.000)	-1.812 (p=0.012)			
COII	-4.917 (p<0.02)	-4.588 (p<0.02)	-1.946	-25.625 (p=0.000)	-2.002 (p=0.001)			
16S + COII ²	-4.548 (p<0.02)	-4.225 (p<0.02)	-1.879	-26.405 (p=0.000)	-1.836 (p=0.005)			
(c) Testes de neutralidade por região								
Fragmento	Teste	Domínio neotropical						
		ANT	BOR	CHA	MES	PAC	PAR	SUL
16S	Fs de Fu	-26.670 (p=0.000)	-19.009 (p=0.000)	-26.571 (p=0.000)	n/c	-18.161 (p=0.000)	-27.313 (p=0.000)	-26.957 (p=0.000)
	D de Tajima	n/s (p>0.10)	-2.013 (p=0.007)	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	-1.467 (p=0.068)	n/s (p>0.10)	-1.584 (p=0.035)
COII	Fs de Fu	-6.462 (p=0.000)	n/c	-25.359 (p>0.000)	-8.657 (p=0.000)	n/c	-25.888 (p=0.000)	-25.735 (p=0.000)
	D de Tajima	-1.446 (p=0.08)	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	-2.128 (p=0.005)
16S + COII	Fs de Fu	-26.671 (p=0.000)	n/c	-26.571 (p=0.000)	n/c	n/c	-27.313 (p=0.000)	-25.031 (p=0.000)
	D de Tajima	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	n/s (p>0.10)	-2.160 (p=0.005)

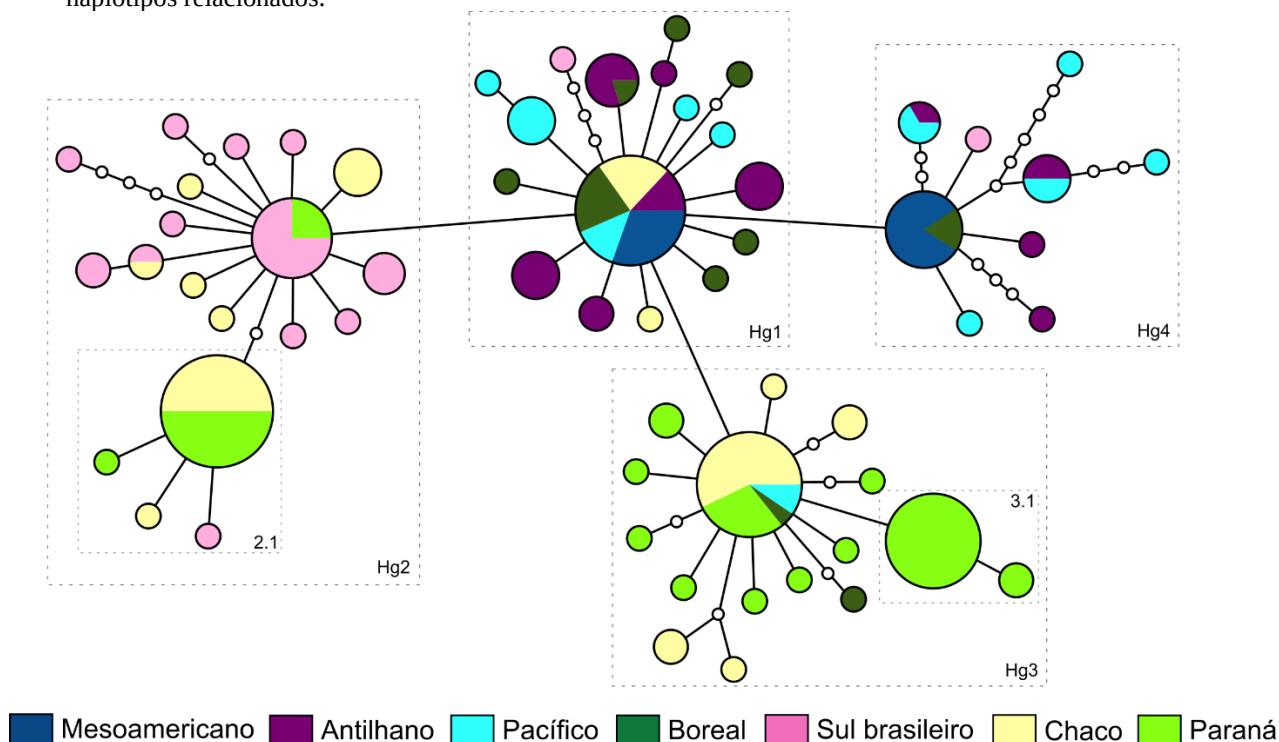
¹ h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; S: número de sítios polimórficos (incluindo *gaps* alinhados para o 16S); k: número médio de diferenças nucleotídicas; π : diversidade nucleotídica. ² Para os

cálculos de D^* e F^* de Fu e Li e $Achaz Y^*$, foram consideradas apenas as amostras com ambas as regiões sequenciadas. Sin.: sítios sinônimos; n.sin.: sítios não sinônimos; n.cod.: sítios não codificantes; n/s: não significativo ($p > 0.05$); n/c: valor não calculado devido ao baixo número de polimorfismos. Valores significantes estão destacados em **negrito**. ANT: Antilhano; BOR: Boreal brasileiro; CHA: Chaco; MES: Mesoamericano; PAC: Pacífico; PAR: Paraná, SUL: Sul brasileiro.

Rede de haplótipos

Uma rede haplotípica gerada a partir das sequências concatenadas, recuperou as relações entre os 61 haplótipos encontrados nas populações de *N. corniger* (Figura 4). Foram observados quatro haplogrupos (Hg), cada um composto por haplótipos próximos entre si e ligados a um haplótipo central mais frequente. Além disso, dois subgrupos também foram identificados – um dentro do haplogrupo 2 (subgrupo 2.1) e outro dentro do haplogrupo 3 (subgrupo 3.1). Esses subgrupos são formados por haplótipos bastante frequentes e seus derivados que permaneceram próximos ao haplótipo central de seu haplogrupo. A topologia dos haplogrupos foi recuperada em formato estrelado pela análise.

Figura 4 – Rede de haplótipos produzida a partir das sequências nucleotídicas concatenadas (16S + COII) das amostras de *N. corniger* analisadas. Os pontos brancos nos ramos indicam passos mutacionais entre os haplótipos relacionados.



A rede também revelou uma diferenciação geográfica entre as populações da América do Sul, que compõem os haplogrupos 2 e 3 predominantemente, e da América Central, que compõem os haplogrupos 1 e 4 predominantemente (Figura 4; Tabela 5). Também foi possível observar que as amostras oriundas dos domínios Pacífico (localizado no norte da América do Sul e sul da América Central) e Boreal (no norte da América do Sul) apareceram em quase todos os haplogrupos (exceto no haplogrupo 2), com maior predominância nos haplogrupos 1 e 4. A distribuição geográfica dos haplogrupos também pode ser vista na Figura 3.

Tabela 5 – Relação entre os haplogrupos (Hg), haplótipos (H), amostras de *N. corniger* e suas localidades e domínios de procedência.

Haplogrupo	Haplótipo	Amostra	Localidade, estado/país	Domínio
Hg01	H01	194	Las Terrenas, Rep. Dominicana	ANT
		201	St. Andrew, Dominica	ANT
		299	Tauá, CE	CHA
		300	Avelinópolis, GO	CHA
		301	Bom Jesus das Selvas, MA	BOR
		303	Lago Verde, MA	BOR
		304	Codó, MA	BOR
		309	Brejinho de Nazaré, TO	CHA
		361	Canas Gordas, Panamá	PAC
		362	Santa Marta, Panamá	PAC
		363	Lajas de Tole, Panamá	PAC
		389	Lancetilla Botanical, Honduras	MES
		390	San Juan Bosque, Honduras	MES
		391	Coyolito, Honduras	MES
		392	Santa Barbara, Honduras	MES
		396	Ometepe, Nicaragua	MES
		397	Road to Cardenas, Nicaragua	MES
		398	Lake Masaya, Nicaragua	MES
		413	Crompton Point, Dominica	ANT
		456	Goiânia, GO	CHA
		589	Ivolândia, GO	CHA
		AWA	Awala-Yalimapo, Guiana Francesa	BOR
		ILM1	Ilet la Mère, Guiana Francesa	BOR
	H02	195	Anãso, Porto Rico	ANT
		415	Yabucoa, Porto Rico	ANT
	H03	593	Coxim, MS	CHA
	H04	200	Paramaribo, Suriname	BOR
	H05	BEL	Bellevue, Guiana Francesa	BOR
	H06	384	Windsor Forest, Jamaica	ANT
		385	Ginger House, Jamaica	ANT
		387	Sch. of Agric. Port Antonio, Jamaica	ANT
		388	St. Ann's, Jamaica	ANT
		406	Grand Riviere, Trinidad e Tobago	PAC
	H07	405	PAX upper trail, Trinidad e Tobago	PAC
	H09	198	Petit-Bourg, Guadalupe	ANT
		199	Church Ground, St. Kitts-Nevis	ANT
		412	Church Grounds, St. Kitts-Nevis	ANT
		420	Highway D23, Guadalupe	ANT
		MON	Montjoly, Guiana Francesa	BOR
	H10	1088	Amajari, RR	BOR
	H11	419	Jessamine Vale, Granada	ANT
	H12	1089	Amajari, RR	BOR
	H13	306	São João do Araguaia, PA	BOR
	H14	371	Von Humbolt, Peru	SUL
	H15	379	Tucacas, Venezuela	PAC
		380	Churaguara, Venezuela	PAC

Haplogrupo	Haplótipo	Amostra	Localidade, estado/país	Domínio
Hg02	H16	381	San Filipi, Venezuela	PAC
		383	San Sabastian, Venezuela	PAC
		382	Yurubi, Venezuela	PAC
	H17	203	Florida, USA	ANT
		407	Florida, USA	ANT
		408	Florida, USA	ANT
	H18	BUJ	Florida, USA	ANT
		267	Castro, PR	PAR
		268	Castro, PR	PAR
		269	Castro, PR	PAR
		273	Cáceres, MT	SUL
		275	Cáceres, MT	SUL
		277	Cáceres, MT	SUL
		278	Cáceres, MT	SUL
		370	Pucallpa, Peru	SUL
		373	Flora & Fauna Hotel, Bolívia	SUL
		374	Villa Tunari, Bolívia	SUL
		375	San Pedro, Bolívia	SUL
		376	Limoncito, Bolívia	SUL
	H19	366	Rio Negro, Peru	SUL
		367	Rio Negro, Peru	SUL
		368	Bajo Pichanaqui, Peru	SUL
	H20	365	Satipo, Peru	SUL
	H21	378	Los Volcanes, Bolívia	SUL
	H22	352	Caacupé, Paraguai	CHA
		353	Guayaibi, Paraguai	CHA
		354	Tacuati, Paraguai	CHA
		357	Yaguarón, Paraguai	CHA
	H23	165	Porto Velho, RO	SUL
	H24	369	Pto. Inca, Peru	SUL
	H25	311	Colinas do Tocantins, TO	CHA
	H26	168	Porto Velho, RO	SUL
	H27	171	Porto Velho, RO	SUL
	H28	377	Yacuces, Bolívia	SUL
	H29	596	Perdido, MS	CHA
		181	Corumbá, MS	SUL
		185	Corumbá, MS	SUL
	H30	603	Anastácio, MS	CHA
	H31	310	Ponte Alta do Tocantins, TO	CHA
	H32	175	Porto Velho, RO	SUL
		178	Porto Velho, RO	SUL
Hg02.1	H33	355	Concepción, Paraguai	CHA
		356	Asuncion, Paraguai	CHA
		469	Céu Azul, PR	PAR
		470	Ivailândia, PR	PAR
		471	Floresta, PR	PAR
		472	Maringá, PR	PAR
		473	Maringá, PR	PAR
		474	Maringá, PR	PAR
		476	Nossa Sra. das Graças, PR	PAR
		477	Itororó, SP	PAR
		478	Tarabaí, SP	PAR
		479	Pirapozinho, SP	PAR
		480	Presidente Prudente, SP	PAR
		481	Martinópolis, SP	PAR
		585	Araguainha, MT	CHA
		588	Paraíso das Águas, MS	CHA
		594	Campo Grande, MS	CHA
		595	Antônio João, MS	CHA
		597	Camapuã, MS	CHA
		598	Bandeirantes, MS	CHA
		599	Costa Rica, MS	CHA
		600	Pedra Preta, MT	CHA
		601	Dourados, MS	CHA
		602	Ivinheima, MS	CHA
	H34	183	Corumbá, MS	SUL

Haplogrupo	Haplótipo	Amostra	Localidade, estado/país	Domínio
Hg03	H35	590	Pedra Preta, MT	CHA
	H36	475	Santa Fé, PR	PAR
	H37	91	Jaboticabal, SP	CHA
		92	Jaboticabal, SP	CHA
		93	Jaboticabal, SP	CHA
		281	João Pessoa, PB	PAR
		282	João Pessoa, PB	PAR
		283	Uberlândia, MG	CHA
		298	Santa Rita, PB	PAR
		347	Sacramento, MG	CHA
		348	Sacramento, MG	CHA
		350	Acaraju - SE	PAR
		351	Tanabi, SP	CHA
		482	Osvaldo Cruz, SP	PAR
		483	Olímpia, SP	CHA
		513	Ribeirão Preto, SP	CHA
		515	Ribeirão Preto, SP	CHA
		587	Paracatu, MG	CHA
		606	Mamanguape, PB	PAR
	ATK		Canal zone, Panamá	PAC
	MAT		Matoury, Guiana Francesa	BOR
	ZHA		Cahuita Nat. Park, Costa Rica	PAC
	H38	454	São Geraldo, MG	PAR
	H39	297	Santa Rita, PB	PAR
	H40	445	Penha do Capim, MG	PAR
	H41	604	Diorama, GO	CHA
	H42	584	Paracatu, MG	CHA
		591	Paracatu, MG	CHA
	H43	605	João Pessoa, PB	PAR
	H44	512	Sooretama, ES	PAR
	H45	349	Maceió, AL	PAR
	H46	307	Abel Figueiredo, PA	BOR
	H47	280	João Pessoa, PB	PAR
	H48	447	Colatina, ES	PAR
		511	Colatina, ES	PAR
	H49	583	Ivolândia, GO	CHA
		586	Firminópolis, GO	CHA
Hg03.1	H50	592	Piranhas, GO	CHA
	H51	437	Ipaba, MG	PAR
		438	Ipaba, MG	PAR
		439	Caratinga, MG	PAR
		440	Caratinga, MG	PAR
		442	Ipanema, MG	PAR
		446	Itapina, ES	PAR
		448	Sooretama, ES	PAR
		449	Sooretama, ES	PAR
		450	Aracruz, ES	PAR
		451	Fundão, ES	PAR
		452	São José do Calçado, ES	PAR
		453	São José do Calçado, ES	PAR
		455	Ipanema, MG	PAR
		487	Entre Rios, BA	PAR
		490	Entre Rios, BA	PAR
		492	Entre Rios, BA	PAR
		502	Entre Rios, BA	PAR
	H52	499	Alagoinhas, BA	PAR
		501	Alagoinhas, BA	PAR
Hg04	H53	197	Salto de Agua, México	MES
		202	Arapiccos, Equador	BOR
		302	Lago Verde, MA	BOR
		393	Punta Gorda, Belize	MES
		394	Jaguar Reef Lodge, Belize	MES
		395	Mayflower Natl Park, Belize	MES
		399	San Carlos, Guatemala	MES
		400	Livingston beach, Guatemala	MES
		401	Cerro San Gil, Guatemala	MES

Haplogrupo	Haplótipo	Amostra	Localidade, estado/país	Domínio
		402	Champlotón, Mexico	MES
		403	Coba, Mexico	MES
	H54	418	Enriquillo, Rep. Dominicana	ANT
	H55	CAS	Colosó, Colômbia	PAC
	H56	411	Coconut Bay Resort, St. Lucia	ANT
	H57	164	Porto Velho, RO	SUL
	H58	358	Santiago, Panamá	PAC
		359	Las Lajas, Panamá	PAC
		417	Fountain Court, Ilhas Cayman	ANT
	H59	360	Punta Robalo, Panamá	PAC
		409	Treasure Cay resort, Bahamas	ANT
		410	Treasure Cay resort, Bahamas	ANT
		416	La Selva Bio. Stat., Costa Rica	PAC
	H60	364	Los Piedras, Panamá	PAC
	H61	MIU	Canal Zone, Panamá	PAC

Estrutura populacional e isolamento por distância

A inferência de estruturação genética para as populações de *N. corniger* foi verificada partir dos resultados da AMOVA (Tabela 6) e da análise de *clustering* (rhierBAPS) (Figura 5). O alto valor de F_{ST} para a AMOVA entre os haplogrupos (Tabela 6.a) indica uma diferenciação genética consistente entre os haplogrupos definidos na rede de haplótipos. Um valor moderado a alto de F_{ST} foi observado na análise entre os domínios neotropicais amostrados (Tabela 6.b), o que é indicativo de estrutura genética populacional entre os domínios. O resultado de F_{ST} para a análise entre continentes (Tabela 6.c) indica uma estruturação baixa a moderada entre América Central e América do Sul.

Tabela 6 – Resultados gerados pela AMOVA entre os haplogrupos observados na rede haplotípica (a), entre os domínios neotropicais amostrados (b) e entre continentes – América Central e do Sul (c).

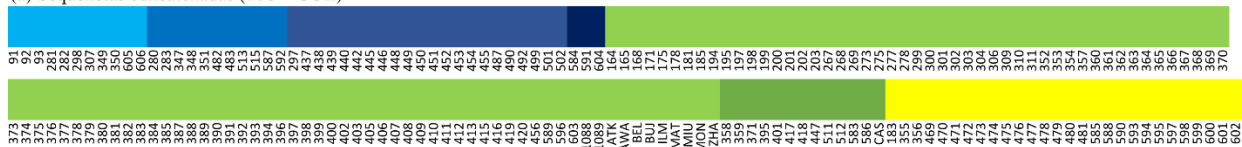
(a) Entre haplogrupos		
Tipo de Variação	Porcentagem da variação	Índice de fixação
Entre haplogrupos	50.30%	$F_{ST} = 0.503$ ($p = 0.000$)
Dentro dos haplogrupos	49.70%	-
(b) Entre domínios		
Entre domínios	23.20%	$F_{ST} = 0.232$ ($p = 0.000$)
Dentro dos domínios	76.80%	-
(c) Entre continentes		
Entre continentes	13.36%	$F_{ST} = 0.134$ ($p = 0.021$)
Dentro dos continentes	86.64%	-

Os resultados das análises de *clustering* (Figura 5) evidenciaram a formação de agrupamentos genéticos dentre as amostras de *N. corniger*, representados pelas cores

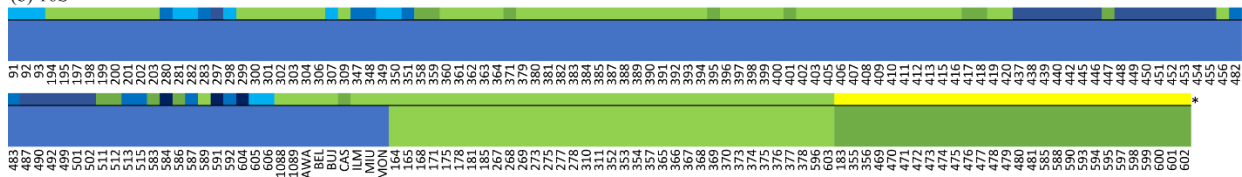
azul, verde, amarelo, laranja e roxo, respectivamente. Os subgrupos, também identificados nas análises, estão representados por variações de tons das respectivas cores.

Figura 5 – Resultados das análises de *clustering* (rhierBAPS) realizadas com as sequências concatenadas (a), com as sequências de 16S (b) e de COII (c) das amostras de *N. corniger*.

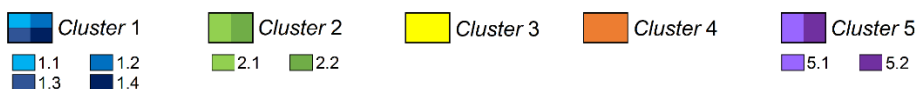
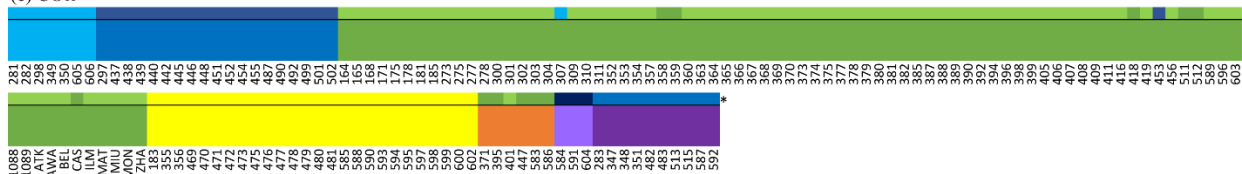
(a) Sequências concatenadas (16S + COII)



(b) 16S



(c) COII



*As cores acima do traço indicam o *cluster* das respectivas amostras na análise com as sequências concatenadas.

Na análise A (Figura 5.a), que considerou as sequências concatenadas (16S + COII), foram recuperados três *clusters*. Nessa análise, o *cluster* 1 foi dividido em quatro subgrupos (1.1, 1.2, 1.3 e 1.4) e o *cluster* 2 em dois subgrupos (2.1 e 2.2).

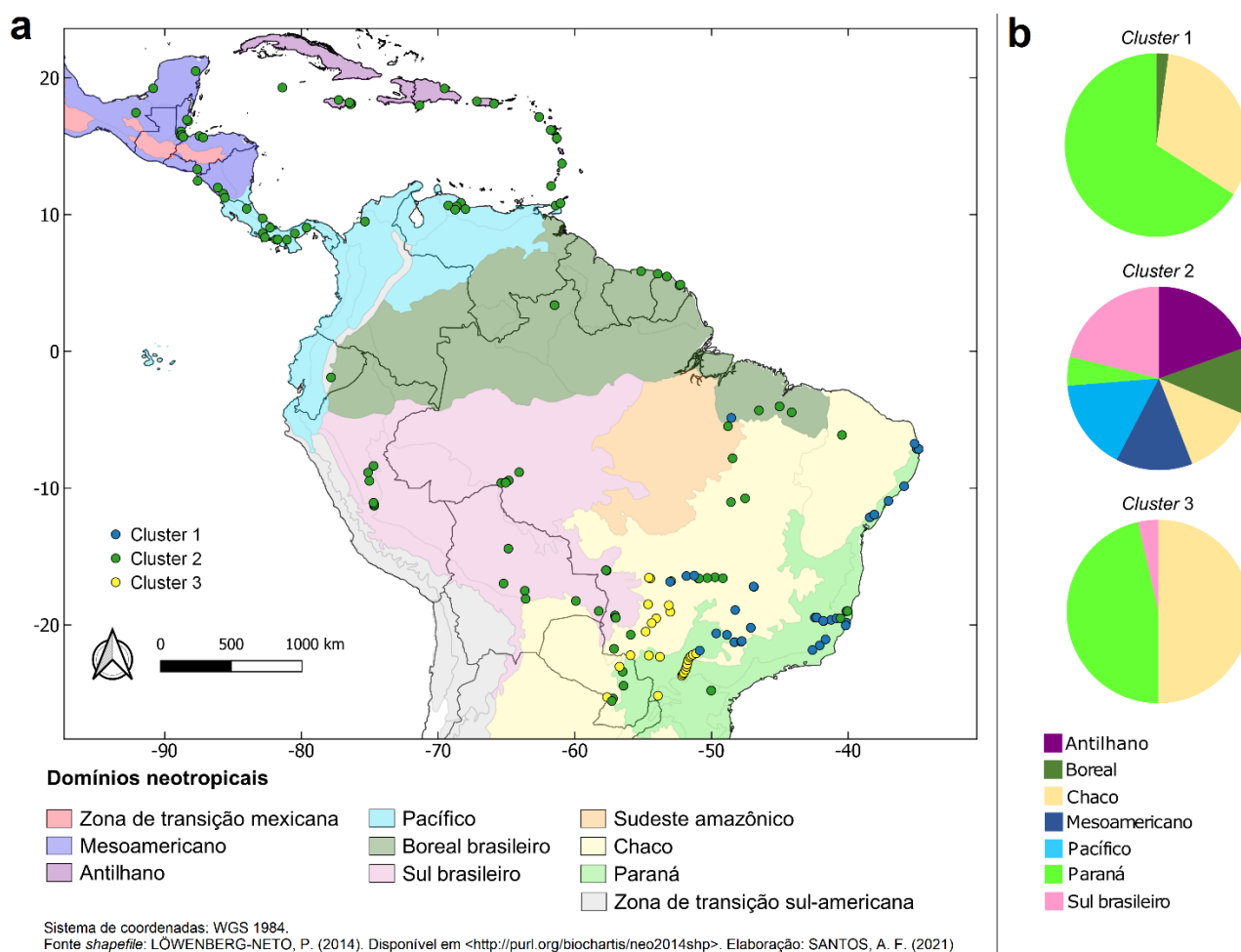
Na análise B, que incluiu apenas as sequências de 16S (Figura 5.b), somente dois *clusters* foram identificados – o *cluster* 2 foi dividido em dois subgrupos (2.1 e 2.2). As amostras referentes ao *cluster* 3 (amarelo) da análise A, que não foi identificado na análise B, foram recuperadas como o subgrupo 2.2 do *cluster* 2 (verde) – essa informação pode ser verificada na Figura 5.b na região marcada com um asterisco.

Na análise C, que incluiu apenas as sequências de COII (Figura 5.c), foram detectados cinco *clusters*, sendo que os *clusters* 1 e 5 foram divididos em dois subgrupos cada um (1.1 e 1.2; 5.1 e 5.2, respectivamente). Os *clusters* 4 e 5 foram identificados somente nessa análise. Comparativamente, as amostras que compõem o *cluster* 4 (laranja) na análise C foram recuperadas dentro do subgrupo 2.2, do *cluster* 2 (verde), na análise A (16S + COII). Já as amostras que compõem o *cluster* 5 (roxo) na análise C (COII)

foram recuperadas dentro dos subgrupos 1.2 e 1.4 (do *cluster* 1, azul) na análise A (16S + COII).

Relacionando a análise de *clustering* para as sequências concatenadas (análise A – Figura 5.a) e as distribuições geográficas das populações analisadas, é possível observar que as amostras do *cluster* 1 (azul) e 3 (amarelo) estão predominantemente distribuídas nos domínios Paraná e Chaco; já as amostras do *cluster* 2 (verde) parecem estar amplamente distribuídas na região Neotropical e podem ser encontradas em todos os domínios amostrados (Figura 6).

Figura 6 – (a) Mapa contendo a distribuição geográfica das amostras de *N. corniger* agrupadas em *clusters* pela análise de *clustering* (rhierBAPS) com as sequências concatenadas (Figura 5.a); (b) Gráficos de pizza gerados a partir da frequência dos domínios em cada um dos *clusters* recuperados pela análise do rhierBAPS com as sequências concatenadas (16S + COII; Figura 5.a).



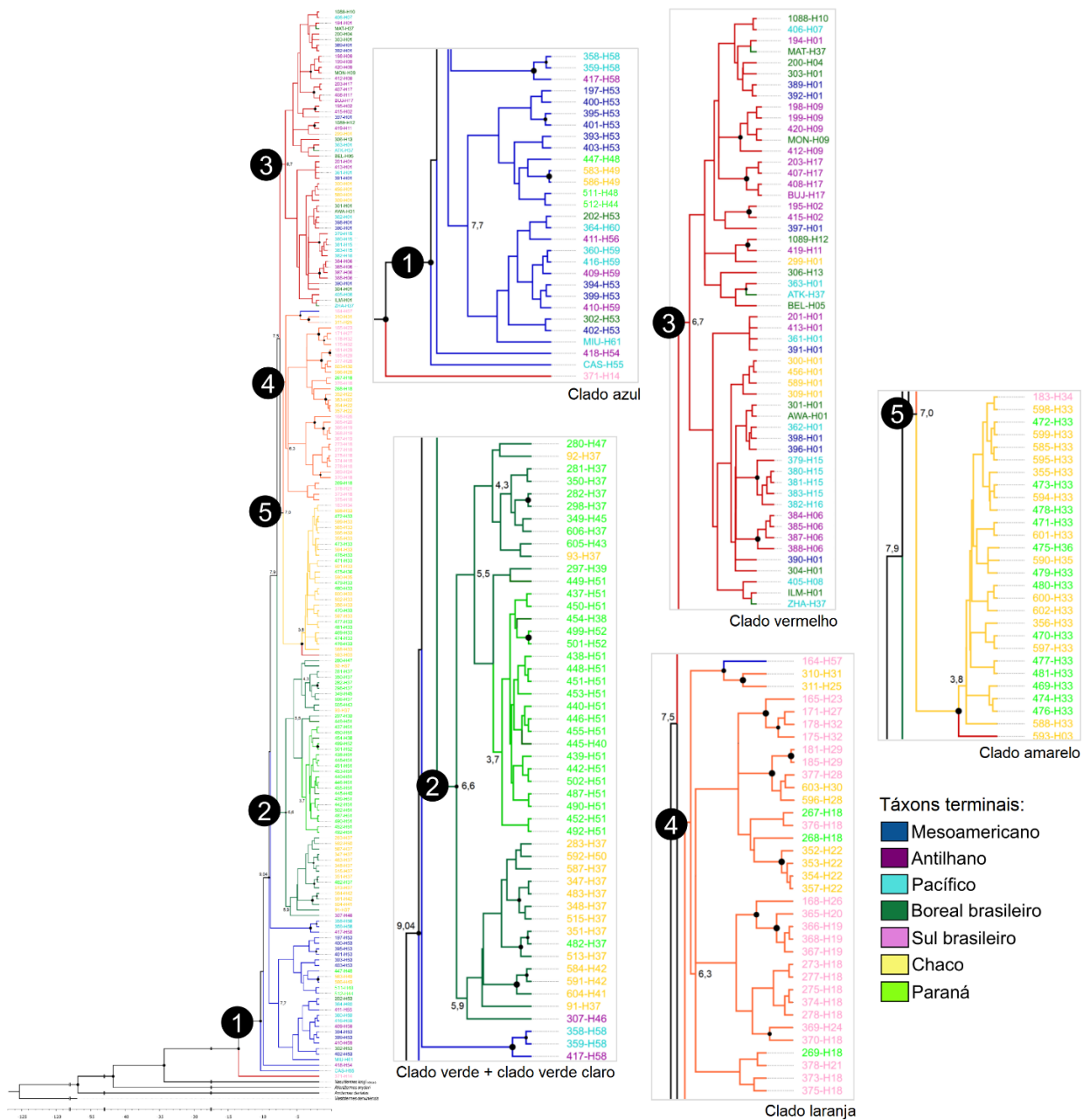
O teste de Mantel, realizado para verificar a ocorrência de isolamento por distância, resultou em um valor de r positivo e significativo ($r = 0,075$; $p = 0,005$), o que indica que há uma correlação positiva entre a distância genética e a distância geográfica, ou seja, quanto mais distantes geograficamente estão as colônias amostradas, maiores as

distâncias genéticas entre elas. Isso também pode ser observado nas matrizes de distância genética entre indivíduos (Tabelas A1, A2 e A3 do Apêndice), que, de modo geral, mostraram valores mais altos na comparação entre amostras oriundas de localidades mais distantes geograficamente entre si.

Tempo de divergência

Uma análise Bayesiana foi utilizada para estimar os tempos de divergência entre as populações de *N. corniger* amostradas (Figura 7; Figura A1 do Apêndice). A topologia da árvore obtida evidenciou cinco grandes eventos cladogenéticos que deram origem às populações analisadas. O primeiro evento separou o clado azul de todos os outros clados há 9,04 Ma. Esse clado abriga, predominantemente, amostras provenientes dos domínios Mesoamericano, Pacífico, Chaco e Antilhano. O segundo evento separou o clado verde + verde claro, que abriga amostras dos domínios Paraná e Chaco, dos clados vermelho, laranja e amarelo há 7,9 Ma. O terceiro evento, que ocorreu há 7,5 Ma, causou a divergência entre o clado vermelho e os clados laranja e amarelo. O clado vermelho inclui espécimes dos domínios Antilhano, Pacífico, Boreal e Chaco, predominantemente. O quarto evento, há 7 Ma, foi responsável pela separação entre os clados laranja e amarelo. Esses clados abrigam, respectivamente, amostras dos domínios Sul brasileiro e Chaco (laranja) e Paraná e Chaco (amarelo). Por fim, o quinto evento, há 5,5 Ma, levou à separação do clado verde claro, que abriga exclusivamente amostras do domínio Paraná, dentro do clado verde + verde claro.

Figura 7 – Árvore de inferência Bayesiana gerada para os espécimes de *N. corniger* amostrados.



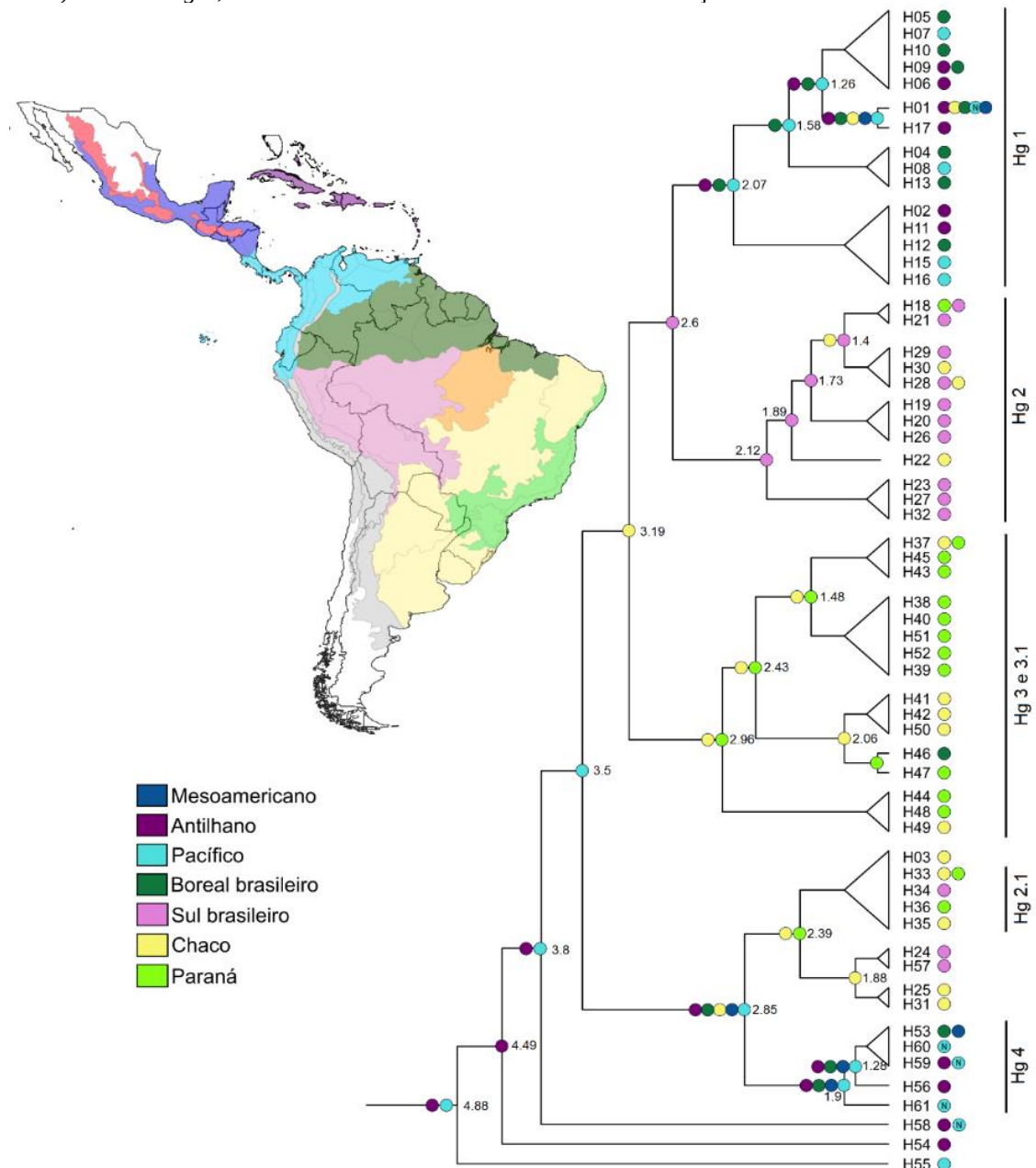
Árvore mostrada em detalhes, com destaque para os grandes clados reconstruídos. As cores dos ramos correspondem às cores dos pontos dos haplogrupos mostrados na Figura 3 – ramos vermelhos correspondem ao haplogrupo 1; ramos laranjas correspondem ao haplogrupo 2 e amarelos ao haplogrupos 2.1; ramos verdes correspondem ao haplogrupo 3 e verde claros ao haplogrupo 3.1; e os ramos azuis correspondem ao haplogrupo 4. Os números próximos aos nós indicam as datas estimadas para os tempos de divergência em milhões de anos e os pontos indicam nós com probabilidades posteriores acima de 0,50 – quanto maior o ponto, maior o valor da probabilidade posterior. As cores dos nomes dos táxons terminais indicam o domínio de procedência do indivíduo de acordo com a legenda.

Reconstrução de área ancestral

Uma árvore de inferência Bayesiana gerada apenas com os haplótipos das sequências de 16S e COII (Figura 8; Figura A2 do Apêndice) – e não com todos os indivíduos, como foi feito para a análise de tempo de divergência – foi utilizada para a

reconstrução de área ancestral das populações de *N. corniger* amostradas. O modelo selecionado, DEC+j, apresentou pesos de AIC e AICc iguais a 0,87 e 0,83, respectivamente. Os resultados mostraram que o ancestral comum a todas as populações analisadas esteve distribuído nos domínios Pacífico e Antilhano, de onde se dispersou para os outros domínios neotropicais.

Figura 8 – Árvore de inferência Bayesiana gerada com os haplótipos das sequências concatenadas (16S + COII) de *N. corniger*, associada aos resultados da análise de reconstrução de área ancestral.



Os números próximos aos nós correspondem às datas estimadas para os tempos de divergência em milhões de anos. O “N” dentro dos círculos referentes ao domínio Pacífico (junto aos nomes dos táxons terminais) indicam que o respectivo haplótipo foi observado na porção norte desse domínio, localizada na América Central. As probabilidades posteriores dessa árvore podem ser vistas na Figura A2.

Os haplogrupos observados na rede haplotípica (Figura 4) também foram recuperados em grande parte nessa árvore Bayesiana, formando os grandes clados da topologia (com exceção do subgrupo 2.1, que ficou posicionado de forma distante em relação ao haplogrupo 2, a partir do qual teve origem). De acordo com a reconstrução de área realizada, o ancestral mais recente de todo o haplogrupo 1 esteve distribuído nos domínios Antilhano, Boreal e Pacífico. O ancestral do haplogrupo 2 esteve distribuído no domínio Sul brasileiro. Os haplogrupos 2.1, 3 e 3.1 surgiram a partir de ancestrais presente nos domínios Chaco e Paraná. Por fim, o ancestral do haplogrupo 4 parece ter ocorrido nos domínios Antilhano, Boreal, Mesoamericano e Pacífico (Figura 8).

4 DISCUSSÃO

4.1 *Nasutitermes corniger*

Os índices de diversidade genética evidenciaram uma alta variabilidade para as populações de *N. corniger* amostradas, observada a partir do número de haplótipos e da diversidade haplotípica encontrada. Esses índices de diversidade foram mais elevados do que os índices encontrados por Santos et al. (2017), que utilizaram apenas o fragmento mitocondrial 16S como marcador molecular. Os valores de diversidade nucleotídica (π) para os dois fragmentos mitocondriais (16S e COII) foram semelhantes e os maiores valores de π foram obtidos para os sítios sinônimos de COII (cerca de 40 vezes maior que o valor para os sítios não sinônimos), como também foi observado para *N. ephratae* (Capítulo 1).

Os testes de neutralidade indicaram expansão populacional para todo o conjunto de amostras de *N. corniger*, corroborando os dados de Santos et al. (2017). Também foi possível inferir a ocorrência de expansão populacional em todos os domínios, considerando os resultados de F_s de Fu (Tabela 4.c), o mais sensível dentre os testes de neutralidade realizados (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002) – embora os valores de F_s de Fu não tenham sido calculados para as sequências concatenadas dos domínios Boreal, Mesoamericano e Pacífico, os resultados foram negativos e significantes na análise que considerou apenas um dos fragmentos (16S para Boreal e Pacífico e COII para Mesoamericano). Além disso, o formato estrelado dos haplogrupos na rede de haplótipos também é um indicativo de expansão demográfica, considerando que vários haplótipos derivados surgiram a partir de um haplótipo central mais frequente.

Assim como já havia sido observado (SANTOS et al., 2017), os dados obtidos aqui também indicaram alta diferenciação genética entre os haplogrupos observados na rede haplotípica de *N. corniger*, de acordo com os resultados da AMOVA (Tabela 6.a). A AMOVA entre continentes (Tabela 6.c) resultou em um valor baixo de F_{ST} , indicando uma estruturação baixa a moderada entre populações localizadas na América Central e do Sul. A AMOVA entre domínios mostrou uma estruturação moderada a alta entre as populações localizadas em diferentes domínios neotropicais (Tabela 6.b). Santos et al. (2017), embora não tenham considerado a regionalização neotropical em domínios proposta por Morrone (2014), já haviam observado a presença de haplótipos característicos de alguns biomas, em especial os da Mata Atlântica, que não são extensamente compartilhados com populações de outras regiões.

Quatro haplogrupos e dois subgrupos foram recuperados na rede de haplótipos (Figura 4) e evidenciaram a diferenciação geográfica das populações de *N. corniger* analisadas. O haplogrupo 1, que está distribuído de forma ampla, é composto por espécimes provenientes dos domínios da América Central, incluindo as ilhas antilhanas, e do norte da América do Sul, mas também inclui, de forma frequente, espécimes do Chaco – principalmente da região central do Cerrado brasileiro [que faz parte do domínio Chaco como uma de suas províncias (MORRONE, 2014)]. O haplogrupo 2 (desconsiderando o subgrupo 2.1) inclui predominantemente amostras dos domínios Sul brasileiro e Chaco; já o subgrupo 2.1 abriga, praticamente de forma exclusiva, amostras da região oeste do Cerrado brasileiro e do oeste da província Floresta do Paraná (que faz parte do domínio Paraná). O haplogrupo 3 pode ser observado na região centro-sul do Cerrado e no leste do domínio Paraná – província Atlântica (MORRONE, 2014), a qual abriga, também, as amostras do subgrupo 3.1. Por fim, o haplogrupo 4 é composto, predominantemente, por amostras oriundas da América Central – domínios Mesoamericano, Antilhano e parte norte do domínio Pacífico (que compreende o Panamá, a Costa Rica e o extremo sul da Nicarágua).

A análise de *clustering* (Figuras 5.a e 6) reconstruiu parte da diferenciação observada entre os haplogrupos. O *cluster* 1 (azul) corresponde ao haplogrupo 3 + 3.1 – centro-sul do Cerrado e leste do domínio Paraná – e o *cluster* 3 corresponde ao subgrupo 2.1 (do haplogrupo 2) – oeste do Cerrado e do domínio Paraná. Esses dados reforçam a existência de estrutura populacional para *N. corniger* nessas regiões. O *cluster* 2 inclui todos os outros haplogrupos e pode ser observado de forma bastante frequente nos domínios da América Central e do Sul.

Em relação à árvore de inferência Bayesiana (Figura 7), foram recuperados poucos nós com probabilidades posteriores acima de 0,50, assim como foi observado para *N. ephratae* (Capítulo 1). Isso se deve à dificuldade do algoritmo, implementado no BEAST, em reconstruir filogenias a partir de sequências nucleotídicas muito semelhantes entre si, que é o que ocorre em estudos filogeográficos e intraespecíficos (SEAL et al., 2011). Apesar disso, os grandes clados da árvore recuperaram os haplogrupos estabelecidos na rede (Figura 4), o que ajuda a sustentar as inferências feitas a partir da topologia da árvore.

O clado azul (Figura 7), que corresponde ao haplogrupo 4 da rede de haplótipos (Figura 4), foi o primeiro a divergir, de acordo com a análise filogenética, e inclui, principalmente, espécimes de *N. corniger* da América Central.

O clado verde + verde claro (Figura 7), que foi o segundo grande clado a divergir, corresponde aos haplogrupos 3 e 3.1 (Figura 4) e inclui amostras dos domínios Chaco e Paraná. Nesse clado, é possível observar a formação de dois grupos principais – um grupo composto por amostras do centro-sul do Cerrado brasileiro e outro grupo que inclui espécimes do leste do domínio Paraná, o que evidencia uma proximidade filogenética e grande similaridade entre as populações dessas duas regiões. O clado verde claro, que corresponde ao subgrupo 3.1 do haplogrupo 3, inclui, exclusivamente, amostras da província Atlântica no leste do domínio Paraná. Assim como foi discutido por Santos et al. (2017), é possível que os processos biogeográficos que levaram às altas taxas de endemismo na Mata Atlântica também tenham causado, a nível intraespecífico, a diferenciação dessas populações da província Atlântica, recuperadas no clado verde claro e no subgrupo 3.1 da rede de haplótipos.

O clado vermelho (Figura 7), embora tenha sido recuperado como o terceiro grande clado a divergir na análise Bayesiana, corresponde ao haplogrupo 1, que é, de acordo com a rede (Figura 4), o haplogrupo central e ancestral dos demais. Esse clado abriga a maior parte dos espécimes do domínio Boreal (Roraima, Suriname, Guiana Francesa e norte do Maranhão), da parte sul do Pacífico (Venezuela e Trinidad e Tobago) e das ilhas antilhanas, além de incluir outras amostras distribuídas nos domínios Mesoamericano, Chaco e na parte norte do Pacífico. O clado vermelho foi dividido em dois grandes grupos – um deles abriga, predominantemente, amostras do domínio Boreal e das Antilhas. O segundo grupo do clado vermelho também abriga espécimes das ilhas antilhanas, que estão relacionados de forma próxima a espécimes da parte do sul do Pacífico (Venezuela). Esses dados sugerem proximidade filogenética entre as populações

do norte da América do Sul (domínio Boreal e parte sul do Pacífico) e das Antilhas, o que também foi observado para *N. ephratae* (Capítulo 1).

Os clados laranja e amarelo (Figura 7) foram recuperados como clados irmãos e correspondem, respectivamente, ao haplogrupo 2 e ao subgrupo 2.1 da rede de haplótipos (Figura 4). No clado laranja também podem ser observados dois grupos principais – o primeiro abriga amostras do domínio Sul brasileiro e do Chaco paraguaio (região de transição entre o Chaco e a província Floresta do Paraná); e o segundo grupo abriga apenas amostras do Sul brasileiro. Por fim, o clado amarelo inclui espécimes do oeste do Cerrado brasileiro e do oeste da província Floresta do Paraná (domínio Paraná). Esses dados confirmam a proximidade entre as populações dessas regiões, como já havia sido observado na rede de haplótipos.

Os dados obtidos a partir dos grandes clados da árvore (Figura 7), da rede (Figura 4) e da análise de *clustering* (Figuras 5.a e 6) evidenciaram a existência de duas linhagens evolutivas que se diferenciaram nos domínios Chaco e Paraná. Uma linhagem, filogeneticamente próxima às populações do Sul brasileiro, está distribuída no sudoeste do território brasileiro, chegando ao Paraguai (subgrupo 2.1 – Figuras 3 e 4; *cluster* 3 – Figuras 5.a e 6; clado amarelo – Figura 7), enquanto a outra ocorre na região centro-sul do Cerrado e nas regiões próximas à costa leste do Brasil (Haplogrupo 3 e 3.1 – Figuras 3 e 4; *cluster* 1 – Figuras 5.a e 6; clado verde + verde claro – Figura 7). Essas linhagens são, possivelmente, resultados de diferentes eventos de dispersão de populações de *N. corniger* que ocorreram na América do Sul.

De acordo com a reconstrução de área ancestral (Figura 8), as populações ancestrais de *N. corniger* estavam distribuídas no domínio Pacífico (desconsiderando os nós que incluem os haplótipos H55, H54 e H58, tratados como *outliers*). O primeiro evento de dispersão, de acordo com a reconstrução, teria ocorrido do Pacífico para o Chaco. No entanto, é pouco provável que essa dispersão tenha acontecido de forma direta, já que esses domínios não são adjacentes e são separados por outros extensos domínios.

A análise Bayesiana realizada com os haplótipos (Figura 8), cuja topologia e datas estimadas foram utilizadas para a reconstrução de área ancestral, apresentou discordâncias na comparação com os resultados das outras análises (em observação à rede de haplótipos e aos grandes clados da análise Bayesiana realizada com todo o conjunto de amostras). Esse fato, junto à baixa probabilidade de dispersão direta entre o Pacífico e o Chaco, inferida pela reconstrução, fazem com que os resultados dessa análise sejam interpretados de forma cautelosa. Sendo assim, a topologia da rede (que foi sustentada

pelas outras análises), aliada às informações sobre a distribuição geográfica dos haplogrupos na região Neotropical, pode servir de base para a proposição de uma rota de dispersão de forma mais consistente. Vale ressaltar que representações filogeográficas em formato de rede esclarecem as relações de origem e ancestralidade de haplótipos de forma mais sólida, já que representações bifurcadas (como as árvores filogenéticas) não recuperam a possibilidade de um haplótipo ancestral dar origem a vários outros haplótipos derivados. Ou seja, as redes fornecem um panorama mais completo dos padrões filogeográficos em estudos intraespecíficos (KIRSCHNER et al., 2021; POSADA; CRANDALL, 2001).

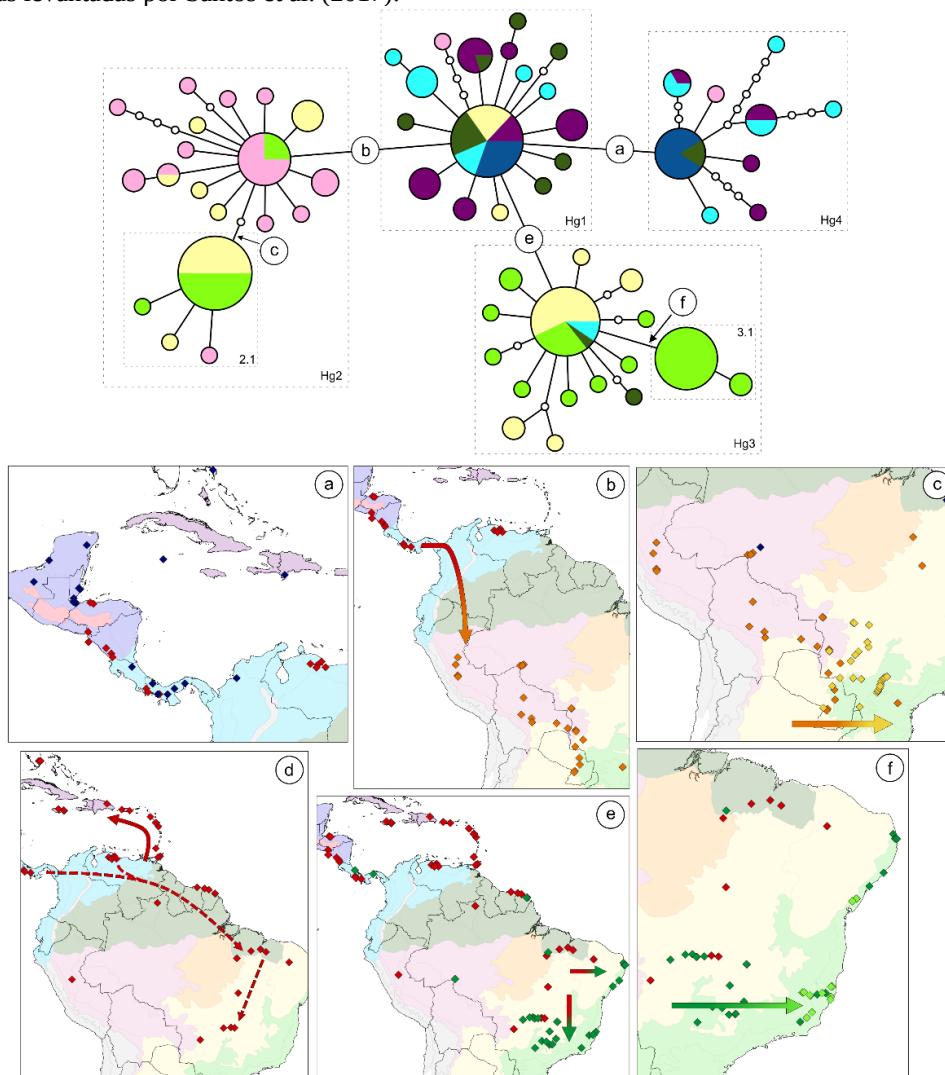
Santos et al. (2017), utilizando apenas o marcador mitocondrial 16S, propuseram uma rota de dispersão baseada nos resultados obtidos na rede haplotípica, sustentada pela análise Bayesiana. No presente estudo, a inclusão das sequências de COII revelou uma maior variabilidade genética para as populações de *N. corniger*, demonstrada pelo aumento do número de haplótipos e da diversidade haplotípica em comparação aos dados de Santos et al. (2017). Apesar disso, o formato da rede, a distribuição geográfica e o relacionamento entre os haplogrupos e os grandes clados na análise Bayesiana, assim como as datas estimadas, foram recuperados de forma muito semelhante em ambos os estudos. Portanto, é possível afirmar que os dados obtidos aqui corroboram, em grande parte, a rota de dispersão proposta por Santos et al. (2017), que propõem uma dispersão de populações de *N. corniger* da América Central para a América do Sul, passando ao leste dos Andes e chegando à Bolívia, Paraguai e centro-oeste do Brasil.

Santos et al. (2017) ainda identificaram uma dispersão sentido leste no território brasileiro, levando as populações do centro-sul do Cerrado até a Mata Atlântica, a última área a ser ocupada. Esse movimento de dispersão foi corroborado pela análise de reconstrução de área ancestral (Figura 8) realizada no presente estudo. Essa análise também recuperou o domínio Pacífico como a área ancestral de todas as populações de *N. corniger* amostradas. Interpretando esse resultado e comparando-o às inferências feitas por Santos et al. (2017) – que propuseram a América Central como região de origem das populações amostradas –, é possível sugerir que a origem mais provável das populações de *N. corniger* seja a parte norte do domínio Pacífico (localizada na América Central).

Além da inclusão do marcador COII, também foram incluídas, neste estudo, novas amostras provenientes do domínio Boreal (Roraima e Guiana Francesa). Embora a amostragem desse domínio permaneça aquém do ideal para o levantamento de inferências mais robustas acerca dos padrões populacionais de *N. corniger* na região, foi possível

notar que as variantes genéticas observadas no domínio Boreal estão, em sua maior parte, contempladas no haplogrupo 1 (agrupamento ancestral). De modo especulativo, é possível sugerir que, além da dispersão da América Central para a América do Sul pelo oeste sul-americano (SANTOS et al., 2017) (Figura 9), uma outra dispersão, também partindo da América Central, pode ter ocorrido pelos entremeios do domínio Boreal, adentrando o Cerrado pelo norte e levando as populações ancestrais de *N. corniger* até a região central do território brasileiro (onde também são observados haplótipos do haplogrupo 1) (Figura 9.d,e). Posteriormente, como foi inferido por Santos et al. (2017), as populações ancestrais estabelecidas nessa região deram origem ao haplogrupo 3 (que ocorre de forma predominante no centro-sul do Cerrado) que, por sua vez, deu origem ao subgrupo 3.1.

Figura 9 – Rota de dispersão identificada para *N. corniger*, contemplando as inferências propostas aqui e as levantadas por Santos et al. (2017).



As setas indicam o sentido de dispersão das populações, coloridas em gradiente de acordo com os haplogrupos de origem/formados – as cores dos pontos e das setas correspondem às cores dos haplogrupos na Figura 3. As setas tracejadas indicam movimentos de dispersão inferidos de forma especulativa.

Essa nova dispersão, embora tenha sido proposta aqui como uma possibilidade (linhas tracejadas na Figura 9.d), ajudaria a esclarecer a existência das duas diferentes linhagens populacionais observadas nos domínios Chaco (província Cerrado) e Paraná. Nesse sentido, uma linhagem se estabeleceu no oeste do Cerrado e da província Floresta do Paraná (haplogrupo 2 e 2.1; clados laranja e amarelo) como resultado de uma dispersão que ocorreu pelo oeste da América do Sul (passando pelo domínio Sul brasileiro) (Figura 9.b), como foi proposto por Santos et al. (2017). Já a outra linhagem (haplogrupo 3 e 3.1; clado verde escuro + verde claro) pode ter se estabelecido no centro-sul do Cerrado brasileiro a partir da dispersão de populações ancestrais (carregando haplótipos do haplogrupo 1) que atravessaram o domínio Boreal, chegando ao Cerrado pelo norte (Figura 9.d,e), como foi discutido. Não foram amostradas populações do domínio Sudeste amazônico e de outras áreas dos domínios Sul brasileiro e Boreal, que compõem as áreas centrais da Amazônia. A inclusão de amostras dessas regiões pode vir a corroborar as suposições feitas acerca desse novo movimento de dispersão proposto aqui.

Apesar dos dados apresentados terem corroborado em grande parte a rota de dispersão proposta por Santos et al. (2017), a ampliação da amostragem do domínio Boreal no norte da América do Sul também levou à identificação de uma origem diferente para as populações localizadas nas Antilhas. Santos et al. (2017) sugeriram que a dispersão para as ilhas caribenhas tivesse ocorrido a partir da América Central (origem mais provável das populações de *N. corniger*, como foi discutido). No entanto, os resultados apresentados aqui evidenciaram uma grande similaridade entre as populações do norte da América do Sul (Boreal e parte sul do domínio Pacífico) e das ilhas antilhanas, que foram recuperadas dentro dos mesmos grupos na maior parte das análises (Figuras 3, 4, 7 e 8). Essa característica também foi observada para *N. ephratae*, onde foi identificada uma dispersão para as ilhas a partir do norte da América do Sul (Capítulo 1).

Embora a reconstrução de área ancestral realizada para *N. corniger* não tenha recuperado esse movimento de dispersão com a mesma clareza (em comparação à análise realizada para *N. ephratae*), é possível sugerir que a dispersão de *N. corniger* para as ilhas antilhanas também tenha ocorrido a partir do norte do continente sul-americano, considerando a rota proposta e a grande similaridade genética entre as populações de ambas as regiões. Essa inferência também é corroborada pelos resultados de Crews e

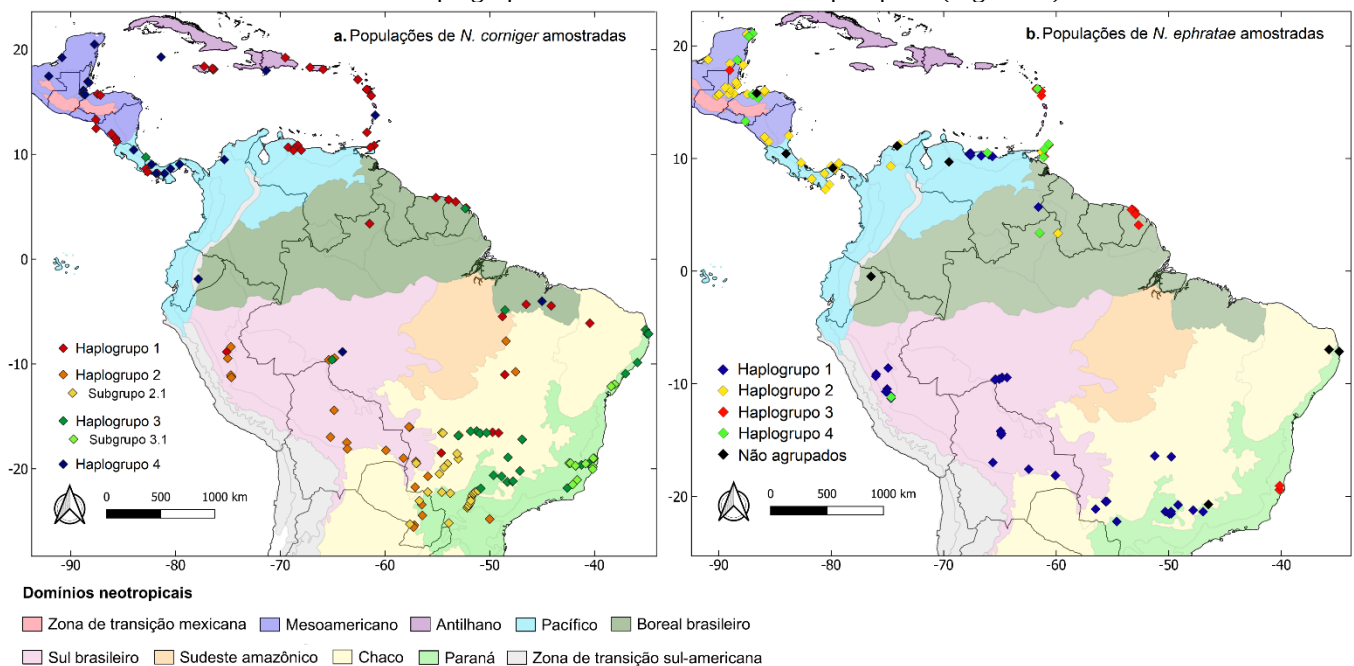
Esposito (2020), que propuseram que a América do Sul é a origem mais provável de grande parte da fauna de artrópodes encontrada no Caribe. Assim como foi discutido para *N. ephratae* (Capítulo 1), é possível que essa dispersão para as Antilhas tenha acontecido através de troncos flutuantes levados às ilhas pelas correntes marítimas. Esse tipo de dispersão já foi identificado para outras espécies de cupins que ocorrem no Caribe (JANOWIECKI et al., 2020).

Os dados apresentados nesse capítulo evidenciaram os padrões populacionais de *N. corniger* ao longo da região Neotropical. Parte desses padrões já havia sido observado de forma muito semelhante por Santos et al. (2017), utilizando apenas o marcador 16S. A inclusão de um marcador molecular mais polimórfico (COII, nesse caso) levou à identificação de um maior número de variantes genéticas para as populações de *N. corniger*. Embora isso seja um dado relevante, é importante destacar que a ampliação da amostragem no norte da América do Sul (apesar de ter permanecido aquém do ideal no domínio Boreal) foi o principal fator responsável pela proposição de novas inferências a respeito da história filogeográfica de *N. corniger* na região Neotropical.

4.2 Padrões populacionais em *N. corniger* e *N. ephratae*: espécies biologicamente semelhantes respondem de forma similar à biogeografia da região?

Nasutitermes corniger e *N. ephratae* (cujos padrões populacionais e história filogeográfica foram abordados no Capítulo 1) foram analisadas de forma muito semelhante nos estudos apresentados por essa tese, salvas algumas especificidades. Foram utilizados os mesmos marcadores genéticos e procedimentos laboratoriais para ambas as espécies, além dos mesmos métodos de análise (incluindo parâmetros, modelos e calibrações) e de interpretação dos resultados. Esses fatores permitiram a comparação dos padrões populacionais dessas espécies de forma equitativa, considerando, ainda, que elas apresentam características biológicas e comportamentais similares, além de possuírem a mesma área de distribuição (Neotropical) (Figura 10).

Figura 10 – Localidades amostradas ao longo da área de distribuição de (a) *N. corniger* e de (b) *N. ephratae*. Os pontos foram coloridos de acordo com os haplogrupos reconstruídos nas redes haplotípicas (Figura 11).



De modo geral, a distância genética média observada entre as amostras de *N. corniger* (0,006) foi menor que a distância média observada para *N. ephratae* (0,011), considerando as sequências concatenadas para ambas. Na análise de distância entre domínios, as duas espécies apresentaram padrões opostos entre si (Tabela 7) – os maiores valores observados em *N. corniger* foram para as comparações entre Sul brasileiro x Paraná, Chaco x Paraná e Chaco x Sul brasileiro, enquanto essas mesmas comparações resultaram nos menores valores de distância genética entre domínios observados para *N. ephratae*. Por outro lado, as comparações entre Boreal x Mesoamericano e Boreal x Pacífico resultaram nos maiores valores de distância observados para *N. ephratae* e nos menores valores observados para *N. corniger* nas análises entre domínios (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de distância genética entre domínios estimados para *N. corniger* e *N. ephratae*.

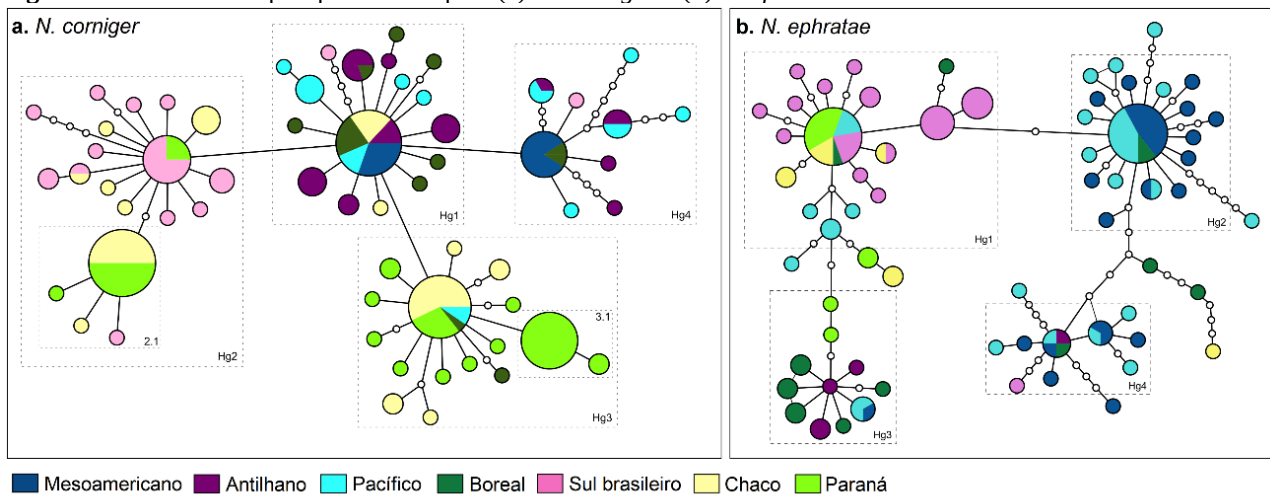
Comparação entre domínios	<i>N. corniger</i>	<i>N. ephratae</i>
Sul brasileiro x Paraná	0.008	0.003
Chaco x Paraná	0.007	0.003
Chaco x Sul brasileiro	0.007	0.004
Boreal x Mesoamericano	0.003	0.016
Boreal x Pacífico	0.003	0.016

Estão destacados em negrito os maiores valores obtidos para as comparações entre domínios em cada espécie.

As redes de haplótipos e as árvores Bayesianas de ambas as espécies evidenciaram uma diferenciação geográfica entre os grupos (haplogrupos/clados) estabelecidos,

principalmente em relação à América Central e do Sul (Figura 11). Bagley e Johnson (2014), analisando histórias filogeográficas de diversas espécies da biota do sul da América Central (Panamá e Costa Rica), identificaram um padrão exponencial de diversificação de linhagens que teve início no fim do Mioceno (há aproximadamente 10 Ma). A divergência entre as linhagens dessa região e as linhagens da América do Sul se intensificou no plio-pleistoceno, o que levou a altos níveis de diferenciação genética entre as biotas desses continentes e ao aumento das taxas de especiação (BAGLEY; JOHNSON, 2014). Os dados obtidos para as duas espécies de *Nasutitermes* analisadas aqui corroboram esse estudo, visto que foram observados grupos exclusivos da América Central e outros exclusivos da América do Sul, evidenciando a diversificação das linhagens nessas regiões (Figura 11). Essa diferenciação também foi observada em espécies de abelhas do grupo Euglossini (*Eulaema meriana*; *Exaerete frontalis* e *E. smaragdina*; *Euglossa imperialis*, *E. ignita* e *E. allosticta*), mas, ao contrário do que foi identificado para *Nasutitermes*, foram encontrados baixíssimos níveis de estruturação populacional para essas abelhas – os mais baixos já reportados, até então, para organismos neotropicais de ampla distribuição –, junto a altos índices de fluxo gênico passado e presente (DICK et al., 2004).

Figura 11 – Redes de haplótipos obtidas para (a) *N. corniger* e (b) *N. ephratae*.



Os pontos brancos nos ramos indicam passos mutacionais entre os haplótipos relacionados.

Ainda de forma similar entre *N. corniger* e *N. ephratae*, os haplótipos encontrados nas ilhas antilhanas permaneceram dentro de grupos que abrigam, também, haplótipos dos domínios do norte da América do Sul (Figuras 10 e 11). Esses dados sugeriram uma dispersão de *Nasutitermes* através de troncos flutuantes (levados por correntes marítimas)

para as ilhas antilhanas a partir do norte sul-americano. Esse mesmo padrão de dispersão também foi observado para outros cupins (JANOWIECKI et al., 2020), para espécies de aranhas (MCHUGH et al., 2014; CHAMBERLAND et al., 2018; AGNARSSON et al., 2016) e até mesmo para grupos de pequenos vertebrados (HEDGES, 2001). A fauna antilhana de Triatomini também teve origem no norte da América do Sul, mas é provável que essa dispersão tenha ocorrido por conexões terrestres durante a GAARlandia, entre 33 e 35 Ma atrás (JUSTI et al., 2016) – muito anterior às datas estimadas para o estabelecimento das populações de *Nasutitermes* analisadas aqui.

Apesar das semelhanças, nenhum haplogrupo de *N. ephratae* ocorre de forma ampla na América Central e do Sul ao mesmo tempo, diferentemente do que foi observado para *N. corniger*, onde o haplogrupo 1 está amplamente distribuído nessas duas porções do continente americano. Além disso, a diversidade de haplogrupos observada na América do Sul (com exceção da parte norte) para *N. corniger* foi maior do que a observada para *N. ephratae*, onde apenas o haplogrupo 1 ocorre de forma frequente (Figura 10). Contrariamente, a região norte da América do Sul abriga haplótipos de todos os haplogrupos de *N. ephratae*, enquanto apenas haplótipos do haplogrupo 1 de *N. corniger* são observados nessa mesma região.

As divergências e o estabelecimento dos haplogrupos na região Neotropical parecem ser mais antigas para *N. corniger* do que para *N. ephratae* – de modo geral, há uma diferença média de cerca de quatro milhões de anos entre as datas estimadas para os grandes clados de *N. corniger* e *N. ephratae* (considerando as análises Bayesianas realizadas com todos os indivíduos). Isso ajudaria a explicar os padrões divergentes das duas espécies em relação aos haplogrupos da América do Sul: é possível sugerir que houve tempo suficiente para que as populações de *N. corniger* pudessem acumular diferenças na região (evidenciadas pela maior diversidade de haplogrupos de *N. corniger* na América do Sul), originando variantes genéticas características de algumas áreas; por outro lado, as populações de *N. ephratae*, que parecem ter se estabelecido mais recentemente, apresentaram padrões mais similares entre si (o que pode ser observado pela distribuição de apenas um haplogrupo de *N. ephratae* em boa parte da América do Sul). Um padrão semelhante a esse de *N. ephratae* foi observado em abelhas do grupo Euglossini; foram identificadas origens recentes para populações sul-americanas, que cruzaram longas distâncias e barreiras geográficas, resultando em uma alta similaridade genética entre elas (DICK et al., 2004).

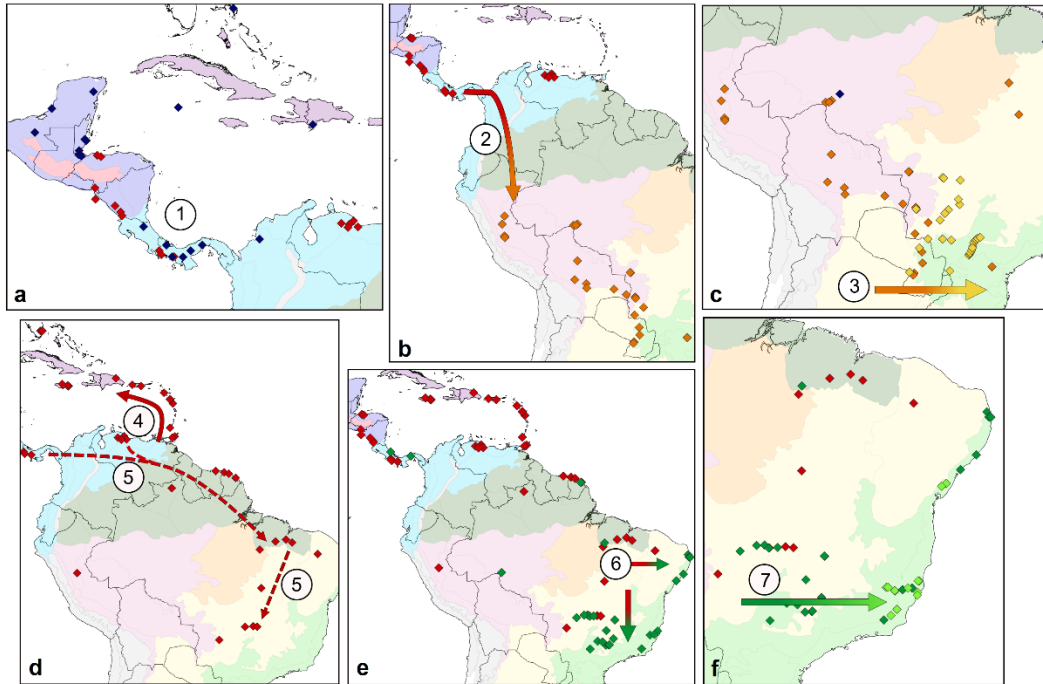
Apesar disso, as rotas de dispersão inferidas para *N. corniger* e *N. ephratae* são muito semelhantes (Figura 12). A América Central, para *N. corniger*, e a América Central junto ao extremo norte da América do Sul (domínio Pacífico), para *N. ephratae*, foram identificados como locais de origem de todas as populações amostradas, de onde se dispersaram para o restante da América do Sul. O Pacífico também foi identificado como domínio ancestral das populações de diversas espécies de barbeiro (Triatomini), que, posteriormente, também sofreram dispersão para outros domínios sul-americanos. Para os Triatomini, o soerguimento gradual dos Andes parece ter sido o principal fator responsável pela diversificação das espécies encontradas na América do Sul (JUSTI et al., 2016).

As rotas de dispersão de *N. corniger* e *N. ephratae* apresentam semelhanças importantes, mas algumas particularidades também foram observadas (Figura 12). Em relação a isso, Borer et al. (2012) afirmam que muitas rotas que são paralelas em grande escala geográfica podem apresentar incongruências em escalas menores, direcionadas por mudanças climáticas ou fatores biogeográficos regionais. Para *N. ephratae*, além da dispersão da América Central para América do Sul, foi identificado um outro movimento no sentido contrário (da América do Sul para a Central). Esse movimento teve um impacto importante na história filogeográfica de *N. ephratae* na América Central, cujos padrões genéticos populacionais parecem ser resultados de diferentes processos de dispersão. Para *N. corniger*, dois caminhos de dispersão, um para o sudoeste e outro para centro-sul do Brasil, parecem ter moldado os padrões populacionais observados nessas regiões – um haplogrupo teve origem a partir de uma dispersão pelo oeste da América do Sul e o outro é, possivelmente, resultado de uma dispersão que ocorreu através do domínio Boreal (Figura 9).

Vale ressaltar que uma amostragem mais ampla de *N. ephratae* nas regiões central e leste do Brasil, assim como na Amazônia, poderia ajudar a esclarecer e identificar outros padrões populacionais da espécie nos domínios brasileiros. Para a Mata Atlântica (domínio Paraná), por exemplo, não foi possível levantar comparações mais robustas entre os padrões de *N. corniger* e *N. ephratae* (cuja amostragem foi aquém do ideal nessa região).

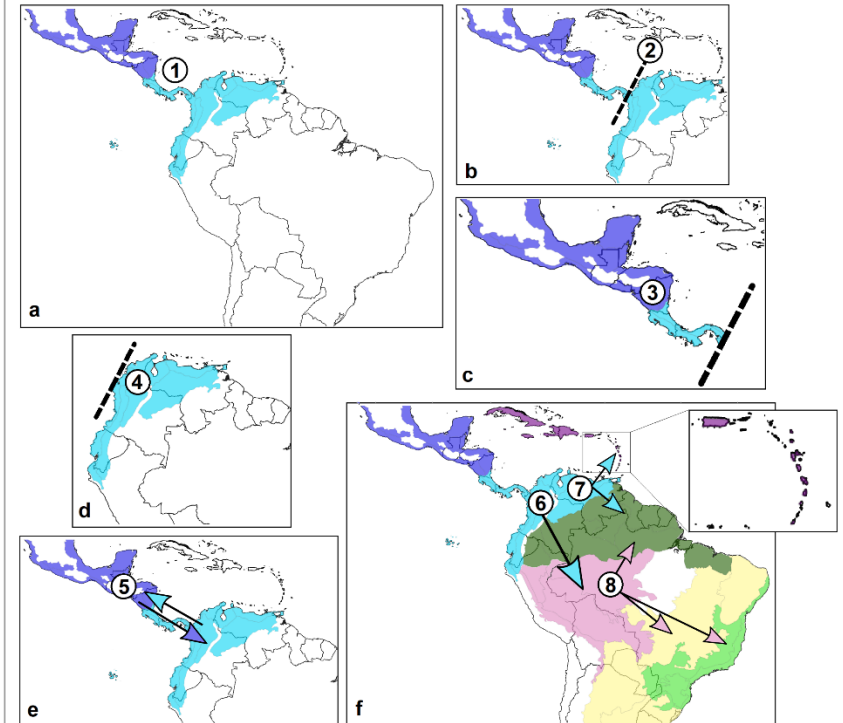
Figura 12 – Rotas de dispersão propostas para (I) *N. corniger* e (II) *N. ephratae*.

I. Rota de dispersão proposta para *N. corniger*



1. Áreas ancestrais: Pacífico e Mesoamericano;
2. Dispersão da Am. Central para Am. do Sul pelo oeste do continente - origem de novo haplogrupo;
3. Dispersão sentido leste: Sul brasileiro para Chaco e sudoeste da Mata Atlântica - origem de novo haplogrupo;
4. Dispersão do norte da Am. do Sul para as ilhas antilhanas;
5. Possível dispersão da Am. Central para Am. do Sul, passando pelo domínio Boreal até o Chaco;
6. Dispersão do Chaco para áreas a leste e sul, predominantemente - origem de novo haplogrupo;
7. Dispersão do Chaco para o leste da Mata Atlântica - origem de novo haplogrupo.

II. Rota de dispersão proposta para *N. ephratae*



1. Áreas ancestrais: Pacífico e Mesoamericano;
2. Separação temporária entre as populações de *N. ephratae*;
3. Origem do ancestral dos haplogrupos 1, 2 e 3;
4. Origem do ancestral do haplogrupo 4;
5. Reconexão das populações e dispersão entre os domínios Mesoamericano e Pacífico;
6. Dispersão do Pacífico para o Sul brasileiro;
7. Dispersão do Pacífico para os domínios Antilhano e Boreal;
8. Ampla dispersão do domínio Sul brasileiro para o Chaco e Paraná.

As setas indicam o sentido de dispersão das populações – em I, estão coloridas em gradiente de acordo com os haplogrupos de origem/formados (as cores dos pontos e das setas correspondem às cores dos haplogrupos na Figura 3); em II, as pontas das setas estão coloridas de acordo com o domínio de origem das populações. As setas vermelhas tracejadas em I indicam movimentos de dispersão inferidos de forma especulativa.

As comparações que foram feitas entre os padrões populacionais das duas espécies evidenciaram algumas semelhanças importantes, como foi discutido. Entre elas, vale destacar: (i) a identificação de expansão populacional recente para todo o conjunto de amostras e para cada um dos domínios; (ii) os pontos iniciais das rotas de dispersão (América Central/norte da América do Sul) e a dispersão para a América do Sul pelo oeste do continente; (iii) a existência de haplogrupos exclusivos da América Central e outros exclusivos da América do Sul em ambas as espécies; e (iv) a dispersão para as ilhas antilhanas a partir do norte da América do Sul.

Bell et al. (2007), também comparando padrões filogeográficos – nesse caso, de dois pares de espécies de besouros australianos do gênero *Temnoplectron* [(*T. aeneopiceum* + *T. subvolitans*) e (*T. politulum* + *T. reyi*)] –, identificaram algumas diferenças dentro dos pares de espécies em relação às áreas geográficas onde houve expansão populacional. Além disso, *T. politulum* e *T. reyi* (espécies mais generalistas) evidenciaram índices mais baixos de estrutura genética. Apesar das especificidades, os resultados desse estudo indicaram que, numa escala mais ampla, as quatro espécies responderam de forma semelhante às flutuações climáticas do Quaternário nas florestas úmidas da Austrália – os padrões detectados para os besouros foram também semelhantes aos padrões observados para espécies de lagartos, sapos e rãs. Em síntese, os dados mostraram que a formação dos padrões temporais e espaciais nas histórias filogeográficas dos organismos analisados foram direcionados por flutuações climáticas. Ou seja, os resultados obtidos nesse estudo com besouros australianos indicaram que os fatores climáticos causaram padrões filogeográficos semelhantes mesmo em grupos de espécies com características biológicas, ecológicas e comportamentais diferentes (BELL et al., 2007).

A partir dos dados levantados para *Nasutitermes*, é possível concluir que, embora existam particularidades na filogeografia de cada uma das espécies, *N. ephratae* e *N. corniger* responderam de forma semelhante aos processos biogeográficos que ocorreram na região Neotropical. Ou seja, em uma escala geográfica mais ampla, o contexto biogeográfico da região levou a padrões genéticos populacionais convergentes, moldando de forma profunda as histórias filogeográficas de *N. corniger* e *N. ephratae*.

5 CONCLUSÃO

Nesse capítulo, boa parte dos padrões populacionais que haviam sido observados por Santos et al. (2017) para *N. corniger* foram corroborados. A inclusão do marcador COII possibilitou a identificação de um número maior de variantes genéticas, mas foi a inclusão de novas amostras do domínio Boreal, no norte da América do Sul, o fator que levou à proposição de novas inferências sobre a história filogeográfica de *N. corniger*. Em relação a isso, uma nova rota de dispersão foi proposta para as populações das ilhas antilhanas, que provavelmente sofreram dispersão a partir do norte da América do Sul. Além disso, um outro movimento de dispersão para o Cerrado brasileiro pelos entremeios da Amazônia foi sugerido como uma possibilidade. Esse movimento ajudaria a explicar os diferentes padrões genéticos observados no sudoeste e centro-sul do Brasil, podendo ser confirmado ao passo em que novas amostras do domínio Boreal (e outras regiões amazônicas) sejam incluídas em estudos futuros.

Comparando os padrões identificados para *N. corniger* nesse capítulo aos padrões identificados para *N. ephratae* (Capítulo 1), foram observadas algumas semelhanças bastante relevantes em relação aos aspectos filogeográficos de ambas as espécies – embora, em menor escala, também tenham sido observadas algumas especificidades em cada uma delas. Tais semelhanças levaram à confirmação de que *N. corniger* e *N. ephratae* – que são espécies semelhantes em relação a aspectos biológicos, ecológicos, comportamentais e de distribuição – foram afetadas também de forma semelhante pela história biogeográfica da região Neotropical.

REFERÊNCIAS

- ACHAZ, G. Testing for neutrality in samples with sequencing errors. **Genetics**, v. 179, p. 1409–1424, 2008.
- AGNARSSON, I. et al. Phylogeography of a good Caribbean disperser: *Argiope argentata* (Araneae, Araneidae) and a new ‘cryptic’ species from Cuba. **ZooKeys**, n. 625, p. 25-44, 2016.
- ARAÚJO, R. L. **Catálogo dos Isoptera do novo mundo**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1977.
- BAGLEY, J. C.; JOHNSON, J. B. Phylogeography and biogeography of the lower Central American Neotropics: diversification between two continents and between two seas. **Biological Reviews**, v. 89, n. 4, p. 767-790, 2014.

- BANKS, N. The termites of Panama and British Guiana. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 38, n. 17, p. 659-667, 1918.
- BELL, K. L. et al. Comparative phylogeography and speciation of dung beetles from the Australian Wet Tropics rainforest. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 23, p. 4984-4998, 2007.
- BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 15, n. 4, p. e1006650, 2019.
- BOURGUIGON, T. et al. Mitochondrial Phylogenomics Resolves the Global Spread of Higher Termites, Ecosystem Engineers of the Tropics. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 589–597, 2016.
- BOURGUIGON, T. et al. Towards a revision of the Neotropical soldierless termites (Isoptera:Termitidae): redescription of the genus *Anoplotermes* and description of *Longustitermes*, gen. nov. *Invertebrate Systematics*, v. 24, p. 357-370, 2010.
- CHAMBERLAND, L. et al. From Gondwana to GAAR landia: Evolutionary history and biogeography of ogre-faced spiders (Deinopis). **Journal of Biogeography**, v. 45, n. 11, p. 2442-2457, 2018.
- CHENG, L. et al. Hierarchical and Spatially Explicit Clustering of DNA Sequences with BAPS Software. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1224–1228, 2013.
- CLEMENT, M.; POSADA, D; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1659, 2000.
- COLLET, T.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. Genetic relationship of *Nasutitermes* populations from Southern Brazil (Isoptera: Termitidae). **Sociobiology**, v. 42, n. 2, p. 343–349, 2003.
- CONSTANTINO, R. Estimating global termite species richness using extrapolation. **Sociobiology**, v. 65, n. 1, p. 10-14, 2018.
- CONSTANTINO, R. **On-line termite database**, 2020. <<http://164.41.140.9/catal/>> Acesso em 06 jan. 2020.
- CREWS, S. C.; ESPOSITO, L. A. Towards a synthesis of the Caribbean biogeography of terrestrial arthropods. **BMC Evolutionary Biology**, v. 20, n. 12, p. 1-27, 2020.
- EISNER, T.; KRISTON, I.; ANESHANSLEY, D. J. Defensive behavior of a termite (*Nasutitermes exitiosus*). **Behavior Ecology and Sociobiology**, v. 1, p. 83-125, 1976.
- ENGEL, M. S.; GRIMALDI, D. A. The termites of Early Eocene Cambay amber, with the earliest record of the Termitidae (Isoptera). **ZooKeys**, v. 148, p. 105-123, 2011.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite v. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564–567, 2010.
- FU, Y. X. Statistical Tests of Neutrality of Mutations against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. **Genetics**, v. 147, p. 915–925, 1997.

- FU, Y. X.; LI, W. H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, p. 693-709, 1993.
- HARTKE, T. R.; ROSENGAUS, R. B. Heterospecific pairing and hybridization between *Nasutitermes corniger* and *N. ephratae*. **Naturwissenschaften**, v. 98, p. 745-753, 2011.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of molecular evolution**, v. 22, n. 2, p. 160-174, 1985.
- HEATH, T. A.; HUELSENBECK, J. P.; STADLER, T. The fossilized birth–death process for coherent calibration of divergence-time estimates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 2957-2966, 2014.
- HEDGES, S. B. Molecular evidence for the early history of living vertebrates. **Systematics Association special volume**, v. 61, p. 119-134, 2001.
- HOLMGREN, N. Versuch einer monographie der amerikanischen Eutermes-Arten. **Jahrbuch der Hamburgischen Wissenschaftlichen Anstalten**, v. 171, n. 27, p. 325, 1910.
- HOWARD, R. W. et al. Cuticular hydrocarbons as chemotaxonomic characters for *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) and *N. ephratae* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). **Annals of Entomological Society of America**, v. 81, n. 3, p. 395-399, 1988.
- JANOWIECKI, M. A. et al. Population Structure of the Drywood Termite *Incisitermes schwarzi* (Blattodea: Kalotermitidae) in the Caribbean. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 36, p. 101-108, 2020.
- JARZEMBOWSKI, E. A. An early Cretaceous termite from southern England (Isoptera: Hodotermitidae). **Systematic Entomology**, v. 6, p. 91-96, 1981.
- JUSTI, S. A.; GALVAO, C.; SCHRAGO, C. G. Geological changes of the Americas and their influence on the diversification of the Neotropical kissing bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004527, 2016.
- KAMBHAMPATI, S. A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 2017–2020, 1995.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, p. 1160-1166, 2017.
- KIRSCHNER, P. et al. Performance comparison of two reduced-representation based genome-wide marker-discovery strategies in a multi-taxon phylogeographic framework. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.
- KRISHNA, K. New fossil species of termites of the Subfamily Nasutitermitinae from Dominican and Mexican amber (Isoptera, Termitidae). **American Museum Novitates**, v. 3176, p. 1-13, 1996.

- KRISHNA, K.; GRIMALDI, D. Diverse Rhinotermitidae and Termitidae (Isoptera) in Dominican Amber. **American Museum Novitates**, v. 3640, p. 1-48, 2009.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- KURAKU, S. et al. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 22-28, 2013.
- LIU, H.; BECKENBACH, A. T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 41-52, 1992.
- LÖWENBERG-NETO, P. Neotropical region: a shapefile of Morrone's (2014) biogeographical regionalization. **Zootaxa**, v. 3802, p. 300-300, 2014.
- MATZKE, N. J. **BioGeoBEARS**: BioGeography with Bayesian (and Likelihood) Evolutionary Analysis in R Scripts. R package, version 0.2.1. 2013. <http://CRAN.R-project.org/package=BioGeoBEARS>
- MCHUGH, A. et al. Molecular phylogenetics of Caribbean Micrathena (Araneae: Araneidae) suggests multiple colonisation events and single island endemism. **Invertebrate Systematics**, v. 28, n. 4, p. 337-349, 2014.
- MIURA, T.; ROISIN, Y.; MATSUMOTO, T. Molecular Phylogeny and Biogeography of Nasute Termite Genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific Tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2000.
- MORRONE, J. J. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. **Zootaxa**, v. 3782, p. 1-110, 2014.
- MOTSCHULSKY, V. Voyages: lettre de M. de Motschulsky à M. Ménétriés. **Etudes Entomologiques**, v. 4, p. 8-25, 1855.
- NICKLE, D.A.; COLLINS, M. S. Termites of Panama. In: QUINTERO, D; AIELLO, A. (Ed.). **Insects of Panama and Mesoamerica**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p. 208-241.
- OKSANEN, F. J. et al. **vegan**: Community Ecology Package. R package version 2.5-7. 2020. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1253–1256, 2008.
- POSADA, D; CRANDALL, K. A. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. **Systematic biology**, v. 50, n. 4, p. 580-601, 2001.
- PRESTWICH, G. Chemical systematics of termite exocrine secretions. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 14, n. 1, p. 287–311, 1983.
- QGIS Development Team, 2009. **QGIS Geographic Information System**. Open Source Geospatial Foundation. <http://qgis.org>
- R Core Team. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2020. URL <https://www.R-project.org/>

- RAMBAUT, A. et al. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901-904, 2018a.
- RAMBAUT, A. **FigTree**: Tree Figure Drawing Tool. v. 1.4.4. University of Edinburgh, 2018b. <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. **TreeAnnotator** v. 2.6.3. University of Edinburgh; University of Auckland, 2020. <http://beast.bio.ed.ac.uk>
- RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular biology and evolution**, v. 19, n. 12, p. 2092-2100, 2002.
- ROY, V. et al. Species delimitation and phylogeny in the genus *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) in French Guiana. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 902–920, 2014.
- ROZAS, J. et al. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 3299-3302, 2017.
- SANTOS, A. F. et al. Phylogeography of *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) in the Neotropical Region. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 230, p. 1-12, 2017.
- SANTOS, A. M. et al. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. **Bioinformatics**, v. 32, p. 627-628, 2016.
- SCHEFFRAHN, R. H. et al. Synonymy of neotropical arboreal termites *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with evidence from morphology, genetics, and biogeography. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, n. 3, p. 273-281, 2005a.
- SCHEFFRAHN, R. H. et al. Synonymy of two arboreal termites (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae): *Nasutitermes corniger* from the neotropics and *N. polygynus* from New Guinea. **Florida Entomologist**, v. 88, n. 1, p. 28-33, 2005b.
- SEAL, J. N. et al. Phylogeography of the parthenogenic ant *Platythyrea punctata*: highly successful colonization of the West Indies by a poor disperser. **Journal of Biogeography**, v. 38, p. 868-882, 2011.
- SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.
- SNYDER, T. E. Catalog of the termites (Isoptera) of the world. **Smithsonian Miscellaneous Collections**, v. 2, p. 1-490, 1949.
- SNYDER, T. E. Termites collected on the mulford biological exploration to the amazon basin, 1921-922. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 68, p. 1-76, 1926.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585–595, 1989.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-26, 1993.

THORNE, B. L. Differences in nest architecture between the neotropical arboreal termites *Nasutitermes corniger* and *Nasutitermes ephratae* (Isoptera: Termitidae). **Psyche: a Journal of Entomology**, v. 87, p. 235-244, 1980.

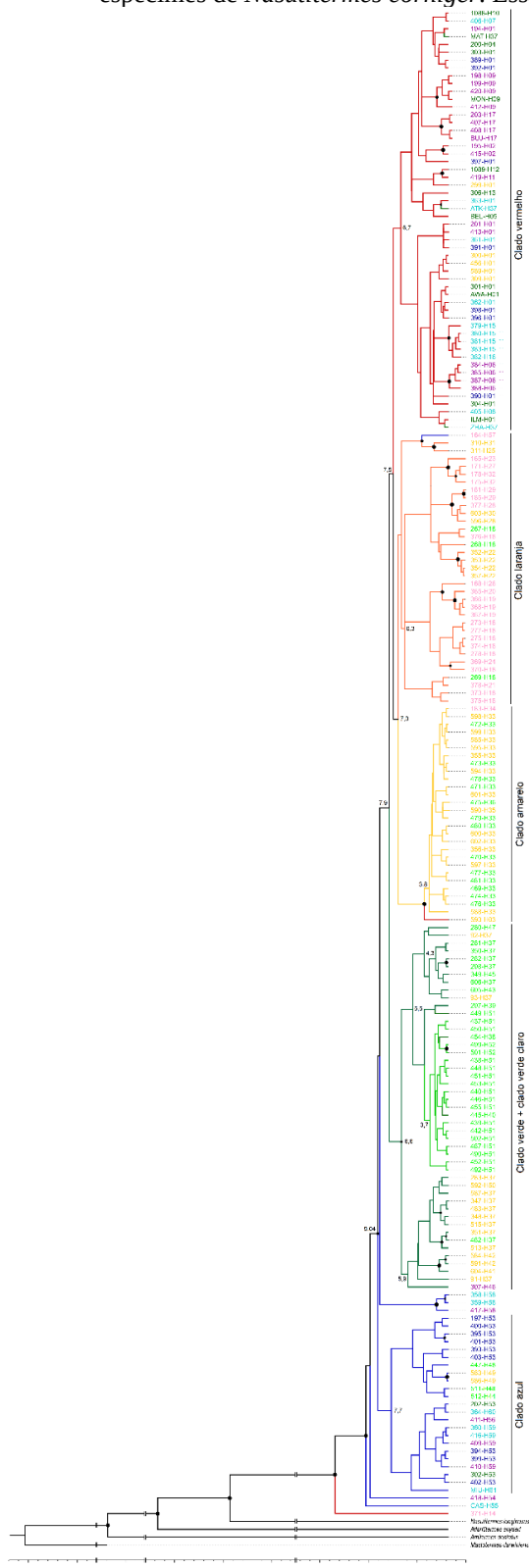
TONKIN-HILL, G. et al. RhierBAPS: An R Implementation of the Population Clustering Algorithm hierBAPS. **Wellcome Open Research**, v. 3, p. 93, 2018.

TORALES, G. J.; ARMUA, A. C. **Contribución al conocimiento de las térmitas de Argentina (Provincia de Corrientes)**. *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae): primera parte. **FACENA**, v. 6, p. 203-222, 1986.

XIONG, B.; KOCHER, T. D. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). **Genome**, v. 34, p. 306–311, 1991.

APÊNDICE

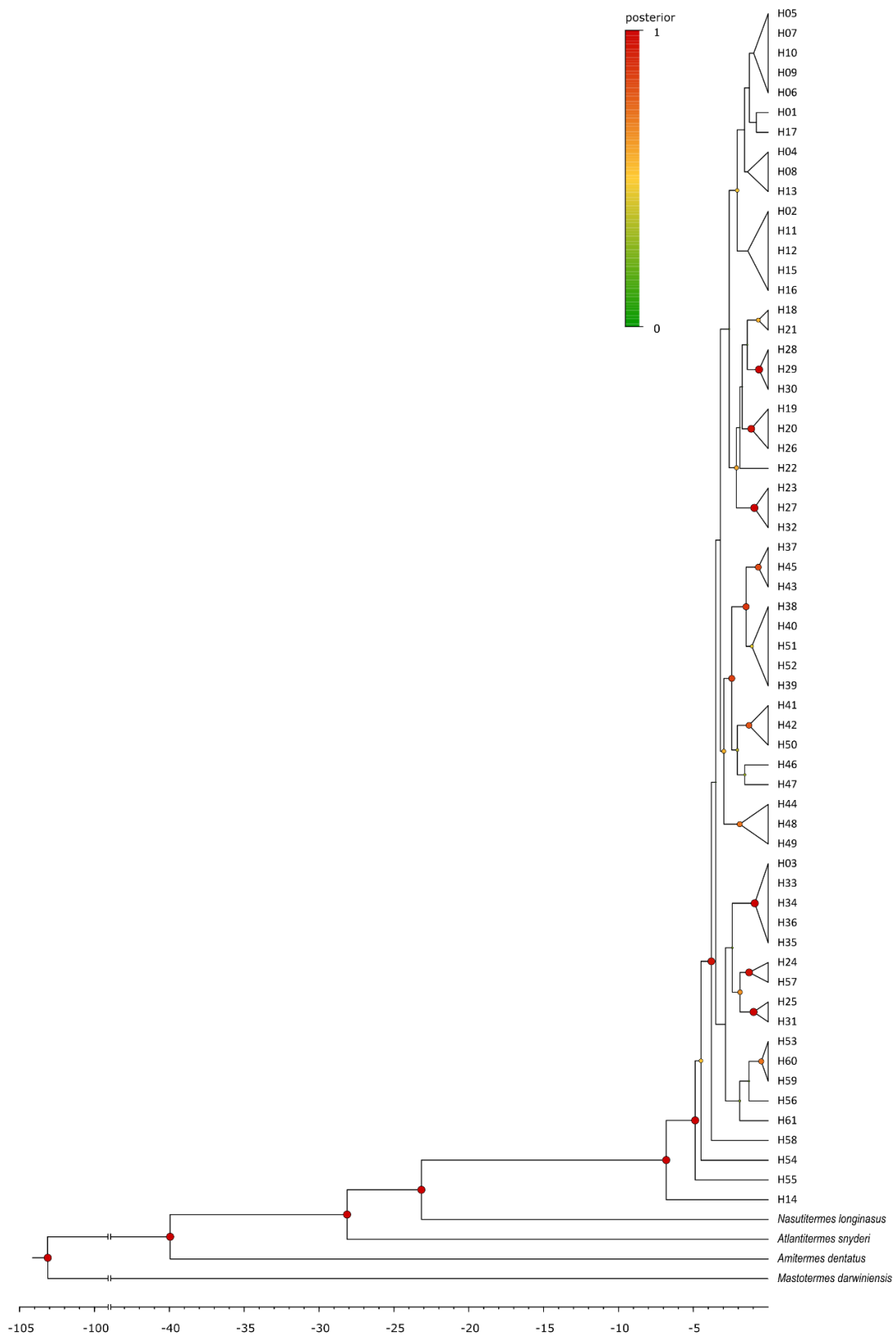
Figura A1 – Árvore de inferência Bayesiana completa, gerada a partir das sequências de 16S e COII dos espécimes de *Nasutitermes corniger*. Essa imagem pode ser acessada em melhor qualidade clicando [aqui](#)¹.



As cores dos ramos correspondem às cores dos pontos dos haplogrupos mostrados na Figura 3 – ramos vermelhos correspondem ao haplogrupo 1; ramos laranjas correspondem ao haplogrupo 2 e amarelos ao haplogrupos 2.1; ramos verdes correspondem ao haplogrupo 3 e verde claros ao haplogrupo 3.1; e os ramos azuis correspondem ao haplogrupo 4. Os números próximos aos nós indicam as datas estimadas para os tempos de divergência em milhões de anos e os pontos indicam nós com probabilidades posteriores acima de 0,50 – quanto maior o ponto, maior o valor da probabilidade posterior. As cores dos nomes dos táxons terminais indicam o domínio de procedência do indivíduo de acordo com as cores da Figura 3 – o esquema de cores para os domínios segue o mesmo padrão para todas as figuras.

¹ <https://1drv.ms/u/s!Av3Yk4Hj-a0gitIWdhzabDeQJQU8Xw>

Figura A2 – Árvore de inferência Bayesiana gerada com os haplótipos das sequências de 16S e COII observados nas populações de *N. corniger*. Essa imagem pode ser acessada em melhor qualidade clicando [aqui](#)¹.



Os círculos indicam a probabilidade posterior do nó, de acordo com a escala de cores (na legenda da figura) e com o tamanho da forma – quanto maior o círculo, maior o valor da probabilidade posterior.

¹ <https://1drv.ms/u/s!Av3Yk4Hj-a0gitIXgHW018oqCBOAeQ>

CAPÍTULO 3

Filogeografia de *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* (Termitidae: Syntermitinae) nos domínios neotropicais brasileiros

Amanda de Faria Santos, Eliana Marques Cancellato, Adriana Coletto Morales

RESUMO

Silvestritermes euamignathus e *S. heyeri* são espécies de cupins da subfamília Syntermitinae (Isoptera: Termitidae). Morfologicamente são muito semelhantes, com operários e soldados praticamente idênticos, mas apresentam diferenças em relação às áreas de ocorrência e estrutura de seus ninhos. Além disso, são frequentemente reconstruídas como espécies próximas em estudos filogenéticos. O objetivo desse capítulo foi analisar as histórias demográficas e filogeográficas dessas espécies, assim como avaliar o grau de similaridade genética entre elas. Para isso, foram utilizados os marcadores mitocondriais 16S rRNA e COII. *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* foram analisadas como componentes de uma única unidade evolutiva nesse estudo, denominada grupo *euamignathus*. Os resultados obtidos revelaram alta similaridade genética entre as espécies, compatível com a hipótese de sinonímia. Além disso, foram detectados eventos de expansão demográfica para as populações do grupo *euamignathus*. As análises filogeográficas evidenciaram um padrão de dispersão partindo do Chaco em direção às áreas florestais da Amazônia e Mata Atlântica. Essas inferências foram discutidas à luz de teorias biogeográficas que foram propostas para explicar os processos de dispersão e diversificação que ocorreram na história evolutiva da biota neotropical.

Palavras-chave: cupins, unidade evolutiva, biogeografia, similaridade genética.

1 INTRODUÇÃO

O território brasileiro ocupa boa parte da região Neotropical, abrigando uma grande diversidade de organismos e habitats. Entre eles, as florestas tropicais estão entre os biomas de maior extensão, mas grande parte do seu território também é composto por áreas de vegetação aberta seca. De acordo com a regionalização da região Neotropical proposta por Morrone (2014), o Brasil é composto por cinco domínios neotropicais, abrigando 12 províncias biogeográficas: (i) Boreal brasileiro, que inclui as províncias Imeri, Pantepui, Roraima, Pará e Planícies da Guiana; (ii) Sul brasileiro, composto pelas províncias Madeira e Rondônia; (iii) Sudeste Amazônico, composto apenas pela província Xingu-Tapajós; (iv) Chaco, incluindo as províncias Cerrado e Caatinga; e (v) Paraná, que abrange as províncias Atlântica, Floresta Paraná e Floresta de *Araucaria*.

Essa regionalização proposta por Morrone (2014) foi utilizada para definir as unidades biogeográficas amostradas neste estudo. Apesar disso, em alguns momentos da discussão os termos Mata Atlântica (que corresponde a todo o domínio Paraná) e Amazônia (contemplando os domínios Boreal e Sul brasileiro) são utilizados, a fim de facilitar a comparação com as informações levantadas por outras pesquisas. Além disso, o termo Chaco, quando utilizado no texto, se refere ao conjunto das províncias Cerrado + Caatinga, conforme proposto por Morrone (2014).

Neste capítulo serão abordados aspectos filogeográficos das espécies *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri*, da subfamília Syntermitinae (Termitidae), cujas distribuições analisadas se limitam ao território brasileiro, embora elas ocorram além desses limites. Diante da grande similaridade morfológica, genética e filogenética que existe entre essas espécies (como será apresentado no próximo tópico), a maior parte das análises, salvas algumas exceções, foram conduzidas considerando *S. euamignathus* e *S. heyeri* como componentes de uma única unidade evolutiva, denominada grupo *euamignathus*. Essa denominação foi utilizada por Rocha, Canello e Carrijo (2012) para se referir ao agrupamento formado pelas espécies *S. euamignathus*, *S. heyeri* e *S. almirsateri* (não contemplada neste estudo). Vale ressaltar que os autores estabeleceram essa nomenclatura com base em características morfológicas das espécies, mas, por definição, a mesma denominação foi utilizada aqui para se referir ao grupo de espécies analisado. Portanto, o termo ‘grupo *euamignathus*’ corresponde, em todo o texto, ao grupo composto pelas espécies *S. euamignathus* e *S. heyeri*.

Aspectos gerais de *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* (Syntermitinae)

As espécies da subfamília Syntermitinae são caracterizadas por possuírem um grande poro no ápice da abertura do tubo frontal, localizado na região dorso-anterior da cabeça, além de um par de mandíbula funcionais (Figura 1), utilizadas como estrutura de defesa (ROCHA; CANCELLO; CARRIJO, 2012). Conhecidos como “nasutos mandibulados”, os representantes de Syntermitinae estavam classificados como grupo basal dentro de Nasutitermitinae. A partir de análises realizadas sobre a história evolutiva dos grupos, Engel e Krishna (2004) sugeriram a classificação de Syntermitinae como uma nova subfamília dentro de Termitidae.

Figura 1 – Soldado de *Silvestritermes euamignathus*.



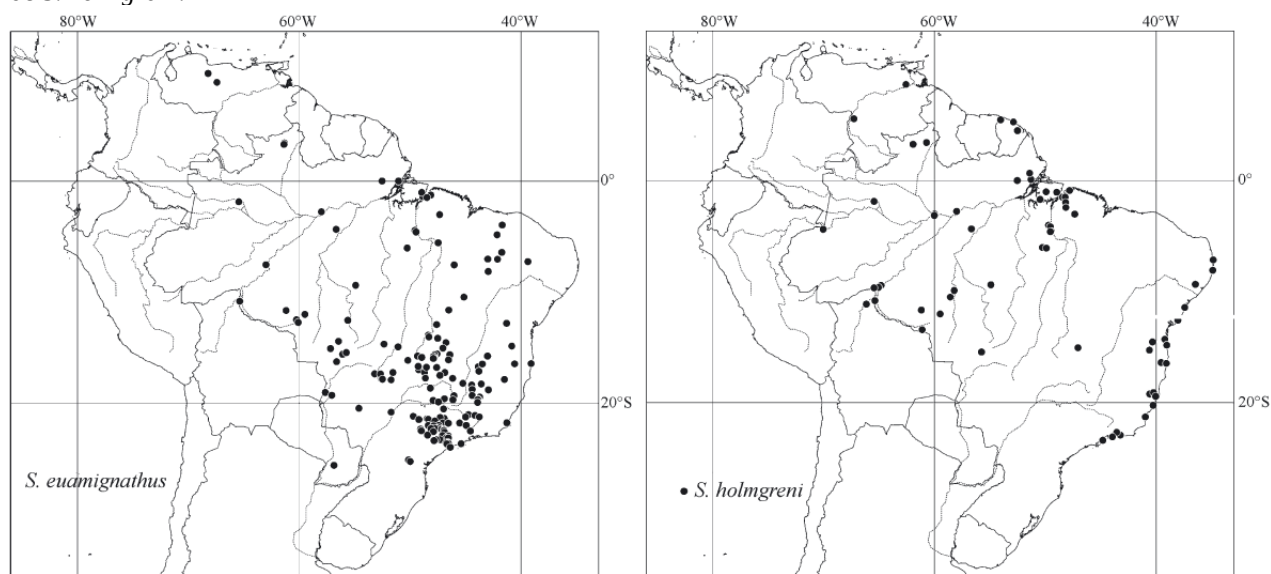
Fonte: Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Maurício Martins da Rocha.

Syntermitinae abriga o gênero *Silvestritermes*, além de 17 outros gêneros (CONSTANTINO, 2020). Anteriormente, os atuais representantes de *Silvestritermes* sp. estavam classificados dentro do gênero *Armitermes*. Com base em características morfológicas gerais e do trato digestivo, Rocha e Canello (2012) propuseram a classificação de *Silvestritermes* como um novo gênero dentro de Syntermitinae, abrigando sete espécies diferentes, incluindo *Silvestritermes euamignathus* (SILVESTRI, 1901) e *S. heyeri* (WASMANN, 1915). Essas espécies foram descritas a partir de indivíduos alados e soldados coletados nos estados do Mato Grosso e São Paulo, respectivamente. *Silvestritermes heyeri*, atual nome válido para a espécie, é sinônimo sênior de *S. holmgreni*, nomenclatura que deixou de ser válida após a sinonímia ter sido observada por diversos autores e confirmada por Krishna et al. (2013, p. 1428).

Ambas as espécies apresentam ampla distribuição e são exclusivamente neotropicais. *Silvestritermes euamignathus* habita, tipicamente, áreas de vegetação

aberta, mas também pode ser encontrada em regiões de floresta, como a Amazônia e a Mata Atlântica, onde também ocorre a espécie *S. heyeri*, que, no geral, se limita a áreas florestais (Figura 2). Não há registros de *S. heyeri* na região sudoeste da América do Sul, enquanto *S. euamignathus* pode ser encontrado em quase todo o continente (ROCHA; CANCELLO; CARRIJO, 2012).

Figura 2 – Distribuição de *Silvestritermes euamignathus* (à esquerda) e de *S. heyeri* (à direita), sinônimo sênior de *S. holmgreni*.



Fonte: Adaptado de Rocha; Canello; Carrijo (2012, p. 824).

Filogeneticamente, *S. euamignathus* e *S. heyeri* são consistentemente consideradas como espécimes próximas (ROCHA; CANCELLO; CARRIJO, 2012). Os soldados de *S. euamignathus* e *S. heyeri* são praticamente idênticos e apresentam variação morfológica intraespecífica bastante ampla, tanto entre as colônias como dentro das mesmas. O amplo espectro de variação e a alta similaridade morfológica entre os soldados dessas espécies geram grandes dificuldades taxonômicas em relação à identificação correta dos espécimes, considerando que a casta dos soldados é a mais utilizada para fins de taxonomia de cupins. Entre os alados, podem ser observadas algumas diferenças morfológicas (CANCELLO, 2021¹), mas as descrições morfológicas dos operários das duas espécies são idênticas (ROCHA; CANCELLO; CARRIJO, 2012).

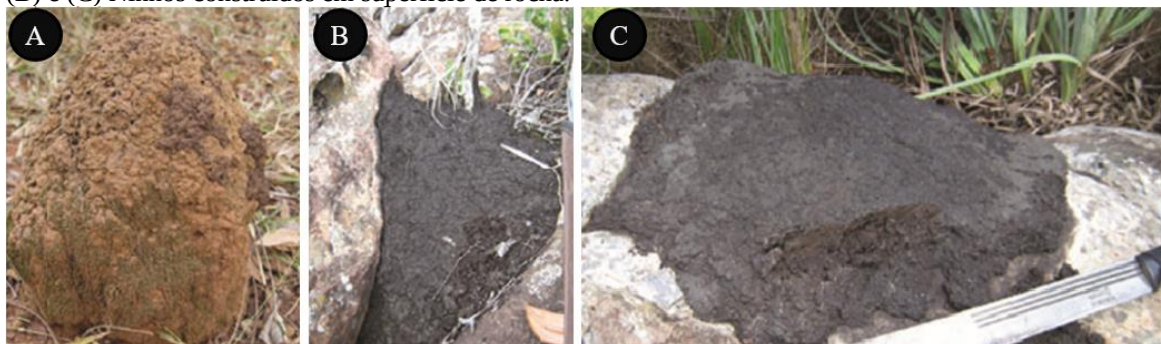
A proximidade filogenética, aliada à baixíssima diferenciação morfológica entre essas espécies, levantam suspeitas de que, na verdade, *S. euamignathus* e *S. heyeri* sejam

¹ Canello, E. M. (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – MZUSP). Comunicação pessoal, 2021.

sinônimos e representem, portanto, uma única espécie. Porém, apesar de evidências morfológicas e filogenéticas suportarem a hipótese de sinonímia entre as duas espécies, alguns aspectos importantes apoiam, até então, a manutenção da classificação de *S. euamignathus* e *S. heyeri* como espécies distintas, em especial as características de seus ninhos (ROCHA; CANCELLO; CARRIJO, 2012).

Os ninhos de *S. euamignathus* são epígeos, mas apresentam enorme variação em relação à forma e constituição. Muitos deles apresentam formato típico de cúpula, construídos sobre o solo, mas também são encontrados ninhos em formato de crosta na superfície de rochas, sem contato direto com o solo (Figura 3). A espécie, além de construir seus próprios ninhos, também pode remodelar ninhos abandonados de outras espécies, como os de *Cornitermes cumulans* (Termitidae: Syntermitinae). *Silvestritermes heyeri* constrói ninhos arborícolas bem característicos em troncos de árvores, apresentando uma superfície recoberta por estruturas semelhantes a “estalactites” (Figura 4). Essa espécie também pode ser frequentemente encontrada habitando ninhos abandonados de outras espécies, como os de *Labiotermes labralis* (Termitidae: Nasutitermitinae) (ROCHA; CANCELLO; CARRIJO, 2012).

Figura 3 – Diferentes tipos de ninhos de *Silvestritermes euamignathus*. (A) Ninho construído sobre o solo; (B) e (C) Ninhos construídos em superfície de rocha.



Fonte: Adaptado de Rocha; Canello; Carrijo (2012, p. 812).

Figura 4 – Ninhos de *Silvestritermes heyeri*.



Fonte: Adaptado de Rocha; Canello; Carrijo (2012, p. 814).

A notável diferença entre os ninhos de *S. euamignathus* e *S. heyeri* é considerada a única forma inequívoca de se distinguir entre as espécies. Apesar disso, é preciso considerar que essas variações podem ser resultado de uma grande plasticidade intraespecífica, o que sustentaria a hipótese de sinonímia entre as duas espécies. Porém, não está claro se o espectro dessa plasticidade poderia incluir a construção de ninhos arborícolas e epígeos pela mesma espécie (ROCHA; CANCELLO; CARRIJO, 2012).

Para esse capítulo, os objetivos principais foram (i) determinar os padrões filogeográficos de *S. euamignathus* e *S. heyeri*; (ii) verificar a ocorrência de processos históricos e demográficos, como expansão ou retração populacional, dispersão e vicariância, na história evolutiva dessas espécies; (iii) detectar níveis de estruturação entre as populações analisadas; e (iv) avaliar os graus de similaridade genética entre as duas espécies, ajudando a esclarecer a hipótese de sinonímia. Para isso, os marcadores mitocondriais 16S rRNA e COII foram utilizados como ferramentas moleculares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Os espécimes de *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* obtidos para esse trabalho (Tabela 1; Figura 5) são provenientes da coleção de Isoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), São Paulo, e foram cedidos por sua curadora, Profa. Dra. Eliana Marques Canello. As amostras foram coletadas em diferentes campanhas e armazenadas em etanol absoluto. O DNA extraído e o material testemunho dos indivíduos utilizados para as análises estão depositados na coleção molecular do Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Além dessas amostras, oito seqüências de *S. heyeri* foram obtidas no *GenBank*, cujo acesso é público, e incluídas nas análises. No total, 35 espécimes de cada uma das espécies – *S. euamignathus* e *S. heyeri* foram analisadas (Tabela 1).

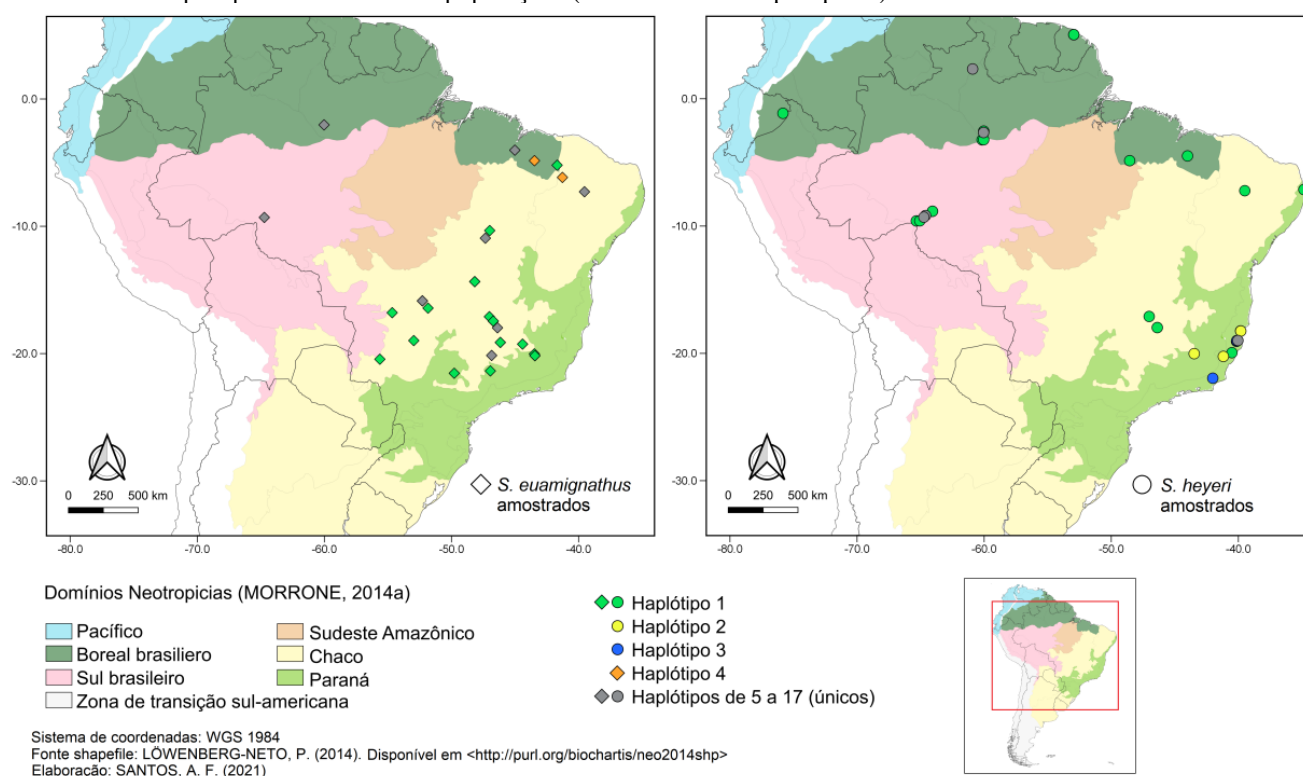
Tabela 1 – Amostras de *S. euamignathus* e *S. heyeri* analisadas, locais de coleta, domínios neotropicais de origem, coordenadas geográficas e sequenciamento das regiões do mtDNA (16S e/ou COII).

Amostra (nº LaBE) ¹	Local de coleta, estado/país	Domínio neotropical ³	Coordenadas geográficas		Sequenciamento (nº acesso GenBank)
			Latitude	Longitude	
Se791	Niquelândia, GO	CHA	-14.3473	-48.1703	16S
Se1001	Presidente Figueiredo, AM	BOR	-2.03435	-60.02590	16S/COII
Se1002	Catas Altas, MG	PAR	-20.1647	-43.4358	16S
Se1003	Arceburgo, MG	PAR	-21.36389	-46.9400	16S/COII
Se1005	Serra da Canastra, MG	CHA	-20.1477	-46.8400	16S/COII
Se1006	Lagoa Grande, MG	CHA	-17.9756	-46.3805	16S/COII
Se1007	Paracatu, MG	CHA	-17.4543	-46.7123	16S/COII
Se1008	Piranhas, GO	CHA	-16.4291	-51.8444	16S
Se1011	Morro da Água Quente, MG	PAR	-20.1647	-43.4358	16S/COII
Se1014	Porto Velho, RO	SUL	-9.306321	-64.725439	16S
Se1016	Barra do Garças, MT	CHA	-15.8599	-52.2874	16S/COII
Se1043	Aquidauana, MS	CHA	-20.4425	-55.6345	16S/COII
Se1044	Paracatu, MG	CHA	-17.1024	-47.019	16S
Se1045	Santa Bárbara, MG	PAR	-20.0234	-43.4792	16S/COII
Se1046	Promissão, SP	PAR	-21.54543	-49.782324	16S/COII
Se1047	Abaeté dos Mendes, MG	CHA	-19.1253	-46.1563	16S/COII
Se1048	Morro da Água Quente, MG	PAR	-20.1647	-43.4358	16S/COII
Se1049	Paraíso das Águas, MS	CHA	-18.9792	-52.9667	16S/COII
Se1050	PE Serra Azul, MT	CHA	-15.8599	-52.2874	16S/COII
Se1051	Paracatu, MG	CHA	-17.443	-46.7123	16S/COII
Se1052	PE Serra Azul, MT	CHA	-15.8599	-52.2874	16S/COII
Se1053	PE Serra Azul, MT	CHA	-15.8599	-52.2874	16S/COII
Se1054	Rondonópolis, MT	CHA	-16.788	-54.664	16S/COII
Se1055	Abaeté dos Mendes, MG	CHA	-19.1253	-46.1563	16S/COII
Se1056	Pimenteiras, PI	CHA	-6.161667	-41.269722	16S/COII
Se1057	Crato, CE	CHA	-7.28896	-39.536692	16S/COII
Se1058	Caxias, MA	BOR	-4.846025	-43.470228	16S
Se1059	Mateiros, TO	CHA	-10.336657	-46.991292	16S/COII
Se1060	Niquelândia, GO	CHA	-14.347294	-48.170306	16S/COII
Se1061	Lago Verde, MA	BOR	-4.022048	-45.016406	16S/COII
Se1062	Pte. Alta do Tocantins, TO	CHA	-10.935375	-47.334872	16S/COII
Se1063	Juazeiro do Piauí, PI	BOR	-5.202175	-41.686567	16S/COII
Se1064	Niquelândia, GO	CHA	-14.347294	-48.170306	16S/COII
Se1065	Niquelândia, GO	CHA	-14.347294	-48.170306	16S/COII
Se1066	Paraopeba, MG	CHA	-19.256973	-44.406793	16S
Sh798	Porto Velho, RO	SUL	-8.838231	-64.065542	16S/COII
Sh799	Porto Velho, RO	SUL	-9.596509	-65.337133	16S/COII
Sh1017	Porto Velho, RO	SUL	-9.172883	-64.613931	16S/COII
Sh1018	Manaus, AM	BOR	-2.653245	-60.046537	16S/COII
Sh1021	Santa Bárbara, MG	PAR	-20.0234	-43.4792	16S/COII
Sh1022	Iranduba, AM	BOR	-3.2259	-60.1645	16S/COII
Sh1023	Codó, MA	BOR	-4.4917	-44.0012	16S/COII
Sh1024	Presidente Figueiredo, AM	BOR	-2.54023	-60.037446	16S/COII
Sh1025	Sooretama, ES	PAR	-18.9897	-40.038	16S/COII
Sh1026	Porto Velho, RO	SUL	-9.301816	-64.742738	16S
Sh1027	Mucajai, RR	BOR	2.340472	-60.908189	16S/COII
Sh1030	Sooretama, ES	PAR	-19.0554	-40.1469	16S/COII
Sh1031	Porto Velho, RO	SUL	-9.588455	-65.066459	16S/COII
Sh1033	Santa Teresa, ES	PAR	-19.9484	-40.5080	16S/COII
Sh1036	Iranduba, AM	BOR	-3.217129	-60.040719	16S/COII
Sh1039	Santa Maria Madalena, RJ	PAR	-21.9522	-42.0148	16S/COII
Sh1040	Abel Figueiredo, PA	BOR	-4.8636	-48.5519	16S/COII
Sh1041	Sooretama, ES	PAR	-19.0123	-40.1030	16S/COII
Sh1067	Sooretama, ES	PAR	-18.9967	-40.1267	16S/COII
Sh1068	Afonso Claudio, ES	PAR	-20.2406	-41.1825	16S/COII
Sh1070	Paracatu, MG	CHA	-17.1024	-47.019	16S
Sh1071	Lagoa Grande, MG	CHA	-17.9756	-46.3805	16S/COII
Sh1072	Lagoa Grande, MG	CHA	-17.9756	-46.3805	16S/COII
Sh1073	Crato, CE	CHA	-7.222497	-39.497696	COII
Sh1075	Pedro Canário, ES	PAR	-18.2356	-39.8262	16S/COII
Sh1076	Pedro Canário, ES	PAR	-18.2457	-39.8138	16S/COII
Sh1077	Pedro Canário, ES	PAR	-18.2457	-39.8138	16S/COII

Amostra (n° LaBE) ¹	Local de coleta, estado/país	Domínio neotropical ³	Coordenadas geográficas		Sequenciamento (n° acesso GenBank)
			Latitude	Longitude	
Sh12MM ²	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR	5.03333	-52.950	COII (MH068005)
Sh33MM ²	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR	5.03333	-52.950	COII (MH068007)
Sh39MM ²	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR	5.03333	-52.950	COII (MH068008)
Sh43MM ²	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR	5.03333	-52.950	COII (MH068006)
ShEcu ²	Aguarico, Equador	BOR	-1.14274	-75.8317	COII (DQ442082)
ShMZ ²	Porto Velho, RO	SUL	-8.83823	-64.0655	COII (KX247023)
ShSh262 ²	João Pessoa, PB	PAR	-7.13445	-34.84602	COII (MT188748)
ShST24 ²	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR	5.03333	-52.950	16S (KX816705)/ COII (KX816677)
Total de amostras					70
Total de amostras com 16S e COII sequenciados					53
Total de sequências de 16S					62
Total de sequências de COII					61

¹ Os prefixos “Se” e “Sh” indicam, respectivamente, *S. euamignathus* e *S. heyeri*; ² Sequências obtidas no GenBank; ³ Domínios regionalizados por Morrone (2014).

Figura 5 – Pontos de coleta de *S. euamignathus* e *S. heyeri* analisados nesse trabalho. As cores dos pontos correspondem às cores dos haplótipos observados nas populações (ver item “Rede haplotípica”).



Procedimentos laboratoriais

O DNA total foi extraído a partir da cabeça de um indivíduo por colônia de acordo com a metodologia de Liu e Beckenbach (1992), que utiliza fenol-clorofórmio para a extração e etanol 100% e 70% para lavagem do DNA. A amplificação das regiões 16S rRNA e COII do mtDNA foram realizadas através de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) de acordo com as condições descritas na Tabela 2. A reação de PCR, com volume final

de 25 µL, foi composta por 3 µL de cada *primer* (*Foward* e *Reverse*) a 5 pmol/µL, 12.5 µL de *PCR Master Mix* (Promega), de 2.5 a 3.5 µL de *Nuclease Free Water* e de 3 µL a 4 µL de DNA com concentração média de 20 ng/µL. A checagem da amplificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1%, com a utilização de um controle negativo para monitoramento de contaminação. O produto de PCR, cuja amplificação foi confirmada, foi purificado com a utilização do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, seguido de sequenciamento tipo *Sanger* através do sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi submetida às mesmas condições descritas para a amplificação dos fragmentos.

Tabela 2 – *Primers* e condições de PCR utilizadas para amplificação dos genes 16S rRNA e COII.

Região	Primers	Ciclagem	nº de ciclos	Tamanho aprox. do fragmento
16S	LR-J-13007 (F) ¹ LR-N-1398 (R) ²	94º por 3' - desnaturação inicial	35	400 pb.
		94º por 45" - desnaturação		
		46º por 45" - anelamento		
		72º por 45" - extensão		
		72º por 7' - extensão final		
COII	Modified A-tLeu (F) ³ B-tLys (R) ⁴	94º por 3' - desnaturação inicial	35	750 pb.
		94º por 30" - desnaturação		
		46º por 1' - anelamento		
		72º por 3' - extensão		
		72º por 10' - extensão final		

¹ KAMBHAMPATI, 1995; ² XIONG; KOCHER, 1991; ³ MIURA et al., 2000; ⁴ SIMON et al., 1994.

Análise dos dados

As espécies *S. euamignathus* e *S. heyeri* foram analisadas em conjunto neste trabalho, como componentes de uma única unidade evolutiva, denominada grupo *euamignathus*. Portanto, todos os métodos de análise apresentados nesta seção se aplicam a matrizes de dados que incluem, simultaneamente, ambas as espécies, salvo algumas exceções, indicadas ao longo do texto.

Alinhamento das sequências, diversidade genética e testes de neutralidade

Todas as sequências nucleotídicas foram lidas através do *software* Chromas Lite v. 2.6.5 (Technelysium Ltd., 2005). As sequências de 16S rRNA foram alinhadas através do Mafft v. 7 (KURAKU et al., 2013; KATOH; ROZEWICKI; YAMADA, 2017) e as de COII foram alinhadas através do Geneious v. 7.1.9 (<https://www.geneious.com>) pelo método ClustalW, seguido de inspeção visual. O Geneious v. 7.1.9 também foi utilizado

para concatenar as sequências de 16S e COII das amostras em que ambas as regiões puderam ser sequenciadas.

Para quantificar a diversidade genética entre as sequências de DNA, os seguintes parâmetros foram estimados através do *software* Arlequin v. 3.5.1.2 (EXCOFFIER, 2010): número de sítios polimórficos (S), diversidade nucleotídica (π), número médio de diferenças nucleotídicas (k), número de haplótipos (h) e diversidade haplotípica (Hd). O mesmo *software* foi utilizado para calcular os valores dos testes de neutralidade F_s de Fu (FU, 1997) e D Tajima (TAJIMA, 1989) – esses testes foram realizados para todo o conjunto de amostras e, separadamente, para cada domínio neotropical amostrado (Boreal brasileiro, Sul brasileiro, Chaco e Paraná), de acordo com a regionalização proposta por Morrone (2014). Os outros testes de neutralidade F^* e D^* de Fu e Li (FU; LI, 1993) e Aichaz Y^* (ACHAZ, 2008) foram realizados através do DnaSP v. 6 (ROZAS et al., 2017).

A porcentagem média de cada nucleotídeo na composição das sequências e as distâncias genéticas par a par entre os indivíduos foram estimadas através do *software* MEGA-X (KUMAR et al., 2018), assim como as distâncias genéticas entre e dentro dos domínios neotropicais amostrados. Para a análise de distância entre domínios, considerou-se, primeiro, cada um dos domínios amostrados, de acordo com a proposta de Morrone (2014). Depois, os domínios Boreal e Sul brasileiro foram incluídos dentro de um único grupo, denominado Amazônia. Um dendrograma de similaridade genética *Neighbor-joining* também foi gerado através do MEGA-X, com *bootstrap* igual a cinco mil replicações e utilizando o Kimura 2-parâmetros (K2P) como método de correção para o cálculo da distância genética entre as unidades taxonômicas. O K2P considera que as transições são mais frequentes que as transversões nas substituições nucleotídicas, o que de fato ocorre em relação ao genoma mitocondrial (PAGE; HOLMES, 1998).

Os cálculos dos valores de distância e dos testes de neutralidade foram realizados considerando as sequências concatenadas e, também, cada um dos genes individualmente. Para os parâmetros de diversidade genética, somente as sequências de cada um dos genes em separado foram consideradas.

Rede de haplótipos

A rede de haplótipos foi gerada com as sequências concatenadas através do programa TCS v. 1.21 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000), que utiliza o método de parcimônia, além da distância genética, para estabelecer o relacionamento entre os haplótipos, com limite de conexão igual a 95%. A rede foi colorida através do

software tcsBU (SANTOS et al., 2016) considerando a frequência do haplótipo em cada domínio neotropical amostrado. Para essa análise as espécies foram analisadas em conjunto e, também, separadamente. Ou seja, três redes haplotípicas foram geradas: uma para *S. euamignathus*, outra para *S. heyeri* e uma terceira contemplando ambas as espécies simultaneamente.

Os mapas de distribuição, contendo todos os pontos de coleta coloridos de acordo com os haplótipos observados, foram elaborados através do programa QGIS v. 3.6.3 (QGIS Development Team, 2018) com base no sistema de coordenadas WGS 1984 e no *shapefile* desenvolvido por Löwenberg-Neto (2014) considerando a regionalização proposta por Morrone (2014).

Estrutura genética populacional

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para avaliar a existência de estrutura genética nas populações analisadas através do programa Arlequin v. 3.5.1.2 (EXCOFFIER, 2010). A partir das sequências concatenadas, três construções foram definidas para essa análise: (i) a primeira AMOVA foi realizada para avaliar o grau de diferenciação entre as duas espécies. Para esse teste, dois agrupamentos foram definidos – um contendo as sequências de *S. euamignathus* e outro contendo as sequências de *S. heyeri*; (ii) a segunda AMOVA, que contemplou as duas espécies em conjunto (grupo *euamignathus*), foi realizada para avaliar o nível de diferenciação genética entre cada um dos domínios amostrados. Para esse teste, quatro agrupamentos foram definidos, de acordo com a regionalização proposta por Morrone (2014) – Boreal, Sul brasileiro, Chaco e Paraná; (iii) uma terceira AMOVA (que, assim como a segunda, incluiu ambas as espécies simultaneamente) foi realizada também para avaliar a diferenciação entre os domínios amostrados, mas considerando Boreal e Sul brasileiro como uma única unidade biogeográfica (Amazônia). Portanto, três agrupamentos foram definidos para esse teste: Amazônia, Chaco e Paraná.

Ainda para avaliar a inferência de estrutura populacional, foi realizada uma análise de *clustering* através da ferramenta rhierBAPS (CHENG et al., 2013; TONKIN-HILL et al., 2018), implementada no R v. 4.0.1 (R Core Team, 2020), que identifica agrupamentos genéticos (“*clusters*”) entre as amostras. Os resultados foram gerados para as sequências concatenadas e para cada um dos genes separadamente, considerando todas as amostras do grupo *euamignathus*. Para verificação da distribuição geográfica predominante de cada um dos *clusters*, gráficos de pizza foram elaborados, através do Microsoft Excel

(2008), com as informações de frequência das amostras e seus respectivos domínios de procedência por *cluster*.

Análise de tempo de divergência e reconstrução de área ancestral

Uma análise de inferência Bayesiana foi utilizada para estimar os tempos de divergência entre as populações do grupo *euamignathus* (*S. euamignathus* + *S. heyeri*) amostradas. A árvore foi gerada através do programa BEAST v. 2.6.3 (BOUCKAERT et al., 2019), com a utilização de relógio molecular estrito e *chain length* igual a 10 milhões. Duas partições foram incluídas na análise, uma contendo as sequências de 16S e outra contendo as sequências de COII. Os modelos para a árvore (*Coalescent Bayesian Skyline*) e para o relógio molecular das duas partições foram conectados, mas diferentes modelos de substituição nucleotídica foram aplicados – HKY+I (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985), com I igual a 0,723, para o 16S e TrN+G (TAMURA; NEI, 1993), com G igual a 0,18, para o COII. Os testes de melhor modelo foram gerados pelo programa jModelTest (POSADA, 2008) e os modelos foram selecionados com base nos menores valores de BIC e menor número de parâmetros.

Diante da escassez de fósseis de Syntermitinae, a análise Bayesiana foi calibrada a partir das datas de origem estimadas por Bourguignon (2016) para os grupos Termitidae [54 milhões de anos (MA)], Syntermitinae (entre 22 e 28 Ma) e para *Syntermes* (aproximadamente 23.2 Ma), outro gênero da subfamília Syntermitinae. Como grupos externos, foram utilizadas as espécies *Amitermes dentatus* (Termitidae: Termitinae), *Syntermes molestus*, *Syntermes parallelus*, *Curvitermes odontognathus* e *Silvestritermes minutus* (Termitidae: Syntermitinae), todas obtidas no *GenBank*.

Os parâmetros gerados pela análise Bayesiana foram analisados no Tracer v. 1.7.1 (RAMBAUT et al., 2018) para verificação dos valores de *Effective Sample Size* (ESS > 200). A melhor árvore foi anotada através da ferramenta TreeAnnotator v. 2.6.3 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2020), com *burn-in* de 10%, e desenhada com a utilização do programa FigTree v. 1.4.4 (RAMBAUT, 2018).

Uma segunda análise de inferência Bayesiana foi realizada considerando somente os haplótipos observados nas populações amostradas (ou seja, foi considerada apenas uma sequência nucleotídica concatenada de cada um dos haplótipos). Os mesmos modelos e procedimentos descritos acima também foram utilizados para essa análise. Considerando que a árvore gerada com os haplótipos apresentou nós com probabilidades posteriores mais altas, a topologia e as datas estimadas por essa inferência Bayesiana foram utilizadas

para a análise de reconstrução de área ancestral. Essa reconstrução foi realizada através do pacote BioGeoBEARS (MATZKE, 2013), implementado no R v. 4.0.1 (R Core Team, 2020), e três áreas de ocorrência foram definidas: Amazônia (contemplando os domínios Boreal e Sul brasileiro), Chaco e Paraná. Foram testados os modelos DEC, DIVALIKE e BAYAREALIKE e o melhor modelo foi selecionado com base nos menores valores e maiores pesos de AIC e de AICc.

3 RESULTADOS

Diversidade genética e inferências demográficas

Dentre as 70 amostras do grupo *euamignathus* (*S. euamignathus* + *S. heyeri*), foram obtidas 62 sequências nucleotídicas para o fragmento 16S rRNA [com 405 pares de base (pb)] e 64 sequências para o COII (com 760 pb), totalizando 53 indivíduos com ambos os fragmentos sequenciados (total de 1165 pb). Em relação às composições nucleotídicas, 18.96% das bases das sequências concatenadas correspondem à citosina, 26.9% correspondem à timina, 41.7% correspondem à adenina e 12.44% correspondem à guanina.

A distância genética média entre todas as sequências de 16S rRNA foi de 0.002, entre todas as sequências de COII foi de 0.009 e entre as sequências concatenadas foi de 0.006. As tabelas contendo todos os valores de distância par a par entre os indivíduos amostrados estão disponíveis no Apêndice (Tabelas A1, A2 e A3). Também foram estimadas as distâncias genéticas entre todos os indivíduos agrupados de acordo com seu domínio neotropical de procedência (Tabela 3.a e 3.b) e as distâncias dentro de cada um dos domínios amostrados (Tabela 3.c). Os maiores valores observados foram entre os domínios Paraná e Sul brasileiro (igual a 0.0084) na análise entre domínios; e entre Amazônia e Paraná (igual a 0.0074), considerando Boreal e Sul brasileiro como uma unidade biogeográfica (Amazônia). Para a estimativa dentro dos domínios, o Sul brasileiro apresentou maior valor de distância entre seus indivíduos (0.0072).

Tabela 3 – Estimativas de distância genética par a par entre os domínios neotropicais amostrados (a e b) e dentro de cada um dos domínios (c).

(a) Distância entre domínios neotropicais			
	CHA	BOR	PAR
BOR	0.0062		
PAR	0.0062	0.0070	
SUL	0.0077	0.0055	0.0084

(b) Distância entre domínios neotropicais (considerando Boreal e Sul brasileiro como Amazônia)		
	Amazônia	CHA
CHA	0.0067	
PAR	0.0074	0.0062
(c) Distância dentro dos domínios neotropicais amostrados		
BOR		0.0036
CHA		0.0050
PAR		0.0049
SUL		0.0072

BOR: Boreal; CHA: Chaco; PAR: Paraná; SUL: Sul brasileiro.

Um total de 13 haplótipos, com diversidade haplotípica moderada ($H_d = 0.62$), foi encontrado dentre as sequências de 16S. Dentre as sequências de COII, 37 haplótipos, com alta diversidade haplotípica ($H_d = 0.97$), foram encontrados. O número de sítios polimórficos encontrados para as sequências de COII foi relativamente baixo (igual a 45, dentro de um total de 760 pares de base). Em relação à diversidade nucleotídica (π), o valor obtido para as sequências de COII foi duas vezes maior do que o valor encontrado para as sequências de 16S, região do genoma mitocondrial que tende a ser menos polimórfica. O maior valor observado para esse parâmetro foi para os sítios sinônimos das sequências de COII ($\pi = 0.01984$) – cerca de 37 vezes maior que o valor encontrado para os sítios não sinônimos (Tabela 4.a).

Os testes de neutralidade F_s de Fu e D de Tajima realizados para todo o conjunto de amostras (Tabela 4.b) resultaram em valores negativos e significantes – com exceção do valor de D de Tajima para as sequências concatenadas –, indicando expansão demográfica para as populações analisadas. Essa mesma inferência pode ser feita a partir do valor negativo obtido para índice Achatz Y^* e dos valores negativos e significantes de F^* de Fu e L_i .

Para os testes de neutralidade por domínio amostrado (Tabela 4.c), considerando as sequências concatenadas, os valores de F_s de Fu foram negativos e significantes para os domínios Boreal, Chaco e Paraná. Em relação ao D de Tajima, apenas o teste para o domínio Sul brasileiro resultou em valor negativo e significativo. Esses resultados sugerem expansão populacional em todos os domínios. Os resultados não significantes indicam que não há evidências suficientes para se inferir entre modelos demográficos de expansão ou gargalo populacional a partir do teste em questão. Considerando apenas o fragmento 16S, foram obtidos resultados negativos e significantes de F_s de Fu para as amostras dos domínios Boreal e Chaco – para esse último, o valor de D de Tajima também foi negativo e significativo. Em relação aos testes para o fragmento COII, os valores de F_s de Fu foram negativos e significantes para todos os domínios.

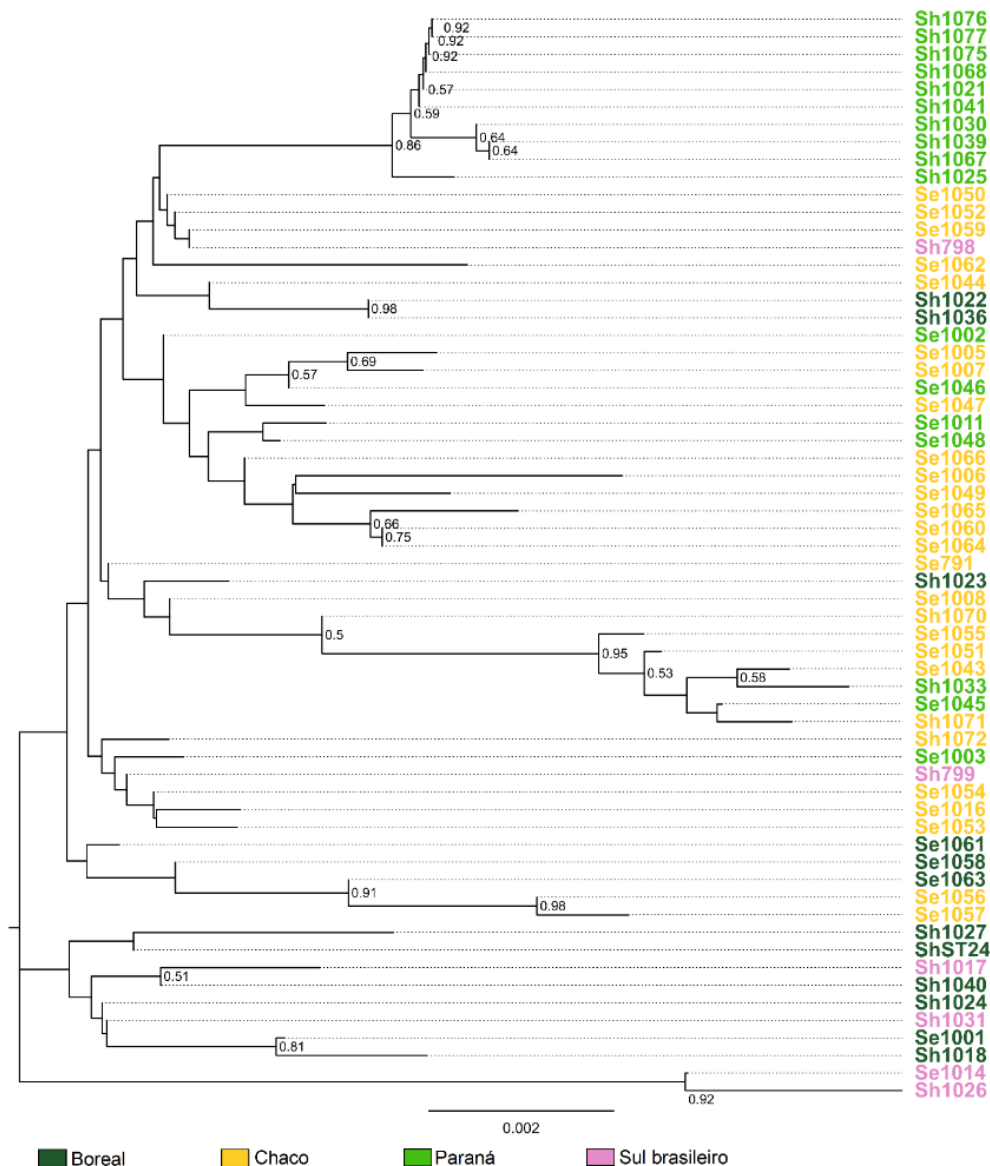
Tabela 4 – Estimativas de diversidade genética (a) e valores dos testes de neutralidade (b e c) calculados para as populações do grupo *euamignathus* (*S. euamignathus* + *S. heyeri*) amostradas.

para as populações do grupo eudimorphinas (S. eudimorphinae, S. heyeri) amostradas.						
(a) Diversidade genética						
Fragmento	nº de seq.	nº de sítios	h (Hd) ¹	S ¹	k ¹	π ¹
16S	62	405	13 (0.617)	20	1.287 (±0.818)	0.0032 (±0.002)
COII	61	760	37 (0.970)	45	5.029 (±2.477)	0.0069 (±0.004)
		sin. = 140 n.sin. = 478 n.cod. = 76				sin. = 0.01984 n.sin. = 0.00054
(b) Testes de neutralidade						
Fragmento	D* de Fu e Li	F* de Fu e Li	Achaz Y*	Fs de Fu	D de Tajima	
16S	-2.788 (p<0.05)	-2.952 (p<0.05)	-1.4208	-7.1551 (p=0.002)	-2.0337 (p=0.004)	
COII	-2.343 (p>0.05)	-2.577 (p<0.05)	-1.5713	-25.4546 (p=0.000)	-1.5938 (p=0.022)	
16S + COII ²	-2.274 (p>0.05)	-2.49073 (p<0.05)	-1.4442	-24.9169 (p=0.000)	-1.4788 (p>0.05)	
(c) Testes de neutralidade por domínio neotropical						
Fragmento	Teste	Domínio biogeográfico neotropical				
		BOR	SUL	CHA	PAR	
16S	Fs de Fu	-2.2953 (p=0.028)	0.6004 (p>0.05)	-4.1515 (p=0.002)	1.3381 (p>0.05)	
	D de Tajima	-1.1790 (p>0.05)	0.8109 (p>0.05)	-2.0041 (p=0.05)	1.4302 (p>0.05)	
COII	Fs de Fu	-16.9415 (p=0.000)	-2.3025 (p=0.029)	-19.1153 (p=0.000)	-14.3974 (p=0.000)	
	D de Tajima	-1.6387 (p=0.041)	0.0477 (p>0.05)	-0.6278 (p>0.05)	-0.6152 (p>0.05)	
16S + COII ²	Fs de Fu	-6.1595 (p=0.001)	-0.8839 (p>0.05)	-16.3089 (p=0.000)	-12.2032 (p=0.000)	
	D de Tajima	-1.0758 (p>0.05)	-1.2455 (p=0.000)	-0.8781 (p>0.05)	-0.3427 (p>0.05)	

¹ h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; S: número de sítios polimórficos (incluindo *gaps* alinhados para o 16S); k: número médio de diferenças nucleotídicas; π: diversidade nucleotídica. ² Para os cálculos dos testes de neutralidade para as sequências concatenadas, foram consideradas apenas as amostras com ambas as regiões sequenciadas. *Sin.*: sítios sinônimos; *n.sin.*: sítios não sinônimos; *n.cod.*: sítios não codificantes. Valores significantes estão destacados em negrito. BOR: Boreal; CHA: Chaco; PAR: Paraná; SUL: Sul brasileiro.

O dendrograma de *Neighbor-joining* (Figura 6) evidenciou alta similaridade genética entre as amostras do domínio Paraná, as quais formaram um grupo (com suporte *bootstrap* igual a 0.86) exclusivamente composto por espécimes dessa região. Um outro grupo foi formado exclusivamente por indivíduos provenientes da Amazônia (considerando os domínios Boreal e Sul brasileiro). Alguns grupos menores também foram formados exclusivamente por amostras do Chaco, embora grande parte dos grupos cladogenéticos mais abrangentes incluam amostras de mais de um domínio – com exceção dos grupos do Paraná e da Amazônia mencionados.

Figura 6 – Dendrograma de similaridade genética *Neighbor-joining* gerado para as amostras do grupo *euamignathus* analisadas.

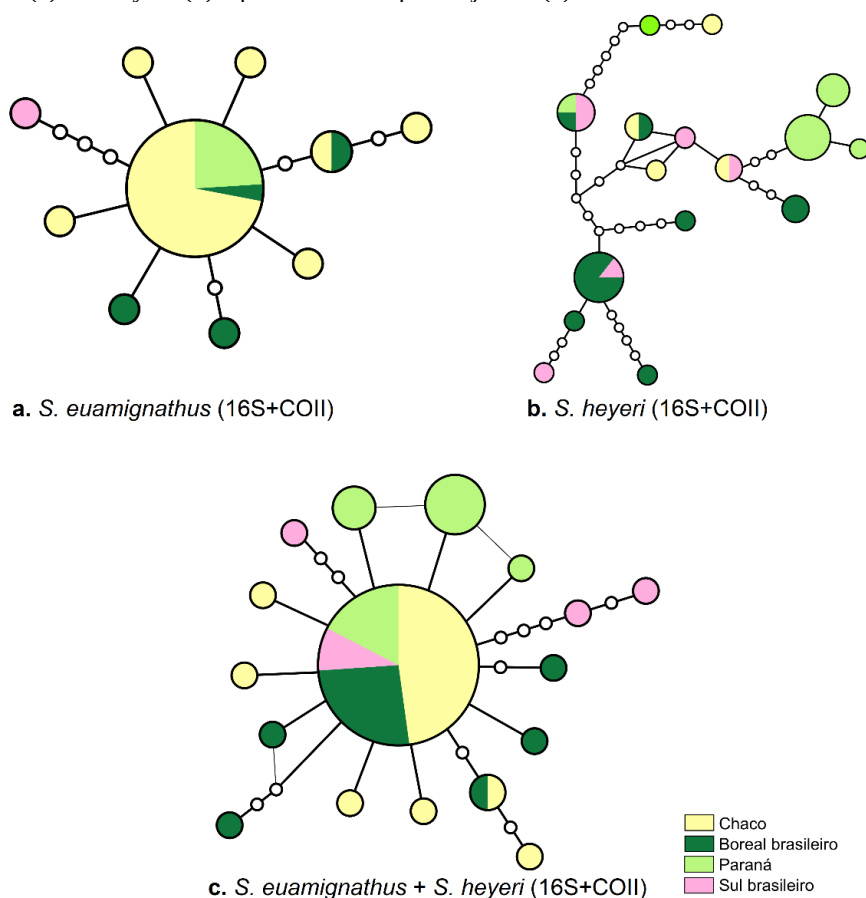


Os prefixos “Se” e “Sh” indicam, respectivamente, *S. euamignathus* e *S. heyeri*. Os números próximos aos nós correspondem aos valores de *bootstrap*.

Rede de haplótipos

Para o estabelecimento do relacionamento entre os haplótipos observados nas populações, uma rede haplotípica foi gerada para cada uma das espécies analisadas – ou seja, uma rede foi gerada para *S. euamignathus* (Figura 7.a) e outra rede foi gerada para *S. heyeri* (Figura 7.b). Além disso, uma terceira rede foi elaborada considerando ambas as espécies simultaneamente (Figura 7.c).

Figura 7 – Redes haplotípicas geradas com as sequências concatenadas (16S+COII) para as espécies *S. euamignathus* (a) e *S. heyeri* (b) e para as duas espécies juntas (c).



As cores dos círculos (que representam os haplótipos) correspondem à frequência do haplótipo nos domínios amostrados, de acordo com a legenda. O tamanho do círculo indica a frequência do haplótipo no conjunto amostral; quanto maior o círculo, maior a frequência. Os pontos brancos indicam haplótipos intermediários que não foram amostrados. As linhas mais estreitas indicam conexões alternativas entre os haplótipos.

Dez haplótipos foram recuperados na rede de *S. euamignathus* (Figura 7.a), sendo um haplótipo central e nove derivados. A maior parte dos haplótipos derivados permaneceu conectada ao haplótipo central através de um ou dois passos mutacionais (indicados pelas linhas e círculos brancos na Figura 7), o que sugere baixa diferenciação genética entre os haplótipos amostrados. Contrariamente, a rede de *S. heyeri* (Figura 7.b) evidenciou um grande número de passos mutacionais entre a maior parte dos 16 haplótipos observados para essa espécie, indicando a existência de uma série de haplótipos, intermediários não amostrados, não incluídos nessa análise. Em ambas as redes é possível notar haplótipos exclusivos de cada um dos domínios amostrados, com destaque para os haplótipos do domínio Paraná, bastante frequentes na rede de *S. heyeri*.

A rede obtida a partir das sequências concatenadas das duas espécies (Figura 7.c) mostrou um total de 17 haplótipos – um central (H01) e 16 haplótipos derivados (Tabela

5). Nessa rede, grande parte das amostras de ambas as espécies foram recuperadas dentro do haplótipo central; 13, dos 17, são haplótipos únicos (Tabela 5). Assim como na rede específica de *S. euamignathus* (Figura 7.a), a maior parte dos haplótipos derivados permaneceram conectados ao haplótipo central através de um ou dois passos mutacionais. A distribuição geográfica dos haplótipos pode ser observada na Figura 5.

Tabela 5 – Lista de haplótipos e sua relação com as amostras, espécies, localidade e domínio de procedência dos espécimes amostrados.

Haplótipo	Amostras ¹	Espécie	Localidade de coleta, estado/país	Domínio neotropical
H01	Se791	<i>S. euamignathus</i>	Niquelândia, GO	CHA
	Se1002	<i>S. euamignathus</i>	Catas Altas, MG	PAR
	Se1003	<i>S. euamignathus</i>	Arceburgo, MG	PAR
	Se1007	<i>S. euamignathus</i>	Paracatu, MG	CHA
	Se1008	<i>S. euamignathus</i>	Piranhas, GO	CHA
	Se1011	<i>S. euamignathus</i>	Morro da Água Quente, MG	PAR
	Se1016	<i>S. euamignathus</i>	Barra do Garças, MT	CHA
	Se1043	<i>S. euamignathus</i>	Aquidauana, MS	CHA
	Se1044	<i>S. euamignathus</i>	Paracatu, MG	CHA
	Se1045	<i>S. euamignathus</i>	Santa Bárbara, MG	PAR
	Se1046	<i>S. euamignathus</i>	Promissão, SP	PAR
	Se1047	<i>S. euamignathus</i>	Abaeté dos Mendes, MG	CHA
	Se1048	<i>S. euamignathus</i>	Morro da Água Quente, MG	PAR
	Se1049	<i>S. euamignathus</i>	Paraíso das Águas, MS	CHA
	Se1050	<i>S. euamignathus</i>	PE Serra Azul, MT	CHA
	Se1051	<i>S. euamignathus</i>	Paracatu, MG	CHA
	Se1052	<i>S. euamignathus</i>	PE Serra Azul, MT	CHA
	Se1054	<i>S. euamignathus</i>	Rondonópolis, MT	CHA
	Se1055	<i>S. euamignathus</i>	Abaeté dos Mendes, MG	CHA
	Se1059	<i>S. euamignathus</i>	Mateiros, TO	CHA
	Se1060	<i>S. euamignathus</i>	Niquelândia, GO	CHA
	Se1063	<i>S. euamignathus</i>	Juazeiro do Piauí, PI	BOR
	Se1064	<i>S. euamignathus</i>	Niquelândia, GO	CHA
	Se1065	<i>S. euamignathus</i>	Niquelândia, GO	CHA
	Se1066	<i>S. euamignathus</i>	Paraopeba, MG	CHA
	Sh798	<i>S. heyeri</i>	Porto Velho, RO	SUL
	Sh799	<i>S. heyeri</i>	Porto Velho, RO	SUL
	Sh1022	<i>S. heyeri</i>	Irاندوبا, AM	BOR
	Sh1023	<i>S. heyeri</i>	Codó, MA	BOR
	Sh1024	<i>S. heyeri</i>	Presidente Figueiredo, AM	BOR
	Sh1031	<i>S. heyeri</i>	Porto Velho, RO	SUL
	Sh1033	<i>S. heyeri</i>	Santa Teresa, ES	PAR
	Sh1036	<i>S. heyeri</i>	Irاندوبا, AM	BOR
	Sh1040	<i>S. heyeri</i>	Abel Figueiredo, PA	BOR
	Sh1070	<i>S. heyeri</i>	Paracatu, MG	CHA
	Sh1071	<i>S. heyeri</i>	Lagoa Grande, MG	CHA
	Sh1072	<i>S. heyeri</i>	Lagoa Grande, MG	CHA
	Sh1073	<i>S. heyeri</i>	Crato, CE	CHA
	Sh12MM	<i>S. heyeri</i>	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR
	Sh33MM	<i>S. heyeri</i>	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR
	Sh39MM	<i>S. heyeri</i>	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR
	Sh43MM	<i>S. heyeri</i>	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR
	ShEcu	<i>S. heyeri</i>	Aguarico, Equador	BOR
	ShMZ	<i>S. heyeri</i>	Porto Velho, RO	SUL
	ShSh262	<i>S. heyeri</i>	João Pessoa, PB	PAR
	ShST24	<i>S. heyeri</i>	Petit Saut, Guiana Francesa	BOR
H02	Sh1021	<i>S. heyeri</i>	Santa Bárbara, MG	PAR
	Sh1041	<i>S. heyeri</i>	Sooretama, ES	PAR
	Sh1068	<i>S. heyeri</i>	Afonso Claudio, ES	PAR
	Sh1075	<i>S. heyeri</i>	Pedro Canário, ES	PAR
	Sh1076	<i>S. heyeri</i>	Pedro Canário, ES	PAR
H03	Sh1077	<i>S. heyeri</i>	Pedro Canário, ES	PAR
	Sh1030	<i>S. heyeri</i>	Sooretama, ES	PAR

Haplótipo	Amostras ¹	Espécie	Localidade de coleta, estado/país	Domínio neotropical
	Sh1039	<i>S. heyeri</i>	Sta. Maria Madalena, RJ	PAR
	Sh1067	<i>S. heyeri</i>	Sooretama, ES	PAR
H04	Se1056	<i>S. euamignathus</i>	Pimenteiras, PI	CHA
	Se1058	<i>S. euamignathus</i>	Caxias, MA	BOR
H05	Se1001	<i>S. euamignathus</i>	Presidente Figueiredo, AM	BOR
H06	Se1005	<i>S. euamignathus</i>	Serra da Canastra, MG	CHA
H07	Se1006	<i>S. euamignathus</i>	Lagoa Grande, MG	CHA
H08	Se1014	<i>S. euamignathus</i>	Porto Velho, RO	SUL
H09	Se1053	<i>S. euamignathus</i>	PE Serra Azul, MT	CHA
H10	Se1057	<i>S. euamignathus</i>	Crato, CE	CHA
H11	Se1061	<i>S. euamignathus</i>	Lago Verde, MA	BOR
H12	Se1062	<i>S. euamignathus</i>	Pte. Alta do Tocantins, TO	CHA
H13	Sh1017	<i>S. heyeri</i>	Porto Velho, RO	SUL
H14	Sh1018	<i>S. heyeri</i>	Manaus, AM	BOR
H15	Sh1025	<i>S. heyeri</i>	Sooretama, ES	PAR
H16	Sh1026	<i>S. heyeri</i>	Porto Velho, RO	SUL
H17	Sh1027	<i>S. heyeri</i>	Mucajai, RR	BOR

¹ Os prefixos “Se” e “Sh” indicam, respectivamente, *S. euamignathus* e *S. heyeri*. BOR: Boreal; CHA: Chaco; PAR: Paraná; SUL: Sul brasileiro.

Estrutura populacional

A inferência de estrutura entre as populações do grupo *euamignathus* foi testada a partir das análises de variância molecular (AMOVA) e de *clustering* (rhierBAPS). A AMOVA também foi utilizada para verificação do grau de diferenciação entre as espécies *S. euamignathus* e *S. heyeri* (Tabela 6.a). O valor de F_{ST} resultante para essa AMOVA foi de 0.12, o que sugere uma diferenciação genética baixa (WRIGHT, 1978) entre as duas espécies, sustentando a hipótese de sinonímia entre elas. Na segunda AMOVA, que analisou a diferenciação entre populações do grupo *euamignathus* dos diferentes domínios neotropicais (Tabela 6.b), o valor de F_{ST} estimado foi de 0.189, indicando moderada diferenciação genética entre populações de domínios distintos. Um valor próximo a esse (igual a 0.199; Tabela 6.c) também foi obtido na terceira construção da AMOVA, considerando os domínios Boreal e Sul brasileiro como uma única unidade biogeográfica (Amazônia).

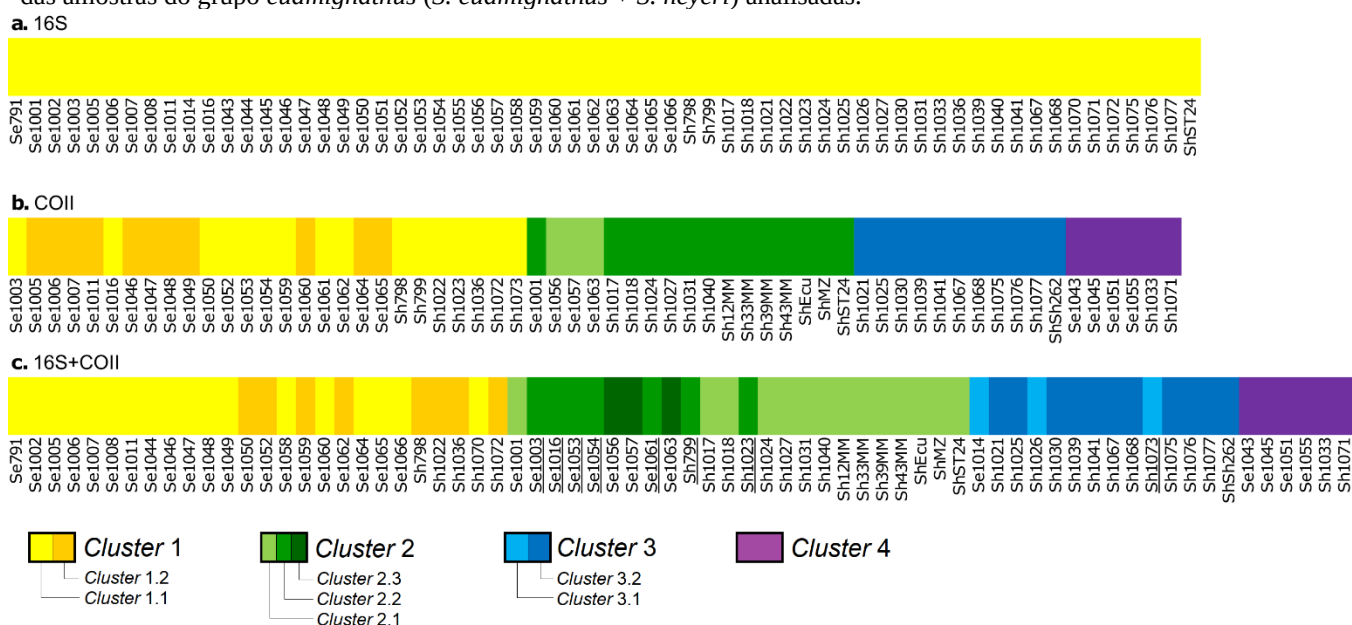
Tabela 6 – Resultados gerados para a análise de variância molecular (AMOVA).

Tipo de variação	Componentes da variação	Porcentagem da variação	Índice de fixação
(a) AMOVA entre espécies (<i>S. euamignathus</i> e <i>S. heyeri</i>)			
Entre espécies	0.4385	12.36%	$F_{ST} = \mathbf{0.123}$ ($p = 0.000$)
Dentro das espécies	3.1084	87.64%	-
(b) AMOVA entre domínios neotropicais - Boreal, Sul brasileiro, Chaco e Paraná			
Entre domínios	0.3764	18.95%	$F_{ST} = \mathbf{0.189}$ ($p = 0.000$)
Dentro dos domínios	1.6100	81.05%	-
(c) AMOVA entre domínios neotropicais - Amazônia, Chaco e Paraná			
Entre domínios	0.401	19.92%	$F_{ST} = \mathbf{0.199}$ ($p = 0.000$)
Dentro dos domínios	1.6123	80.08%	-

Valores significantes de F_{ST} estão destacados em negrito.

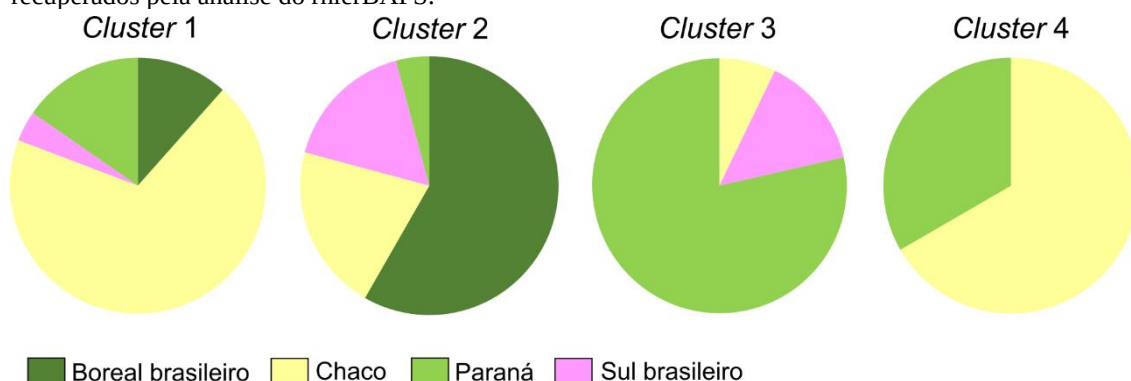
Os resultados da análise de *clustering* (Figura 8) realizada através do rhierBAPS indicaram a formação de apenas um *cluster* para todas as sequências de 16S (Figura 8.a), indicando que há pouquíssima variação genética entre essas sequências. A análise realizada para as sequências de COII (Figura 8.b) e para as sequências concatenadas (Figura 8.c) recuperaram quatro *clusters*: 1 (amarelo), 2 (verde), 3 (azul) e 4 (roxo). Para as sequências de COII, os *clusters* 1 e 2 foram subdivididos em dois agrupamentos (*clusters* 1.1 e 1.2; *clusters* 2.1 e 2.2, respectivamente). Para as sequências concatenadas, o *cluster* 2 apresentou mais uma subdivisão (portanto, *clusters* 2.1, 2.2 e 2.3) e, além disso, o *cluster* 3 também foi subdividido, nesse caso, em dois agrupamentos (*clusters* 3.1 e 3.2).

Figura 8 – Análise de clustering realizada com as sequências de 16S (a), de COII (b) e com as sequências concatenadas (c) das amostras do grupo *euamignathus* (*S. euamignathus* + *S. heyeri*) analisadas.



Em relação a distribuição geográfica dos *clusters* recuperados pela análise, os gráficos gerados (Figura 9) a partir dos resultados obtidos com as sequências concatenadas (Figura 8.c) mostraram que os *clusters* 1 e 4 incluem, em sua maioria, amostras distribuídas no Chaco; o *cluster* 2 está predominantemente distribuído no domínio Boreal e o *cluster* 3 no domínio Paraná.

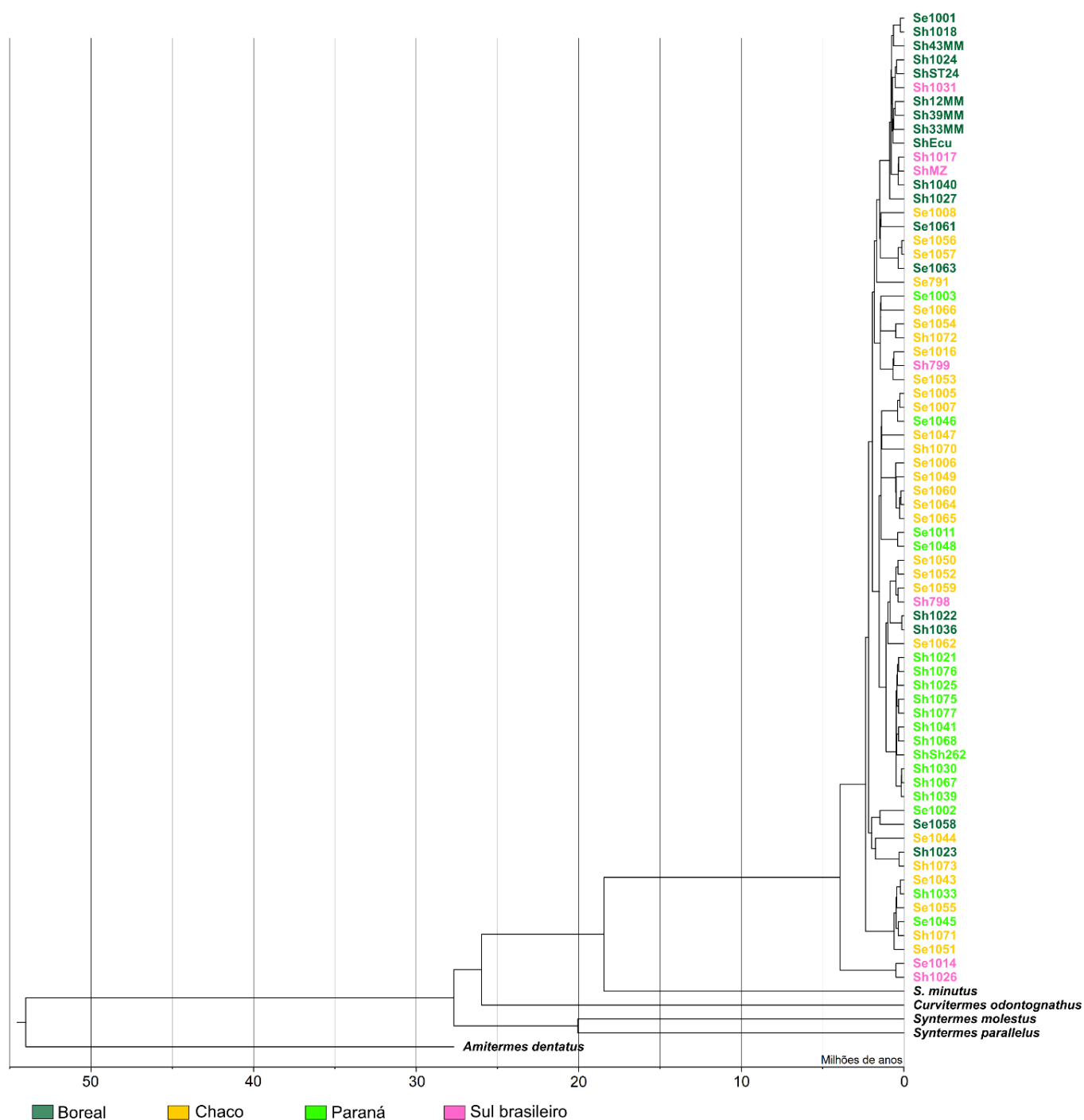
Figura 9 – Gráficos de pizza gerados a partir da frequência dos domínios em cada um dos *clusters* recuperados pela análise do rhierBAPS.



Análise de tempo de divergência

Os tempos de divergência para as populações do grupo *euamignathus* amostradas foram estimados a partir de uma análise de inferência Bayesiana, calibrada com as datas de origem estabelecidas por Bourguignon (2016). A árvore gerada pela análise mostrou nós com probabilidades posteriores baixas (Figura A1 do Apêndice) e datas de divergência recentes (Figura 10), todas com menos de quatro milhões de anos (a primeira divergência do grupo *euamignathus* data de 3.93 Ma). A topologia da árvore Bayesiana também evidenciou um clado formado exclusivamente por espécimes provenientes do domínio Paraná (datado em 480 mil anos), outro clado formado apenas por amostras amazônicas (datado em 880 mil anos) – considerando os domínios Boreal e Sul brasileiro – e dois outros clados formados majoritariamente por espécimes do Chaco (ambos datados em 1.4 Ma).

Figura 10 – Árvore de inferência Bayesiana gerada a partir das sequências concatenadas dos espécimes do grupo *euamignathus* amostrados.



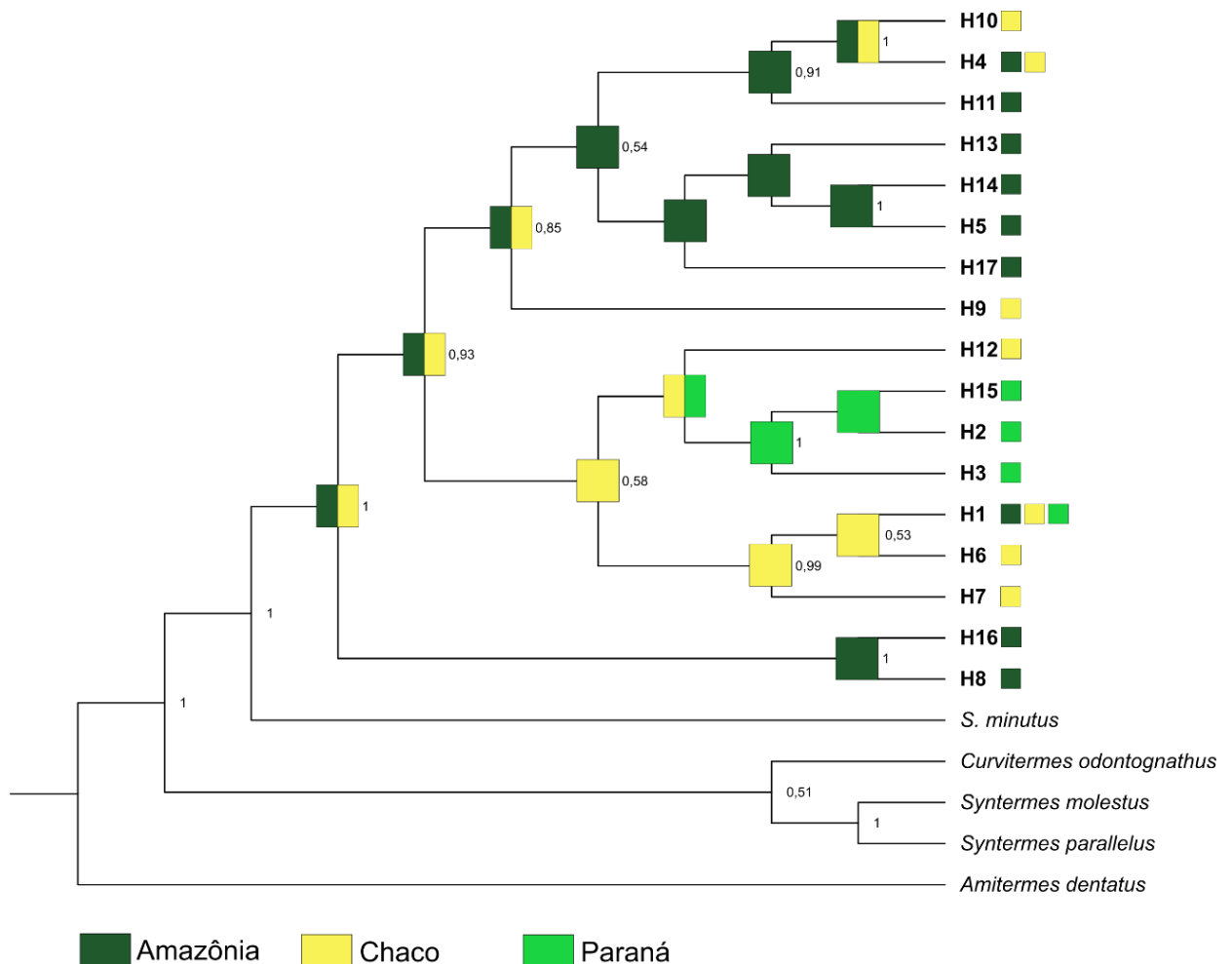
Os prefixos “Se” e “Sh” indicam, respectivamente, *S. euamignathus* e *S. heyeri*.

Reconstrução de área ancestral

Para reconstruir as áreas ancestrais das populações do grupo *euamignathus* analisadas, utilizou-se uma árvore de inferência Bayesiana considerando apenas os haplótipos das sequências concatenadas (Figura 11) – e não todos os indivíduos

amostrados, como foi feito para a análise de tempo de divergência. Essa árvore também recuperou clados compostos por haplótipos exclusivos da Amazônia e do domínio Paraná. O melhor modelo selecionado para a reconstrução das áreas ancestrais, DEC, apresentou valores de AIC e AICc iguais a 47.55 e 49.39, respectivamente, cujos pesos foram iguais a 0.54 e 0.44, respectivamente. De acordo com essa análise, o ancestral comum a todos os clados do grupo *euamignathus* esteve distribuído na Amazônia e no Chaco, se dispersando, mais recentemente, para o domínio Paraná. Ainda segundo os resultados dessa reconstrução, a dispersão para o Paraná ocorreu a partir de uma população ancestral distribuída no Chaco (Figura 11; Figura A2 do Apêndice).

Figura 11 – Árvore de inferência Bayesiana gerada com os haplótipos das sequências concatenadas (16S+COII) observados para o grupo *euamignathus*, associada aos resultados da reconstrução de área ancestral.



Os números próximos aos nós indicam os valores de probabilidade posterior. Os quadrados mostrados nos nós da árvore indicam a área de distribuição mais provável do ancestral. Os pequenos quadrados mostrados a frente dos táxons terminais indicam a área de distribuição do respectivo haplótipo. As cores de todos os quadrados indicam as áreas de acordo com a legenda da figura.

4 DISCUSSÃO

As estimativas de diversidade genética geradas para as espécies do grupo *euamignathus* (*S. euamignathus* + *S. heyeri*) indicaram uma variabilidade moderada para as populações analisadas, mais baixa que a observada para as espécies *Nasutitermes ephratae* e *N. corniger* (SANTOS et al., 2017; SANTOS; CANCELLO; MORALES, 2021 – Cap. 1 e 2 desta tese), que também apresentam distribuição neotropical (embora *N. corniger* e *N. ephratae* não estejam restritas à América do Sul). Isso pode ser inferido a partir do número de haplótipos em relação ao número total de amostras e pelos valores de diversidade haplotípica – elevada para as sequências de COII, mas moderada para as sequências de 16S. Assim como foi observado para as populações de *N. ephratae* e *N. corniger*, a taxa de diversidade nucleotídica (π) obtida para o COII foi maior que a obtida para o 16S. Além disso, o valor de π para os sítios sinônimos do COII foi cerca de 37 vezes maior que o valor para os sítios não sinônimos (Tabela 4.a). Isso se deve ao fato de que mutações não sinônimas tendem a não se fixar nas populações (apresentando, portanto, uma diversidade nucleotídica mais baixa para esses sítios), já que podem produzir alterações deletérias na estrutura das proteínas sintetizadas, o que raramente acontece em relação às mutações em sítios sinônimos.

Os testes de neutralidade indicaram expansão demográfica recente para todas as populações analisadas (Tabela 4.b) e, também, em cada um dos domínios amostrados (Tabela 4.c). Isso também pode ser inferido a partir do formato estrelado da rede de haplótipos de *S. euamignathus* (Figura 7.a) e de ambas as espécies (Figura 7.c), considerando, também, a ampla distribuição do haplótipo central dessas redes. A existência de expansão populacional recente também foi inferida para populações de abelhas mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) distribuídas na Mata Atlântica, onde foram observados valores negativos para os testes de neutralidade, além de baixos níveis de diversidade nucleotídica (BATALHA-FILHO et al., 2010).

Analisando as redes haplotípicas geradas para as espécies separadamente, foi possível notar uma baixa diferenciação genética entre os haplótipos de *S. euamignathus* (Figura 7.a), enquanto o oposto foi observado para a rede de *S. heyeri* (Figura 7.b) – muitos passos mutacionais nos ramos de conexão entre os haplótipos. Ao incluir ambas as espécies em uma mesma rede (Figura 7.c), foi possível notar que os haplótipos intermediários que não haviam sido amostrados na rede de *S. heyeri* correspondem, na verdade, a haplótipos encontrados em *S. euamignathus*. Por outro lado, os haplótipos de

S. heyeri parecem complementar a diversidade de haplótipos observada na rede exclusiva de *S. euamignathus*. Além disso, o haplótipo central (que é, também, o haplótipo ancestral) da terceira rede (Figura 7.c) inclui boa parte de todo o conjunto amostral do grupo *euamignathus* (*S. euamignathus* + *S. heyeri*), indicando que é um haplótipo bastante frequente compartilhado por ambas as espécies. Essas inferências, junto aos resultados da AMOVA realizada para avaliar a diferenciação entre as duas espécies – que resultou em um valor baixo de F_{ST} (Tabela 6.a) – sustentam a hipótese de sinonímia entre *S. euamignathus* e *S. heyeri*.

Essa afirmação também pode ser sustentada pelos resultados observados na análise de *clustering*. Para o fragmento 16S (Figura 8.a), todos os espécimes amostrados permaneceram dentro de um único grupo, indicando baixíssima diferenciação entre as sequências nucleotídicas desse gene. Na análise de *clustering* que considerou as sequências concatenadas (16S + COII), todos os *clusters* formados contemplam espécimes de *S. euamignathus* e *S. heyeri* simultaneamente.

Dentre os *clusters* observados, dois são formados por amostras do Chaco (*clusters* 1 e 4), um *cluster* é formado por amostras da Amazônia (incluindo os domínios Boreal e Sul brasileiro) e um *cluster* é formado por amostras do domínio Paraná. Essa diferenciação entre os domínios é confirmada pelos resultados da AMOVA, que indicaram estruturação genética moderada entre eles (Tabela 6.b e 6.c).

A árvore de inferência Bayesiana também evidenciou a formação de quatro clados compostos por amostras oriundas exclusivamente, ou predominantemente, de um único domínio (Figura 10; Figura A1 do Apêndice, onde os nós dos clados mencionados estão destacados com um losango). A existência de alguns clados compostos por amostras de diferentes domínios condiz com a inferência de estrutura populacional moderada (Tabela 6.b e 6.c), ao contrário do que seria esperado a partir de um resultado de forte estruturação, como foi observado para populações de *N. corniger* (SANTOS et al., 2017). Ou seja, embora existam haplótipos característicos de um domínio, há, também, haplótipos iguais ou semelhantes que são compartilhados entre eles.

Todas as inferências levantadas por este trabalho a partir dos resultados da análise Bayesiana foram feitas cautelosamente, visto que poucos nós da árvore foram recuperados com probabilidades posteriores acima de 0.50. Isso se dá em decorrência da inabilidade do algoritmo implementado na análise em reconstruir topologias a partir de conjuntos de dados genéticos muito semelhantes entre si (SEAL et al., 2011). Apesar disso, boa parte dos clados mais abrangentes (em especial os clados destacados na Figura

A1 do Apêndice) também foram recuperados no dendrograma de similaridade genética *Neighbor-joining*, o que ajuda a sustentar as principais inferências feitas a partir da topologia da árvore Bayesiana.

As datas de origem estimadas para os principais clados da Bayesiana evidenciaram a formação recente das populações do grupo *euamignathus*. Além disso, as datas estimadas aclaram as inferências levantadas a partir da análise de reconstrução de área ancestral (Figura 11). Os resultados dessa análise indicaram que o ancestral comum a todas as populações analisadas esteve distribuído na Amazônia (contemplando os domínios Boreal e Sul brasileiro) e no Chaco, de onde sofreu dispersão para o domínio Paraná. Os dois clados compostos, majoritariamente, por espécimes do Chaco foram datados em 1.4 Ma na análise Bayesiana (Figura 10); e o clado composto exclusivamente por amostras amazônicas surgiu há 880 mil anos. Portanto, é possível afirmar que esses clados são de origem anterior ao clado formado por espécimes do domínio Paraná, cuja data de divergência estimada foi de 480 mil anos.

Em relação ao dois clados formados predominantemente por espécimes do Chaco (Figura 10; Figura A1 do Apêndice), observou-se que um deles foi recuperado filogeneticamente mais próximo ao clado da Amazônia, enquanto o outro se posicionou de forma mais próxima ao clado do domínio Paraná (Mata Atlântica *lato sensu* – denominação que será utilizada em alguns momentos do texto daqui em diante). Embora a análise do BioGeoBears tenha indicado a Amazônia e o Chaco como prováveis áreas ancestrais, o posicionamento filogenético e a datação dos principais clados do Chaco podem ser indicativos de que esse domínio é uma área ancestral ainda mais provável que a Amazônia.

Em síntese, a topologia da árvore indica proximidade filogenética entre a Mata Atlântica e o Chaco e entre a Amazônia e o Chaco, mas essa proximidade não foi observada, de modo geral, entre a Mata Atlântica e a Amazônia. Em outras palavras, pode-se inferir que houve, ao longo da história evolutiva do grupo *euamignathus*, uma maior conexão entre as populações do Chaco e da Amazônia, inicialmente, e entre as populações do Chaco e da Mata Atlântica, posteriormente. Além da distância filogenética observada entre os clados da Amazônia e da Mata Atlântica (domínio Paraná), a distância genética estimada entre as populações dessas regiões também é a maior na comparação entre domínios neotropicais (considerando Boreal e Sul brasileiro como Amazônia; Tabela 3.b), o que também pode ser visto no dendrograma de *Neighbor-joining* (Figura 6).

Isso ainda indica que o Chaco (que compõe a diagonal de formações abertas secas da América do Sul), embora provavelmente seja a área ancestral do grupo *euamignathus*, funciona como barreira à dispersão de populações entre a Mata Atlântica e a Amazônia, dificultando o compartilhamento direto de haplótipos e gerando maior distanciamento genético entre os espécimes dessas duas florestas úmidas.

Para outros grupos de organismos, contrariamente aos dados aqui observados, foram encontradas conexões entre a Mata Atlântica e a Amazônia através de corredores ao longo da Caatinga e do Cerrado, possibilitando um intercâmbio direto entre as biotas dessas regiões, como é o caso do tangará-príncipe (*Chiroxiphia pareola*) (NASCIMENTO et al., 2021), do arapaçu-rajado (*Xiphorhynchus fuscus*) (CABANNE et al., 2008) e de outros passeriformes (BATES; HACKETT; CRACRAFT, 1998), além de pequenos mamíferos (COSTA, 2003), primatas e dípteros (AMORIM; PIRES, 1996), borboletas (BROWN, 1987) e até plantas lenhosas (SANTOS et al., 2007). Por outro lado, a diagonal seca também funciona como barreira à dispersão de algumas espécies de cupins, como é o caso de *Anoplotermes banksi*, que não ocorre em biomas tipicamente secos, mas é abundante e frequente em áreas de florestas úmidas, como a Amazônia e a Mata Atlântica (CONSTANTINO, 1992; MARTIUS; RIBEIRO, 1996; BOURGUIGNON et al., 2010).

À luz da abordagem biogeográfica e geológica, há evidências de que espécies associadas a domínios de formação aberta responderam de diferentes formas às oscilações climáticas que ocorreram nos ambientes ao longo do tempo, podendo ter sofrido expansão, retração ou até mesmo ter mantido a amplitude de sua distribuição (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). Durante flutuações climáticas do Quaternário, os processos históricos que envolvem a biota do Cerrado (um dos componentes do domínio Chaco e que abriga grande parte das populações analisadas neste estudo) foram determinados principalmente por um intenso intercâmbio biótico entre suas áreas e as grandes áreas florestais adjacentes (Amazônia e Mata Atlântica) (WERNECK, 2011). Isso ajudaria a explicar os eventos de dispersão do grupo *euamignathus* a partir do domínio Chaco, que ocorreram para a Amazônia, primeiro, e para a Mata Atlântica, depois.

Pesquisas feitas com espécies de Lepidoptera também evidenciaram conexões entre o Cerrado (sudeste) e a Mata Atlântica e entre o Cerrado (noroeste) e a Amazônia (BROWN; GIFFORD, 2002). Além disso, abelhas do gênero *Paratetrapedia*, endêmicas do Cerrado, também mostraram relações próximas às espécies florestais do grupo,

endêmicas da Amazônia e Mata Atlântica (AGUIAR; MELO, 2007). A nível filogeográfico, eventos de dispersão partindo do Cerrado e da Caatinga em direção à Mata Atlântica também foram observados para a espécie de cupim *Nasutitermes corniger*, sendo essa área florestal a última a ser ocupada pela espécie na América do Sul e que, além disso, mantém haplótipos exclusivos (SANTOS et al., 2017) na região.

Em relação às populações do grupo *euamignathus*, o domínio Paraná (Mata Atlântica), além de abrigar o haplótipo 1 (H01; Tabela 5; Figura 5), comum a todos os domínios, abriga, também, outros haplótipos frequentes (H02 e H03) que não são compartilhados com outros biomas. Algumas teorias biogeográficas, que explicam a diversificação e a origem de novas linhagens na Mata Atlântica, podem ajudar a esclarecer essa estruturação genética observada na região. Por exemplo, a controversa teoria dos refúgios do Pleistoceno (ilhas florestais formadas durante períodos de glaciação); a hipótese tectônica, que discute os impactos do soerguimento de cadeias de montanhas (como a da Serra do Mar) nesse bioma; e a hipótese do gradiente ecológico (AB’SABER, 1979; SIMPSON, 1979 citados por MARQUES et al., 2021, p. 4). Outras hipóteses, além dessas citadas, também serão discutidas aqui.

A hipótese do gradiente ecológico afirma que a transição entre os ambientes úmidos e as regiões secas adjacentes (que divergem em relação a fatores como umidade, sazonalidade e luminosidade) gera diferentes regimes seletivos ao longo do gradiente geográfico. Diferentes regimes seletivos levam, por sua vez, a divergências entre as biotas dessas regiões (CABANNE et al., 2011). Embora Cabanne et al. (2011) tenham discutido essa hipótese considerando traços adaptativos fenotípicos, Peres et al. (2018) analisaram os efeitos dos gradientes de umidade nas populações de opiliões endêmicos da Mata Atlântica (*Acutisoma longipes*) utilizando marcadores genéticos mitocondriais e nucleares. Nesse estudo filogeográfico, os autores observaram que os ambientes mais secos, localizados nos vales, podem ter limitado o fluxo gênico entre as populações, considerando a alta dependência à umidade desses organismos, o que levou a uma diversificação de linhagens. Assim como os opiliões, os cupins também são afetados por diferenças nos gradientes de umidade, entre outros fatores, como demonstrou Canello et al. (2014).

Cabanne et al. (2011), estudando populações de arapaçu-grande (*Dendrocolaptes platyrostris*) da Mata Atlântica e da diagonal seca, também verificaram a existência de estrutura genética nas populações florestais, o que seria explicado por um processo de divergência com fluxo gênico. De acordo com esse argumento, a transição entre os

habitats pode funcionar como uma barreira parcial ao fluxo gênico, o que aumenta os níveis de estruturação genética. Essa hipótese pode ajudar a esclarecer a existência de haplótipos exclusivos e do haplótipo ancestral do grupo *euamignathus* dentro dos limites da Mata Atlântica. Nesse sentido, pode-se inferir que as populações ancestrais desse grupo chegaram à Mata Atlântica como resultado de um evento de expansão demográfica (demonstrado pelos testes de neutralidade), onde houve, então, o surgimento recente de novos haplótipos – esse surgimento foi possivelmente direcionado por processos evolutivos parapatricos. Os novos haplótipos ficaram restritos à Mata Atlântica em decorrência de uma limitação ao fluxo gênico (sem interrupção total). Essa limitação pode ter sido causada por barreiras bioclimáticas relacionadas às transições entre as áreas (CABANNE et al., 2016).

Uma outra hipótese é de que a estruturação observada foi causada por recorrentes eventos de expansão e fragmentação da floresta atlântica causados pelas oscilações climáticas do Pleistoceno. Além disso, essas oscilações de temperatura e umidade causaram impactos na adaptabilidade e migração de espécies e populações (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). Rull (2011) ainda discute que uma rápida evolução causada por pressões ambientais ocorreu no Quaternário, período no qual a estruturação genética observada atualmente foi moldada. Assim, as oscilações climáticas do Pleistoceno também causaram efeitos na história demográfica e na distribuição de algumas espécies na América do Sul (RULL, 2011).

Diante de todas essas hipóteses apresentadas, é possível que um conjunto delas, e não apenas uma, explique os padrões observados neste estudo para o grupo *euamignathus*. Novos estudos sobre aspectos filogeográficos de outras espécies neotropicais poderão ampliar a compreensão desse panorama, permitindo o esclarecimento dos processos de diversificação da termitofauna e dos impactos dos processos históricos e biogeográficos na biota dessa região.

5 CONCLUSÃO

Os dados deste estudo realizado com populações do grupo *euamignathus* indicaram altos níveis de similaridade genética entre as espécies do grupo (*S. euamignathus* e *S. heyeri*), o que ajuda a sustentar a hipótese de sinonímia entre elas.

Do ponto de vista genético populacional e filogeográfico, uma variabilidade genética moderada foi encontrada para o grupo *euamignathus*, além de evidências de

expansão populacional recente em todos os domínios amostrados (Boreal e Sul brasileiro, que compõem a Amazônia como uma unidade biogeográfica; Chaco, que inclui as áreas de Cerrado e Caatinga do território brasileiro; e Paraná, que corresponde à Mata Atlântica *lato sensu*). Os resultados ainda evidenciaram maiores conexões entre Chaco-Mata Atlântica e entre Chaco-Amazônia, mas conexões diretas entre as duas florestas úmidas não foram observadas, de modo geral. A Mata Atlântica, assim como foi observado para outras espécies de cupins, abriga haplótipos exclusivos, o que indica um grau moderado de estrutura populacional para essa região. Todos esses padrões observados podem ser explicados por teorias biogeográficas a respeito de processos históricos que ocorreram na região Neotropical durante o Pleistoceno, principalmente. Porém, é importante destacar que esses padrões são mais bem explicados por um conjunto de hipóteses, e não por uma exclusiva. De todo modo, a realização de estudos futuros, incluindo aspectos filogeográficos de outras espécies (principalmente de cupins e/ou outros insetos), pode ampliar os conhecimentos sobre os processos biogeográficos que moldaram os atuais padrões observados para a biota neotropical.

REFERÊNCIAS

- ACHAZ, G. Testing for neutrality in samples with sequencing errors. **Genetics**, v. 179, p. 1409–1424, 2008.
- AGUIAR, A. J. C.; MELO, G. A. R. Systematics and biogeography of the bee genus *Paratetrapedia* sl (Hymenoptera, Apidae, Tapinotaspidini): Cerrado as a composite area. **Darwiniana**, v. 45, p. 58-60, 2007.
- AMORIM, D. S.; PIRES, M. R. S. Neotropical biogeography and a method for maximum biodiversity estimation. **Biodiversity in Brazil, a first approach**. São Paulo: CNPq, 1996, p. 183-219.
- BATALHA-FILHO, H. et al. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie**, v. 41, n. 5, p. 534-547, 2010.
- BATES, J. M.; HACKETT, S. J.; CRACRAFT, J. Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of Passerine birds. **Journal of biogeography**, v. 25, n. 4, p. 783-793, 1998.
- BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 15, n. 4, p. e1006650, 2019.
- BOURGUIGON, T. et al. Mitochondrial phylogenomics resolves the global spread of higher termites, ecosystem engineers of the tropics. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 589–597, 2016.
- BOURGUIGON, T. et al. Towards a revision of the Neotropical soldierless termites (Isoptera: Termitidae): redescription of the genus *Anoplotermes* and description of *Longustitermes*, gen. nov. **Invertebrate Systematics**, v. 24, p. 357-370, 2010.
- BROWN, K. R. Biogeography and evolution of Neotropical butterflies. In: WHITMORE, T. C.; PRANCE, G. T. (Ed.). **Biogeography and Quaternary history in tropical America**, Oxford: Oxford Science Publications, 1987, p. 66-104.
- BROWN, K. S.; GIFFORD, D. R. Lepidoptera in the Cerrado landscape and the conservation of vegetation, soil, and topographical mosaics. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Eds.). **The Cerrados of Brazil**. Nova York: Columbia University Press, 2002, p. 201-222.
- CABANNE, G. S. et al. Effects of Pleistocene climate changes on species ranges and evolutionary processes in the Neotropical Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 119, n. 4, p. 856-872, 2016.
- CABANNE, G. S. et al. Evolution of *Dendrocolaptes platyrostris* (Aves: Furnariidae) between the South American open vegetation corridor and the Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, n. 4, p. 801-820, 2011.
- CABANNE, G. S. et al. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 49, n. 3, p. 760-773, 2008.

- CANCELLO, E. M. et al. Latitudinal variation in termite species richness and abundance along the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Biotropica**, v. 46, n. 4, p. 441-450, 2014.
- CHENG, L. et al. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS Software. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1224–1228, 2013.
- CLEMENT, M.; POSADA, D; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1659, 2000.
- CONSTANTINO, R. Abundance and diversity of Termites (Insecta: Isoptera) in Two Sites of Primary Rain Forest in Brazilian Amazonia. **Biotropica**, v. 24, n. 3, p. 420-430, 1992.
- CONSTANTINO, R. **On-line termite database**, 2018. Disponível em: <<http://164.41.140.9/catal/>> Acesso em 13 mar. 2019.
- COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 30, p. 71-86, 2003.
- ENGEL, M. S.; KRISHNA, K. Family-group names for termites (Isoptera). **American Museum Novitates**, n. 3432, p. 1–9, 2004.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564–567, 2010.
- FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915–925, 1997.
- FU, Y. X.; LI, W. H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, p. 693-709, 1993.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of molecular evolution**, v. 22, n. 2, p. 160-174, 1985.
- KAMBHAMPATI, S. A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 2017–2020, 1995.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, p. 1160-1166, 2017.
- KRISHNA, K. et al. Treatise on the Isoptera of the world. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 4, n. 377, p. 977-1494, 2013.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- KURAKU, S. et al. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 22-28, 2013.

LIU, H.; BECKENBACH, A. T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 41-52, 1992.

LÖWENBERG-NETO, P. Neotropical region: a shapefile of Morrone's (2014) biogeographical regionalization. **Zootaxa**, v. 3802, p. 300-300, 2014.

MARQUES, M. C. M. et al. The Atlantic Forest: An Introduction to the megadiverse forest of South America. In: MARQUES, M. C. M.; GRELLE, C. E. V. (Eds.). **The Atlantic Forest: History, Biodiversity, Threats and Opportunities of the Mega-diverse Forest**. Cham: Springer, 2021, p. 3-23.

MARTIUS, C.; RIBEIRO, J. d'A. Colony populations and biomass in nests of the Amazonian Forest termite *Anoplotermes banksi* Emerson (Isoptera: Termitidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 31, n. 2, p. 82-86, 1996.

MATZKE, N. J. **BioGeoBEARS**: BioGeography with Bayesian (and Likelihood) Evolutionary Analysis in R Scripts. R package, version 0.2.1. 2013. <http://CRAN.R-project.org/package=BioGeoBEARS>

MIURA, T.; ROISIN, Y.; MATSUMOTO, T. Molecular phylogeny and biogeography of nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific Tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2000.

MORRONE, J. J. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. **Zootaxa**, v. 3782, p. 1-110, 2014.

NASCIMENTO, N. F. F. et al. Population history of the Blue-backed Manakin (*Chiroxiphia pareola*) supports Plio-Pleistocene diversification in the Amazon and shows a recent connection with the Atlantic Forest. **Journal of Ornithology**, v. 162, n. 2, p. 549-563, 2021.

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C. **Molecular evolution**: A phylogenetic approach. Oxford: Blackwell Science, 1998. p.47-48.

PERES, E. A. et al. A short-range endemic species from south-eastern Atlantic Rain Forest shows deep signature of historical events: phylogeography of harvestmen *Acutisoma longipes* (Arachnida: Opiliones). **Systematics and Biodiversity**, v. 16, n. 2, p. 171-187, 2018.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, p. 1253–1256, 2008.

R Core Team. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2020. URL <https://www.R-project.org/>

RAMBAUT, A. et al. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901-904, 2018a.

RAMBAUT, A. **FigTree**: Tree Figure Drawing Tool. v. 1.4.4. University of Edinburgh, 2018b. <http://tree.bio.ed.ac.uk>

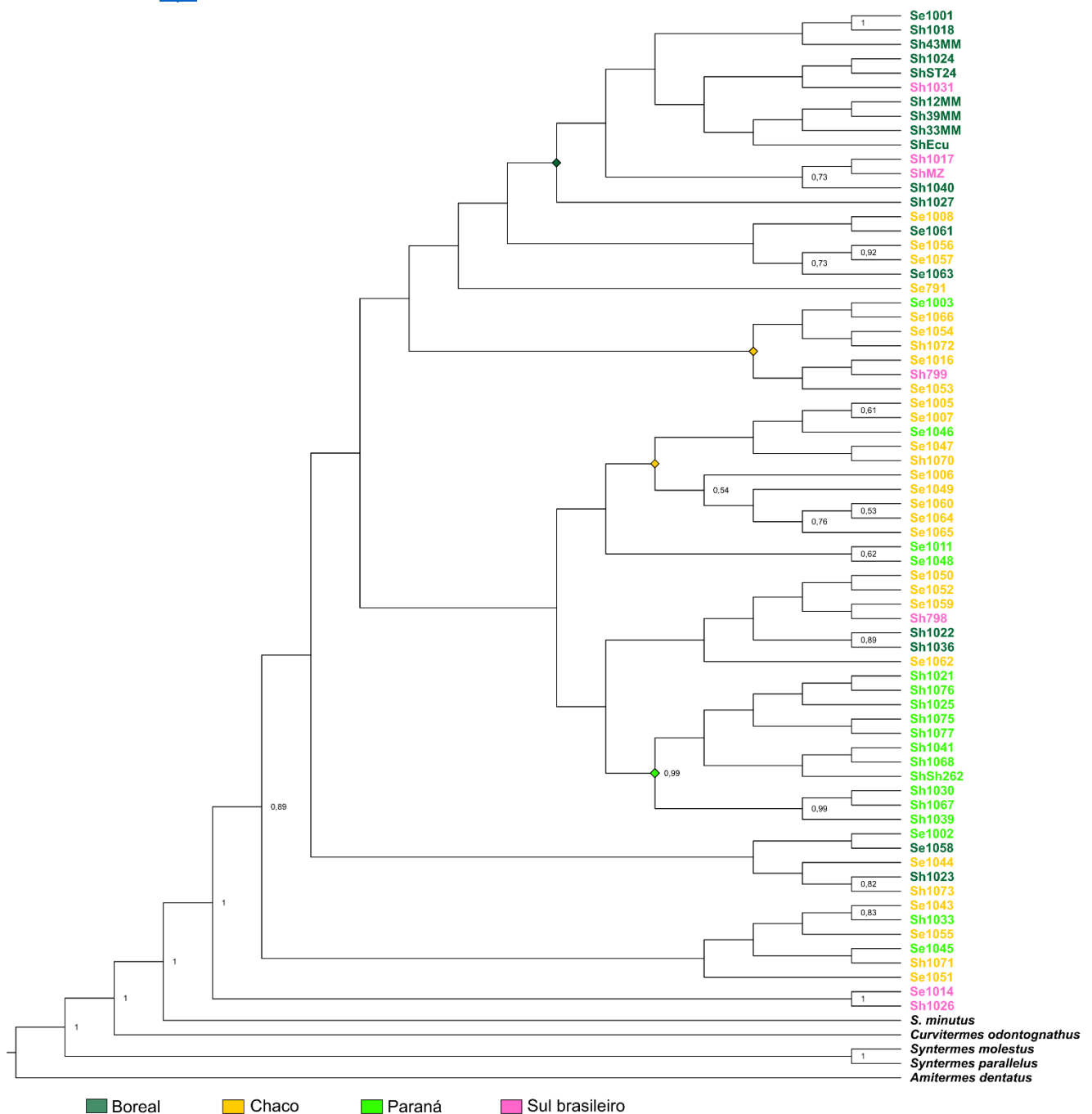
RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. **TreeAnnotator** v. 2.6.3. University of Edinburgh; University of Auckland, 2020. <http://beast.bio.ed.ac.uk>

- ROCHA, M. M.; CANCELLO, E. M.; CARRIJO, T. F. Neotropical termites: revision of *Armitermes* Wasmann (Isoptera, Termitidae, Syntermitinae) and phylogeny of the Syntermitinae. **Systematic Entomology**, v. 37, p. 793–827, 2012.
- ROZAS, J. et al. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 3299-3302, 2017.
- RULL, V. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 26, n. 10, p. 508-513, 2011.
- SANTOS, A. F. et al. Phylogeography of *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) in the Neotropical Region. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 230, p. 1-12, 2017.
- SANTOS, A. M. et al. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. **Journal of biogeography**, v. 34, n. 3, p. 437-446, 2007.
- SANTOS, A. M. et al. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. **Bioinformatics**, v. 32, p. 627-628, 2016.
- SEAL, J. N. et al. Phylogeography of the parthenogenic ant *Platythyrea punctata*: highly successful colonization of the West Indies by a poor disperser. **Journal of Biogeography**, v. 38, p. 868-882, 2011.
- SILVESTRI, F. Nota preliminare sui termitidi sud-americani. **Bollettino dei Musei di Zoologia e Anatomia Comparata dela Universit`a di Torino**, v. 16, p. 1-8, 1901.
- SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585–595, 1989.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-26, 1993.
- TONKIN-HILL, G. et al. RhierBAPS: An R Implementation of the Population Clustering Algorithm hierBAPS. **Wellcome Open Research**, v. 3, p. 93, 2018.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular ecology**, v. 22, n. 5, p. 1193-1213, 2013.
- WASMANN, E. Termiten von Madagaskar und Ostafrika. **Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft**, v. 21, p. 137-182, 1897.
- WERNECK, F. P. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews**, v. 30, n. 13-14, p. 1630-1648, 2011.
- WRIGHT, S. Variability within and among natural populations. In: WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**, Chicago: University of Chicago press, 1978, p. 85.

XIONG, B.; KOCHER, T. D. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). **Genome**, Ottawa, v. 34, p. 306–311, 1991.

APÊNDICE

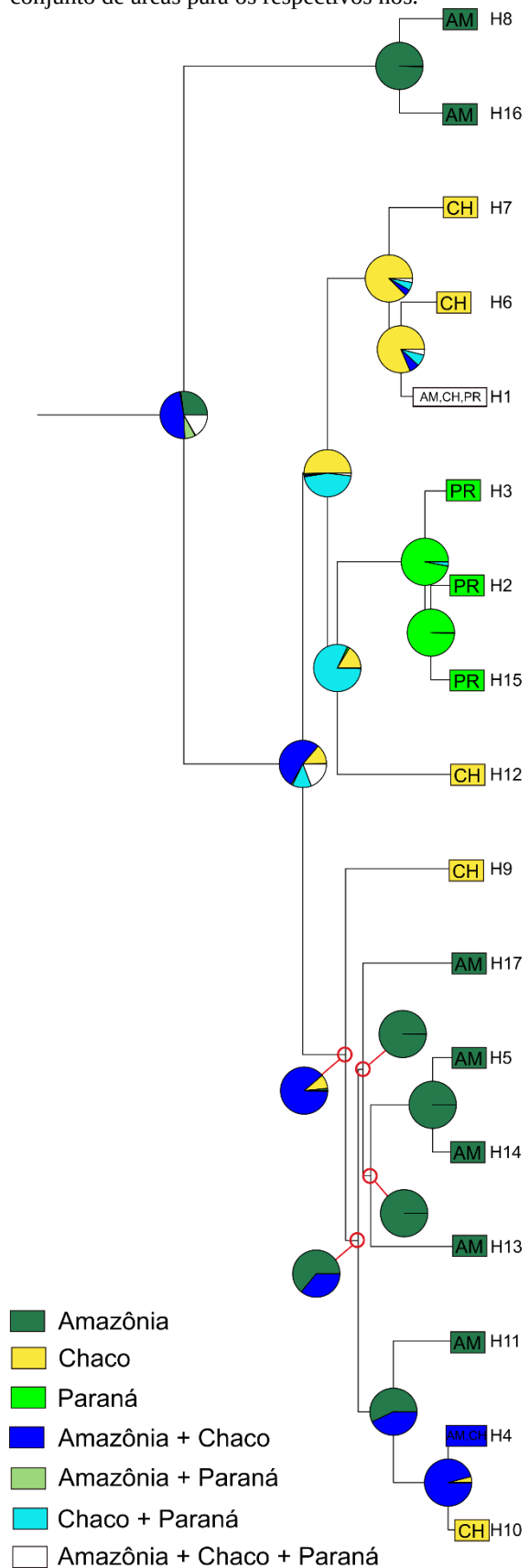
Figura A1. Árvore de inferência Bayesiana gerada a partir das sequências concatenadas dos espécimes do grupo *euamignathus* amostrados, evidenciando a topologia da árvore e as probabilidades posteriores (valores abaixo de 0.50 não estão sendo exibidos). Essa imagem pode ser acessada em melhor qualidade clicando [aqui](#)¹.



Os nós destacados com um losango correspondem aos clados principais mencionados na discussão.

¹ <https://1drv.ms/u/s!Av3Yk4Hj-a0gtIY3bt5DDRHR2l7tw>

Figura A2. Árvore gerada com os haplótipos das sequências concatenadas (16S+COII) observados para o grupo *euamignathus*, associada aos resultados da reconstrução de área ancestral. Os gráficos de pizza localizados nos nós da árvore correspondem às probabilidades de ancestralidade de cada uma das áreas ou conjunto de áreas para os respectivos nós.



As Tabelas A1, A2 e A3 podem ser acessadas clicando [aqui](#)¹.

Tabela A1. Estimativas de distância genética entre os indivíduos amostrados, considerando o fragmento de mtDNA 16S rRNA.

Tabela A2. Estimativas de distância genética entre os indivíduos amostrados, considerando o fragmento de mtDNA COII.

Tabela A3. Estimativas de distância genética entre os indivíduos amostrados, considerando as sequências concatenadas (16S+COII).

¹ <https://1drv.ms/x/s!Av3Yk4Hj-a0girYa-6bEUODVp8-fug?e=qLpEtE>

DISCUSSÃO GERAL

As análises realizadas neste trabalho, cujos resultados foram contemplados ao longo dos três capítulos apresentados, abordaram aspectos genéticos e filogeográficos de quatro espécies diferentes de cupins – *Nasutitermes ephratae* (Cap 1 e 2), *N. corniger* (Cap. 2), *Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri* (Cap. 3). Essas espécies possuem distribuição Neotropical e áreas de ocorrência sobrepostas, embora as espécies de *Silvestritermes* ocorram apenas na América do Sul. Foram obtidas amostras dos domínios Boreal, Chaco, Paraná e Sul brasileiro para as quatro espécies analisadas. O mesmo esquema de regionalização em domínios da região Neotropical (MORRONE, 2014) foi utilizado para a definição das unidades biogeográficas analisadas nos três capítulos, além dos mesmos marcadores mitocondriais (16S e COII) terem sido utilizados para a obtenção dos dados genéticos das quatro espécies.

Nasutitermes e *Silvestritermes* apresentam diferenças profundas em relação a características morfológicas, genéticas, comportamentais e de construção de ninho, como foi discutido nos respectivos capítulos. Dentro de cada um dos pares [(*Nasutitermes corniger* e *N. ephratae*); (*Silvestritermes euamignathus* e *S. heyeri*)], as espécies são muito semelhantes entre si em relação a diversos aspectos e, além disso, são frequentemente recuperadas como espécies próximas em estudos filogenéticos. Diante da grande similaridade genética e morfológica observada entre *S. euamignathus* e *S. heyeri*, as duas espécies foram analisadas como uma única unidade evolutiva, denominada grupo *euamignathus* – que contempla, portanto, ambas as espécies de *Silvestritermes*.

As estimativas de diversidade genética indicaram alta variabilidade para as quatro espécies, com exceção do marcador 16S para o grupo *euamignathus*, cujos valores de diversidade haplotípica e distância genética média ficaram bem abaixo dos índices para as outras espécies e em relação ao COII (Quadro 1).

Quadro 1 – Comparação entre inferências demográficas e filogeográficas levantadas para *N. corniger*, *N. ephratae* e para o grupo *euamignathus* (*Silvestritermes euamignathus* + *S. heyeri*).

Inferência		<i>N. corniger</i>	<i>N. ephratae</i>	grupo <i>euamignathus</i>
Diversidade genética	Hd ¹	16S: 0.94 COII: 0.94	16S: 0.89 COII: 0.93	16S: 0.62 COII: 0.97
	Razão h/N ¹	16S: 0.24 COII: 0.31	16S: 0.33 COII: 0.49	16S: 0.20 COII: 0.60
	Distância ²	16S: 0.006 COII: 0.006	16S: 0.007 COII: 0.015	16S: 0.002 COII: 0.009
História demográfica		Expansão populacional para todas as populações e em cada um dos domínios amostrados.		
Estrutura populacional		Forte estrutura entre domínios, estrutura baixa a moderada entre continentes	Forte estrutura entre domínios e entre continentes	Forte estrutura entre domínios
Similaridade entre domínios	Mais similares	BOR x MES BOR x PAC	CHA x PAR CHA x SUL SUL x PAR	BOR x SUL
	Menos similares	CHA x PAR CHA x SUL SUL x PAR	BOR x MES BOR x PAC	BOR+SUL x PAR
Tempo estimado para a primeira grande divergência entre clados		9.04 Ma	8.98 Ma	3.93 Ma
Espécie		Rota de dispersão (resumo)		
<i>N. corniger</i>		Parte norte do PAC como área ancestral; duas vias de dispersão para a AmS (a leste dos Andes e pelos entremeios do domínio BOR); dispersão para ANT a partir do norte da AmS; dispersão sentido leste na Am. do Sul; Mata Atlântica (PAR) como última área ocupada.		
<i>N. ephratae</i>		MES e PAC como áreas ancestrais; separação temporária entre populações da AmC e da AmS; dispersão entre AmC e AmS nas duas direções pós reconexão; dispersão para AmS pelo leste dos Andes; dispersão para ANT a partir do norte da mas; dispersão sentido leste na Am. do Sul; Mata Atlântica (PAR) como última área ocupada.		
grupo <i>euamignathus</i>		CHA como área ancestral mais provável; dispersão do CHA para Amazônia e, depois, dispersão do CHA para Mata Atlântica.		

¹Hd: diversidade haplotípica; h/N: razão entre o número de haplótipos e o número de sequências nucleotídicas; ²Distância genética média. ANT: Antilhano; BOR: Boreal; CHA: Chaco; MES: Mesoamericano; PAC: Pacífico; PAR: Paraná; SUL: Sul brasileiro. AmS: América do Sul; AmC: América Central.

As análises demográficas indicaram expansão populacional recente para as todas as populações das quatro espécies e em cada um dos domínios amostrados (Quadro 1), o que também pode ser inferido a partir do formato estrelado dos (i) haplogrupos de *Nasutitermes* nas redes haplotípicas e (ii) da rede gerada para o grupo *euamignathus*. As redes também destacaram a distribuição geográfica dos haplótipos e haplogrupos. Para *Nasutitermes*, ficou evidente a diferenciação genética entre América Central e América do Sul. Tanto para *Nasutitermes* quanto para *Silvestritermes*, foi possível observar a existência de haplótipos ou haplogrupos característicos de uma região, em especial no domínio Paraná (Mata Atlântica *lato sensu*) – que abriga um haplogrupo exclusivo em *N.*

corniger e vários haplótipos exclusivos do grupo *euamignathus* (não foi possível levantar inferências e comparações sólidas em relação a *N. ephratae* na Mata Atlântica em decorrência da baixa amostragem para essa espécie nessa região).

Ao longo dos capítulos 2 e 3, foram discutidas diferentes hipóteses que podem ajudar a explicar essa diferenciação genética das populações de *N. corniger* e *Silvestritermes* da Mata Atlântica, como a hipótese do gradiente latitudinal e a ocorrência de processos de divergência com fluxo gênico (CABANNE et al., 2011; 2016). Também é possível que a estruturação observada tenha sido causada por recorrentes eventos de retração e expansão da floresta atlântica no Pleistoceno (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013) ou tenha sido moldada por pressões ambientais, como as oscilações climáticas que ocorreram ao longo de todo o Quaternário (RULL, 2011). Diante das hipóteses levantadas e da constatação de estrutura populacional em *N. corniger* e *Silvestritermes* na Mata Atlântica, é possível inferir que um conjunto de eventos biogeográficos que ocorreram nessa região tenha afetado de forma semelhante essas espécies, levando à formação de haplótipos/haplogrupos exclusivos dessa região. Ainda, e considerando a dependência do regime de chuvas de muitas espécies de cupins para a revoada, é esperado que ocorra maior fluxo gênico entre populações localizadas dentro de áreas mais úmidas do que entre populações de áreas úmidas e de áreas secas, o que pode aumentar a estruturação genética nas regiões de floresta (FEITOSA et al., 2021).

A rota de dispersão inferida para *N. corniger* e a reconstrução de área ancestral realizada para *Silvestritermes* mostraram que o domínio Paraná foi a última área a ser ocupada por essas espécies (Quadro 1), sendo que, em ambos os casos, a dispersão para esse domínio ocorreu a partir do Chaco. Apesar dessa semelhança, a dispersão entre Chaco e Amazônia parece ter acontecido em sentidos contrários para *N. corniger* e *Silvestritermes* – é possível que a dispersão para o Chaco tenha ocorrido através do domínio Boreal para *N. corniger*; para *Silvestritermes*, houve dispersão do Chaco para a Amazônia.

Em relação ao Chaco, foi observado que esse domínio atua como região geneticamente intermediária entre a Mata Atlântica e a Amazônia para *Silvestritermes* – parte das populações do Chaco foram reconstruídas filogeneticamente como mais próxima às populações da Mata Atlântica e outra parte permaneceu mais próxima às populações da Amazônia. Com exceção do haplótipo 1, distribuído em todas as regiões amostradas, não há compartilhamento de haplótipos de *Silvestritermes* entre a Mata Atlântica e a Amazônia. Isso também pode ser observado em relação às populações de *N.*

corniger; para essa espécie, a similaridade entre o Chaco e a Mata Atlântica e entre o Chaco e a Amazônia ficou ainda mais marcada: as populações da parte leste do Chaco apresentaram grande similaridade com as populações da Mata Atlântica, enquanto as populações da parte oeste do Chaco apresentaram grande similaridade com as populações do domínio Sul brasileiro (um dos componentes da Amazônia). Além disso, haplótipos do haplogrupo 1 de *N. corniger* e de *N. ephratae* estão distribuídos no Chaco e na Amazônia (domínio Boreal para *N. corniger* e Sul brasileiro para *N. ephratae*), mas não no domínio Paraná. Curiosamente, e de forma contrária ao que foi observado em *N. corniger* e em *Silvestritermes*, haplótipos de *N. ephratae* do haplogrupo 3 foram observados em dois pontos da Mata Atlântica e em pontos do domínio Boreal no norte da América do Sul, chegando às Antilhas. Apesar disso, não é possível inferir de forma consistente qualquer proximidade genética entre as populações dessas regiões até que uma amostragem mais ampla de *N. ephratae* na Mata Atlântica seja analisada.

As análises de tempo de divergência, junto a outras inferências levantadas ao longo dos capítulos, indicaram que as populações de *N. corniger* se estabeleceram na América do Sul há mais tempo do que as outras espécies, seguidas das populações de *N. ephratae* e, mais tarde, de *Silvestritermes* (Quadro 1). Apesar da diferença temporal em que esses eventos aconteceram, foram observadas semelhanças importantes entre os padrões filogeográficos observados, como a ocupação tardia da Mata Atlântica e a partir do Chaco, a forte estruturação genética observada nessa floresta, a alta similaridade genética entre populações do Chaco e dos domínios amazônicos e a permanência de haplótipos/haplogrupos ancestrais amplamente distribuídos na América do Sul, além de expansão demográfica recente em todos os domínios amostrados.

Considerando as inferências levantadas, é possível sugerir que espécies de cupins diferentes quanto a aspectos morfológicos, comportamentais, genéticos e filogenéticos – mas que compartilham áreas de ocorrência – apresentam padrões filogeográficos convergentes em grandes escalas geográficas (como a América do Sul ou a região Neotropical). Portanto, mesmo diante das profundas diferenças biológicas que existem entre os pares de espécies analisados, é possível concluir que as histórias filogeográficas recuperadas aqui foram fortemente direcionadas e moldadas pela biogeografia da região, culminando nos padrões filogeográficos semelhantes que foram observados. Essa constatação refuta a hipótese inicial desse estudo, de que os eventos biogeográficos que ocorreram ao longo da história da região Neotropical causariam efeitos divergentes em espécies de cupins com características biológicas profundamente diferentes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados levantados por esse estudo recuperaram a história filogeográfica das espécies de cupins *Nasutitermes corniger* e *N. ephratae* e do grupo *euamignathus* (*Silvestritermes euamignathus* + *S. heyeri*), que ocorrem em áreas sobrepostas da região Neotropical – em especial na América do Sul. *Nasutitermes* e *Silvestritermes* apresentam diferenças marcantes em relação a aspectos morfológicos, comportamentais, genéticos e filogenéticos. Apesar disso, foram observadas semelhanças importantes nos padrões filogeográficos entre as espécies. Considerando as comparações feitas, é possível concluir que os fatores históricos da biogeografia da região direcionaram e moldaram os padrões genéticos identificados aqui, levando a histórias filogeográficas convergentes mesmo em espécies de cupins consistentemente diferentes em diversos aspectos biológicos, refutando a hipótese inicial desse estudo. Esses dados prestam importantes contribuições para o estudo do panorama histórico da região Neotropical e de seus domínios e biomas. Além disso, a identificação e o estudo de eventos passados são análogos bastante relevantes para a previsão de potenciais situações futuras.

REFERÊNCIAS

- AUSTIN, J. W. et al. Molecular phylogeography of the subterranean termite *Reticulitermes tibialis* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 25, n. 2, p. 63–79, 2008.
- AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annals Reviews of Ecology Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000. 447 p.
- BANKHEAD-DRONNET, S. et al. Spatial structuring of the population genetics of a European subterranean termite species. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 15, p. 3090-3102, 2015.
- BECCALONI, G.; EGGLETON, P. Order Blattodea. In: ZHANG, Z. Q. (Ed.). **Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness** (Addenda 2013). **Zootaxa**, v. 3703, n. 1, p. 46-48, 2013.
- BIGNELL, D. E. Termites as soil engineers and soil processors. In: KÖNIG, H.; VARMA, A. (Orgs.). **Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates**. Berlin: Springer, p. 183–220, 2006.
- BLACK, H.; OKWAKOL, M. J. N. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of termites. **Applied Soil Ecology**, v. 6, p. 37–53, 1997.
- BOURGUIGNON, T. et al. Feeding ecology and phylogenetic structure of a complex neotropical termite assemblage, revealed by nitrogen stable isotope ratios. **Ecological Entomology**, v. 36, n. 2, p. 261-269, 2011.
- BOURGUIGNON, T. et al. The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 2, p. 406-421, 2014.
- BOURGUIGNON, T. et al. Mitochondrial Phylogenomics Resolves the Global Spread of Higher Termites, Ecosystem Engineers of the Tropics. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 589–597, 2016.
- BOURGUIGNON, T. et al. Towards a revision of the Neotropical soldierless termites (Isoptera:Termitidae): redescription of the genus *Anoplotermes* and description of *Longustitermes*, gen. nov. **Invertebrate Systematics**, v. 24, p. 357-370, 2010.
- BRECHT, B. Vida de Galileu. In: BRECHT, B. **Teatro completo**. Rio de Janeiro: Paz e Terra, p. 124, 1991.
- CABANNE, G. S. et al. Effects of Pleistocene climate changes on species ranges and evolutionary processes in the Neotropical Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 119, n. 4, p. 856-872, 2016.
- CABANNE, G. S. et al. Evolution of *Dendrocolaptes platyrostris* (Aves: Furnariidae) between the South American open vegetation corridor and the Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, n. 4, p. 801-820, 2011.

- CARVALHO, C. J. B.; COURI, M. S. Biogeografia de Muscidae (Insecta: Isoptera) da América do Sul. In: _____; ALMEIDA, E. A. B. (Orgs.). **Biogeografia da América do Sul: padrões e processos**. São Paulo: Roca, 2010. p. 277-298
- CONSTANTINO, R. **On-line termite database**, 2020. Disponível em: <<http://164.41.140.9/catal/>> Acesso em 21 nov. 2021.
- CONSTANTINO, R. Padrões de diversidade e endemismo de térmitas no bioma cerrado. In: SCARIOT, A. O.; SILVA, J. C. S.; FELFILI, J. M. (Eds.). Biodiversidade, Ecologia e Conservação do Cerrado. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 319-333.
- COX, B. The biogeographic regions reconsidered. **Journal of biogeography**, v. 28, n. 4, p. 511-523, 2001.
- DONOVAN, S. E.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D. E. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. **Ecological Entomology**, v. 26, n. 4, p. 356-366, 2001.
- ENGEL, M. S. Family-group names for termites (Isoptera), reduz. **ZooKeys**, v. 148, p. 171-184, 2011.
- ENGEL, M. S. GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, K. Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. **American Museum Novitates**, v. 3650, p. 1-27, 2009.
- FEITOSA, R. M. et al. Social Insects of the Atlantic Forest. In: MARQUES, M. C. M.; GRELLE, C. E. V. (Eds.). **The Atlantic Forest: History, Biodiversity, Threats and Opportunities of the Mega-diverse Forest**. Cham: Springer, 2021, p. 151-183.
- HIGASHI, M.; ABE, T. Global diversification of termites driven by the evolution of symbiosis and sociality. In: ABE, S.; LEVIN, S.A., HIGASHI, M. (Orgs.). **Biodiversity: an ecological perspective**. New York: Springer, 1997. p. 83-112.
- INWARD, D. J. G.; VOGLER, A. P.; EGGLETON, P. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 3, p. 953-967, 2007.
- JENKINS, T. M. et al. Phylogeography illuminates maternal origins of exotic *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, p. 612-621, 2007.
- JOUQUET, P. et al. Influence of termites on ecosystem functioning: ecosystem services provided by termites. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 215-222, 2011.
- KLASS, K. D.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of Dictyoptera (Insecta) based on morphological characters. **Entomologische Abhandlungen**, v. 63, n. 1-2, p. 3-50, 2006.
- KRISHNA, K. et al. Treatise on the Isoptera of the world. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 377, n. 1, p. 1-202, 2013.
- KUTNIK, M. et al. Phylogeography of two European *Reticulitermes* (Isoptera) species: the iberian refugium. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3099-3113, 2004.
- LAVELLE, P. et al. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology**, v. 33, p. 159-193, 1997.

- LAWTON, J. H. What do species do in ecosystems? **Oikos**, v. 71, p. 367-374, 1994.
- LEGENDRE, F. et al. The phylogeny of termites (Dictyoptera: Isoptera) based on mitochondrial and nuclear markers: implications for the evolution of the worker and pseudergate castes, and foraging behaviors. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, p. 615-627, 2008.
- LI, H. F. et al. Phylogeography of *Coptotermes gestroi* and *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Taiwan. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, n. 4, p. 684-693, 2009.
- LYNCH, M.; KOSKELLA, B.; SCHAACK, S. Mutation Pressure and the Evolution of Organelle
- MORRONE, J. J. América do Sul e geografia da vida: Comparação de algumas propostas de regionalização. In: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (Eds.). **Biogeografia da América do Sul: padrões e processos**. São Paulo: Roca, 2010. p. 14-40.
- MORRONE, J. J. Biogeographic regions under track and cladistic scrutiny. **Journal of Biogeography**, v. 29, p. 149-152, 2002.
- MORRONE, J. J. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. **Zootaxa**, v. 3782, p. 1-110, 2014.
- OSÉS, C. S.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, R. Historia y tabla de equivalencias de las propuestas de subdivisiones biogeográficas de la región Neotropical. In: BOUSQUETS, J. L.; MORRONE, J. J. (Eds.). **Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines** – Primeras Jornadas Biogeográficas de la Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática (RIBES XII.I-CYTED). Mexico City: Las Prensas de Ciencias, UNAM, 2005. p. 495–508.
- OSÉS, C. S.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, R. Revisión histórica de las subdivisiones biogeográficas de la región Neotropical, con especial énfasis en Suramérica. **Montalbán**, v. 31, p. 169-210, 1998.
- PARK, Y. C. et al. Intraspecific molecular phylogeny, genetic variation and phylogeography of *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Molecules and Cells**, v. 21, n. 1, p. 89-103, 2006.
- PÉREZ-HERNÁNDEZ, R.; LEW, D.. Las clasificaciones e hipótesis biogeográficas para la Guayana venezolana. **Interciencia**, v. 26, n. 9, p. 373-382, 2001.
- RAPOPORT, E. H. Algunos problemas biogeográficos del Nuevo Mundo con especial referencia a la región Neotropical. In: DEBOUTEVILLE, C. D.; RAPOPORT, E.H. (Eds.). **Biologie de l'Amerique Australe**, v. 4. Paris: CNRS, 1968s. p. 55–110.
- REDFORD, K. H. The termitaria of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) and their role in determining a potential keystone species. **Biotropica**, v. 16, p.112–19, 1984.
- ROSS, K. G. Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. **Molecular ecology**, v. 10, n. 2, p. 265-284, 2001.
- RULL, V. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 26, n. 10, p. 508-513, 2011.

- SANTOS, A. F. et al. Phylogeography of *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) in the Neotropical Region. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 230, p. 1-12, 2017.
- THERAULAZ, G.; BONABEAU, E.; DENEUBOURG, J. L. The origin of nest complexity in social insects. **Complexity**, v. 3, n. 6, p. 15-25, 1998.
- TRIPODI, A.D. et al. Phylogeography of *Reticulitermes Termites* (Isoptera: Rhinotermitidae) in California inferred from mitochondrial DNA sequences. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, n. 4, p. 697-706, 2006.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular ecology**, v. 22, n. 5, p. 1193-1213, 2013.
- VARGO, E. L.; HUSSENER, C. Genetic structure of termite colonies and populations. In: BIGNELL, D. E.; ROISUN, Y. (Orgs.). **Biology of Termites: a modern synthesis**. New York: Springer, 2011. p. 321-347.
- WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press, 1971.