



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

AMANDA DE FARIA SANTOS

**Filogeografia de *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae:
Nasutitermitinae) na região Neotropical**

São José do Rio Preto
Março de 2016



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

AMANDA DE FARIA SANTOS

**Filogeografia de *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae:
Nasutitermitinae) na região Neotropical**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética 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 Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Coletto Morales Corrêa e Castro

São José do Rio Preto
Março de 2016

Santos, Amanda de Faria.

Filogeografia de *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae) na região Neotropical / Amanda de Faria Santos. -- São José do Rio Preto, 2016

80 p. : il., tabs.

Orientador: Adriana Coletto Morales Corrêa e Castro

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética de populações. 2. Filogeografia. 3. Térmita – Aspectos genéticos. 4. DNA mitocondrial. I. Castro, Adriana Coletto Morales Corrêa e. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575(038)

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Amanda de Faria Santos

**Filogeografia de *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae) na
região Neotropical**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética 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 Mestre em Genética.

Data de aprovação: 04 de março de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana Coletto Morales Corrêa e Castro
UNESP – São José do Rio Preto / UNESP – Jaboticabal
Orientadora

Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto / UNESP – Jaboticabal

Dr. Maurício Martins da Rocha
Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP – São Paulo)

São José do Rio Preto
04 de março de 2016

Dedico este trabalho e todos os seus bons frutos aos meus pais, Laura e Admilson.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer àqueles diretamente envolvidos no desenvolvimento deste trabalho. À minha orientadora, professora Adriana, que não mediu esforços para que a minha formação profissional e acadêmica fosse a mais ética e correta possível. Agradeço imensamente a dedicação e a paciência que teve para, de fato, me orientar ao longo desse de trajeto de aprendizagem. À professora Eliana Canello e toda a equipe do MZUSP – em especial ao Tiago Carrijo, grande colaborador e parceiro de coletas – por dividir conosco, além de grande parte do material biológico utilizado neste trabalho, todo o seu vasto conhecimento sobre os cupins. Ao professor Manoel Victor Lemos, à professora Janete Desidério e à técnica Eliane Alves, do Laboratório de Genética de Bactérias, pela concessão do espaço e dos equipamentos necessários. A CAPES, pelo auxílio financeiro, e ao Programa de Pós-Graduação em Genética do IBILCE – UNESP por abrir as suas portas para nos acolher. Por último, e muitíssimo importante, gostaria de agradecer imensamente aos meus amigos do LaBE, Rullian, Maria Cecília, Nara e Thaís, pelos cafés, bolos, cervejas, cafés, conversas, cafés e, principalmente, pelos cafés. Por toda a ajuda, companheirismo e pelas risadas ao longo desse tempo. Um agradecimento especial ao Rullian, que, assim como eu, encerra essa etapa de aprendizagem, e foi/é muito mais do que um companheiro – de longa data – nas tardes, noites e madrugadas de escrita e nas de descontração. Agradeço também à Juliana, que passou pelo LaBE como minha primeira co-orientada, me dando a oportunidade de conhecer novas habilidades e dificuldades dentro de mim.

Gostaria de agradecer também àqueles que me deram toda a força necessária para que eu seguisse sempre em frente. Aos meus pais e exemplos, Laura e Admilson, pelo amor incondicional, pelos valores que construíram em mim, e, principalmente, por toda dedicação e renúncia – às vezes necessária – despendidos para que eu sempre pudesse trilhar meu caminho com persistência e sabedoria. Aos meus irmãos, Alan e Ana Laura, pelo amor e cumplicidade de sempre. À minha avó Maria e à minha tia Airma, que sempre permaneceram ao meu lado. Às minhas amigas, “metades da minha goiaba”, Rafa, Cilene (“Dou”), Nayara, Andrezza, Marina, Emily e Marcella, por todas as risadas, cervejas e noites gourmet, meu combustível essencial dos fins de semana. À minha família UNESPiana, as lindas da República “Chá na Brasa” e do “Cafofo”, e os meus amigos Néviton (“Tchê”) e Gabriele (“Tostex”), pela amizade e companheirismo de todos os momentos.

A todos esses, e também àqueles que não couberam nessas poucas linhas, mas que me preenchem como pessoa, um muito obrigada cheio de carinho. Essa conquista é nossa!



Fonte: Blog “Um Sábado Qualquer”, autoria de Carlos Ruas.

RESUMO

Cupins são insetos eussociais da infraordem Isoptera, que, atualmente, é composta por nove famílias com representantes vivos. Ecologicamente, os cupins desempenham um importante papel na ciclagem de nutrientes do solo, e são conhecidos como "super decompositores". A região Neotropical é a terceira em número de espécies de cupins conhecidas, com aproximadamente 600 descritas, que são divididas em cinco famílias, incluindo Termitidae, que abriga a espécie deste trabalho, *Nasutitermes corniger*. O presente trabalho se propôs a estudar as populações de *N. corniger* sob a perspectiva da genética de populações e da filogeografia. Essas duas áreas de estudo, aliadas, permitem que se trace a história evolutiva dos processos responsáveis pelo surgimento de padrões encontrados atualmente. De modo geral, esse foi o objetivo deste trabalho: encontrar e compreender os padrões e os processos que permitem traçar a história evolutiva da espécie *N. corniger*, distribuída ao longo da região Neotropical, utilizando-se o marcador molecular mitocondrial 16S rDNA. Foram utilizados 230 espécimes de *N. corniger*, provenientes de mais de 15 estados brasileiros, de países da América do Sul, América Central e Ilhas do Caribe. Após sequenciamento dos fragmentos de 16S rDNA, obteve-se 45 haplótipos, que puderam ser divididos em 6 agrupamentos. Com exceção de alguns haplótipos do agrupamento 1, considerado o mais antigo, os agrupamentos estão distribuídos de modo a relacionar áreas geográficas proximamente localizadas. A observação desse padrão, junto aos resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA), permitiu que se inferisse que as populações analisadas estão estruturadas ao longo da área amostrada. Os resultados da *Nested Clade Phylogeographic Analysis* (NCPA) frequentemente indicaram isolamento por distância como causa do padrão de distribuição de haplótipos encontrado, inferência corroborada pelo teste de Mantel. A partir dos agrupamentos observados na rede haplotípica e do padrão de distribuição dos haplótipos ao longo da região Neotropical, ainda foi possível inferir uma provável rota de dispersão para a espécie, que parte da América Central em direção à América do Sul, adentrando o território brasileiro. Além disso, foi possível observar que a distribuição dos haplótipos ao longo da área amostrada está associada a eventos biogeográficos que ocorreram na América do Sul e à distribuição das biotas encontradas no continente, como é o caso dos haplótipos encontrados na Mata Atlântica, e nas regiões de vegetação aberta do Cerrado, Caatinga e Chaco.

Palavras-chave: Cupins. Genética de Populações. DNA mitocondrial. Haplótipos. 16S rDNA.

ABSTRACT

Termites are eusocial insects of the infraorder Isoptera, which is currently composed of nine families with living representatives. Ecologically, termites have an important role in nutrient cycling of the soil, and are known as "super decomposers". The Neotropical region is the third in number of known species, with about 600 described species, that are divided in five families, including Termitidae, which involving the specie of this work, *Nasutitermes corniger*. This work proposed to study the populations of *N. corniger* by the approach of Populations Genetics and Phylogeography. Both study areas, together, allow to trace the evolutionary history of the processes responsible for the origin of currently found patterns. Overall, this was the aim of this work: to find and understand the patterns and processes which allow to trace the evolutionary history of the specie *N. corniger*, distributed along the Neotropics, using the mitochondrial molecular marker 16S rDNA. Have been used 230 specimens of *N. corniger*, from more than 15 Brazilian states, South and Central America countries and Caribbean Islands. After sequencing of 16S rDNA fragments, 45 haplotypes were obtained, which could be divided into six groupings. Except some haplotypes of grouping 1, considered oldest, the groupings are distributed to relate geographical areas most closely located. The observation of this pattern, together with the results of Analysis of Molecular Variance (AMOVA), allowed it to be deduced that populations are structured along sampled area. The results of Nested Clade Phylogeografic Analysis (NCPA) indicate, frequently, isolation by distance as cause of distribution pattern found, inference supported by Mantel's test. From the groupings which were observed at haplotypic network and the haplotype distribution pattern throughout the sampled region, it was still possible to infer a probable expansion route for the specie, which goes from Central America in direction to South America, entering in the Brazilian territory. Furthermore, it was possible to observe that the haplotype distribution along sampled area is associated with biogeographic events which occurred in South America and with the biotas' distribution found in the continent, as the case of haplotypes found in Atlantic Forest, and in the regions of opened vegetation of Cerrado and Caatinga.

Key-words: Termites. Population Genetics. Mitochondrial DNA. Haplotypes. 16S rDNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Locais de coleta de <i>N. corniger</i> para o trabalho de Scheffrahn et al. (2005a)	25
Figura 2 – Locais de coleta de <i>N. corniger</i> para o trabalho de Scheffrahn et al.(2005b).	25
Figura 3 – Fotomicrografia das vistas dorsal (A-D) e lateral (E-H) da cabeça de soldados de <i>N. corniger</i> da República Dominicana, México, Venezuela e Trindade, respectivamente.. ...	26
Figura 4 – (A) Ninho de <i>Nasutitermes corniger</i> ; (B) Ninho de <i>Nasutitermes ephratae</i>	27
Figura 5 – Categorias de padrões gerais filogeográficos propostos por Avise et al. (1987)..	29
Figura 6 – Área de abrangência da região Neotropical.....	31
Figura 7 – Sequência de eventos biogeográficos sugeridos pelo cladograma de área geral de Morrone (2014).....	33
Figura 8 – Gráfico representando o número de publicações em filogeografia para a região Neotropical e para o restante do mundo, de 1987 a meados de 2008.	34
Figura 9 – Rede de haplótipos não enraizada para <i>N. corniger</i> gerada através das sequências do gene mitocondrial 16S rDNA.	48
Figura 10 – Mapas evidenciando a distribuição dos haplótipos obtidos neste trabalho.	51
Figura 11 – Rede de haplótipos evidenciando os clados aninhados utilizados na NCPA	52
Figura 12 – Representações gráficas das diferenças par a par (<i>Mismatch Distribution</i>) das sequências do gene mitocondrial 16S rDNA	55
Figura 13 – Árvore de similaridade genética <i>Neighbor-joining</i> obtida a partir do cálculo das distâncias genéticas entre os haplótipos de <i>N. corniger</i> obtidos.....	58
Figura 14 – (A) Árvore de inferência bayesiana gerada com os 45 haplótipos obtidos.	60
Figura 15 – Esquemas dos processos de dispersão de populações de <i>N. corniger</i> na América do Sul.	65
Figura 16 – Mapa evidenciando as subdivisões dos biomas da região Neotropical propostas por Morrone (2013).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número <i>voucher</i> , código de localidade, localidade de procedência e coordenadas geográficas dos espécimes de <i>Nasutitermes corniger</i> utilizados neste trabalho.	39
Tabela 2. Relação entre os haplótipos, sua frequência, compartilhamento com os indivíduos de <i>N. corniger</i> e alocação no respectivo agrupamento na rede haplotípica (Figura 9).	49
Tabela 3. Resultados da NCPA gerados através do software GeoDis e interpretados a partir da chave de inferências de Templeton (2004).	53
Tabela 4. Valores dos testes de neutralidade	54
Tabela 5. Primeira construção para o teste de AMOVA	56
Tabela 6. Segunda construção para o teste de AMOVA	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Objetivos.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Aspectos biológicos e diversidade dos cupins	23
2.2	Genética de Populações e Filogeografia	27
2.3	Biogeografia da região Neotropical	30
2.3.1	Biogeografia da Mata Atlântica	35
2.3.2	Biogeografia da Diagonal de Formações Abertas Secas da América do Sul	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Obtenção do material biológico	39
3.2	Obtenção do DNA mitocondrial	42
3.3	Análise dos dados	43
4	RESULTADOS	47
4.1	Estatística descritiva	47
4.2	Rede haplotípica e análises filogeográficas	47
4.3	Testes de neutralidade e <i>Mismatch Distribution</i>	54
4.4	Análise de Variância Molecular (AMOVA).....	56
4.5	Análise de Similaridade Genética.....	57
4.6	Análise Filogenética e de Tempo de Divergência	59
5	DISCUSSÃO	61
5.1	Abordagem genética populacional	61
5.2	Abordagem filogeográfica e biogeográfica	62
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE.....	79

1 INTRODUÇÃO

Cupins são insetos eussociais da infraordem Isoptera, que, atualmente, é composta por nove famílias com representantes vivos. Possuem castas diferenciadas e apresentam divisão reprodutiva do trabalho na colônia, sobreposição de gerações e cuidado cooperativo com a prole. Ecologicamente, os cupins desempenham um importante papel na ciclagem de nutrientes do solo, e são conhecidos como "super decompositores". Seus ninhos constituem um microambiente particular e podem envolver inúmeros inquilinos, como vermes, outros artrópodes e até mesmo alguns vertebrados.

A região Neotropical, área de abrangência deste estudo, é a terceira em número de espécies de cupins conhecidas, com aproximadamente 600 descritas, que são divididas em cinco famílias, incluindo Termitidae, que abriga a espécie deste trabalho, *Nasutitermes corniger*. Essa espécie possui uma distribuição exclusivamente Neotropical, abrangendo mais de 6000 km de distância no sentido Norte-Sul. Nessa região, *N. corniger* é a espécie do gênero *Nasutitermes* com maior distribuição. Seus ninhos, cartonados e arbóreos, apresentam uma superfície marrom escura com pequenos solavancos cobrindo seu exterior. Internamente, os ninhos são fortemente reforçados em torno da câmara da rainha, que, geralmente, se localiza no centro do ninho. O presente trabalho se propôs a estudar as populações de *N. corniger* sob a perspectiva da genética de populações e da filogeografia.

Através de diversas ferramentas moleculares, a genética de populações busca compreender os padrões de variações genéticas para esclarecer os processos responsáveis por tal variabilidade. Dentre elas, o DNA mitocondrial (mtDNA) – devido a algumas características peculiares, como herança materna, ritmo rápido de evolução e alto polimorfismo intraespecífico – tem sido extensamente utilizado em estudos de diferentes táxons envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e diversos outros aspectos biológicos e evolutivos. Em relação à filogeografia, Avise et al. (1987), utilizando dados de mtDNA, propuseram as questões centrais dessa área de estudo: encontrar e compreender as inter-relações filogenéticas entre as moléculas de mtDNA, e elucidar o padrão de distribuição geográfica dos agrupamentos filogenéticos. Esses autores ainda propuseram que filogenias intraespecíficas sobrepostas em mapas geográficos podem produzir diversas interpretações a respeito da história evolutiva das populações em questão.

A partir dos padrões obtidos nas análises genéticas populacionais e dos processos inferidos pela filogeografia, é possível que se trace a história evolutiva da espécie, ou seja, os processos responsáveis pelo surgimento de tais padrões. De modo geral, é exatamente este o

objetivo deste trabalho: estimar e analisar os padrões e os processos que permitem traçar a história evolutiva da espécie *N. corniger*, distribuída ao longo da região Neotropical, utilizando-se, para isto, o marcador molecular mitocondrial 16S rDNA.

1.1 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar, através do marcador molecular mitocondrial 16S rDNA, variantes populacionais de *Nasutitermes corniger* que ocorrem na região Neotropical. Para tanto, foram objetivos específicos deste trabalho:

i) obtenção das sequências nucleotídicas do gene mitocondrial 16S rDNA das amostras de *N. corniger* de diferentes localidades estudadas;

ii) determinar as variantes genéticas existentes nas populações através da identificação e quantificação de sítios polimórficos, diversidade e diferenças nucleotídicas, bem como a diversidade haplotípica;

iii) determinar a distância genética e grau de estruturação das populações amostradas;

iv) verificar se eventos recorrentes, como fluxo gênico ou eventos históricos, contribuem para a estrutura genética das populações de *N. corniger* estudadas;

v) estabelecer inferências filogeográficas para auxiliar na compreensão da evolução da espécie;

vi) estimar o tempo de divergência das populações amostradas e inferir possíveis eventos geográficos associados aos padrões encontrados;

vii) utilizar as inferências levantadas para diagnosticar um modelo de distribuição biogeográfica para a espécie na região Neotropical, bem como utilizá-las junto a outras pesquisas para ajudar na compreensão dos processos biogeográficos dos biomas que permeiam a região Neotropical.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos biológicos e diversidade dos cupins

Cupins são insetos eussociais da ordem Blattaria, infraordem Isoptera, composta atualmente por aproximadamente 3170 espécies (CONSTANTINO, 2016). Isoptera, junto a Blattodea e Mantodea, compõe o grupo Dictyoptera, reconhecido como monofilético. Recentemente esse grupo foi alvo de diversos estudos filogenéticos (KLASS, 2003; KLASS; MEIER, 2006; WARE et al., 2008) e, atualmente, pouca dúvida existe sobre o posicionamento filogenético dos cupins dentro do grupo das baratas (INWARD et al., 2007a,b; LO et al., 2007; BECCALONI; EGGLETON, 2013; ENGEL, 2011). Ou seja, apesar de ser um grupo monofilético, Isoptera é considerado grupo irmão da família de baratas Cryptocercidae, o que torna Blattodea um grupo parafilético (DJERNAES et al., 2012).

Dentro de Isoptera, a classificação mais aceita, atualmente, de cupins com representantes vivos reconhece nove famílias (ENGEL, 2011; KRISHNA et al., 2013). Recentemente foram publicadas algumas propostas de filogenia de Isoptera com o objetivo de se compreender as relações de parentesco entre grupos dessa infraordem, bem como estabelecer os grupos basais, como pode ser visto nos trabalhos de Donovan et al. (2000), Inward et al. (2007), Legendre et al. (2008) e Engel et al. (2009). Também foi realizada uma proposta filogenética de Isoptera como um todo, com ênfase nos grupos basais Mastotermitidae e Kalotermitidae, a fim de se responder questões a respeito de determinados comportamentos e da existência de algumas das castas (operários e/ou *pseudergates*) dentro de um contexto evolutivo, baseada em dados moleculares (LEGENDRE et al., 2008). Legendre et al. (2008) ainda compararam as propostas de relações filogenéticas entre famílias de cupins levantadas por diferentes autores.

Quanto aos aspectos da biologia dos cupins, esses insetos eussociais possuem castas diferenciadas e apresentam divisão reprodutiva do trabalho na colônia, sobreposição de gerações e cuidado cooperativo com a prole (WILSON, 1971), 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, os cupins desempenham importantes papéis no ecossistema, como o de “super decompositores” e auxiliares no balanço Carbono-Nitrogênio (HIGASHI; ABE, 1997). Os cupins estão entre os mais abundantes artrópodes de solo 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. Em algumas regiões os cupinzeiros dominam a paisagem local devido à densidade elevada de ninhos presentes (SANTOS et al., 2007). Cada cupinzeiro constitui um microambiente particular, podendo envolver incontáveis números de inquilinos, que vão de vermes (planárias terrestres e lesmas) e artrópodes (formigas, abelhas, vespas, miriápodes, aranhas, opiliões, escorpiões, hemípteros, coleópteros, etc.) a vertebrados (sapos, cobras, lagartos e roedores) (FONTES; ARAÚJO, 1999). 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*, por exemplo, o que corresponde a aproximadamente 600 vezes o tamanho de um cupim operário (THERAULAZ et al., 1998).

A região Neotropical, área de amostragem deste trabalho, é a terceira em número de espécies conhecidas de cupins, ficando atrás das regiões Etiópica e Oriental. Nessa região há, atualmente, aproximadamente 600 espécies descritas (CONSTANTINO, 2016), que se dividem em cinco famílias: Stolotermitidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae, a mais diversa – aproximadamente 2165 espécies descritas (CONSTANTINO, 2016) – e que abriga a espécie deste trabalho, *Nasutitermes corniger* (MOTSCHULSKY, 1855). Dentro de Termitidae, *Nasutitermes* é o gênero mais amplamente distribuído, abrangendo todas as regiões tropicais, e com a maior riqueza de espécies – 260, aproximadamente (CONSTANTINO, 2016).

A espécie *Nasutitermes corniger*, assim como as outras da subfamília Nasutitermitinae, é caracterizada por soldados que possuem uma estrutura cônica na região anterior da cabeça, chamada de tubo frontal ou *nasus*, onde há uma glândula exócrina responsável por secretar substâncias que atuam como defesa química dos indivíduos (EISNER et al., 1976). Foi originalmente descrita por Motschulsky (1855) a partir de soldados coletados no Panamá. Banks (1918) modificou a descrição de soldado de Motschulsky e adicionou a primeira descrição de alados, também do Panamá.

A distribuição de *N. corniger* é Neotropical e bastante ampla nessa região, abrangendo, do sul do México ao norte da Argentina, mais de 6000 km de distância no sentido norte-sul (SCHEFFRAHN et al., 2005b), incluindo muitas outras regiões, como Colômbia, Venezuela, Guiana, Brasil, Equador, Bolívia e Argentina (SNYDER, 1926; 1949; ARAUJO, 1977; TORALES; ARMUA, 1986; CONSTANTINO, 1998). Scheffrahn et al.

(2005a, 2005b) realizaram a sinonímia entre *N. corniger* e *N. costalis*, assim como de *N. corniger* e *N. polygynus*, baseadas em evidências morfológicas, genéticas e biogeográficas. Os espécimes obtidos para o trabalho de sinonímia entre *N. corniger* e *N. costalis* foram coletados no sul da América do Norte, ao longo da América Central, incluindo suas ilhas, e América do Sul (Figura 1). Já para o trabalho de sinonímia entre *N. corniger* e *N. polygynus*, os espécimes foram coletados em Nova Guiné (Figura 2). A nomenclatura *Nasutitermes corniger* foi mantida, como 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 (SZALANSKI et al., 2004).

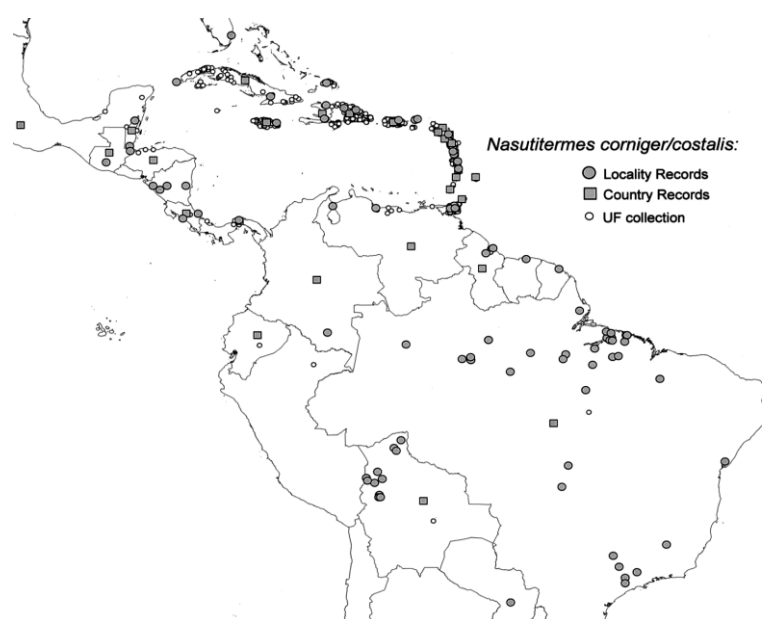


Figura 1 – Locais de coleta de *N. corniger* para o trabalho de Scheffrahn et al. (2005a). Fonte: SCHEFFRAHN et al., 2005a, p. 277.

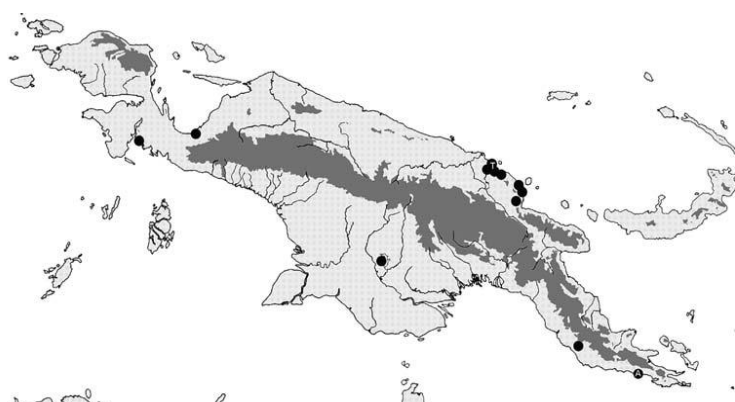


Figura 2 – Locais de coleta (marcados com os pontos pretos) de *N. corniger* para o trabalho de Scheffrahn et al. (2005b). Fonte: SCHEFFRAHN et al., 2005b, p. 30.

Na região Neotropical, *Nasutitermes corniger* é a espécie do gênero *Nasutitermes* de maior dominância e distribuição. Scheffrahn et al. (2005a) ainda descreveram algumas variações entre soldados e operários de *N. corniger* em caracteres como coloração, dimensão e morfologia (Figura 3). As variações de tamanho da cabeça dos soldados foram de 60% entre a menor e a maior, de 40% no tamanho do *nasus*, 50% no tamanho da tíbia e de 84% no tamanho total (SCHEFFRAHN et al., 2005a). Encontrou-se variação, também, da pilosidade da cabeça e dos tergitos abdominais. Neste trabalho, Scheffrahn et al. também descreveram variações genéticas utilizando o gene mitocondrial 16S rDNA. Entre os 421 nucleotídeos analisados, 26% foram variáveis e 15% foram filogeneticamente informativos (SCHEFFRAHN et al., 2005a).

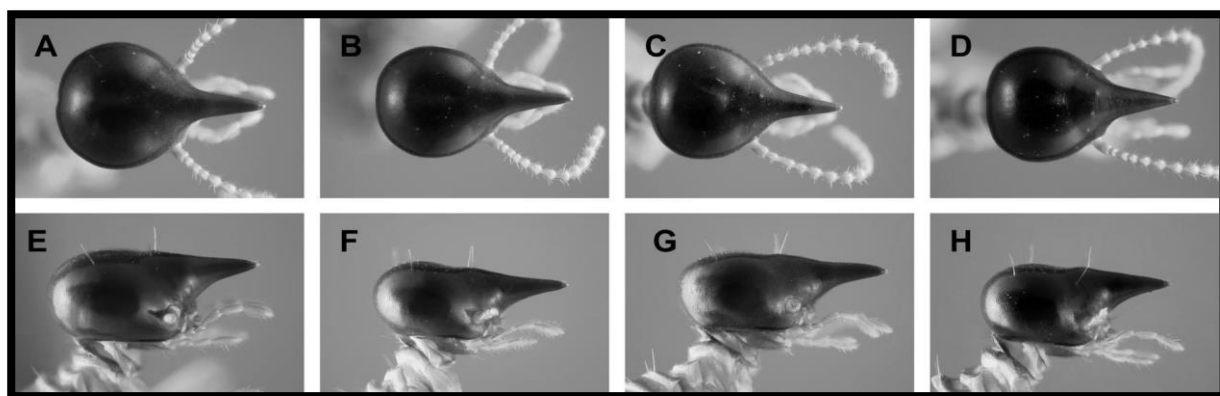


Figura 3 – Fotomicrografia das vistas dorsal (A-D) e lateral (E-H) da cabeça de soldados de *N. corniger* da República Dominicana, México, Venezuela e Trindade, respectivamente. Fonte: SCHEFFRAHN et al., 2005a, p. 277.

O ninho de *N. corniger*, cartonado e arbóreo, apresenta uma superfície marrom escura grosseira (Figura 4.A), com pequenos solavancos cobrindo todo o exterior, e tendem a ser mais esféricos quando pequenos e com forma elipsoidal quando maiores. Quando vistos de longe, esses ninhos podem ser confundidos com ninhos da espécie *N. ephratae*, que é marrom mais suave e possui uma superfície que cria uma aparência coriácea (Figura 4.B) (THORNE, 1980). Internamente, os ninhos de ambas as espécies são fortemente reforçados em torno da câmara da rainha, que geralmente se localiza em uma porção mais central do ninho, mais próximo ao tronco da árvore ou ramo que o abriga. As galerias de *N. corniger* são relativamente pequenas ao longo de cada colônia, embora possam aumentar de tamanho perto da borda externa do ninho. Além das semelhanças entre seus ninhos, *N. corniger* e *N. ephratae* ainda possuem áreas de ocorrência similares, e são morfologicamente bastante parecidas – as maiores diferenças morfológicas entre essas espécies ocorrem entre os

indivíduos alados ou reprodutores, e são mais sutis quando se comparam seus soldados (THORNE, 1980).

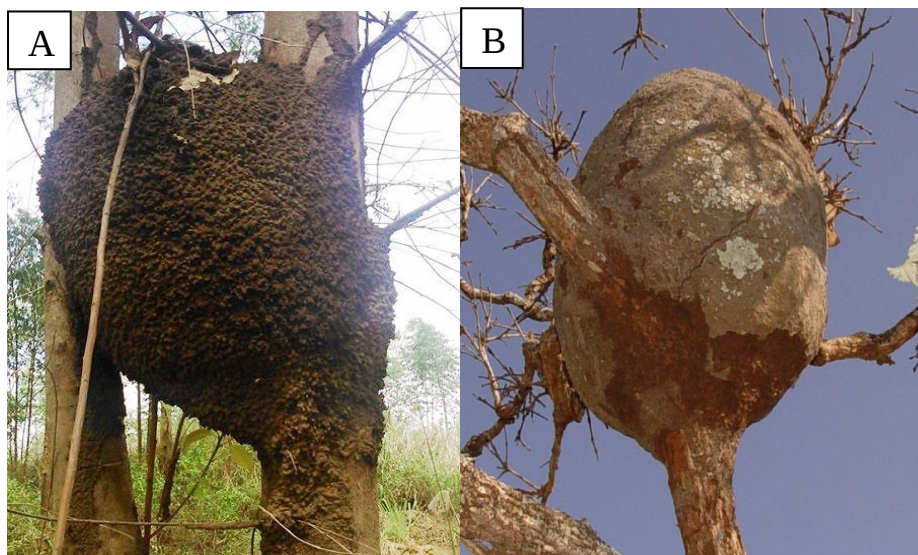


Figura 4 – (A) Ninho de *Nasutitermes corniger*; (B) Ninho de *Nasutitermes ephratae*. Fonte: Figura A – acervo pessoal; Figura B – imagem cedida pelo Dr. Tiago Fernandes Carrijo.

2.2 Genética de Populações e Filogeografia

O estudo da genética de populações busca analisar os padrões de variações genéticas em populações naturais, a fim de que se compreendam os processos responsáveis por essa variabilidade. Atualmente, há um grande número de ferramentas moleculares capazes de avaliar tais variações em todos os níveis taxonômicos. Junto aos avanços nos modelos genéticos de populações e análise de dados, essas técnicas proporcionaram métodos poderosos pra inferir a estrutura genética da colônia 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 moleculares, a molécula de DNA mitocondrial (mtDNA) passou a fazer parte de vários estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de diversos aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (WILSON et al., 1985; AVISE et al., 1987; MORITZ et al., 1987; AVISE, 1994), inclusive de cupins, como pode ser visto nos trabalhos com *Coptotermes* spp. de Li et al. (2009) e Jenkins et al. (2007), e nos trabalhos com *Reticulitermes* spp. de Austin et al. (2008), Kutnik et al. (2004), Tripodi et al. (2006) e Park et al. (2005).

Uma vez que cupins são insetos sociais, a unidade básica da população é a colônia em vez do indivíduo (THORNE et al., 1999; LEPAGE; DARLINGTON, 2000), e a estrutura genética dessas populações está intimamente ligada à estrutura genética da colônia. Assim, populações de insetos sociais estão hierarquicamente estruturados, com indivíduos formando colônias e colônias compondo populações (ROSS, 2001). Nesse contexto, Garcia et al. (2004) investigaram a estrutura populacional e as distâncias genéticas existentes entre as populações de *Nasutitermes takasagoensis*, localizadas ao sul de Taiwan e nas Ilhas Yaeyama, no Japão, utilizando marcadores genéticos. Nesse trabalho foram calculados parâmetros como diversidade genética, média de heterozigose e porcentagem de sítios polimórficos em espécimes de ambas as populações. Segundo os resultados encontrados, as populações se mostraram muito bem estruturadas, indicando que a distância geográfica entre as duas localidades é, portanto, grande o suficiente para prevenir o fluxo gênico entre elas (GARCIA et al., 2004).

Em táxons de importância econômica, dados moleculares, junto a dados morfológicos, têm sido utilizados para investigar a variabilidade genética das populações (AUSTIN et al., 2002, 2004a,b), assim como a identidade específica, para espécies de Rhinotermitidae, como *Heterotermes* sp. e *Reticulitermes* sp. (SZLANSKI et al., 2004). Ainda, para investigações sobre identidade de espécies morfológicamente muito próximas, há os trabalhos de Scheffrahn et al. (2005a, 2005b).

O mtDNA possui algumas características peculiares que são essenciais para estudos populacionais, 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 A-T 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 encontram-se organizados (AVISE et al., 1987). O mtDNA de invertebrados bilaterais possui uma taxa de substituições nucleotídicas muito alta, aproximadamente oito vezes maior que o DNA nuclear (LYNCH; KOSKELLA; SCHAACK, 2006), o que faz dele uma ferramenta extremamente importante para estudos de genética de populações. Além dessas características, o genoma mitocondrial não possui íntrons e apresenta múltiplas cópias dentro de uma mesma célula, o que aumenta a facilidade de acesso à informação genética.

No campo da filogeografia, Avise et al. (1987), com base nos resultados de análises utilizando mtDNA como marcador molecular, propuseram questões centrais da chamada

filogeografia intraespecífica: encontrar e compreender as inter-relações filogenéticas entre as moléculas de mtDNA, e elucidar o padrão de distribuição geográfica dos agrupamentos filogenéticos. Avise et al. (1987) afirmaram que filogenias intraespecíficas, geradas através de mtDNA, sobrepostas em mapas geográficos podem produzir diversas interpretações a respeito da história evolutiva das populações em questão. Os autores, então, estabeleceram cinco grandes categorias de interpretações, como ser visto na Figura 5. Se, em uma determinada análise de filogenia intraespecífica, um agrupamento de genótipos relacionados diferir de outro por muitos passos mutacionais, pode-se inferir que tais agrupamentos ocorrem em regiões separadas dentro da área de ocorrência da espécie (padrão correspondente à Categoria I da Figura 5), ou que coocorrem nas regiões geográficas em questão (padrão correspondente à Categoria II da Figura 5), gerando um padrão de divergência genética descontínuo. Por outro lado, quando se observam poucos passos mutacionais entre um agrupamento de genótipos e outro, podem ser encontrados padrões que sejam mais ou menos contínuos geneticamente, além de espacialmente separados (padrão correspondente à Categoria III da Figura 5), totalmente sobrepostos (padrão correspondente à Categoria IV da Figura 5) ou aninhados (padrão correspondente à Categoria V da Figura 5) (AVISE et al., 1987).

CATEGORY	GENETIC DIVERGENCE PATTERN	GEOGRAPHIC DISTRIBUTION			LIKELY EVOLUTIONARY CIRCUMSTANCE
		REGION 1	REGION 2	REGION 3	
I	discontinuous				A) LONG-TERM EXTRINSIC (E.G. ZOOGEOGRAPHIC) BARRIERS TO GENE FLOW; AND/OR B) EXTINCTIONS OF INTERMEDIATE GENOTYPES IN SPECIES WITH LIMITED GENE FLOW.
II	discontinuous				A) RECENT, SECONDARY ADMIXTURE ZONES; OR B) INTRINSIC (E.G. REPRODUCTIVE ISOLATION) BARRIERS AMONG SYMPATRIC SIBLING SPECIES.
III	continuous				LIMITED GENE FLOW IN A SPECIES NOT SUBDIVIDED BY LONG-TERM ZOOGEOGRAPHIC BARRIERS.
IV	continuous				VERY EXTENSIVE GENE FLOW IN A SPECIES NOT SUBDIVIDED BY LONG-TERM ZOOGEOGRAPHIC BARRIERS.
V	continuous				INTERMEDIATE GENE FLOW IN A SPECIES NOT SUBDIVIDED BY LONG-TERM ZOOGEOGRAPHIC BARRIERS.

Figura 5 – Categorias de padrões gerais filogeográficos (determinados a partir de pesquisas com mtDNA) propostos por Avise et al. (1987). Fonte: AVISE et al., 1987, p.501.

Além de tal categorização dos padrões de divergência genética, Avise et al. (1987), considerando a distribuição geográfica de determinada espécie, também estabeleceram algumas premissas importantes para estudos filogeográficos, as quais eles chamaram de “hipóteses filogeográficas”. A primeira hipótese afirma que a maioria das espécies é composta por populações geográficas cujos membros ocupam diferentes ramos em uma filogenia intraespecífica. Tal separação geográfica dos ramos pode ser chamada de “estrutura populacional filogeográfica”. Já a segunda hipótese afirma que espécies que apresentam estruturas populacionais filogeográficas limitadas provavelmente ocupam extensões de áreas livres de fortes barreiras ao fluxo gênico, e tendem a ter histórias de vida que conduzem à dispersão. Além disso, tais espécies provavelmente tiveram uma circulação geográfica fluida ao longo do tempo evolutivo recente. A terceira hipótese afirma que grupos monofiléticos diferenciados por grandes ramos filogenéticos possivelmente surgiram a partir de barreiras de longo prazo ao fluxo gênico. Considerando que a reprodução leva a uma geração contínua de linhagens, populações isoladas evoluem através do tempo em condições de monofilia recíproca, e o tempo de isolamento, portanto, deve ser positivamente correlacionado à dimensão da diferenciação genealógica (AVISE et al., 1987).

Tendo em vista o exposto acerca da genética de populações e da filogeografia, esses dois campos de pesquisa, aliados, permitem que se compreenda, de fato, o que se entende por evolução intraespecífica. Em outras palavras, a partir dos padrões obtidos nas análises genéticas populacionais, é possível que se trace a história evolutiva da espécie, ou seja, os processos responsáveis pelo surgimento de tais padrões.

2.3 Biogeografia da região Neotropical

Em decorrência da formação geológica e biogeograficamente híbrida do continente americano, inúmeras teorias foram propostas para explicar a formação e a evolução da biota Neotropical (CARVALHO; COURI, 2010). Os trópicos americanos são conhecidos por sua notável diversidade, que teria surgido devido à heterogeneidade de habitats e à sua complexa história geológica. Além disso, esses fatores também teriam sido responsáveis pela formação dos padrões de distribuição geográfica das espécies encontradas nesta região (MORRONE, 2014). Quanto aos biomas, as florestas estão entre os mais comuns da região Neotropical, mas também são encontrados extensos biomas de vegetação aberta, como a Diagonal de Formações Abertas Secas da América do Sul, composta pelas regiões dos Pampas, Chaco, Cerrado e Caatinga.

A definição de “região Neotropical” se iniciou com De Candolle (1820 apud CARVALHO; COURI, 2010) ainda no século XIX, que listou cinco grandes regiões que, hoje, correspondem à região Neotropical. São elas: México, América Tropical, Chile, Sul do Brasil e Argentina e Terra do Fogo. Sclater (1858) e, posteriormente, Wallace (1876) estabeleceram que a região Neotropical corresponde às Américas do Sul e Central, e, mais ao norte, até o México central. Essa definição foi bastante aceita por pesquisadores que trabalham com vertebrados. Porém, muitos biogeógrafos de plantas e invertebrados têm adotado uma definição mais restrita a respeito da área de abrangência da região Neotropical, que corresponderia à maior parte da América do Sul, América Central, sul do México, Índias Ocidentais e o sul da Flórida, excluindo a porção Andina e o norte do México (que seria abrangido pela região Neártica). Essa definição mais restrita é chamada de região Neotropical *sensu stricto*, enquanto que a outra definição, mais abrangente, é chamada de *sensu lato* (Figura 6) (MORRONE, 2014).



Figura 6 – Área de abrangência da região Neotropical. As áreas de transição do México e da América do Sul estão representadas pelas linhas pontilhadas. A definição de região Neotropical *sensu stricto* não inclui essas regiões, que são consideradas apenas na definição Neotropical *sensu lato*. Fonte: MORRONE, 2014, p. 203.

Morrone, em 2014, publicou um trabalho sobre a biogeografia da região Neotropical sob a perspectiva da cladística, isto é, uma análise baseada na correspondência entre as relações filogenéticas dos clados analisados e as relações de áreas biogeográficas. Visto isso, um cladograma de área geral, produzido por tal análise cladística, representa hipóteses sobre a história biogeográfica dos táxons analisados e as áreas nas quais eles estão distribuídos (MORRONE, 2009 apud MORRONE, 2014). Nesse trabalho, Morrone propôs esclarecer e estabelecer subdivisões da região Neotropical, além de relacionar a existência de tais sub-regiões a eventos geológicos e tectônicos ocorridos ao longo da história dessa área. Para isso, foram gerados cladogramas de área geral para a região Neotropical, utilizando-se dados de gêneros de insetos, aranhas, vertebrados e plantas – selecionados levando-se em consideração a existência de estudos filogenéticos disponíveis e a distribuição desses gêneros nas áreas analisadas no trabalho.

O cladograma de área geral resultante do trabalho de Morrone (2014) mostrou que as áreas Neotropicais *sensu stricto* constituem uma unidade filogenética, e as zonas de transição dos Andes e do México se posicionam como “áreas irmãs” das regiões Andina e Neártica, respectivamente. Tendo em vista a análise geral desse cladograma, Morrone (2014) propôs a seguinte regionalização da região Neotropical: sub-região Antilha, sub-região Amazônica (que abrange os Domínios Amazônico Norte, Sudoeste, Mesoamericano e Noroeste Sul-Americano) e sub-região Chacoana (que abrange os Domínios Sudeste-Amazônico, Chaco e Paraná). Morrone ainda associou a formação dessas sub-regiões a eventos tectônicos e geológicos (Figura 7) que ocorreram na região, tais como:

i) a antiga conexão entre as massas continentais da América do Sul e do Norte entre o início do período Jurássico e o início do Cretáceo (aproximadamente de 190 Ma a 148 Ma), que permitiu a dispersão da biota Neotropical para a América do Norte – fato que pode explicar a presença de características Neotropicais antigas no norte do México (Figura 7.a) (HALFFTER, 1987; MORRONE, 2005b apud MORRONE, 2014);

ii) a vicariância entre as Antilhas e o restante da região Neotropical, que possivelmente está ligada ao rompimento da conexão da placa do Caribe durante sua deriva na direção nordeste. Essa placa esteve reconectada à América do Norte e do Sul entre meados e fim do Cretáceo, quando começou sua separação (Figura 7.b) – o rompimento dessa conexão foi finalizado entre o Mioceno e Plioceno Médio (PITMAN et al., 1993 apud MORRONE, 2014);

iii) a vicariância entre o norte da Amazônia e as áreas remanescentes da porção noroeste, que pode estar associada à Zona de Falha Romeral e/ou à elevação do norte da

Cordilheira dos Andes, que se iniciou no Cretáceo, foi intensificada no Mioceno e finalizada no Plioceno (Figura 7.d) (LUNDBERG et al., 1998; KENNAN, 2000; CORTÉS-ORTIZ et al., 2003; GARZIONE et al., 2008; HOORN et al., 2010 apud MORRONE, 2014);

iv) a vicariância entre o Chaco e o Paraná, que pode estar relacionada à conexão das bacias do Parnaíba e Paraná durante o Paleoceno (Figura 7.g) (AMORIM, 2001; NIHEI; CARVALHO, 2004 apud MORRONE, 2014).

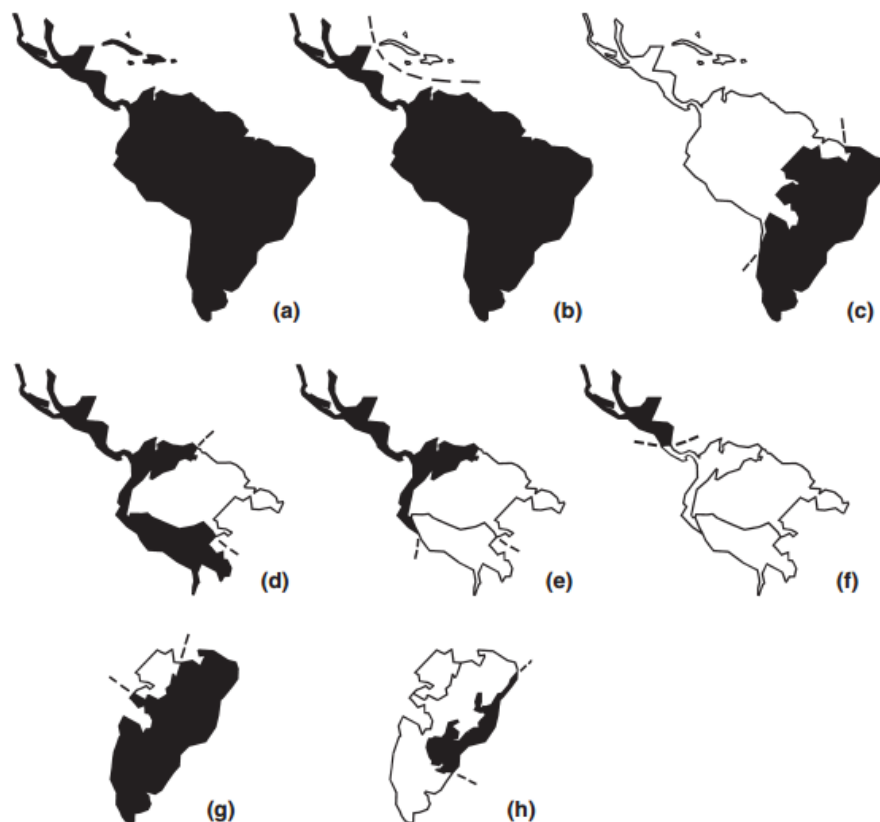


Figura 7 – Sequência de eventos biogeográficos sugeridos pelo cladograma de área geral de Morrone (2014). (a) Geodispersão da biota Neotropical da América do Sul para a América do Norte; (b) vicariância entre as Antilhas e a massa continental sudeste; (c) vicariância entre as porções noroeste e sudeste da América do Sul; (d) vicariância entre o norte da Amazônia e o restante da porção noroeste; (e) vicariância entre o sudoeste da Amazônia e o noroeste da América do Sul e Mesoamérica; (f) vicariância entre o noroeste da América do Sul e Mesoamérica; (g) vicariância entre o sul da Amazônia e o Chaco-Paraná; (h) vicariância entre o Chaco e o Paraná. Fonte: MORRONE, 2014, p. 209.

Diversos autores, trabalhando com diferentes táxons, corroboram a dispersão das biotas entre a América do Sul e América do Norte, e, além disso, reconhecem dois *cenocrons*¹, um chamado de “Velho Sul” ou “Neotropical antigo” (que teria dispersado entre o Cretáceo e o Paleoceno), e outro, mais recente, que teria dispersado entre o Plioceno e o Pleistoceno, depois do estabelecimento do istmo do Panamá, há aproximadamente 4,6

¹ Conjuntos de táxons que dividem a mesma história biogeográfica.

milhões de anos (MORRONE, 2014). Hennig (1965), um dos primeiros a propor hipóteses a respeito da presença de algumas espécies no continente sul-americano, afirma que houve intercâmbio faunístico entre as Américas em diversas ocasiões – a América do Sul, isolada desde o início do Terciário, foi reconectada ao restante do continente no Plioceno pela elevação do istmo do Panamá, o que permitiu a dispersão continental de diversos grupos de espécies.

Ainda para tentar esclarecer aspectos a respeito da biogeografia da região Neotropical, Carvalho e Couri (2010) utilizaram espécies da família Muscidae (Insecta: Diptera) como organismos modelos em sua pesquisa – como os dípteros estão entre os táxons mais bem catalogados em todas as regiões biogeográficas, a ordem Diptera, no geral, é considerada um bom modelo para estudos biogeográficos (CARVALHO; COURI, 2010). Em relação a esse grupo de organismos, Michelsens (1991) propôs que o processo de dispersão de espécies dos gêneros *Coenosopsia* e *Phaonantho* (Diptera: Muscidae) teria ocorrido da América do Norte para o Sul através de conexões terrestres. Para cupins, entretanto, são bastante incipientes os estudos biogeográficos e filogeográficos que abrangem a região Neotropical. Além disso, como mostra a Figura 8, o número de publicações envolvendo filogeografia para essa região é muito pouco expressivo se comparado a outras regiões (MARTINS, DOMINGUES, 2010) – aproximadamente 75 para a região Neotropical e 775 para o restante do mundo no período de 1987 a 2008.

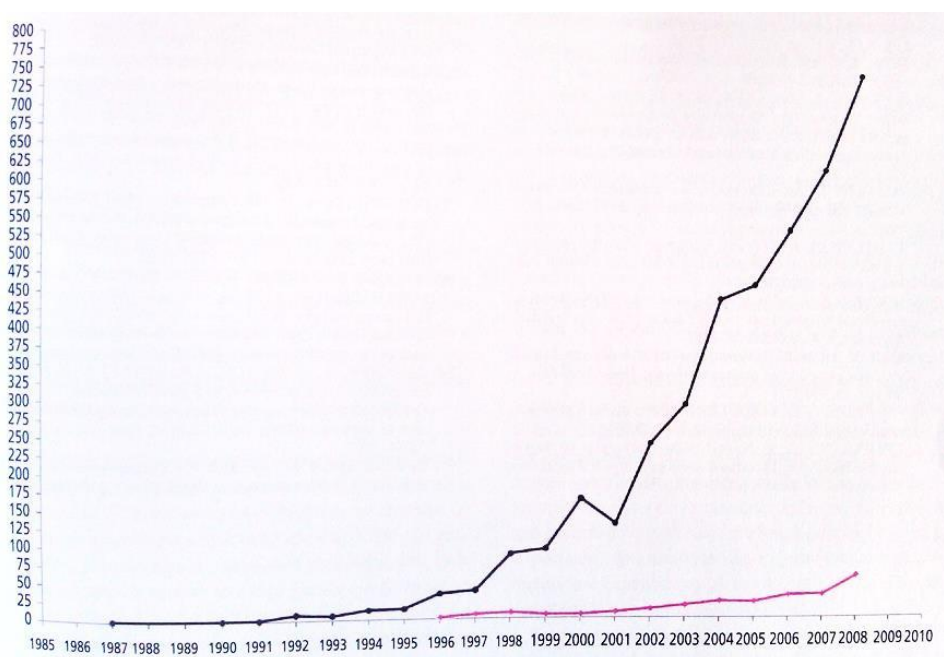


Figura 8 – Gráfico representando o número de publicações em filogeografia para a região Neotropical (linha cor de rosa) e para o restante do mundo (linha preta), de 1987 a meados de 2008. Fonte: MARTINS; DOMINGUES, 2010, p. 149.

Diversos autores afirmam que não é possível levantar somente uma hipótese para esclarecer aspectos da distribuição da biota Neotropical. Pires e Marinoni (2010), por exemplo, sugerem que, diante da ausência de informações temporais (inferidas através de filogenias moleculares), não se pode afirmar com absoluta certeza que um determinado padrão geral surgiu a partir de uma única história comum de diversificação biótica. Nesse sentido, análises filogenéticas moleculares, calibradas temporalmente, permitem compreender com mais clareza uma sequência de eventos históricos e biogeográficos que levaram à diversificação da biota da região Neotropical.

2.3.1 Biogeografia da Mata Atlântica

Há aproximadamente 500 anos, anterior a chegada dos colonizadores europeus ao território brasileiro, a Mata Atlântica cobria toda a extensão da costa leste brasileira, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, limitando-se, nas bordas a oeste, pelo Cerrado e pela Caatinga. Devido a essa grande extensão, é possível observar ampla variação nas características dessa floresta, que é bastante úmida próxima ao litoral e mais seca no interior, além de ser mais quente em baixas latitudes e com invernos rigorosos nos limites ao sul. Toda essa variação climática faz com que a Mata Atlântica possa ser dividida em diferentes tipos de florestas, o que influencia, conseqüentemente, os processos que determinam a composição e diversificação dos táxons encontrados nessas regiões (DASILVA; PINTO-DA-ROCHA, 2010).

É consenso entre diversos autores que a Mata Atlântica surgiu entre o final do Paleoceno e início do Eoceno (aproximadamente 50 Ma), quando o clima predominantemente quente e úmido favoreceu a diversificação das angiospermas, o que garantiu a manutenção das florestas úmidas da América do Sul – nessa época, as florestas provavelmente cobriam toda a extensão longitudinal do continente, do oceano Pacífico ao Atlântico. A partir do Plioceno, porém, a expansão de grandes áreas abertas savânicas (que, hoje, correspondem a Diagonal de Formações Abertas da América do Sul) isolou a Mata Atlântica das outras florestas sul-americanas, o que resultou, ao longo do tempo, em um alto nível de diversificação de espécies dentro de seus limites (DASILVA; PINTO-DA-ROCHA, 2010).

Alguns estudos apontam, porém, que a biota da Mata Atlântica é composta por táxons de diferentes origens biogeográficas, e indicam relações próximas entre essa biota e a da porção sudeste da Floresta Amazônica. A respeito disso, Costa (2003) realizou uma análise filogeográfica comparativa de pequenos mamíferos distribuídos tanto na Mata Atlântica

quanto na Floresta Amazônica. Os resultados desse trabalho indicaram que a similaridade das sequências nucleotídicas analisadas foi, muitas vezes, maior entre as amostras das duas florestas do que entre as amostras de um mesmo bioma. Além disso, os clados da Mata Atlântica se posicionaram como grupos irmãos de todos os outros clados analisados.

A grande questão central a respeito da grande diversificação e do alto nível de endemismo observados na Mata Atlântica se refere a quais processos teriam sido responsáveis por esse padrão. A respeito disso, ressalta-se a importância de se analisar a história filogenética dos táxons encontrados na Mata Atlântica. Visto isso, DaSilva e Pinto-da-Rocha (2010) desenvolveram um trabalho utilizando, como modelo, opiliões (Arachnida) da família Gonyleptidae – bastante diversa e endêmica da Mata Atlântica – com o objetivo de procurar padrões comuns de distribuição que podem indicar eventos históricos que ocorreram na história biogeográfica desse bioma. De acordo com os resultados dessa pesquisa, a diversificação na floresta Atlântica parece ter sido impulsionada por processos cíclicos de restrição e vicariância, alternados com simpatria e dispersão. Porém, os autores consideram que processos propostos por modelos diferentes podem se complementar para explicar padrões de especiação e diversidade, como, por exemplo, informações sobre a história geomorfológica da região. Assim,

[...] o tectonismo que abre o vale e forma a serra teria influenciado a formação de refúgios florestais em momentos diferentes e alternados, que, por sua vez, teriam sido influenciados por escarpas e vales, alternados por transgressões marinhas e influência sedimentar-marinha. Esses processos funcionam de forma dinâmica e conjunta e não impedem a formação de um padrão geral [...]. Pelo, contrário, ele sugere que o entendimento detalhado das relações biogeográficas entre as áreas de Mata Atlântica e de seu próprio passado depende da compreensão de uma história geomorfológica e climática bastante complexa (DASILVA; PINTO-DA-ROCHA, 2010, p. 237).

2.3.2 Biogeografia da Diagonal de Formações Abertas Secas da América do Sul

A área de abrangência da Diagonal de Formações Abertas Secas da América do Sul se estende do Nordeste do Brasil ao Noroeste da Argentina, incluindo as províncias biogeográficas da Caatinga, Chaco e Cerrado. Essa região tem como características predominantes o clima sazonal e a restrição hídrica em determinada parte do ano, e apresenta uma grande variedade de formações de vegetação aberta (ZANELLA, 2010). Das três províncias, o Cerrado é a que apresenta maiores volumes de chuva, o que torna a Caatinga (isolada entre áreas mais chuvosas) e o Chaco (vizinho de áreas mais úmidas a leste e a oeste) dois polos de maior aridez. A maior parte do Cerrado está localizada sobre o Planalto Central

Brasileiro (com altitude variando entre 500 e 1200m), e apresenta solos bastante ácidos e pobres em nutrientes. A Caatinga está localizada em terras baixas, com depressões interplanálticas de solos rasos. O Chaco também está localizado em terras baixas, porém em uma ampla planície bastante uniforme. A Caatinga e o Cerrado são tipicamente tropicais, enquanto que o Chaco, localizado em posição subtropical, apresenta grande variação sazonal, mas com um verão tipicamente quente – apresentando temperaturas que podem chegar a 49°C – e chuvoso (ZANELLA, 2010).

Quanto à origem de cada uma dessas províncias, Zanella (2010) afirma que os extensos planaltos que compõem o Cerrado provavelmente foram formados durante o período Terciário. A partir da metade do Oligoceno, quando o clima se tornou mais frio e seco, houve uma intensificação na formação de solos sedimentares mais profundos. A origem do Chaco, por sua vez, está relacionada ao soerguimento da Cordilheira dos Andes (entre o Plioceno e o Pleistoceno), que deu origem à extensa planície sedimentar, que abriga essa província, e que afetou a América do Sul como um todo, elevando, também, o Planalto Central Brasileiro. A elevação desse Planalto causou grande desnudação do Nordeste brasileiro, originando, assim, a Caatinga, que, segundo Gottsberger e Silberbauer-Gottsberger (2006), surgiu concomitantemente ao Cerrado.

A respeito da origem e diversificação da biota encontrada nas áreas da Diagonal de Formações Abertas Secas, Zanella (2010) ressalta a importância do soerguimento do istmo do Panamá, que permitiu o intercâmbio de diversos táxons que ocuparam essa região e se diversificaram ao longo do tempo, como grupos de cervos, felinos, canídeos, porcos-do-mato, abelhas mamangavas sociais e abelhas solitárias. Os eventos que levaram à diversificação desses grupos, porém, ainda não estão bem esclarecidos. Entretanto, sabe-se que existiram duas rotas para essa ocupação: uma pelas terras altas dos Andes e outra pelas terras baixas do leste do continente sul-americano (ZANELLA, 2010).

Considerando que o surgimento da Diagonal de Formações Abertas Secas separou as florestas tropicais da América do Sul (Floresta Amazônia e Mata Atlântica), Sigrist e Carvalho (2009) – utilizando a Análise de Parcimônia de Brooks (BPA – *Brooks parsimony analysis*) – analisaram as relações históricas entre esses biomas, a fim de analisar as influências da Diagonal nas histórias evolutivas das biotas das florestas adjacentes. Nessa análise, os autores encontraram uma divisão basal entre a Amazônia e a Mata Atlântica, sugerindo que elas tem estado isoladas por um longo período de tempo. Porém, quando os autores adicionaram o Cerrado e a Caatinga às análises, as relações internas dentro dos clados da Amazônia mudaram, sugerindo que uma classificação biogeográfica que compreenda

ambas as florestas e as áreas de vegetação aberta deve ser considerada, observando-se suas histórias complementares.

Henderson (1991 apud ZANELLA, 2010) ressalta que o objetivo da biogeografia deve ser o estudo da história das biotas que compõem as áreas, e não o estudo da história das áreas, por si só. Sendo assim, o autor ressalta que o reconhecimento das biotas ancestrais, junto a informações históricas e geológicas da área em questão, é essencial para o esclarecimento da história biogeográfica das regiões.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material biológico

No presente trabalho foram utilizados 230 indivíduos de *Nasutitermes corniger*, provenientes de diversas localidades ao longo da área de distribuição da espécie (Tabela 1). Parte desse material foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Eliana Marques Cancellato, curadora da coleção de Isoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Os indivíduos provenientes dos países da América Central e América do Sul (exceto Brasil) foram cedidos pelo Prof. Dr. Rudolf Scheffrahn, da Universidade da Flórida – Estados Unidos. Também foram utilizadas sequências nucleotídicas disponíveis no *GenBank*, (Tabela 1). Outra parte do material foi coletada entre os meses de novembro de 2014 e julho de 2015. Todas as amostras estão armazenadas em álcool absoluto na Coleção de Isoptera do Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. As sequências nucleotídicas de todos os indivíduos estão armazenadas no banco de dados moleculares do LaBE, cujo número de acesso corresponde ao número *voucher* apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Número *voucher*, código de localidade, localidade de procedência e coordenadas geográficas dos espécimes de *Nasutitermes corniger* utilizados neste trabalho.

Nº <i>voucher</i>	Código de localidade	Local de procedência	Coordenadas	
			Latitude	Longitude
88-95	JAB	Jaboticabal - SP	-21.25472	-48.32222
156	RO	Porto Velho - RO	-9.14664	-64.50953
158	RO	Porto Velho - RO	-9.45261	-64.39004
159	RO	Porto Velho - RO	-9.45205	-64.38508
161	RO	Porto Velho - RO	-9.45022	-64.36745
162	RO	Porto Velho - RO	-9.44910	-64.35772
163	RO	Porto Velho - RO	-8.84126	-64.06220
164	RO	Porto Velho - RO	-8.83823	-64.06554
165	RO	Porto Velho - RO	-9.60888	-65.37693
166	RO	Porto Velho - RO	-9.61876	-65.44740
167	RO	Porto Velho - RO	-9.61162	-65.45280
168	RO	Porto Velho - RO	-9.43718	-64.83201
170	RO	Porto Velho - RO	-9.59153	-65.05023
171	RO	Porto Velho - RO	-9.57909	-65.05786
172	RO	Porto Velho - RO	-9.57274	-65.06102
173	RO	Porto Velho - RO	-9.59837	-65.04759
174	RO	Porto Velho - RO	-9.61621	-65.04501
175	RO	Porto Velho - RO	-9.59471	-65.06456
176	RO	Porto Velho - RO	-9.57405	-65.07168
177	RO	Porto Velho - RO	-9.60185	-65.05691
178	RO	Porto Velho - RO	-9.60185	-65.05691
179-180	MS	Corumbá - MS	-19.57680	-57.01800
181-182	MS	Corumbá - MS	-19.30605	-57.05536
183	MS	Corumbá - MS	-19.46908	-57.02810

184-185	MS	Corumbá - MS	-19.48230	-56.99310
194	RDOM	República Dominicana (AY623100.1*)	19.221	-69.529
195	PRICO	Porto Rico (AY623098.1*)	18.283	-67.167
197	MEX	México (AY623094.1*)	17.449	-92.104
198	GUA	Guadalupe (AY623099.1*)	16.167	-61.664
199	SKN	Saint Kiss e Nevis (AY623097.1*)	17.13422	-62.60183
200	SUR	Suriname (AY623095.1*)	5.86	-55.15
201	DOM	Dominica (AY623093.1*)	15.58	-61.32
202	EQUA	Equador (AY623085.1*)	-1.90	-77.83
203	WIND	West Indies (AY486438.1*)	17.0000	-76.0000
267-269	PR	Castro - PR	-24.79430	-50.01594
270-274	MT	Cáceres - MT	-16.02350	-57.66110
275-279	MT	Cáceres - MT	-16.00293	-57.71705
280	PB	João Pessoa - PB	-7.13445	-34.84602
281	PB	João Pessoa - PB	-7.13445	-34.84602
282	PB	João Pessoa - PB	-7.13445	-34.84602
283	MG	Uberlândia - MG	-18.9113	-48.2622
297-298	PB	Santa Rita - PB	-7.11631	-34.9812
299	CE	Tauá - CE	-6.1144	-40.4477
300	GO	Avelinópolis - GO	-16.5133	-49.7372
301	MA	Bom Jesus das Selvas - MA	-4.3133	-46.5289
302-303	MA	Lago Verde - MA	-4.022	-45.0164
304	MA	Codó - MA	-4.4575	-44.1329
306	PA	São João do Araguaia - PA	-5.4739	-48.7946
307	PA	Abel Figueiredo - PA	-4.8625	-48.5467
309	TO	Brejinho de Nazaré - TO	-11.0164	-48.5689
310	TO	Ponte Alta do Tocantins - TO	-10.7436	-47.5378
311	TO	Colinas do Tocantins - TO	-7.815	-48.4529
347-348	MG	Sacramento - MG	-20.2019444	-47.122222
349	AL	Maceió - AL	-9.8586111	-35.903888
350	SE	Acaraju - SE	-10.929166	-37.0475
351	SP	Tanabi - SP	-20.619777	-49.649185
352	PGUAI	Caacupé - Paraguai	-25.38044	-57.20014
353	PGUAI	Guayaibí - Paraguai	-24.44771	-56.43303
354	PGUAI	Tacuati - Paraguai	-23.42052	-56.49494
355	PGUAI	Concepción - Paraguai	-23.05027	-56.72764
356	PGUAI	Asuncion - Paraguai	-25.27856	-57.63545
357	PGUAI	Yaguarón - Paraguai	-25.56204	-57.28416
358	PMA	Santiago - Panamá	8.15942	-81.05536
359	PMA	Las Lajas - Panamá	8.17263	-81.86517
360	PMA	Punta Robalo - Panamá	9.04350	-82.29374
361	PMA	Canas Gordas - Panamá	8.63203	-82.82654
362	PMA	Santa Marta - Panamá	8.33266	-82.67223
363	PMA	Lajas de Tole - Panamá	8.18740	-81.72511
364	PMA	Los Piedras - Panamá	8.62902	-80.48495
365	PRU	Satipo - Peru	-11.28681	-74.67691
366	PRU	Rio Negro - Peru	-11.18070	-74.68987
367	PRU	Rio Negro - Peru	-11.18987	-74.66985
368	PRU	Bajo Pichanaqui - Peru	-11.06414	-74.71955
369	PRU	Pto. Inca - Peru	-9.46759	-75.02367
370	PRU	Pucallpa - Peru	-8.36714	-74.71778
371-372	PRU	Von Humbolt - Peru	-8.85449	-75.11904
373	BOL	Flora & Fauna Hotel - Bolívia	-17.49893	-63.65244
374	BOL	Villa Tunari - Bolívia	-16.97043	-65.21001
375	BOL	San Pedro - Bolívia	-14.42390	-64.86053
376	BOL	Limoncito - Bolívia	-18.24663	-59.91882
377	BOL	Yacuces - Bolívia	-18.98723	-58.24453
378	BOL	Los Volcanes - Bolívia	-18.10037	-63.59343
379	VEN	Tucacas - Venezuela	10.86081	-68.33140
380	VEN	Churaguara - Venezuela	10.67215	-69.24857

381	VEN	San Filipi - Venezuela	10.59770	-68.64485
382	VEN	Yurubi - Venezuela	10.36432	-68.74982
383	VEN	San Sabastian - Venezuela	10.40245	-68.00039
384	JAM	Windsor Forest - Jamaica	18.11114	-76.34124
385	JAM	Ginger House - Jamaica	18.05814	-76.41414
387	JAM	School of Agric. Port Antonio - Jamaica	18.19923	-76.48380
388	JAM	St. Ann's - Jamaica	18.38411	-77.27663
389	HON	Lancetilla Botanical - Honduras	15.74626	-87.45343
390	HON	San Juan Bosque - Honduras	15.64030	-87.17666
391	HON	Coyolito - Honduras	13.31492	-87.62271
392	HON	Santa Barbara - Honduras	12.46915	-87.58688
393	BLZ	Punta Gorda - Belize	16.09112	-88.80841
394	BLZ	Jaguar Reef Lodge - Belize	16.83997	-88.27174
395	BLZ	Mayflower Natl Park - Belize	16.93243	-88.38291
396	NIC	Ometepe - Nicaragua	11.52188	-85.71052
397	NIC	Road to Cardenas - Nicaragua	11.23548	-85.59799
398	NIC	Lake Masaya - Nicaragua	11.97336	-86.12502
399	GTM	San Carlos - Guatemala	15.78895	-88.84182
400	GTM	Livingston beach - Guatemala	15.82811	-88.74756
401	GTM	Cerro San Gil Protected Area - Guatemala	15.68554	-88.64486
402	MEX	Mexico	19.23112	-90.84244
403	MEX	Coba - Mexico	20.48872	-87.73501
405	TT	PAX upper trail - Trinidad e Tobago	10.66400	-61.40400
406	TT	Grand Riviere - Trinidad e Tobago	10.83000	-61.04400
407	BRW	Dania - Broward	26.06902	-80.16941
408	BRW	Dania Beach - Broward	26.06403	-80.17375
409	BHM	Treasure Cay resort - Bahamas	26.67635	-77.28432
410	BHM	Treasure Cay resort - Bahamas	26.67643	-77.28560
411	STL	Coconut Bay Resort - St. Lucia	13.73000	-60.94000
412	SKN	Church Grounds - St Kitts-Nevis	17.13422	-62.60183
413	DOM	Crompton Point - Dominica	15.58333	-61.31667
415	UST	Highway 902 - U.S. Terr.	18.10167	-65.91272
416	CRICA	La Selva Biological Station - Costa Rica	10.42540	-84.00220
417	CAY	Fountain Court - Ilhas Cayman	19.28423	-81.38697
418	RDOM	Enriquillo - Rep. Dominicana	18.00078	-71.35010
419	GRAN	Jessamine Vale - Granada	12.09006	-61.73523
420	GUA	Highway D23 - Guadalupe	16.18393	-61.77020
437-438	MG	Ipaba - MG	-19.4623	-42.43
439-440	MG	Caratinga - MG	-19.4562	-42.3004
441-442	MG	Ipanema - MG	-19.7245	-41.8028
443-444; 455	MG	Ipanema - MG	-19.6985	-41.8241
445	MG	Penha do Capim - MG	-19.6284	-41.2483
446	ES	Itapina - ES	-19.5118	-40.8472
447	ES	Colatina - ES	-19.5099	-40.5591
448	ES	Sooretama - ES	-18.9897	-40.038
449	ES	Sooretama - ES	-18.9967	-40.1267
450	ES	Aracruz - ES	-19.821	-40.1537
451	ES	Fundão - ES	-20.0372	-40.1769
452	ES	São José do Calçado - ES	-21.0575	-41.657
453	ES	São José do Calçado - ES	-21.5	-42.083333
454	MG	São Geraldo - MG	-21.8315	-42.6069
456	GO	Goiânia - GO	-16.5843	-49.1614
469	PR	Céu Azul - PR	-25.175126	-53.913901
470	PR	Ivaílandia - PR	-23.710449	-52.160627
471	PR	Floresta - PR	-23.598891	-52.07929
472-473	PR	Maringá - PR	-23.497496	-52.014919
474	PR	Maringá - PR	-23.279694	-51.888869
475	PR	Santa Fé - PR	-23.056231	-51.82309
476	PR	Nossa Senhora das Graças - PR	-22.882321	-51.790357
477	SP	Itororó - SP	-22.580632	-51.707383

478	SP	Tarabá - SP	-22.3660206	-51.583056
479	SP	Pirapozinho - SP	-22.271347	-51.484303
480	SP	Presidente Prudente - SP	-22.173129	-51.344981
481	SP	Martinópolis - SP	-22.081654	-51.12027
482	SP	Osvaldo Cruz - SP	-21.874343	-50.8583
483	SP	Olímpia - SP	-20.72184	-48.869361
487-495; 502-509	BA	Entre Rios - BA	-11.9419444	-38.08444
496-501	BA	Alagoinhas - BA	-12.13555	-38.419166
511	ES	Colatina - ES	-19.5099	-40.5591
512	ES	Sooretama - ES	-18.9897	-40.038
513	SP	Ribeirão Preto - SP	-21.225277	-47.8272222
515	SP	Ribeirão Preto - SP	-21.178055	-47.78
583	GO	Ivolândia - GO	-16.6101	-50.9525
584	MG	Paracatu - MG	-17.2108	-46.8956
585	MT	Araguainha - MT	-16.7994	-52.9446
586	GO	Firminópolis - GO	-16.5697	-50.3082
587	MG	Paracatu - MG	-16.8409	-53.027
588	MS	Paraíso das Águas - MS	-19.0462	-53.0096
589	GO	Ivolândia - GO	-16.6068	-50.9086
590	MT	Pedra Preta - MT	-16.6068	-54.4709
591	MG	Paracatu - MG	-17.1896	-46.9226
592	GO	Piranhas - GO	-16.4256	-51.8316
593	MS	Coxim - MS	-18.495	-54.6354
594	MS	Campo Grande - MS	-20.4877	-54.8131
595	MS	Antônio João - MS	-22.2159	-55.9236
596	MS	Perdido - MS	-21.7419	-57.1254
597	MS	Camapuã - MS	-19.5211	-54.0406
598	MS	Bandeirantes - MS	-19.8639	-54.3688
599	MS	Costa Rica - MS	-18.5641	-53.121
600	MT	Pedra Preta - MT	-16.549	-54.5748
601	MS	Dourados - MS	-22.2334	-54.5815
602	MS	Ivinheima - MS	-22.3337	-53.7695
603	MS	Anastácio - MS	-20.7137	-55.9087
604	GO	Diorama - GO	-16.3947	-51.2571
605	PB	João Pessoa - PB	-7.13445	-34.84602
606	PB	Mamanguape - PB	-6.7416	-35.1405
Total: 230 indivíduos		180 localidades	-	-

* Número de acesso da sequência no *GenBank*.

3.2 Obtenção das sequências de 16S rDNA

Extração do DNA total: Para obtenção do DNA total foi utilizada a metodologia de Liu e Beckenbach (1992). As cabeças dos insetos foram retiradas, colocadas em tubo com 60µL de tampão com proteinase (0,1M Tris-OH, pH 8.0, 0,05M EDTA, 0,2M NaCl, 1% SDS, com 20 mg/µL de proteinase K), maceradas e imediatamente colocadas em banho-maria a 65°C por, aproximadamente, 2 horas. A solução resultante foi extraída com Fenol (saturado com 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) e clorofórmio/álcool-isoamílico (24/1). Após o sobrenadante ser extraído, adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto para a precipitação do DNA. A suspensão foi centrifugada a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos, lavada duas vezes com etanol 70%, secada naturalmente e dissolvida em 30µL de água estéril bidestilada.

Amplificação do gene 16S rDNA: Para amplificação parcial do gene mitocondrial 16S rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos *LR-J-13007* (KAMBHAMPATI, 1995) e *LR-N-1398* (XIONG; KOSHER, 1991), em uma reação de PCR com volume total igual a 25µL (3µL de cada um dos oligonucleotídeos a 5 pmol; 4µL de água deionizada; 12,5µL de PCR master mix Promega®; e 2,5µL de amostra de DNA total). Esta reação foi submetida à amplificação nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial; seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento, 72°C por 1 minuto e 15 segundos para extensão; e, por fim, 72°C por 7 minutos para extensão final (LEGENDRE et al., 2008). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo, e visualizado em luz ultravioleta para checagem da especificidade do fragmento e monitoramento de contaminação.

Purificação do produto de PCR: O produto da PCR foi tratado com o conjunto de reagentes *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*, seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 20 µL de produto de PCR e 40 µL de “*Binding Buffer NTI*” em um mesmo tubo. A solução resultante foi transferida para uma coluna de purificação acoplada a um tubo coletor, e foi submetida a sucessivas lavagens com “*Wash Buffer NT3*”, álcool absoluto e álcool 70%, seguidas de centrifugações a 14000 rpm. A última etapa consistiu na lavagem do DNA, ligado à coluna de purificação, com “*Elution Buffer NE*”.

Reação de Sequenciamento do gene 16S rDNA: As amostras foram sequenciadas através do conjunto de reagentes “*Big Dye*” (Perkin-Elmer) no sequenciador automático *ABI 3730 XL DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia (CA)), seguindo-se as instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi submetida aos mesmos ciclos da reação de amplificação do fragmento do gene mitocondrial.

3.3 Análise dos dados

Análise das sequências nucleotídicas: As sequências nucleotídicas foram lidas através do *software* Chromas Lite v. 2.01 (Technelysium Ltd., 2005) e alinhadas com o auxílio do programa BioEdit v. 7.0.9.0 (HALL, 1999), através da ferramenta ClustalW, seguida de inspeção manual.

Estatística descritiva: Através do programa DnaSP v. 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009), foram realizadas as análises de estatística descritiva, que visam quantificar a variação presente nas sequências de DNA. Para tal, foram estimados os seguintes parâmetros: quantidade de sítios polimórficos ou segregantes (S) – número de sítios que mostram variação entre as sequências amostradas e os sítios monomórficos; diversidade nucleotídica (π) – número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências; número médio de diferenças nucleotídicas (k) – médias das diferenças nucleotídicas entre pares de sequências tomadas ao acaso na população amostrada; e diversidade haplotípica (Hd) – medida de variação genética considerando o número real de mudanças de base entre as sequências. Através do programa MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013) foi estimada a porcentagem média de cada uma das bases nitrogenadas (A, T, C e G) na composição das sequências de mtDNA dos indivíduos amostrados, bem como os valores de distância genética entre as sequências.

Testes de neutralidade e *Mismatch Distribution*: Foram realizados os testes de F_s de Fu e D de Tajima por meio do programa DnaSP v. 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Os testes de neutralidade avaliam se os polimorfismos observados nas sequências seguem o modelo de variação neutra, entretanto os cálculos para cada teste são baseados em parâmetros distintos. O teste F_s de Fu é baseado na distribuição de frequência dos haplótipos em função de θ (“teta”) ($\theta=4N\mu$, em que N corresponde ao tamanho efetivo da população e μ à taxa de mutação por sequência por geração). Valores negativos e significativos para F_s são indicativos de expansão populacional (FU, 1997). O teste D de Tajima baseia-se nas diferenças entre o número de sítios segregantes (polimórficos) e o número de diferenças nucleotídicas. Valores negativos e significativos para o D de Tajima sugerem seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional; enquanto que os valores positivos são indicativos de seleção estabilizadora ou contração populacional (TAJIMA, 1989). A *Mismatch Distribution*, também realizada por meio do programa DnaSP v. 5.10.01, avalia a distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos, investigando a história demográfica das populações. Ela permite discriminar entre populações que permaneceram estáveis ao longo do tempo (curvas multimodais) e populações que sofreram expansão demográfica a partir de uma população fundadora pequena (curva unimodal) (ROGERS; HARPENDING, 1992; MOUSSET et al., 2004; LOPES, 2006; AOKI et al., 2008).

Análise de similaridade genética: A análise de similaridade genética *Neighbor-joining* e a distância genética entre as populações foram obtidas com o auxílio do programa MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013). A distância genética pode variar entre 0 e 1, sendo que

quanto mais próximo de 1, mais distante geneticamente são as populações analisadas. O método de análise de similaridade genética *Neighbor-joining* tem como premissa encontrar pares de unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic units* – OTU [=neighbors]) que minimizem o comprimento total do ramo em cada estágio do agrupamento das OTUs. Para essa análise foi utilizado o modelo de correção Kimura-2-parâmetros (K2P). Uma sequência nucleotídica do gene 16S rDNA de *Nasutitermes guayanae* foi utilizada como grupo externo para polarizar a árvore.

Análises Filogeográficas: Para as análises filogeográficas foi utilizada a NCPA (*Nested Clade Phylogeographic Analysis*), que propõe a investigação dos processos históricos que determinaram a evolução das populações. Para esta análise, uma rede haplotípica foi obtida com o auxílio do programa TCS v.1.21 (CLEMENT et al., 2000), que baseia-se na parcimônia estatística, e aninhada manualmente de acordo com a metodologia proposta por Templeton et al. (1987). Por meio do programa *GeoDis* v.2.5 (POSADA et al., 2000) foram calculados os valores de Dc (distância do clado), Dn (distância do clado agrupado) e I-T (interior-extremidade) para os clados formados na rede haplotípica. A análise combinada dos índices Dc, que mede a amplitude da distribuição geográfica de um determinado haplótipo, e Dn, que mede a distância média de haplótipos do clado de interesse, em relação ao centro geográfico de distribuição dos haplótipos do clado no nível superior da categoria aninhada, possibilitou que fosse testada a hipótese nula de não associação entre a distribuição geográfica da espécie e sua genealogia (TEMPLETON et al., 1995; TEMPLETON, 1998). Em cada categoria aninhada também foi realizado o teste estatístico interior-extremidade (I-T). Ao final do processo, os índices calculados (Dc, Dn e I-T) e sua significância foram testados na chave de inferências filogeográficas de Templeton (2004). Para verificação do resultado obtido a partir dessa chave, foi realizado o teste de Mantel através do programa *Alleles in Space* (AIS) v.1.0 (MILLER, 2005), um teste estatístico que avalia a correlação entre duas matrizes de dissimilaridade: uma matriz de distância genética e uma matriz de distância geográfica (gerada a partir das coordenadas geográficas das localidades de coleta) para todos os indivíduos amostrados. O teste de Mantel mede o grau de associação entre as duas matrizes a partir do valor e da significância do coeficiente de correlação de Pearson (r) resultante, que varia de -1 a 1. Valores de r significativos e mais próximos de 1 indicam forte correlação positiva entre as duas variáveis, enquanto que valores significativos mais próximos de -1 indicam forte correlação negativa entre as variáveis (isto é, se uma aumenta, a outra diminui). Valores iguais a 0 indicam que não há correlação linear entre as matrizes.

Análise de Variância Molecular (AMOVA): Através do programa Arlequin v. 3.11 (EXCOFFIER, 2005) foi realizada a AMOVA, construída a partir da análise hierárquica da variância, que estabelece uma partição da variação total em componentes de covariância devido à diferença entre indivíduos dentro de populações (F_{ST}), entre populações do mesmo grupo (F_{SC}) e entre grupos (F_{CT}) (EXCOFFIER et al., 1992). Quando a análise é feita utilizando-se apenas dois níveis hierárquicos (dentro de populações e entre populações), o valor de F_{ST} indica a variação entre populações. Os grupos utilizados para essa análise foram estabelecidos de acordo com os agrupamentos observados na rede haplotípica gerada.

Análises Filogenéticas: Para se entender as relações evolutivas entre as populações e possíveis linhagens de acordo com o grau de estruturação encontrado, foi realizada a análise de inferência Bayesiana. O melhor modelo de substituição nucleotídica para essa análise foi selecionado através do programa Mega v.6 (TAMURA et al., 2013), utilizando-se o *Bayesian Information Criterion* (DARRIBA et al., 2012). A reconstrução filogenética por inferência Bayesiana, assim como as estimativas do tempo de divergência entre as linhagens, foram realizadas através do programa BEAST 1.8.0 (DRUMMOND et al., 2013), utilizando-se *Lognormal Relaxed Clock* como tipo de relógio molecular – calibrado com um valor de taxa de mutação (*mean*) igual a 0,00000000187 e desvio padrão (*stdev*) igual a 0,0000000000105, valores apresentados por Velonà (2010) para o gene mitocondrial COII – e *Coalescent: Constant size* como tipo de árvore a ser gerada. Uma sequência de 16S rDNA de *Spinitermes longiceps* e uma de *Spinitermes robustus*, espécies da família Termitidae, subfamília Termitinae, foram usadas para polarizar a árvore.

4 RESULTADOS

4.1 Estatística descritiva

No total, foram obtidas 230 sequências parciais do gene 16S rDNA de amostras de *Nasutitermes corniger*, provenientes de diversas localidades da região Neotropical (Tabela 1). Após alinhamento de todas as sequências e inspeção manual, obtiveram-se sequências contendo 401 pares de base. Dentre as 230 sequências, foram encontrados 33 sítios polimórficos (S) e 45 haplótipos, com diversidade haplotípica (Hd) igual a 0,880, considerada bastante elevada. A diversidade nucleotídica (π) encontrada foi de 0,00505 e o número médio de diferenças nucleotídicas (k) foi de 1,988. Quanto à composição nucleotídica das sequências de mtDNA obtidas, observou-se que, em média, 25,2% correspondem a base timina (T), 21,1% correspondem a base citosina (C), 42,7% correspondem a base adenina (A) e 11,0% correspondem a base guanina (G). Como pode ser observado, a porcentagem de bases A-T é superior a porcentagem de base C-G, característica esperada para genomas de insetos.

4.2 Rede haplotípica e análises filogeográficas

A rede haplotípica gerada (Figura 9) agrupou todos os indivíduos de *N. corniger* de acordo com seu respectivo haplótipo (Tabela 2). Na rede também foi possível observar as relações de proximidade entre os haplótipos encontrados, a partir das linhas que indicam os passos mutacionais entre um haplótipo e outro. Além disso, a rede haplotípica gerada evidenciou seis grandes agrupamentos de haplótipos (Figura 9). Os haplótipos obtidos estão plotados ao longo da região Neotropical, como mostra a Figura 10.

Para a *Nested Clade Phylogeographic Analysis* (NCPA) a rede foi aninhada manualmente (Figura 11), obtendo-se um total de 31 clados. Para a matriz da NCPA, porém, foram desconsiderados os clados que não apresentavam variações geográficas entre seus haplótipos relacionados e os clados com apenas um haplótipo agrupado, o que resultou num total de 19 clados a serem analisados. Entre os 19 clados, 11 geraram resultados significativos, incluindo todos os de alto nível (níveis três e quatro) (Tabela 3).

Tabela 2 – Relação entre os haplótipos, sua frequência, compartilhamento com os indivíduos de *N. corniger* e alocação no respectivo agrupamento na rede haplotípica (Figura 9). As letras antes dos números *voucher* de cada indivíduo (última coluna) correspondem ao seu respectivo código de localidade.

Agrupamento	Haplótipo	Frequência	Indivíduos que contém o haplótipo
1	I	21	RDOM194, DOM201, CE299, GO300, MA301, MA303, MA304, TO309, PMA361, PMA362, PMA363, HON389, HON390, HON391, HON392, NIC396, NIC397, NIC398, DOM413, GO456, GO589
	II	1	PRU371
	III	2	PRICO195, UST415
	IV	1	SUR200
	V	1	TT405
	VI	1	MS593
	VII	1	GRAN419
	VIII	1	TT406
	IX	4	JAM384, JAM385, JAM387, JAM388
	X	4	VEN379, VEN380, VEN381, VEN383
	XI	1	VEN382
	XII	2	PA306, BA506
	XIII	3	WIND203, BRW407, BRW408
	XIV	4	GUA198, SKN199, SKN412, GUA420
2	XV	11	MEX197, EQUA202, MA302, BLZ393, BLZ394, BLZ395, GTM399, GTM400, GTM401, MEX402, MEX403
	XVI	1	STL411
	XVII	4	PMA360, BHM409, BHM410, CRICA416
	XVIII	3	PMA358, PMA359, CAY417
	XIX	1	PMA364
	XX	1	RDOM418
3	XXI	19	PR267, PR268, PR269, MT270, MT271, MT272, MT273, MT274, MT275, MT276, MT277, MT278, MT279, PRU370, PRU372, BOL373, BOL374, BOL375, BOL376
	XXII	9	RO165, RO170, RO171, RO173, RO174, RO175, RO176, RO177, RO178
	XXIII	1	RO172
	XXIV	2	RO166, RO167
	XXV	1	RO168
	XXVI	1	BOL378
	XXVII	4	PGUAI352, PGUAI353, PGUAI354, PGUAI357
	XXVIII	5	MS180, MS182, BOL377, MS596, MS603
	XXIX	4	MS179, MS181, MS184, MS185
	XXX	4	PRU365, PRU366, PRU367, PRU368

4	XXXI	8	RO156, RO158, RO159, RO162, RO163, RO164, TO310, TO311
	XXXII	1	PRU369
	XXXIII	1	RO161
	XXXIV	25	PGUAI355, PGUAI356, PR469, PR470, PR471, PR472, PR473, PR474, PR475, PR476, SP477, SP478, SP479, SP480, SP481, MT585, MS588, MS594, MS595, MS597, MS598, MS599, MT600, MS601, MS602
	XXXV	1	MS183
	XXXVI	1	MT590
5	XXXVII	22	JAB88, JAB89, JAB90, JAB91, JAB92, JAB93, JAB94, JAB95, PB281, PB282, MG283, PB298, MG347, MG348, SE350, TAN351, SP482, SP483, SP513, SP515, MG587, PB606
	XXXVIII	5	GO583, MG584, GO586, MG591, GO604
	XXXIX	1	PA307
	XL	1	PB280
	XLI	1	AL349
6	XLII	36	MG437, MG438, MG439, MG440, MG441, MG442, MG443, MG444, MG445, ES446, ES447, ES448, ES449, ES450, ES451, ES452, RJ453, MG454, MG455, BA487, BA490, BA491, BA492, BA493, BA494, BA495, BA498, BA502, BA503, BA504, BA505, BA507, ES511, ES512, GO592, PB605
	XLIII	6	BA496, BA499, BA500, BA501, BA508, BA509
	XLIV	2	BA488, BA489
	XLV	1	PB297

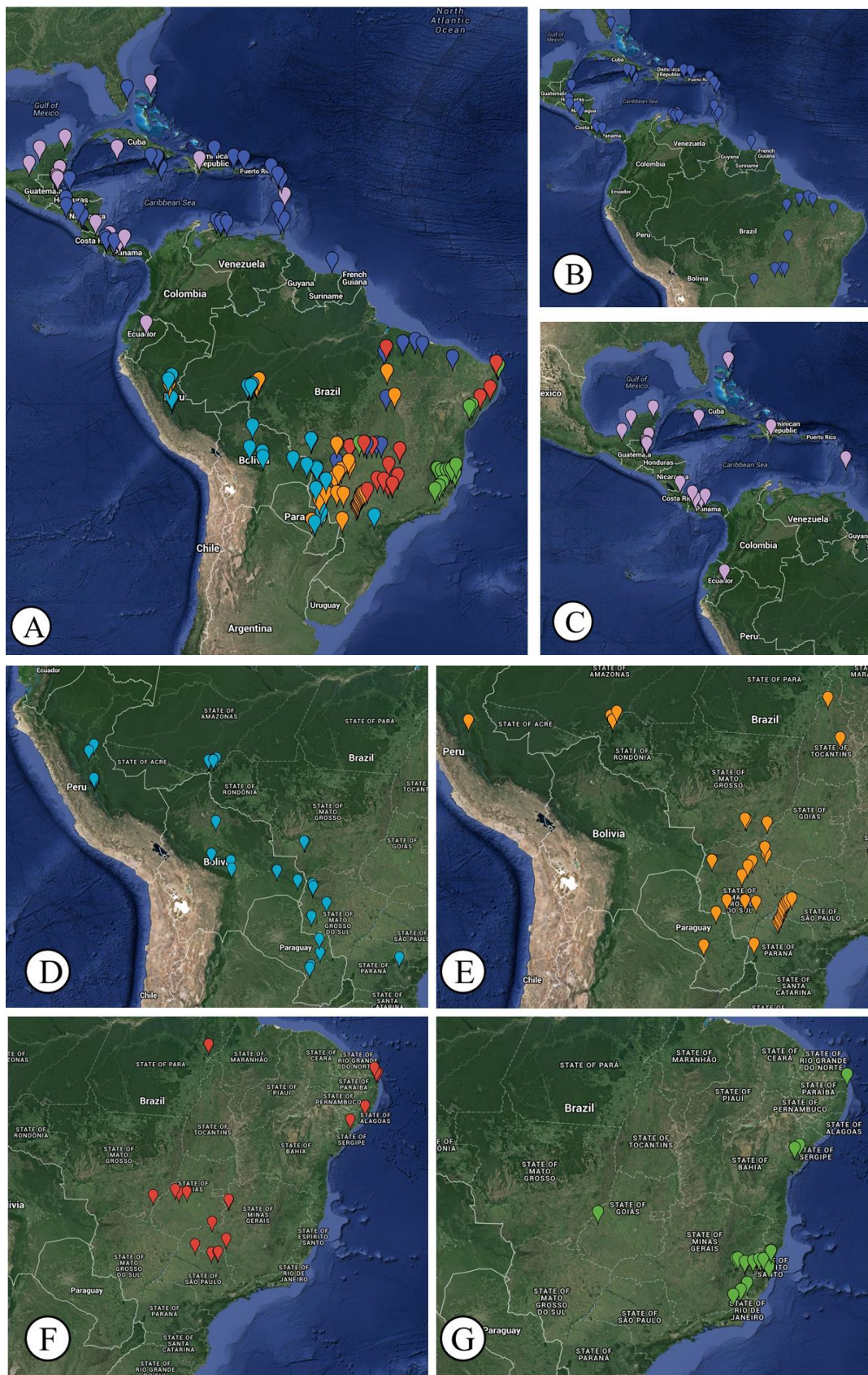


Figura 10 – Mapas evidenciando a distribuição dos haplótipos obtidos neste trabalho. **(A)** Todos os haplótipos alocados em suas respectivas localidades. As cores dos marcadores de ponto correspondem às cores dos agrupamentos observados na rede haplotípica (Figura 9); **(B)** localidades correspondentes ao agrupamento número 1 da rede de haplótipos; **(C)** localidades correspondentes ao agrupamento 2 da rede de haplótipos; **(D)** localidades correspondentes ao agrupamento 3 da rede de haplótipos; **(E)** localidades correspondentes ao agrupamento número 4 da rede de haplótipos; **(F)** localidades correspondentes ao agrupamento número 5 da rede de haplótipos; **(G)** localidades correspondentes ao agrupamento número 6 da rede de haplótipos. Fonte: Imagens geradas pela autora com o auxílio do Google Maps.

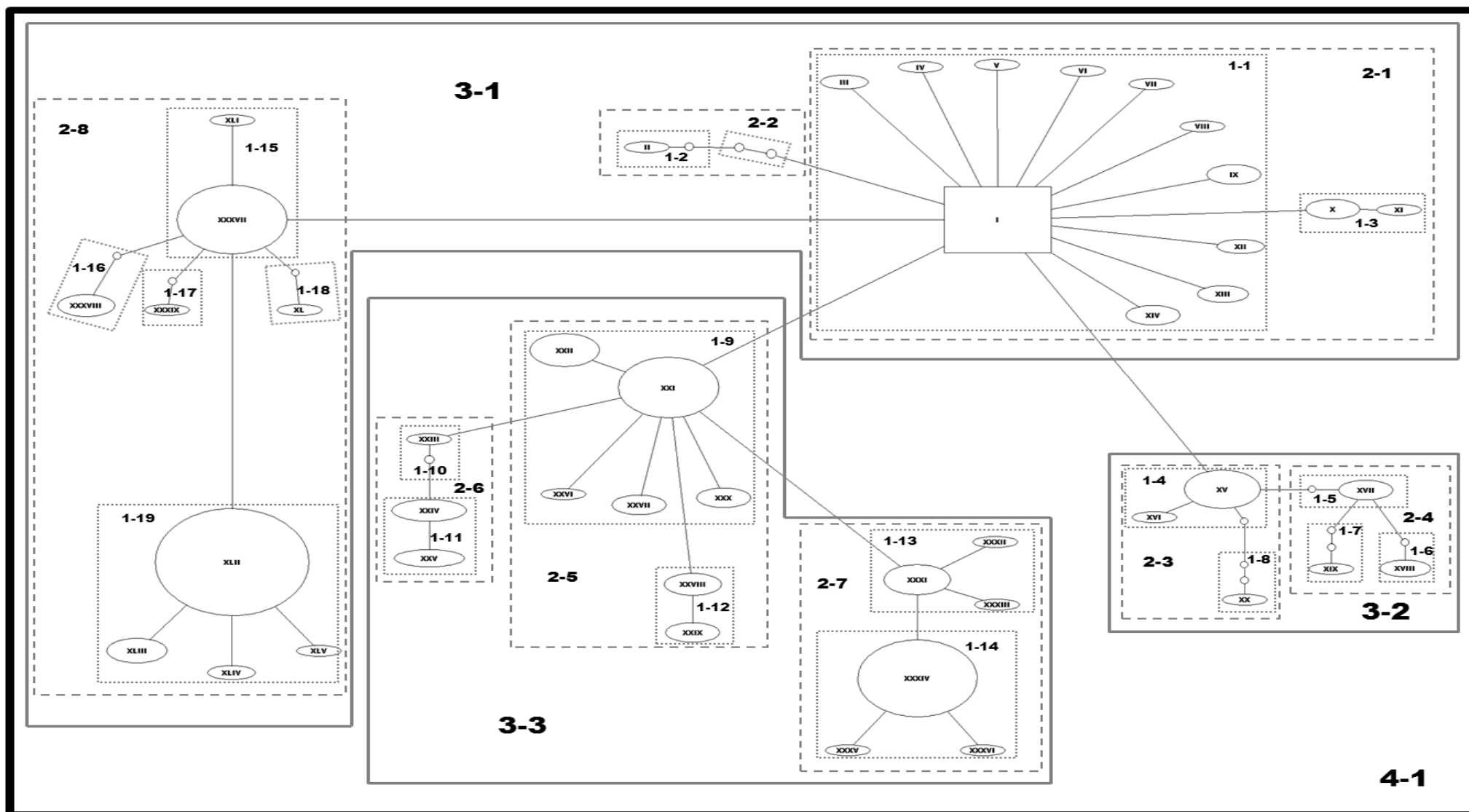


Figura 11 – Rede de haplótipos evidenciando os clados aninhados utilizados na NCPA. Cada linha da rede representa um simples passo mutacional; haplótipos são representados por números romanos e os pequenos círculos indicam haplótipos hipotéticos que são intermediários necessários entre os haplótipos amostrados, mas que não foram observados na amostra. Linhas pontilhadas indicam clados de nível 1; linhas tracejadas indicam clados de nível 2; linhas inteiras e claras indicam clados de nível 3; e linhas inteiras e escuras indicam o clado de nível 4.

Tabela 3 – Resultados da NCPA gerados através do software GeoDis e interpretados a partir da chave de inferências de Templeton (2004).

Clado	Subconjuntos significativos	Parâmetros significativos	Parâmetros I-T significativos	Inferência filogeográfica
1-1	I (interior)	Dc>; Dn>	Dc>; Dn>	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
	IX (ponta)	Dc<		
	XIV (ponta)	Dc<		
1-9	XXII (ponta)	Dc<	Dc>	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
	XXVII (ponta)	Dc<		
	XXX (ponta)	Dc<		
1-19	XLIII (ponta)	Dc<	Nenhum	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
2-1	1-1 (interior)	Dc>; Dn>	Dc>; Dn>	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
	1-3 (ponta)	Dc<; Dn<		
2-5	1-12 (ponta)	Dc<	Dc>	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
2-7	1-13 (interior)	Dc>; Dn>	Dc>; Dn>	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
	1-14 (ponta)	Dc<; Dn<		
2-8	1-19 (ponta)	Dc<; Dn<	Dc>; Dn>	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
3-1	2-1 (interior)	Dc<	Dc>	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
	2-8 (ponta)	Dc<		
3-2	2-4 (ponta)	Dn<	Dn>	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
3-3	2-7 (ponta)	Dc<	Nenhum	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
4-1	3-2 (ponta)	Dc<; Dn>	Dc>; Dn>	Fluxo gênico restrito ou Dispersão com alguma dispersão a longa distância
	3-3 (ponta)	Dc<; Dn<		

Segundo a interpretação dos dados obtidos na NCPA através da chave de inferências de Templeton (2004), os resultados frequentemente indicaram “Fluxo gênico restrito com isolamento por distância” (Tabela 3) como causa do padrão de distribuição de haplótipos encontrado. Esta inferência foi corroborada pelo teste de Mantel, que resultou em um valor de correlação R positivo e significativo, igual a 0,252090 ($p=0,0009$). O teste de Mantel, portanto, confirmou a inferência de que há correlação entre os haplótipos e as localidades, ou seja, o número de diferenças observadas entre os haplótipos provenientes de localidades mais próximas entre si é menor do que entre os haplótipos encontrados em localidades mais distantes.

4.3 Testes de neutralidade e *Mismatch Distribution*

Os valores dos testes de neutralidade – D e F e F_u e L_i , F_s de F_u e D de Tajima – estão relacionados na Tabela 4. Primeiramente, os testes foram realizados considerando-se todos os indivíduos de *N. corniger* amostrados. Nessa análise, os valores de F_s de F_u e D de Tajima foram significativos e negativos, o que é indicativo de expansão populacional. Porém, para uma análise mais detalhada, os testes também foram realizados considerando-se os agrupamentos da rede de haplótipos separadamente. Para todos os agrupamentos encontrou-se valor negativo e significativo para F_s de F_u , o que indica, novamente, expansão populacional. Quanto ao parâmetro D de Tajima, o valor foi significativo e negativo apenas para o agrupamento número 1.

Tabela 4 – Valores dos testes de neutralidade (gerados pelo *software* DnaSP v.5) considerando-se, primeiramente, todas as amostras de *N. corniger* em uma mesma análise. Posteriormente, foram realizadas análises separadas para cada agrupamento observado na rede haplotípica.

Amostras consideradas	D de F_u e L_i	F de F_u e L_i	F_s de F_u	D de Tajima
Todas	-3,31153*	-3,24939*	-31,673*	-3,3115*
Agrupamento 1	Não significativo	-2,55659*	-9,162*	-1,96222*
Agrupamento 2	Não significativo	Não significativo	-1,282*	Não significativo
Agrupamento 3	Não significativo	Não significativo	-2,787*	Não significativo
Agrupamento 4	Não significativo	Não significativo	-0,986*	Não significativo
Agrupamento 5	Não significativo	Não significativo	-0,883*	Não significativo
Agrupamento 6	Não significativo	Não significativo	-1,691*	Não significativo

*Valores significativos ($p < 0,05$)

Para a análise de *Mismatch Distribution* também foram considerados, em um primeiro momento, todos os indivíduos de *N. corniger* amostrados e, depois, as análises foram realizadas separadamente para cada agrupamento haplotípico (Figura 12), a fim de que se pudesse investigar mais detalhadamente a história demográfica das populações. Para a análise de todos os indivíduos obteve-se uma curva unimodal (Figura 12.A), que é indicativo de que as populações podem ter sofrido um processo recente de expansão populacional. Esse resultado também foi obtido para todos os seis agrupamentos analisados individualmente (Figuras 12.B a 12.G, respectivamente).

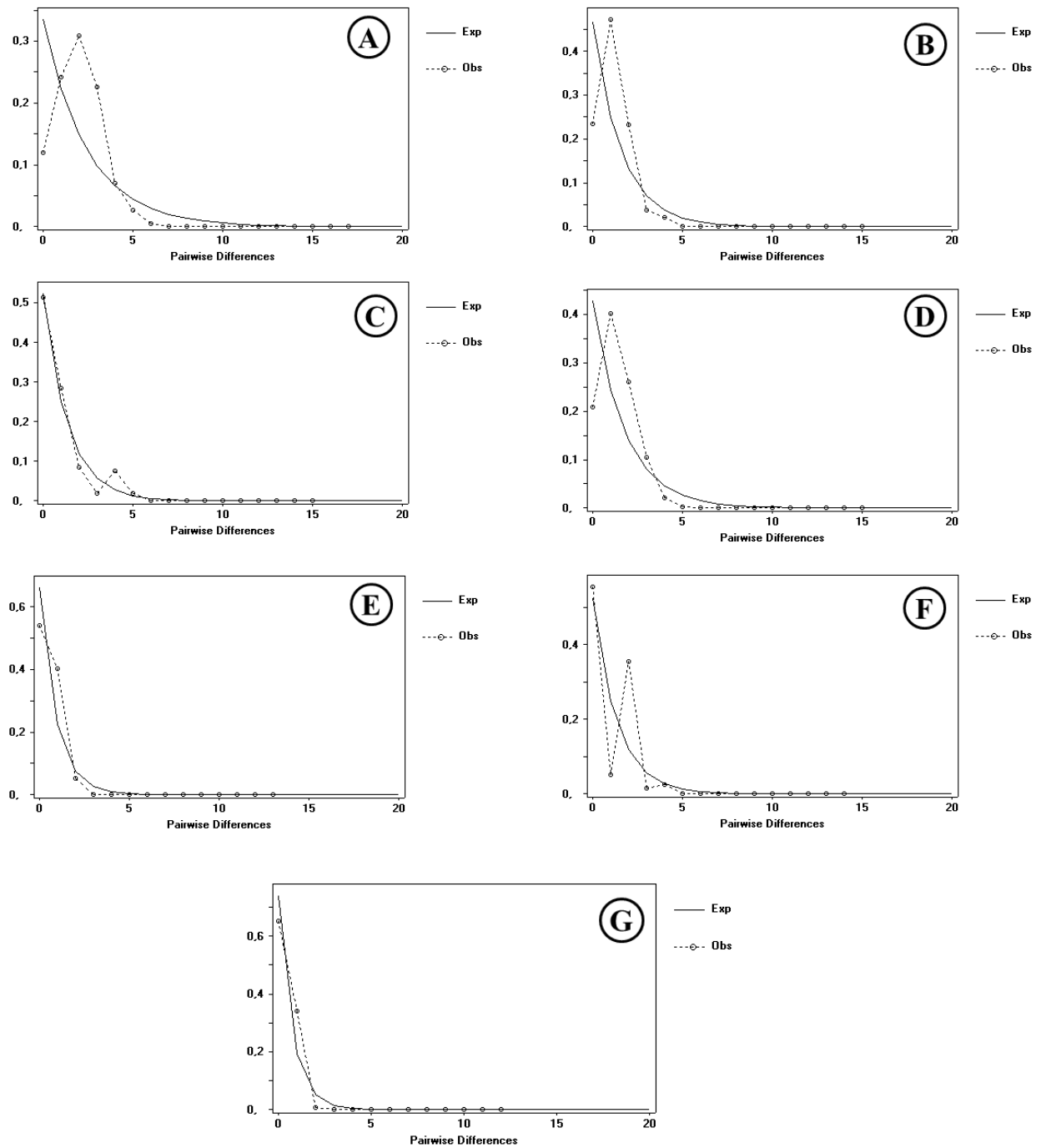


Figura 12 – Representações gráficas das diferenças par a par (*Mismatch Distribution*) das sequências do gene mitocondrial 16S rDNA **(A)** para todas populações de *N. corniger* amostradas; **(B)** para os indivíduos do agrupamento 1 da rede de haplótipos; **(C)** para os indivíduos do agrupamento 2 da rede de haplótipos; **(D)** para os indivíduos do agrupamento 3 da rede de haplótipos; **(E)** para os indivíduos do agrupamento 4 da rede de haplótipos; **(F)** para os indivíduos do agrupamento 5 da rede de haplótipos; **(G)** para os indivíduos do agrupamento 6 da rede de haplótipos.

4.4 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

A AMOVA foi aplicada a fim de se testar o grau de partição da variação genética entre as populações de *N. corniger* amostradas. Foram testadas duas construções de hierarquia. Na primeira, considerou-se cada um dos agrupamentos como uma população, todas alocadas dentro de um mesmo grupo. Os resultados desta análise foram todos significativos ($p < 0,05$) e evidenciaram elevada diferenciação genética entre os indivíduos dentro das populações e entre as populações (Tabela 5). A porcentagem de variação, porém, foi consideravelmente maior para a análise entre populações (ou seja, entre os agrupamentos), com um valor de 65,46%. O alto valor de F_{ST} resultante (0,65457) indica um elevado grau de estruturação genética entre os agrupamentos amostrados.

Tabela 5 – Primeira construção para o teste de AMOVA. Nesse teste, cada um dos agrupamentos foi considerado uma população, que, por sua vez, estão contidas dentro de um mesmo grupo.

Tipo de Variação	Componentes da variação	Porcentagem da variação	Índice de fixação
Entre populações	0,99576 (Va)	65,46%	$F_{ST}=0,65457^*$
Dentro das populações	0,52547 (Vb)	34,54%	-

*Valor significativo ($p=0,00000$).

Na segunda construção também se considerou cada um dos agrupamentos como uma população. Porém, nesse teste, cada agrupamento foi alocado dentro de um grupo, de acordo com seu posicionamento geográfico. Como o agrupamento 1 está distribuído de maneira bastante ampla, ele foi desconsiderado nessa análise, levando-se em conta que se busca avaliar o grau de estruturação dos agrupamentos com distribuição mais restrita. Sendo assim, foram construídos três grupos: o primeiro contendo todas as sequências presentes no agrupamento 2 (praticamente exclusivas da América Central); o segundo contendo todas as sequências presentes nos agrupamentos 3 e 4 (localizadas, predominantemente, na porção centro-oeste da América do Sul); e o terceiro contendo todas as sequências presentes nos agrupamentos 5 e 6 (predominantemente localizadas na porção centro-leste da América do Sul). Todos os resultados desse teste foram significativos ($p < 0,05$), e também indicaram estruturação populacional (evidenciada pelos altos valores dos índices F) para os grupos estabelecidos (Tabela 6). Além disso, o alto valor de F_{ST} (0,71436) é indicativo de alta variabilidade genética dentro das populações.

Tabela 6 – Segunda construção para o teste de AMOVA. Nesse teste, cada um dos agrupamentos foi considerado uma população, que, por sua vez, estão contidas dentro de três grupos distintos, estabelecidos de acordo com o posicionamento geográfico dos agrupamentos.

Tipo de Variação	Componentes da variação	Porcentagem da variação	Índice de fixação
Entre grupos	0,57593 (Va)	32,72%	$F_{CT}=0,32721^*$
Entre populações dentro dos grupos	0,68143 (Vb)	38,71%	$F_{SC}=0,57544^*$
Dentro das populações	0,50277 (Vc)	28,56%	$F_{ST}=0,71436^*$

*Valor significativo ($p=0,00000$).

4.5 Análise de Similaridade Genética

O dendrograma de similaridade genética *Neighbor-joining* (Figura 13) foi construído a partir das distâncias genéticas entre os haplótipos de *N. corniger* obtidos neste trabalho. Sua topologia evidenciou que os grandes ramos gerados corroboram, em grande parte, os agrupamentos observados na rede haplotípica, com exceção dos haplótipos II, X, XI e XXVII, que não apareceram posicionados junto aos ramos dos outros haplótipos de seu respectivo agrupamento. Esta subdivisão dos ramos observada no dendrograma, e que evidencia os agrupamentos haplotípicos, é um forte indício de estruturação populacional destes grupos amostrados. As cores dos ramos correspondem às cores estabelecidas para cada agrupamento da rede haplotípica (Figura 9).

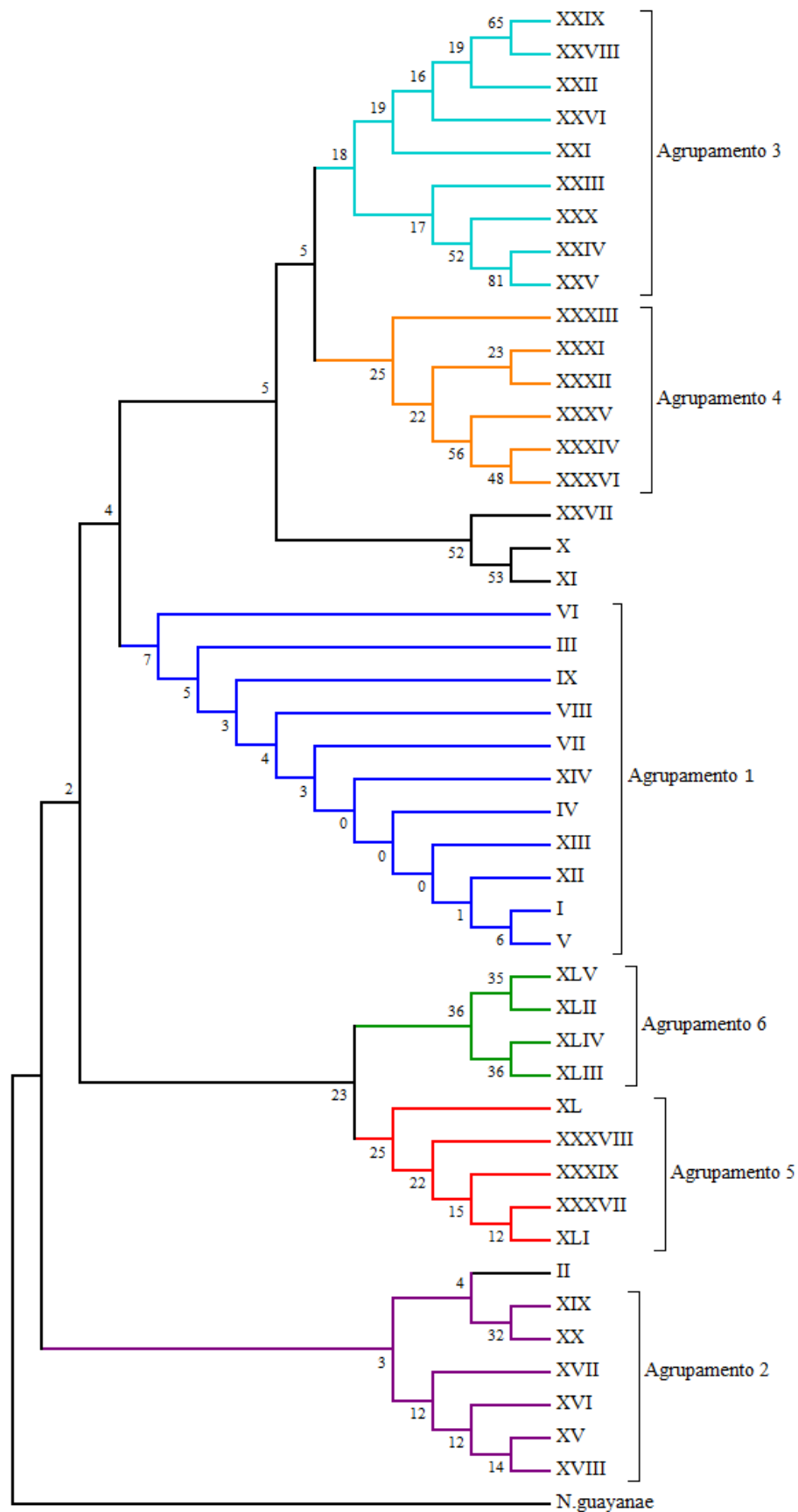


Figura 13 – Dendrograma de similaridade genética *Neighbor-joining* obtido a partir do cálculo das distâncias genéticas entre os haplótipos de *N. corniger* obtidos, gerado com o auxílio do programa MEGA v.4 (TAMURA et al., 2007). As cores dos ramos correspondem às cores dos agrupamentos observados na Figura 9.

4.6 Análise Filogenética e de Tempo de Divergência

Foi realizada uma análise Bayesiana (Figura 14) para se analisar o tempo de divergência entre os agrupamentos das populações amostradas, utilizando-se as 45 sequências haplotípicas obtidas neste trabalho. Para essa análise, o melhor modelo de substituições nucleotídicas encontrado foi o HKY+G+I (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985). A topologia da árvore gerada também corroborou os agrupamentos observados na rede haplotípica (Figura 9), sendo que, novamente, as cores dos ramos correspondem às cores estabelecidas para cada agrupamento da rede.

De acordo com a topologia da árvore e os tempos de divergência gerados, os haplótipos dos agrupamentos 1 e 2 são os mais antigos, com pouco mais de 3,76 e 3,66 milhões de anos (Ma), respectivamente. Os haplótipos dos agrupamentos 3, 4 e 5 apresentaram tempos de divergência de pouco mais de 3,17 Ma, 2,29 Ma e 2,88 Ma, respectivamente. Para o agrupamento número 6 o tempo de divergência encontrado foi de aproximadamente 2,04 Ma, o mais recente, portanto.

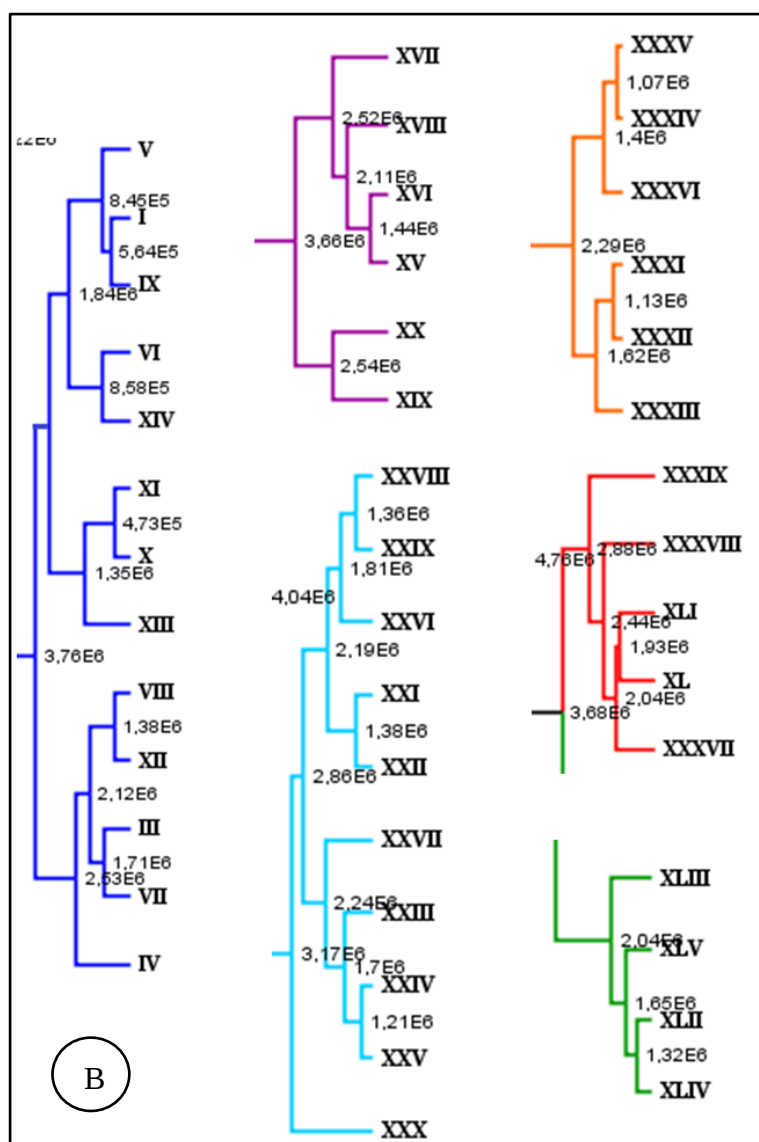
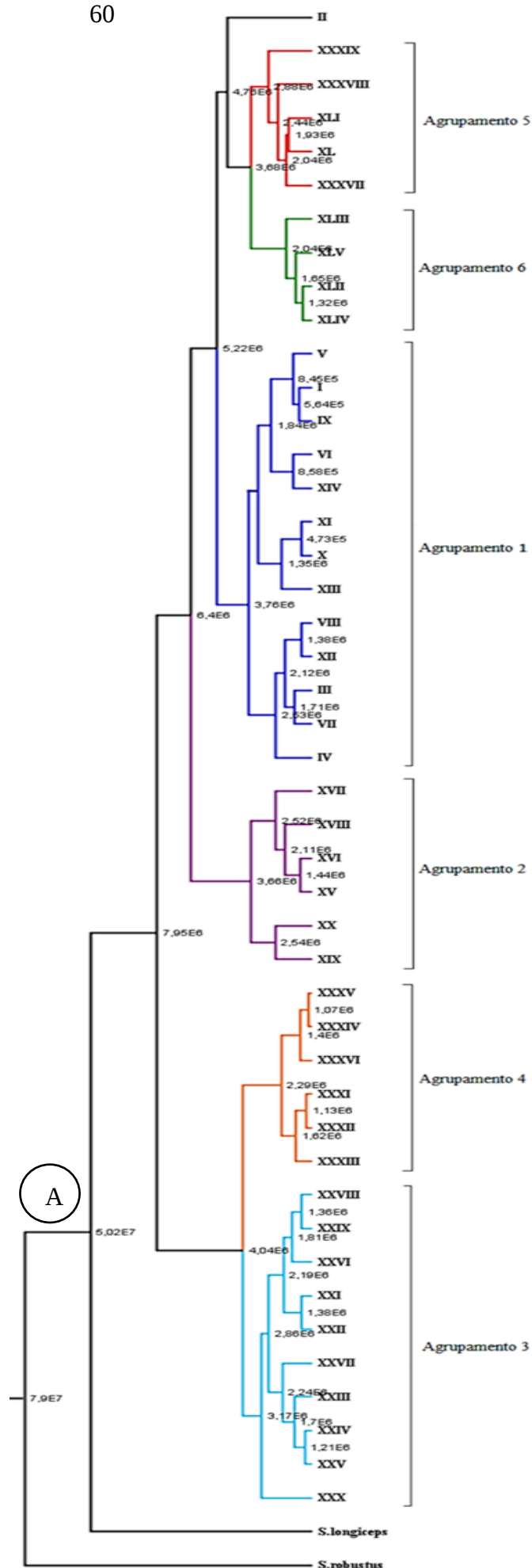


Figura 14 – (A) Árvore de inferência bayesiana gerada com os 45 haplótipos obtidos. As cores dos ramos correspondem às cores dos agrupamentos observados na Figura 9; os números indicados nos nós de cada ramo correspondem ao tempo de divergência do grupo em anos. **(B)** Ramos dos agrupamentos em detalhes.

5 DISCUSSÃO

5.1 Abordagem genética populacional

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar grande variabilidade genética entre as populações de *N. corniger* amostradas, evidenciada pelo alto número de haplótipos (45) e elevada diversidade haplotípica (0,880). Dentre os 45 haplótipos, cinco se mostraram consideravelmente mais frequentes: haplótipo I, presente em 21 indivíduos, provenientes, principalmente, de populações da Nicarágua, Dominica, Honduras, Panamá, até os estados do Maranhão e Goiás; haplótipo XXI, presente em 19 indivíduos, provenientes de populações do Paraná, Mato Grosso, Peru e Bolívia; haplótipo XXXIV, presente em 25 indivíduos, provenientes de populações do Paraguai, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul; haplótipo XXXVII, presente em 22 indivíduos, provenientes de populações de Minas Gerais e São Paulo, predominantemente; e, por fim, haplótipo XLII, presente em 36 indivíduos, provenientes dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia.

Essa variabilidade observada pode ser subdividida em agrupamentos de haplótipos, onde os menos frequentes e posicionados nas extremidades da rede estão ligados a um haplótipo mais central e frequente. Com exceção do agrupamento 1, que tem seus haplótipos distribuídos de forma mais ampla, cada um dos agrupamentos abrangem, de maneira geral, indivíduos provenientes de regiões geográficas adjacentes ou mais proximamente relacionadas, como pode ser observado na Figura 10. Esse resultado levantou um primeiro indício de estruturação populacional entre as localidades amostradas.

Além disso, os grandes ramos das árvores, tanto no dendrograma de *Neighbor-joining* quanto na árvore de inferência Bayesiana, correspondem, em sua maioria, aos agrupamentos da rede haplotípica, fato que corrobora a delimitação de tais agrupamentos na rede – com exceção do haplótipo II, que aparece distante dos outros haplótipos de seu agrupamento em ambas as árvores, e dos haplótipos X, XI e XXVII na árvore de *Neighbor-joining*. Vale ressaltar que, devido ao caráter populacional do presente trabalho, a rede haplotípica esclarece de maneira mais fiel os relacionamentos entre os haplótipos. Tal fato se deve a sua característica reticulada de apresentar as relações, e não bifurcada, como em uma árvore filogenética, considerando que um mesmo haplótipo pode dar origem a vários outros a partir de um mesmo número de passos mutacionais.

O teste de AMOVA, realizado de modo a relacionar as populações de acordo com seu agrupamento na rede haplotípica, resultou em alto valor de F_{ST} (0,65457) na primeira construção hierárquica, indicando, novamente, a inferência de estruturação populacional observada anteriormente. Os resultados da segunda construção da AMOVA reforçaram a hipótese de estruturação populacional, evidenciada pelo alto valor de F_{CT} da análise entre grupos – apesar desse valor ser mais baixo que o valor de F_{ST} da primeira construção, o valor de F_{CT} gerado (0,32721) ainda é considerado elevado e, portanto, reafirma a hipótese de estruturação populacional. Além disso, observando-se o alto valor de F_{ST} (0,71436) resultante da análise dentro das populações da segunda construção, pode-se dizer que essas populações apresentam uma alta variabilidade genética, que não está, portanto, sendo extensamente compartilhada entre regiões geográficas muito distantes.

Partindo da inferência de que as populações estão estruturadas, e observando a distribuição dos agrupamentos de haplótipos ao longo de toda a área amostrada, foi possível perceber que algumas regiões são caracterizadas pelos haplótipos que possuem. Esse padrão pode ser observado na região a leste dos Andes, onde se encontram, predominantemente, haplótipos do agrupamento 3 (Figura 10.D); na porção leste do sudeste brasileiro, onde são observados apenas haplótipos do agrupamento 6 (Figura 10.G); na região sudoeste do Brasil, onde há predominância de haplótipos do agrupamento 4 (Figura 10.E); e na porção centro-sul do Brasil, onde, apesar de serem encontrados alguns haplótipos do agrupamento 1 (mais amplamente distribuídos), há predominância de haplótipos do agrupamento 5 (Figura 10.F). Já na América Central e Ilhas do Caribe são encontrados exclusivamente haplótipos dos agrupamentos 1 e 2 (Figura 10.A), sendo que esse último é praticamente exclusivo dessas regiões.

5.2 Abordagem filogeográfica e biogeográfica

Na rede de haplótipos (Figura 9) observou-se que o haplótipo I, contido no agrupamento 1, aparece em posição mais centralizada na rede, de forma bastante frequente e mais amplamente distribuída ao longo da área amostrada, abrangendo os países da América Central e Ilhas do Caribe, chegando à Venezuela, Suriname e às áreas de vegetação aberta no território brasileiro (Figura 10.B). Levando-se em conta a teoria da coalescência, inferiu-se, então, que o haplótipo I seja, também, o haplótipo mais antigo. Assim, foi possível estabelecer um provável centro de dispersão para a espécie, localizado na América Central (onde haplótipos do agrupamento 1 são mais frequentes). As estimativas de tempo de

divergência dos nós que sustentam os agrupamentos na árvore de inferência Bayesiana corroboram a hipótese de que o agrupamento 1 contém, de fato, haplótipos mais antigos.

Na árvore de inferência Bayesiana, ainda notou-se que as estimativas de tempo de divergência dos agrupamentos 1 e 2 são bastante próximos (aproximadamente 3,76 Ma e 3,66 Ma, respectivamente), menos de 100 mil anos. A dispersão das populações contendo haplótipos dos dois agrupamentos pela América Central e Ilhas de Caribe provavelmente ocorreu anteriormente ao processo de vicariância que ocorreu entre essas regiões – a separação completa ocorreu entre o fim do Mioceno e o Plioceno Médio (entre 5,5 Ma e 3 Ma, aproximadamente). Tal inferência é proposta considerando-se que haplótipos de ambos os agrupamentos são encontrados tanto nas Ilhas quanto na massa continental da América Central. Os haplótipos do agrupamento 2, porém, se mantiveram praticamente restritos a essas regiões, enquanto que as populações que continham haplótipos do agrupamento 1 podem ser encontrados na América do Sul, principalmente na região central do Brasil e na porção norte do nordeste brasileiro.

Devido ao padrão de dispersão encontrado, e considerando que o haplótipo I (centro do agrupamento 1) é significativamente frequente, infere-se que esse haplótipo – dentre os amostrados – tenha, de fato, sido ancestral dos haplótipos dos outros agrupamentos observados ao longo da América do Sul, hipótese fortemente suportada pelos padrões de reticulação da rede haplotípica (Figura 9). Visto isso, foi possível propor um modelo de rota de dispersão, que teria ocorrido da América Central em direção a América do Sul. Tal hipótese de rota será discutida mais detalhadamente a seguir.

A observação da rede haplotípica, aliada às estimativas dos tempos de divergência da árvore de inferência Bayesiana, em especial as datações dos nós que sustentam os agrupamentos (mostrados na Figura 14), possibilitaram a proposição de uma clara rota de dispersão para as populações de *N. corniger*. Considera-se, ainda, que a elevação completa do istmo do Panamá, há aproximadamente 4,6 Ma (durante o Plioceno), foi o evento geológico que possibilitou a dispersão das populações de *N. corniger* em direção a América do Sul, assim como possibilitou o intercâmbio faunístico de diversos outros táxons. É importante ressaltar que a datação de cada um dos agrupamentos encontrados somente na América do Sul (agrupamentos 3, 4, 5 e 6) é posterior à data estimada de elevação total do istmo do Panamá, corroborando a hipótese de que esse evento geográfico possibilitou a dispersão das populações de *N. corniger* para a América do Sul. Michelsens (1991) já havia proposto que os processos de dispersão de espécies dos gêneros *Coenosopsia* e *Phaonantho* (Diptera:

Muscidae) teriam ocorrido da América do Norte para o Sul através de conexões terrestres. Ressalta-se que, apesar de ser a nível intraespecífico, tal padrão também foi encontrado para as populações de *Nasutitermes corniger* amostradas no presente trabalho, corroborando, assim, as hipóteses propostas anteriormente para grupos de Diptera.

Zanella (2010) já havia afirmado que se admite um modelo de rota de dispersão para a América do Sul através das terras altas a leste dos Andes. Considerando essa informação, e observando a disposição dos agrupamentos da rede (Figura 9), a distribuição dos haplótipos ao longo das regiões amostradas (Figura 10) e os tempos de divergência gerados para os ramos dos agrupamentos na árvore de inferência Bayesiana (Figura 14), propõe-se, aqui, os seguintes eventos e processos que compõem a história da rota de dispersão das populações de *N. corniger* pela América do Sul:

i) Após adentrar o continente sul-americano, as populações foram se dispersando na direção sul a leste dos Andes, originando os haplótipos do agrupamento 3, há aproximadamente 3,17 Ma (Figura 15.A);

ii) Populações que continham haplótipos do agrupamento 3 se dispersaram na direção leste do continente, originando os haplótipos do agrupamento 4, localizados, em sua grande maioria, nas fronteiras a oeste do Brasil, nos Estados de Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná. Alguns desses haplótipos chegaram até a porção sudoeste do Estado de São Paulo. O estabelecimento do agrupamento 4 se deu há, aproximadamente, 2,29 Ma (Figura 15.B);

iii) Nota-se que alguns haplótipos do agrupamento 1 abrangem regiões localizadas bem ao centro do território brasileiro. É bastante provável que populações dessa região contendo esses haplótipos tenham dado origem aos haplótipos do agrupamento 5, que são predominantes em regiões também bastante centrais do território brasileiro, como o Estado de Goiás, a porção noroeste de São Paulo e as porções sudoeste e oeste de Minas Gerais. Alguns haplótipos do agrupamento 5 se dispersaram até o leste do nordeste brasileiro. Segundo a análise de tempo de divergência, o estabelecimento do agrupamento 5 se deu há, aproximadamente, 2,88 Ma (Figura 15.C);

iv) Populações que continham haplótipos do agrupamento 5 se dispersaram, principalmente, na direção leste do território brasileiro, dando origem às populações que contém os haplótipos do agrupamento 6. O estabelecimento desse agrupamento se deu há cerca de 2,04 Ma. Na porção leste da região sudeste do Brasil encontrou-se exclusivamente haplótipos do agrupamento 6. Na porção leste da região nordeste os haplótipos desse agrupamento dividem espaço com haplótipos do agrupamento 5 (Figura 15.D).

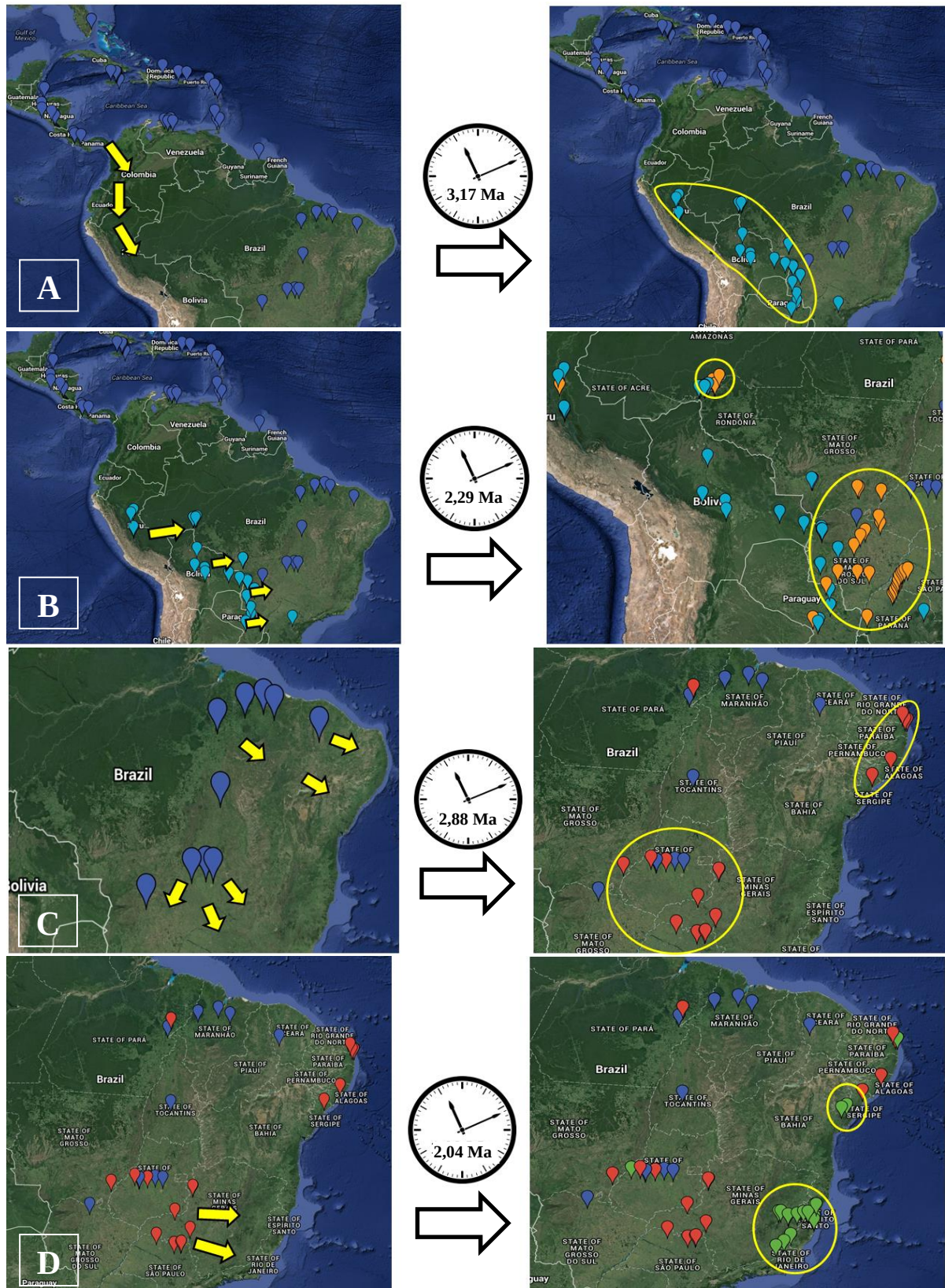


Figura 15 – Esquemas dos processos de dispersão de populações de *N. corniger* na América do Sul. As setas amarelas indicam o sentido da dispersão e os círculos evidenciam a região onde predominam os haplótipos originados. Os tempos de divergência para o estabelecimento de cada um dos agrupamentos estão indicados no interior dos relógios. (A) Processo de origem e estabelecimento dos haplótipos do agrupamento 3; (B) processo de origem e estabelecimento dos haplótipos do agrupamento 4; (C) processo de origem e estabelecimento dos haplótipos do agrupamento 5; (D) processo de origem e estabelecimento dos haplótipos do agrupamento 6.

A respeito dos processos de dispersão, Croizat (1982) levantou a ideia de que os organismos se dispersam naturalmente e somente depois se tornam geograficamente isolados em decorrência de eventos históricos, tais como a vicariância. Explicação semelhante pode ser utilizada para a compreensão dos padrões encontrados para as populações de *N. corniger*. Ao longo dos trajetos de dispersão das populações de *N. corniger*, alguns haplótipos podem ter se diferenciado e permanecido relativamente isolados, o que pode ter causado um padrão de estruturação populacional consequente de um processo de isolamento por distância (como foi discutido no tópico anterior, a partir dos resultados da AMOVA e da NCPA). Ao passo que se associa esses padrões de estruturação, ao posicionamento geográfico dos agrupamentos da rede e aos biomas encontrados na América do Sul (Figura 16), observa-se a sobreposição de algumas características, como será explicado a seguir.

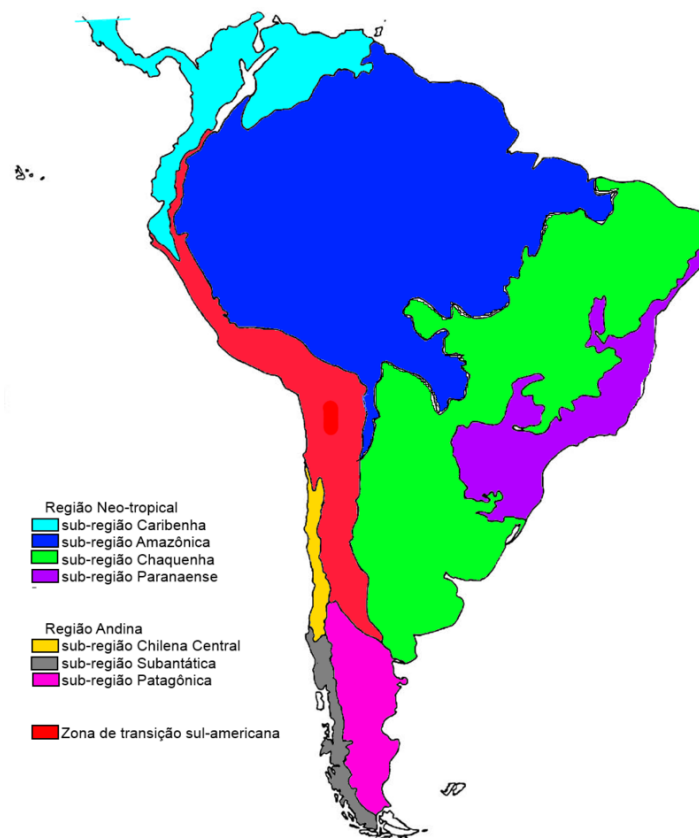


Figura 16 – Mapa evidenciando as subdivisões dos biomas da região Neotropical propostas por Morrone (2013).

Quando se observa a localização dos haplótipos do agrupamento 6, percebe-se que esse agrupamento é praticamente exclusivo de regiões de Mata Atlântica do sudeste e nordeste brasileiros. Esse padrão pode indicar que processos biogeográficos de formação e evolução do bioma atlântico levaram à estruturação genética de tais populações, como a

expansão da Diagonal de Formações Abertas (Chaco, Cerrado e Caatinga), que ocorreu a partir do Plioceno e isolou a Mata Atlântica das outras florestas sul-americanas. Sabendo que esse isolamento resultou, ao longo do tempo, em um alto nível de endemismo e diversificação de espécies dentro de seus limites (DASILVA; PINTO-DA-ROCHA, 2010), pode-se inferir que tal processo de isolamento também causou a estruturação das populações de *N. corniger* nessa área.

Além desse padrão obtido para a Mata Atlântica, também foi possível associar a localização geográfica dos haplótipos do agrupamento 5 às áreas de Cerrado e Caatinga, biomas tipicamente mais secos do território brasileiro. Nessas áreas também pode ser observada a presença de haplótipos do agrupamento 1, o que indica que tais regiões ainda preservam resquícios de populações ancestrais que continham haplótipos desse agrupamento e que teriam dado origem aos haplótipos do agrupamento 5. O fato de que haplótipos, tanto do agrupamento 5 quanto do 6, são encontrados no nordeste brasileiro pode ser explicado pela presença de áreas de transição entre o bioma Atlântico (onde o agrupamento 6 é praticamente exclusivo) e a Caatinga (onde são encontrados haplótipos do agrupamento 5).

Ainda se tratando de áreas da Diagonal de Formações Abertas da América do Sul, pode-se observar que na região do Chaco há predominância dos agrupamentos 3 e 4. O agrupamento 3 abrange, em seus limites a noroeste, a Zona de Transição entre a região Andina e a região Neotropical *stricto sensu*, atingindo, em seus limites ao sul, a região do Chaco na Bolívia e no Paraguai. O agrupamento 4 abrange, em seus limites a oeste, uma parte do bioma Amazônico localizado em Rondônia, no sentido sudeste também abrange o Chaco, chegando, a leste, em regiões de Florestas Mistas (que fazem parte da Mata Atlântica de interior) localizadas no Paraná.

A respeito da afirmação de Pires e Marinoni (2010), de que não se pode associar seguramente os processo de formação de determinados padrões a uma história biogeográfica comum de diversificação biótica sem informações temporais (fornecidas por filogenias moleculares), é possível propor que o presente trabalho, ao passo que utiliza tais informações, pode auxiliar substancialmente na compreensão dos processos biogeográficos de dispersão de espécies na região Neotropical, além de esclarecer, de maneira bem sustentada, a evolução filogeográfica de *N. corniger*. Também se pode afirmar que essa espécie se mostrou um excelente modelo para estudos biogeográficos na região Neotropical. Ainda, vale ressaltar que processos propostos por modelos diferentes podem se complementar para explicar padrões de especiação e diversidade (DASILVA; PINTO-DA-ROCHA, 2010).

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados levantados e discutidos por esse trabalho, foi possível concluir que as populações de *Nasutitermes corniger* amostradas apresentam alta variabilidade genética e que estão estruturadas ao longo da região Neotropical. Na rede haplotípica encontrou-se seis grandes agrupamentos, que serviram de base para análises mais refinadas a respeito da história evolutiva das populações ao longo de sua área de abrangência. A partir dessas análises, foi possível propor uma rota de dispersão para a espécie *N. corniger*, que teria partido da América Central em direção a América do Sul pelo istmo do Panamá, se dispersando pelas terras altas a leste do Andes, e ocupando regiões na direção leste do continente. Durante esse trajeto de dispersão, novos haplótipos foram sendo originados e notou-se que grande parte deles ficou restrita a regiões proximamente relacionadas, que correspondem a regiões de ocorrência de alguns biomas, como é o caso das populações encontradas na Mata Atlântica e nas regiões de vegetação aberta do Cerrado e Caatinga. Além disso, foi possível propor que a espécie *N. corniger* é um ótimo modelo para estudos biogeográficos e filogeográficos na região Neotropical, contribuindo para o entendimento dos processos que levaram à formação dos padrões de distribuição encontrados atualmente.

REFERÊNCIAS

- AOKI, K.; KATO, M.; MURAKAMI, N. Glacial bottleneck and postglacial recolonization of a seed parasitic weevil, *Curculio hilgendorfi*, inferred from mitochondrial DNA variation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 14, p. 3276–3289, 2008.
- ARAUJO, R. L. **Catálogo dos Isoptera do novo mundo**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1977.
- AUSTIN, J. W.; SZALANSKI, A. L.; MESSENGER, M. T. Genetic variation and distribution of the subterranean termite genus *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Arkansas and Louisiana. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, p. 473-480, 2004 (a).
- _____ et al. A comparative genetic analysis of the subterranean termite genus *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 95, n. 6, p. 753-760, 2002.
- _____ et al. Molecular phylogeography of the subterranean termite *Reticulitermes tibialis* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, Clemson, v. 25, n. 2, p. 63–79, 2008
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994.
- _____ et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial dna bridge between population genetics and systematics. **Annals Reviews of Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BANKS, N. The termites of Panama and British Guiana. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v. 38, p. 659-667, 1918.
- BECCALONI, G. W.; EGGLETON, P. Order Blattodea. **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**, Amsterdam, v. 6, p. 37–53, 1997.
- 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 & processos**. São Paulo: Roca, 2010. p. 277-298.
- CLEMENT, M.; POSADA, D; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1657-1659, 2000.

CONSTANTINO, R. Catalog of the living termites of the new world (Insecta: Isoptera). **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v. 135, p. 135-231, 1998.

CONTANTINO, R. **On-line termite database**. Brasília,[s.d.]. Disponível em: <<http://164.41.140.9/catal/>> Acesso em 1 fev. 2016.

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.

CROIZAT, L. Vicariance/vicariism, panbiogeography, "vicariance biogeography", etc.: a clarification. **Systematic Zoology**, Washington, v. 31, p. 291-304, 1982.

DARRIBA, D. et al. JModel Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, New York, v. 9, p. 772, 2012.

DASILVA, M. B.; PINTO-DA-ROCHA, R. História biogeográfica da mata atlântica: opiliões (Arachnida) como modelo para sua inferência. In: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (Orgs.). **Biogeografia da América do Sul: padrões & processos**. São Paulo: Roca, 2010. p. 221-238.

DAVIES, R. G. et al. Successional response of a tropical forest termite assemblage to experimental habitat perturbation. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 36, p. 946–962, 1999.

DJERNAES, M. et al. Phylogeny of cockroaches (Insecta, Dictyoptera, Blattodea), with placement of aberrant taxa and exploration of out-group sampling. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 37, p. 65–83, 2012.

DONOVAN, S. E. et al. Morphological phylogenetics of termites (Isoptera). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 70, p. 67–513, 2000.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 29, p. 1969-1973, 2012.

EISNER, T.; KRISTON, I.; ANESHANSLEY, D. J. Defensive behavior of a termite (*Nasutitermes exitiosus*). **Behavior Ecology and Sociobiology**, Heidelberg, v. 1, p. 83-125, 1976.

ENGEL, M. S. Family-group names for termites (Isoptera), reduz. **ZooKeys**, Sofia, v. 148, p. 171-184, 2011.

_____; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, K. Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. **American Museum Novitates**, New York, v. 3650, p. 1–27, 2009.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 479-491, 1992.

EXCOFFIER., L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin v.3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Auckland, v. 1, p. 47-50, 2005.

FONTES, L. R.; ARAÚJO, R. L. Os cupins. In: MARICONI, F. A. M. (Coord.). **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 1999. p. 35-90.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, Austin, v. 147, p. 915-925, 1997.

GARCÍA, J. et al. Genetic distance between *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae) populations in Taiwan and the Yaeyama Islands, analyzed by amplified fragment length polymorphism markers. **Entomological Science**, Richmond, v. 7, p. 245-249, 2004.

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Life in the cerrado - a South American tropical seasonal ecosystem. origin, structure and plant use. Ulm: Reta Verlag, 2006. v. 1.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, n. 41, p. 95-98, 1999.

HENNIG, W. Vorarbeiten zu einem phylogenetischen system der Muscidae (Diptera: Cyclophoridae). **Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde**, Stuttgart, v. 141, p. 1-100, 1965.

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.

HOLMGREN, N. Versuch einer monographie der amerikanischen *Eutermes*-Arten. **Jahrbuch der Hamburgischen Wissenschaftlichen Anstalten**, Hamburg, v. 171, n. 27, p. 325, 1910.

INWARD, D. J. G.; BECCALONI, G.; EGGLETON, P. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. **Biology Letters**, London, v. 3, p. 331-335, 2007b.

_____; VOGLER, A. P.; EGGLETON, P. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 44, n. 3, p. 953-967, 2007a.

JENKINS, T. M. et al. Phylogeography illuminates maternal origins of exotic *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, 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**, Montrouge, v. 47, p. 215-222, 2011.

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.

KLASS, K. D. Relationships among the principal lineages of Dictyoptera inferred from morphological data. **Abhandlungen und Berichte des Staatlichen Museum fur Tierkunde in Dresden: Entomologische Abhandlungen**, Dresden, v. 61, n. 2, p. 134-137, 2003.

_____; 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**, New York, v. 377, n. 1, p. 1-202, 2013.

KUTNIK, M. et al. Phylogeography of two European *Reticulitermes* (Isoptera) species: the Iberian refugium. **Molecular Ecology**, Oxford, 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**, Montrouge, v. 33, p. 159-193, 1997.

LAWTON, J. H. What do species do in ecosystems? **Oikos**, Copenhagen, 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**, Orlando, v. 48, p. 615-627, 2008.

LEPAGE, M.; DARLINGTON, J. P. E. C. Population dynamics of termites. In: ABE, H.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (Orgs.). **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 333-361.

LI, H. F. et al. Phylogeography of *Coptotermes gestroi* and *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Taiwan. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 102, n. 4, p. 684-693, 2009.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

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

LO, N. et al. Save Isoptera: a comment on Inward et al. **Biology Letters**, London, v. 3, p. 562–565, 2007.

LOPES, I. F. **Variabilidade genética em populações de *Jabiru mycteria* (Lichtenstein, 1819) e *Mycteria americana* (Linnaeus, 1758) (Aves Ciconiidae): fluxo gênico e filogeografia**. 7 jul. 2006. 106 p. Tese (Doutorado) -Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MICHELSSEN, Y. Revision of the aberrant new world genus *Coenosopsia* (Diptera: Anthomyiidae), with a discussion of anthomyiid relationships. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 16, p. 85-104, 1991.

MILLER, M. M. Alleles in space: computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. **Journal of Heredity**, Washington, v. 96, p. 722-724, 2005.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 269-292, 1987.

MORRONE, J. J. Cladistic biogeography of the neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. **Cladistics**, Westport, v. 30, p. 202-214, 2014.

MOUSSET, S.; DEROME, N.; VEUILLE, M. A test of neutrality and constant population size based on the *mismatch distribution*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 4, p.724–731, 2004.

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

PARK, Y. C. et al. Intraspecific molecular phylogeny, genetic variation and phylogeography of *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Molecules and Cells**, Seoul, v. 21, n. 1, p. 89-103, 2006.

PIRES, A. C.; MARINONI, L. Historical relationships among neotropical endemic areas based on *Sepedonea* (Diptera: Sciomyzidae) phylogenetic and distribution data. **Zoologia**, Curitiba, v. 27, p. 681–690, 2010.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A, TEMPLETON, A.R. GeoDis: a program for the cladistics nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 487-488, 2000.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, n. 3, p. 552-569, 1992.

ROISIN, Y.; PASTEELS, J. M. Imaginal polymorphism and polygyny in the Neo-Guinean termite *Nasutitermes princeps* (Desneux). **Insectes Sociaux**, Paris, v. 32, p. 140-157, 1985.

ROSS, K. G. Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 265-284, 2001.

SANTOS, P. P.; VASCONCELLOS, A.; DELABIE, J. H. C. Use of nests of *Nasutitermes* spp. (Isoptera; Termitidae) by ants (Hymenoptera; Formicidae) in Bahia, Brazil. **O Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 356-367, 2007.

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**, College Park, v. 98, n. 3, p. 273-281, 2005a.

_____. et al. Synonymy of two arboreal termites (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae): *Nasutitermes corniger* from the neotropics and *N. polygynus* from New Guinea. **Florida Entomologist**, Gainesville v. 88, n. 1, p. 28-33, 2005b.

SCLATER, P. L. On the general geographical distribution of the members of the class Aves. **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, v. 2, p. 130–145, 1858.

SIGRIST, M. S., CARVALHO, C. J. B. Historical relationships among areas of endemism in tropical South America using Brooks parsimony analysis (BPA). **Biota Neotropica**. Campinas, v. 9, p. 79-90, 2009.

SNYDER, T. E. Termites collected on the mulford biological exploration to the amazon basin, 1921-1922. **Proceedings of the United States National Museum**, Washington, v. 68, p. 1-76, 1926.

_____. Catalog of the termites (Isoptera) of the world. **Smithsonian Miscellaneous Collections**, Washington v. 2, p. 1-490, 1949.

SZALANSKI, A. L. et al. Molecular phylogeny and biogeography of *Heterotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in the West Indies. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 97, n. 3, p. 556-566, 2004.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, Austin v. 123, p. 585–595, 1989.

TAMURA, K. et al. Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago , v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TEMPLETON, A. R. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 381-397, 1998.

_____. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 789-809, 2004.

_____; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**, Austin, v. 140, p. 767–782, 1995.

_____; BOERWINKLE, E.; SING, C. F. A Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I: Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics**, Austin, v. 117, p. 343-351, 1987.

THERAULAZ, G.; BONABEAU, E.; DENEUBOURG, J. L. The origin of nest complexity in social insects. **Complexity**, New York, v. 3, n. 6, p. 15-25, 1998.

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

_____ et al. Reproductive dynamics and colony structure of subterranean termites of the genus *Reticulitermes* (Isoptera Rhinotermitidae): a review of the evidence from behavioral, ecological and genetic studies. **Ethology, Ecology & Evolution**, Firenze, v. 11, p. 149-169, 1999.

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

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**, College Park, v. 99, n. 4, p. 697-706, 2006.

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.

WALLACE, A. R. **The geographical distribution of animals**. London: Macmillan, 1876.

WARE, J. L. et al. Relationships among the major lineages of Dictyoptera: the effect of outgroup selection on dictyopteran tree topology. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 33, p. 429-450, 2008.

WILSON, A. C. et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 26, n. 4, p. 375-400, 1985.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press, 1971.

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.

ZANELLA, F. C. V. Evolução da biota da diagonal de formações abertas secas da América do Sul. In: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (Orgs.). **Biogeografia da América do Sul: padrões & processos**. São Paulo: Roca, 2010. p.198-220.

APÊNDICE

Sequências nucleotídicas dos sítios variáveis dos haplótipos obtidos neste trabalho.

	[	10	20	30	]
	[	*	*	*	]
XXXVII	TCTTAA-CTACTTCTAAACTTATACCTTTT-CTTGA				
XXIX	C-....T.....C-....A.				
XXVIII	C-.....C-....A.				
XXXV	-.....C.....C-....AG				
XXXI	-.....C.....C-....A.				
XXXIII	-.....C.C.....C-....A.				
XXII	-.....T.....C-....A.				
XXIV	-.....T....CT.C.A.				
XXV	.A....-.....T....CT.C.A.				
XXIII	-.....C-.C.A.				
I	-.....-....A.				
III	-.....A....-....A.				
XV	-.....C.....-....A.				
XIV	-.....C.-....A.				
IV	-.....G.....-....A.				
XIII	-.....C.-....A.				
XXI	-.....C-....A.				
XL	-.....C.....-C...				
XII	-..G.....-....A.				
XXXIX	-.....A.....G.....-.....				
XLV	-.....C.....C.....-.....				

XLI	-T.....-.....
XXVII	-.....C.....C-...A.
XXXIV	-.....C.....C-...AG
XVIII	T.A.....C.....-...A.
XVII	T.....C.....-...A.
XIX	T.....C.....CTC.A.
XXX	-.....T....C-...A.
XXXII	-.....C.....C-...A.
II	-C.....-.....TC...-...A.
XXVI	-.....C-...A.
X	-.....C.....-...A.
XI	-.....C.....C.....-...A.
IX	-.....G.....-...A.
V	...C.-.....-...A.
VIII	-.....-...A.
XVI	-.....C.....-...CA.
XX	..C...-C.....C.G.....-C.A.
VII	-.....G.....-...A.
XLII	-.....C.....-.....
XLIV	-.....A.C.....-.....
XLIII	-.....C.C.....-.....
XXXVIII	C.....-.....-...C..
XXXVI	-.....C....C.....C-...AG
VI	-.....-...AG