

# UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

# KAROLINA SUEMY KOHARI

Análise filogeográfica de *Nasutitermes kemneri* Snyder & Emerson, 1949 (Isoptera: Termitidae)

Santo André

#### KAROLINA SUEMY KOHARI

Análise filogeográfica de *Nasutitermes kemneri* Snyder & Emerson, 1949 (Isoptera: Termitidae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do ABC – UFABC na área de concentração de Genética Molecular como requisito para obtenção do grau de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Fernandes Carrijo Co-orientadora: Ma. Rafaella Gregorio Santos

Santo André

2017

#### KAROLINA SUEMY KOHARI

# Análise filogeográfica de *Nasutitermes kemneri* Snyder & Emerson, 1949 (Isoptera: Termitidae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do ABC – UFABC na área de concentração de Genética Molecular como requisito para obtenção do grau de bacharel.

**Orientador:** Prof. Dr. Tiago Fernandes Carrijo **Co-orientadora:** Ma. Rafaella Gregorio Santos

#### COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Cibele Biondo Universidade: Universidade Federal do ABC

Profa. Dra. Eliana M. Cancello Universidade: Museu da Universidade de São

Paulo

Prof. Dr. Anselmo Nogueira Universidade: Universidade Federal do ABC

"Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber."

(Confúcio)

#### **RESUMO**

Os cupins são insetos sociais com indivíduos com diferentes funções dentro da colônia, se distinguindo por características morfológicas e fisiológicas, de acordo com a casta ao qual pertence. Dentre as subfamílias de Termitidae, Nasutitermitinae é aquela com maior diversidade, e o gênero com maior número de espécies é Nasutitermes. A espécie Nasutitermes kemneri, tem uma distribuição conhecida em regiões abertas da América do Sul (Caatinga, Cerrado e Chaco). Recentemente foram coletadas amostras na savana de Roraima (RR), as quais foram identificadas como N. kemneri. Assim, este trabalho tem como objetivo verificar se estas amostras de RR se tratam mesmo desta espécie, além de realizar a filogeografia da espécie N. kemneri, a fim de entender os processos determinantes para sua atual distribuição geográfica. Para isso foram utilizados os genes mitocondriais 16S rRNA, COI e COII, e a região ribossomal nuclear (ITS1+5.8S+ITS2). Através de uma análise filogenética por Interferência Bayesiana, utilizando outras espécies de Nasutitermes, foi verificado que a população de Roraima não se trata da espécie foco desse trabalho. Além disso, foi feita uma rede de haplótipos com as populações da espécie N. kemneri, verifica-se uma quebra genética em duas principais populações (Nordeste e Sudoeste), com diversidade haplotípica acima de 0,82, variação interpopulacional média de 74,30% e intrapopulacional de 25,69%. Dessa forma, é possível inferir que o surgimento do Planalto Central pode ter contribuído para a interrupção do fluxo gênico entre as duas populações, provavelmente devido a diferença de altitude e clima.

Palavras-chave: Diagonal seca, Genética de populações, Vicariância.

**ABSTRACT** 

Termites are social insects with individuals with different functions within the colony, being

distinguished by morphological and physiological characteristics, according to their. Among

the subfamilies of Termitidae, Nasutitermitinae is the one with the greatest diversity, and the

genus with the greatest number of species is *Nasutitermes*. The species *Nasutitermes kemneri*,

has a known distribution in open regions of South America (Caatinga, Cerrado and Chaco).

Recently, samples identified as *N. kemneri* were collected in the Roraima savanna (RR). Thus,

this work aims to verify if these samples from RR belongs to this species, in addition to study

the phylogeography of N. kemneri species, in order to understand the processes that

determined its current geographical distribution. The mitochondrial genes 16S rRNA, COI and

COII, and the nuclear ribosomal region ITS (ITS1 + 5.8S + ITS2) were used. Through a

Bayesian phylogenetic inference using other species of *Nasutitermes*, it was verified that the

population of Roraima is not the species focus of this study. In addition, a haplotype network

was made with the N. kemneri species, showing a genetic break in two main populations

(Northeast and Southwest), with haplotypic diversity above 0.82, mean interpopulational

variation of 74.30%, and of 25.69%. Thus, it is possible to infer that the emergence of the

Central Plateau contributed to the interruption of the gene flow between the two populations,

probably due to the difference in altitude and climate.

**Keywords:** Dry diagonal, Genetics of populations, Vicariance.

# **SUMÁRIO**

1.INTRODUÇÃO	7
2.OBJETIVOS	
2.1. Objetivos gerais	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3.METODOLOGIA	10
3.1. Amostragem	10
3.2. Dados moleculares	11
3.3. Análises	
4.RESULTADOS	
4.1. Amostras de Roraima	
4.2. Filogeografia de N. kemneri	19
4.3. Estatísticas descritivas e análises demográficas	23
5.DISCUSSÃO	27
5.1. Amostras de Roraima	27
5.2. Filogeografia de N. kemneri	27
5.3. Estatísticas descritivas e análises demográficas	28
6.CONCLUSÃO	29
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
& ANEYOS	36

# 1.INTRODUÇÃO

Os cupins (Isoptera) são insetos eussociais, isto é, apresentam divisões na tarefa reprodutiva, sobreposição de gerações dentro da mesma colônia e cuidado cooperativo com a prole (Wilson, 1971). Essas divisões de tarefas são características de cada casta, que possuem diferentes funções dentro da sociedade, bem como se distinguem morfofisiologicamente. Aqueles indivíduos denominados reis, rainhas e alados formam a casta dos reprodutores, enquanto que os demais, normalmente estéreis, se enquadram nas castas de soldados ou operários (Krishna *et al.*, 2013). Os cupins ainda possuem um papel ecológico essencial pois, além de serem muito abundantes, são decompositores de materiais celulósicos, portanto contribuintes necessários para a ciclagem de nutrientes no solo em muitos ecossistemas (Jouquet *et al.*, 2016).

Os cupins pertencem ao grupo Dictyoptera que inclui as baratas (Blattaria), cupins (Isoptera) e louva-deus (Mantodea). Esse grupo vem sendo historicamente corroborado como monofilético, suportado pelo compartilhamento de caracteres como a presença de uma perfuração no esqueleto interno da cabeça (tentorium) e o armazenamento dos ovos em uma ooteca. Os louva-deus provavelmente divergiram primeiro dentro de Dictyoptera, sendo grupo irmão de baratas mais cupins. O relacionamento entre cupins e baratas foi amplamente discutido nos últimos 10 anos, nos dias de hoje há um consenso de que o gênero de baratas *Cryptocercus* é grupo irmão de Isoptera tornando Blattaria um grupo parafilético caso os cupins não estejam incluídos (Inward et al., 2007; Engel *et al.*, 2009). Os cupins, então, formam um grupo monofilético dentro da ordem de baratas (Blattaria).

Isoptera possui cerca de 3000 espécies descritas no mundo (Constantino & Acioli, 2006; Krishna, 2013), sendo que 654 ocorrem na Região Neotropical (Constantino, 2017). Krishna *et al.* (2013) considera nove famílias com representantes atuais: Archotermopsidae, Hodotermitidae, Kalotermitidae, Mastotermitidae, Stolotermitidae, Rhinotermitidae,

Serritermitidae, Stylotermitidae e Termitidae. A família Termitidae, que corresponde a 75% das espécies do grupo, é dividida em oito subfamílias: Apicotermitinae, Cubitermitinae, Foraminitermitinae, Macrotermitinae, Nasutitermitinae, Sphaerotermitinae, Syntermitinae e Termitinae (Krishna *et al.*, 2013).

A subfamília Nasutitermitinae é a maior e talvez mais característica dentro de Termitidae (Krishna *et al.*, 2013). Seus soldados possuem mandíbula reduzida e uma glândula frontal que se abre na ponta de uma projeção da cabeça (o tubo frontal, "nasus" ou "naso"). Essa glândula tem função na defesa contra predadores, bem como na liberação de feromônio de alerta (Quennedey, 1984), e os principais compostos químicos liberados por ela são monoterpenos e diterpenos (Prestwith, 1982). *Nasutitermes* é o gênero de cupins com maior riqueza, suas espécies são de médio porte, e a maioria constrói ninhos arborícolas, mas existem as que fazem ninhos dentro de troncos de árvores, embaixo da terra ou em montes no solo (Mathews, 1997; Boulogne *et al.*, 2016).

A espécie *Nasutitermes kemneri* Snyder & Emerson, 1949 (Snyder, 1949) se alimenta de madeiras em baixo estágio de decomposição, o soldado apresenta naso curto, fino e cônico, e pontas das mandíbulas com anatomia irregular. As colônias de *N. kemneri* podem ser encontradas em diversos tipos de vegetação, principalmente em lugares com temperaturas mais elevadas, sendo bastante comum no bioma Cerrado (Mathews, 1977). Em um levantamento das amostras depositadas no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), constatou-se a presença da espécie nos biomas Caatinga, Cerrado e Chaco, que formam o "corredor de savana" ou "diagonal de formação aberta" (Ministério do Meio Ambiente, 2007; Silva, 2008; Zanella, 2010). Além disso, recentemente o grupo de pesquisa do MZUSP identificou, com base em morfologia, algumas amostras encontradas na savana de Roraima como sendo de *N. kemneri* (M. M. Rocha & T. F. Carrijo, comunicação pessoal).

A disposição atual das formações abertas possivelmente se deve ao soerguimento do Planalto Central Brasileiro, alterando a localização da região do Cerrado, Caatinga e Chaco, além dos períodos de flutuações climáticas durante o Quaternário, quando a Terra sofreu eras glaciais intercaladas com períodos mais quentes. Durante essas flutuações a vegetação seca teria se expandido e contraído durante os máximos e mínimos glaciais, enquanto que as regiões de florestas tropicais teriam seguido o padrão inverso (Zanella, 2010). Essas flutuações permitiram que durante o período glacial regiões secas se ligassem e com a expansão das florestas tropicais nos períodos interglaciais, elas se desconectassem (Pennington *et al.*, 2000; Werneck *et al.*, 2012).

O estudo da Filogeografía busca conhecer a história evolutiva das espécies e suas populações, através da compreensão dos processos que determinaram a distribuição geográfica das linhagens genealógicas (Avise, 2000). Criada como uma subdisciplina dentro da Biogeografía com a finalidade de unir parâmetros micro e macroevolutivos, a Filogeografía utiliza de diversos recursos como a genética de populações, demografía filogenética e paleontologia (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000). É possível então buscar mudanças ambientais históricas que expliquem as distribuições geográficas atuais das espécies, além de inferir eventos de expansões demográficas ou gargalos populacionais. Por fim, a Filogeografía ainda pode auxiliar na resolução de problemas taxonômicos, como os casos de espécies morfologicamente muito similares (isto é, espécies crípticas) e complexos de espécies (Hickerson *et al.*, 2010).

Nesse contexto a utilização de marcadores moleculares no estudo filogeográfico aplicado à espécie *Nasutitermes kemneri* irá gerar informações que permitirão entender a história evolutiva dessa espécie, testando diferentes hipóteses. É possível testar, por exemplo, se existe divergências entre as populações distribuídas desde a região do Chaco até a Caatinga, e se essas possíveis divergências são devido à isolamentos populacionais ou existe

uma estrutura genética causada por distância geográfica. Além disso, refúgios climáticos para as regiões de formação aberta poderão ser inferidos caso algumas populações de *N. kemneri* tenham se mantido durante os períodos interglaciais (quando as áreas abertas estavam contraídas, portanto menores e desconectadas), e posteriormente expandido para suas distribuições atuais, sendo assim, apresentando distribuição em manchas.

#### 2.OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivos gerais

Este trabalho tem dois objetivos principais: primeiramente realizar uma análise para verificar se a população encontrada em Roraima trata-se realmente da espécie de *Nasutitermes kemneri*, e posteriormente realizar uma análise filogeográfica desta espécie a fim de compreender os processos evolutivos que levaram a sua distribuição geográfica atual.

#### 2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos propostos para esse trabalho são:

- Caracterizar geneticamente a espécie Nasutitermes kemneri;
- Associar os eventos de flutuações climáticas do Quaternário com a atual distribuição geográfica, e os padrões genéticos encontrados entre as populações;
- Verificar os possíveis isolamentos populacionais e/ou refúgios derivados de isolamentos passados.

#### 3.METODOLOGIA

#### 3.1. Amostragem

Foram utilizadas amostras coletadas nas regiões da Caatinga, Cerrado, Chaco (formação da diagonal de formação aberta) e da savana de Roraima (Figura 1 e Anexo).

Todas amostras encontram-se no acervo de Isoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), e possuem indivíduos conservados em álcool 80% e duplicatas em 92%, para estudos moleculares. A fim de aumentar a quantidade de indivíduos para análise, e aumentar a distribuição espacial estudada, foram solicitados materiais adicionais coletados na Bolívia, ao Prof. Dr. Rudolf Scheffrahn da Universidade da Flórida, e no Nordeste, ao Prof. Dr. Alexandre Vasconcellos da Universidade Federal da Paraíba.

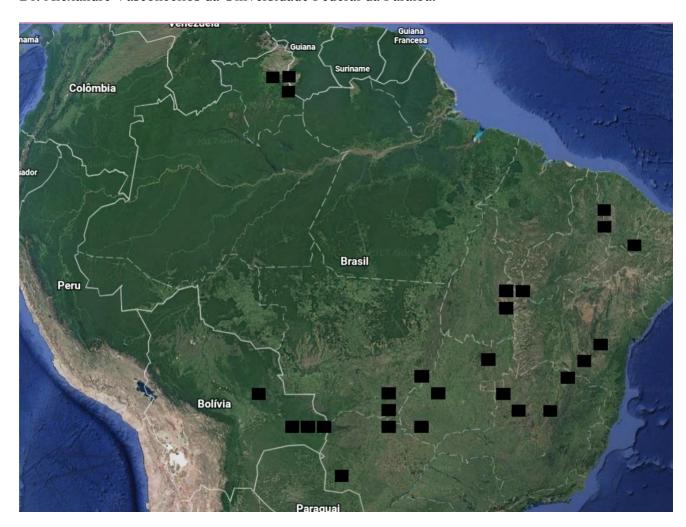


Figura 1: Mapa com a localidade de coleta das amostras utilizadas no presente estudo.

#### 3.2. Dados moleculares

O DNA foi extraído por meio do kit de extração *DNeasy Blood & Tissue – QIAGEN*.
Os genes mitocondriais 16S rRNA (63 amostras), Citocromo Oxidase I (COI) (29 amostras) e

Citocromo Oxidase II (COII) (60 amostras), e a região ribossomal nuclear (ITS1+5.8S+ITS2) (50 amostras) foram isolados e amplificados através de reações de cadeia de polimerase (PCR), com a utilização dos protocolos descritos na Tabela 1, o reagente *Master Mix* (*Prodimol*) e os *primers* descritos na Tabela 2. Os resultados dos produtos de PCR foram verificados por meio do gel de eletroforese. As amostras que apresentam banda (exemplo mostrado na Figura 2) foram purificadas e enviadas para sequenciamento.

A purificação dos produtos de PCR foi feita com o uso do reagente *ExoSap (GE Technology Infrastructure)* seguindo as orientações do fabricante. Este purificado foi enviado ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP de Jaboticabal para obtenção do sequenciamento, que foi feito em sequenciador automático de *DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, CA)* com o auxílio do kit sequenciamento *Big Dye Terminator (Perkin-Elmer)* conforme as instruções do fabricante. Foram obtidas as fitas *forward* e *reverse*, e as fitas consenso foram montadas e editadas no programa *Geneious 9.0* (Kearse et al., 2012) na direção *forward*, e alinhadas pelo plugin do MUSCLE 3.6 (Edgar, 2004) no mesmo programa, e então editadas por inspeção visual.

**Tabela 1:** Programas de amplificação utilizados para cada marcador.

Genes	Desnaturação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão	Ciclos
	Inicial				Final	
COII	94°C (3min)	94°C (30s)	45°C (1min)	72°C	72°C (10min)	35
0011	) (211111)	) . C (202)	(111111)	(3min)	, = 0 (1011111)	
COI	04°C (2min)	0.49C (1min)	419C (1min)	72°C	72°C (2min)	35
COI	94°C (2min)	94°C (1min)	41°C (1min)	(1min)	72°C (3min)	33
16S	94°C (2min)	94°C (1min)	50°C (1min)	72°C	72°C (7min)	35
rRNA	94 (211111)	94 C (111111)	30 C (111111)	(1:15min)	/2 C (/IIIII)	33
ITS	94°C (2min)	94°C (1min)	46°C (1min)	72°C	72°C (2min)	35
113	94 (211111)	94 C (111111)	40 C (111111)	(1min)	/2 C (2111111)	33

Tabela 3: Primers que foram utilizados na amplificação dos genes de interesse por meio do PCR.

Gene	Primer	Sequência	Referência
ITS1+5.8S+ITS2	ITS2-F	TGTGAACTGCAGGACACAT	Jenkins et al. (2007)
ITS1+5.8S+ITS2	ITS2-R	GCTTAAATTTAGGGGGTAGTC	Jenkins et al. (2007)
COII	Modificada A-tLeu	CAGATAAGTGCATTGGATTT	(Miura et al. 2000)
COII	B-tLys	GTTTAAGAGACCAGTACTTG	(Liu & Beckenbach 1992; Simon et al. 1994)
16S rRNA	LRJ13007	TTACGCTGTTATCCCTAA	Szalanski et al. (2004)
16S rRNA	LRN1398	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Szalanski et al. (2004)
COI	LCO1490F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	(Folmer et al. 1994)
COI	HCO2198R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	(Folmer et al. 1994)

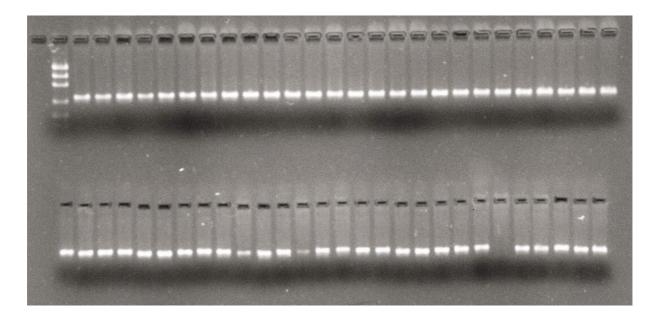


Figura 2: Gel de eletroforese do gene mitocondrial 16S rRNA.

#### 3.3. Análises

Com a finalidade de reconstruir as relações evolutivas entre os indivíduos e as populações de *N. kemneri*, bem como algumas espécies de *Nasutitermes*, foi utilizado o método de interferência bayesiana. A seleção do melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi feita por meio do programa JModelTest, usando o *Bayesian Information* 

*Criterion*, (Darriba et al., 2012). Os melhores modelos foram, HKY + G para os genes 16S rRNA, COI e ITS, e para o gene COII foi HKY + I + G.

A fim de realizar as reconstruções filogenéticas, foram utilizadas matrizes concatenadas com os quatro genes. Para isso, foram gerados arquivos XML com o auxílio do programa BEAUti 1.8.0. O arquivo XML foi utilizado no programa BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2012). As análises do BEAST utilizaram o algoritmo MCMC (Markov chain Monte Carlo) sob o modelo de coalescência (Kingman, 1982). A convergência e estabilização foi checada pelo programa Tracer 1.4 (Rambaut & Drummond, 2007).

Foram feitas duas árvores filogenéticas. A primeira para verificar se as amostras de Roraima eram *N. kemneri*. Para isso foram utilizadas as sequências de diversas espécies de *Nasutitermes* retiradas do trabalho da Roy et al. (2014). Verificando que as amostras de Roraima não pertencem à espécie *N. kemneri*, estas foram retiradas das demais análises. A segunda árvore filogenética foi feita então apenas com a espécie *N. kemneri*, a fim de determinar possíveis agrupamentos (populações).

Foram construídas também redes de haplótipos para todos os genes, através do programa R (Core Team R, 2016), utilizando as funções "haplotype" e "haploNet", do pacote "pegas" (Paradis, 2010).

Após observar os padrões da filogenia e das redes de haplótipos, foram definidas 2 populações, Sudoeste (indivíduos da Bolívia, Centro Oeste e Sudeste do Brasil), e Nordeste (indivíduos do Norte e Nordeste do Brasil), as quais, foram separadas com o programa DNAsp para cada um dos genes. O programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) foi utilizado para realizar Análises de Variância Molecular (AMOVA) com o intuito de estudar a estrutura genética das populações dentro da espécie, além de testes de significância das estatísticas F. Os resultados de estrutura genética do programa Arlequin mostram a variação

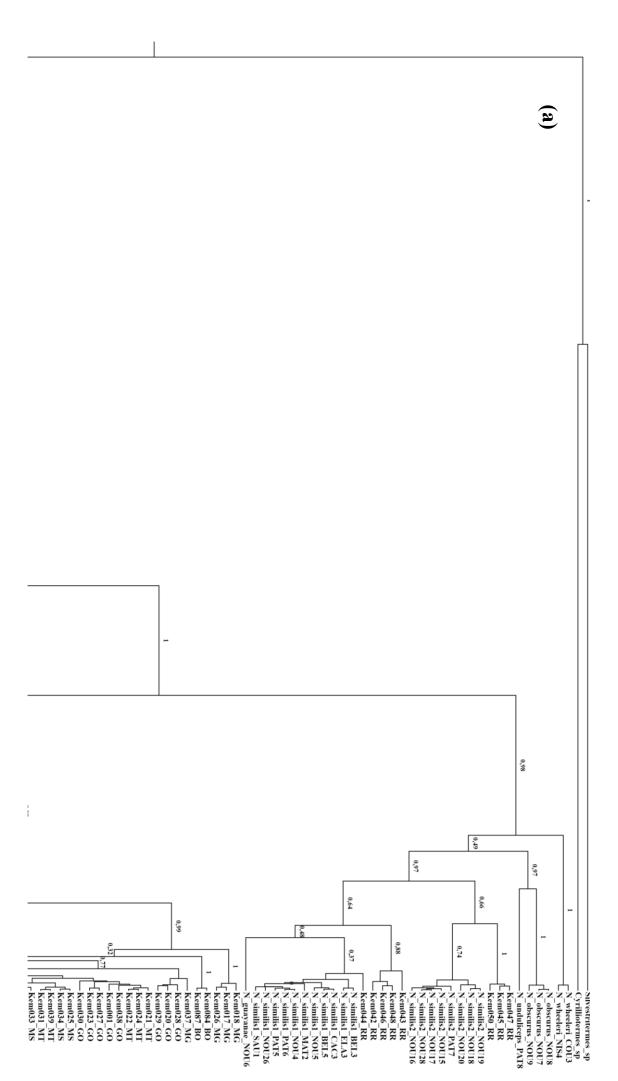
inter- e intrapopulacional, determinando a quantidade de fluxo gênico entre as populações predeterminadas.

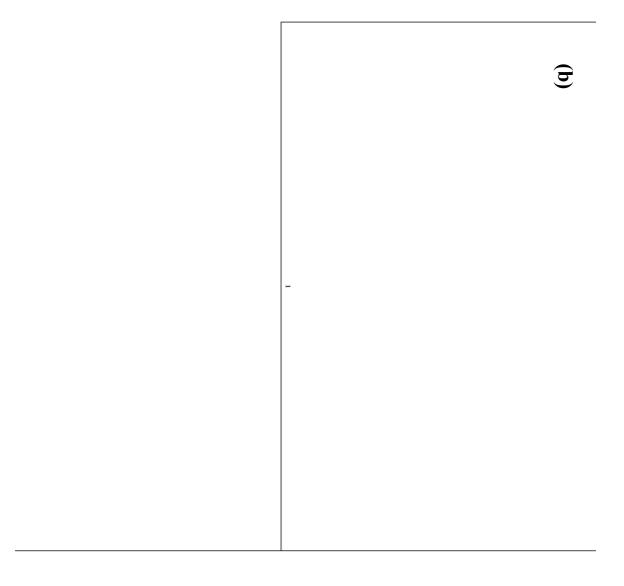
Também por meio do programa DNAsp foram realizadas análises estatísticas para cada gene e população a fim de estimar o número de haplótipos, diversidade haplotípica (h) das populações, diversidade nucleotídica (π) e o teste de neutralidade de Tajima (D de Tajima). D de Tajima, juntamente com a análise da frequência das diferenças nucleotídicas compartilhadas por pares de indivíduos (*mismatch distribution*) foram obtidos no programa R (Core Team R, 2016), com o auxílio do pacote "pegas" (Paradis, 2010). *Mismatch distribution* é utilizado para estudo da história demográfica do grupo de amostras, avaliando se o polimorfismo proveniente do DNA segue o modelo de variação neutra (Tajima, 1989).

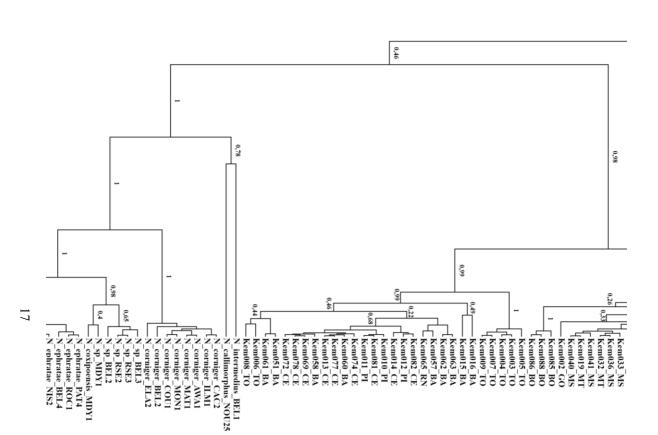
#### 4.RESULTADOS

#### 4.1. Amostras de Roraima

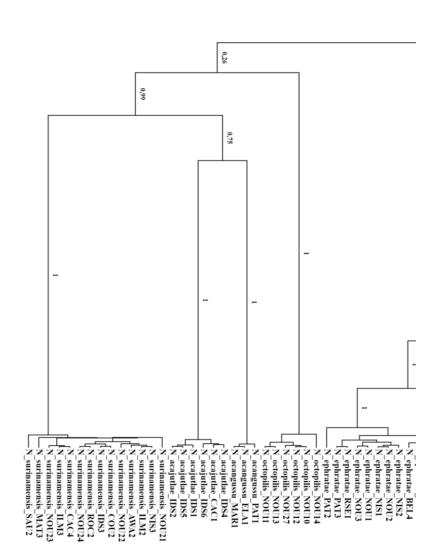
A partir dos dados concatenados, foi obtida uma árvore filogenética por interferência bayesiana, onde as amostras identificadas como *N. kemneri* coletadas em Roraima (RR) não estavam agrupadas com o grupo monofilético formado pelas demais amostras de *N. kemneri* (Figura 3). Este agrupamento com suporte de ramo alto, apresenta probabilidade de 99%. As colônias de RR provavelmente são da espécie *N. similis*, e foi um erro de identificação, pois encontram-se próximos a essa espécie, com probabilidade de 97% para esse agrupamento. Desta forma, estas amostras foram excluídas das análises populacionais.







 $\odot$ 



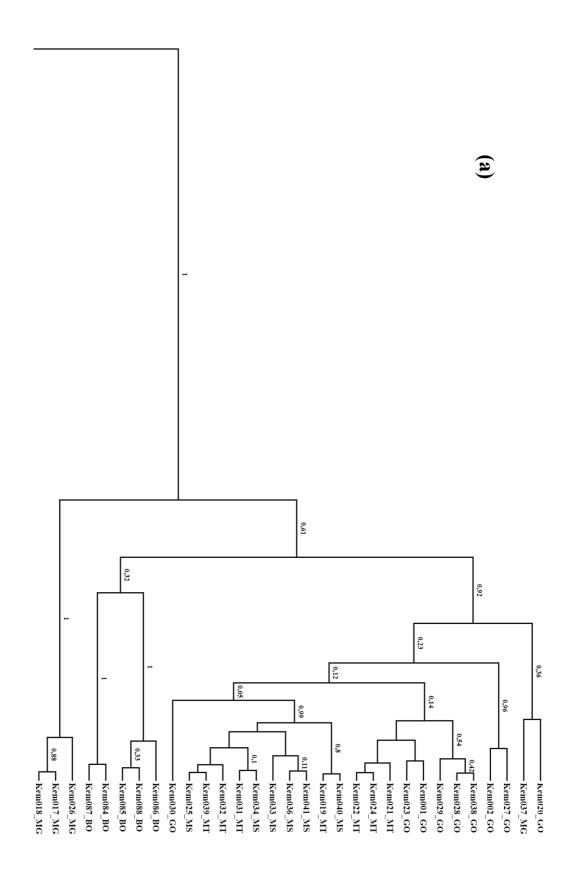
Nasutitermes retiradas de Roy et al. (2014). Suporte de ramo = probabilidade posterior. Figura 3: (a), (b) e (c) Arvore filogenética, construída por interferência bayesiana com indivíduos de N. kemneri e, de diversas outras espécies de

18

#### 4.2. Filogeografia de <u>N. kemneri</u>

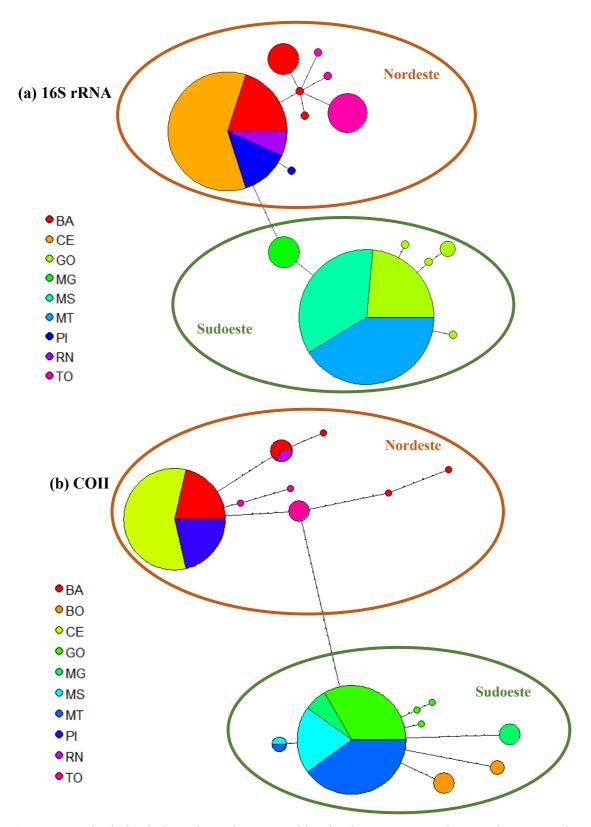
Na filogenia encontrada apartir de todos os indivíduos de *N. kemneri* (após excluir àqueles de RR) (Figura 4), pode-se observar um padrão de divisão entre duas populações principais, Nordeste e Sudoeste. Este padrão apresenta alto suporte de ramo, pois a probabilidade posterior é de 100%. Estes dados foram corroborados com as redes de haplótipos feitas para cada gene (Figura 5), sendo que as redes dos genes COI e ITS foram descartadas, pois o primeiro apresentam poucos indivíduos e o segundo pouca diverdidade. Os resultados demonstram que os indivíduos da população Nordeste se encontram na região superior e os indivíduos da população Sudoeste se encontram na porção inferior.

Este padrão foi utilizado posteriormente para as análises de variação populacional. Os quais, os resultados das AMOVAs para as populações Nordeste e Sudoeste mostraram uma maior variação interpopulacional do que intrapopulacional, sendo que para os genes 16S rRNA, COI e COII os resultados foram bastante próximos, pois se tratam de genes mitocondriais, obtendo-se uma média de 74,30% e 25,69% respectivamente (Tabela 4). Estes resultados corroboram com a filogenia e a rede de haplótipos, que mostram uma divergência entre esses dois grupos. A região ITS trata-se de um gene mais conservado, ou seja, com taxa de mutação menor, portanto apresentaram maior variação dentro das populações do que que entre as populações (Tabela 3).





demonstrando formação de dois grandes grupos, Sudoeste e Nordeste. Suporte de ramo = probabilidade posterior. Figura 4: (a) e (b) Árvore filogenética, construída por interferência bayesiana com todos os indivíduos da espécie N. kemneri e os quatro genes concatenados,

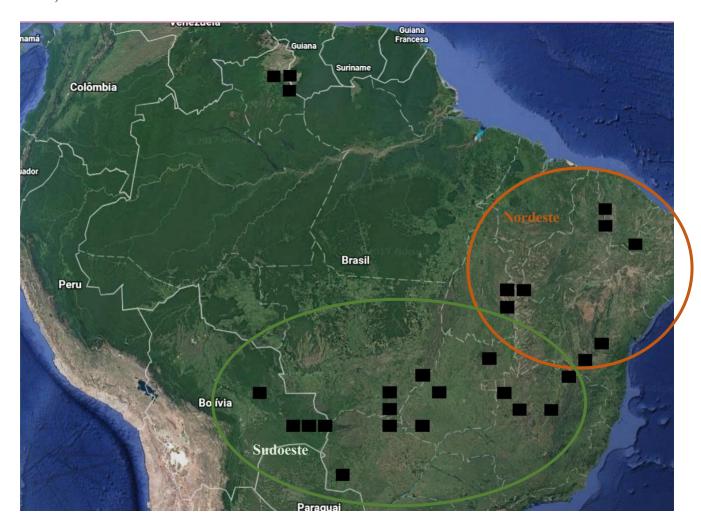


**Figura 5:** Rede de haplótipos de *N. kemneri* evidenciando a separação das populações Nordeste na região superior, e Sudoeste região inferior. (a) gene 16S rRNA, (b) gene COI.

**Tabela 3:** Resultados da AMOVA para as populações Nordeste e Sudoeste para os quatro genes estudados.

	16S rRNA	COI	COII	ITS
Variação Interpopulacional (%)	75,05	74,48	73,38	5,07
Variação Intrapopulacional (%)	24,95	25,52	26,62	94,93
FST	0,7504*	0,7448*	0,7338*	0,0507*

<sup>\*</sup>P<0,001



**Figura 4:** Mapa de distribuição das amostras da espécie *N. kemneri* com delimitação dos haplótipos de acordo com sua população.

## 4.3. Estatísticas descritivas e análises demográficas

O número de haplótipos, diversidade haplotípica (h), nucleotídica ( $\pi$ ) e D de Tajima para cada gene, e para cada população são apresentados na Tabela 4. Entre os genes, houve

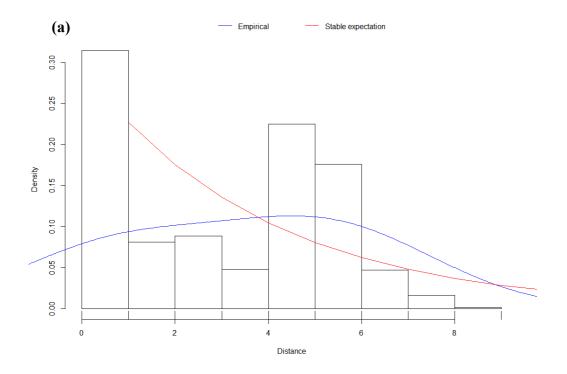
variação do número de haplótipos devido a quantidade de indivíduos e as mutações sofridas. A variação foi entre 12 a 16 haplótipos. Apenas o gene 16S rRNA apresentou número de haplótipos diferente para cada população, sendo que a população do Nordeste obteve três haplótipos a mais. A diversidade haplotípica foi acima de 0,677 para a maioria dos genes e populações, sendo que as populações do Nordeste apresentam diversidade menor em relação a população do Sudoeste, exceto para o gene 16S rRNA.

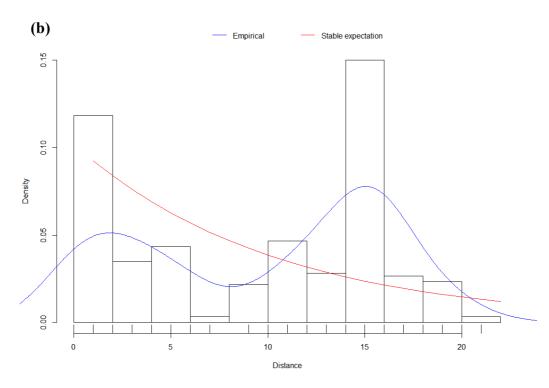
A diversidade nucleotídica foi bastante variável, sendo maior na população do Nordeste em todos os casos. O D de Tajima não foi significativo para nenhuma população para nenhum dos genes. Os gráficos de *mismatch distribution* apresentam tendência bimodal para os genes 16S rRNA, COI e COII, a região ITS apresenta tendência unimodal (Figura 6),

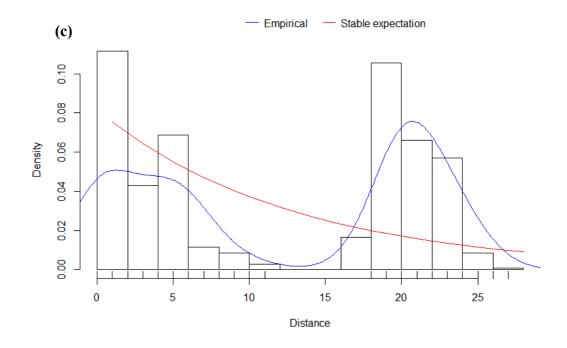
**Tabela 5:** Resultados das estatísticas descritivas para todos os genes e populações.

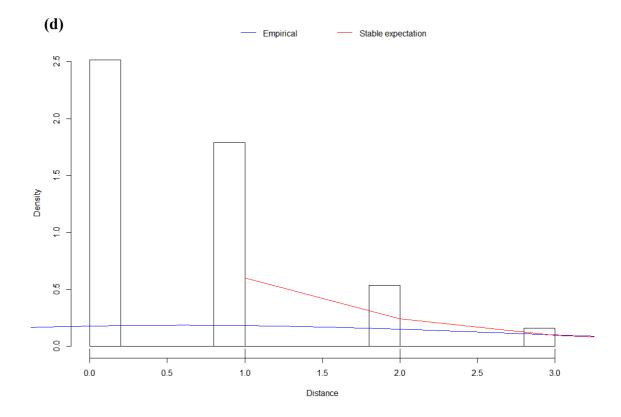
Gene/População	Número de	Diversidade	Diversidade	D de
	Haplótipos	Haplotipica (h)	Nucleotídica (π)	Tajima
16S rRNA – Todos	13	0,799	0,01083	0,11264
16S rRNA – Nordeste	8	0,702	0,00535	-0,81604
16S rRNA – Sudoeste	5	0,455	0,00159	-1,39336
COI – Todos	12	0,877	0,01809	-0,19333
COI - Nordeste	6	0,681	0,00858	-1,62628
COI – Sudoeste	6	0,855	0,00550	-0,12437
COII - Todos	16	0,848	0,01922	0,99703
COII - Nordeste	8	0,677	0,00555	-0,92037
COII – Sudoeste	8	0,701	0,00436	-1,11514
ITS – Todos	4	0,497	0,00121	-0,07560

<sup>\*</sup> P<0.01









**Figura 5:** *Mismatch distribution* para cada gene. (a) gene 16S rRNA, (b) gene COI, (c) gene COII e (d) região ITS.

# 5.DISCUSSÃO

#### 5.1. Amostras de Roraima

Apesar da hipótese inicial ser de que os indivíduos coletados na savana de Roraima pertenciam à espécie de *N. kemneri*, as análises moleculares não corroboraram. Essas amostras agrupam-se com *N. similis*. O gênero *Nasutitermes* é o gênero de cupins com maior número de espécies, com maior diversidade neotropical, possuindo uma taxonomia complicada, o que resulta em dificuldade para a identificação das espécies (Constantino, 1999). As espécies *N. kemneri* e *N. similis* possuem características parecidas, como por exemplo, ambos possuem bastante pelos na cabeça, além disso, a coloração da cabeça de *N. similis* pode ser bastante variável (Emerson, 1935). Com isso erros na identificação e diferenciação das espécies podem ocorrer.

## 5.2. Filogeografia de <u>N. kemneri</u>

As populações encontradas na filogenia e na rede de haplótipos foram corroboradas com os resultados obtidos na análise de AMOVA. Uma das populações ocupa as regiões delimitadas pela Caatinga (população do Nordeste), e a outra as regiões do Cerrado e Chaco (população do Sudoeste). Este padrão pode ser relacionado ao soerguimento do planalto central durante o Terciário, que resultou em altas altitudes para o Cerrado, enquanto houve desnudação na Caatinga e subsidência do Chaco (Carvalho & Almeida, 2011), o que pode ter dividido as populações. Esse padrão também foi encontrado por Silva (1995), com aves que apresentaram distribuição disjunta entre o Cerrado e Cadeia do Espinhaço, e regiões de formação aberta no Sul, incluindo o Chaco. Porzecanski & Cracraft (2005), encontraram padrões que corroboram com a hipótese de Silva (1995), o trabalho realizado por eles também encontrou populações de aves distribuídas entre Cerrado, Caatinga e Chaco, entretanto as

populações do Cerrado e Chaco compartilhavam mais espécies do que com a Caatinga, isso se deve aos corredores úmidos que segregam a Caatinga do Cerrado e Chaco.

A hipótese de refúgios originados devido à expansão e contração da vegetação durante os períodos glaciais e interglaciais foi descartada, pois a hipótese de refúgio de Haffer (1982, 1969) se baseia na formação de grupos geneticamente distintos, distribuídos em forma de "manchas" nas vegetações aberta ou nas florestas tropicais. Ou seja, as populações apresentariam variações de diversidade genética intrapopulacional, obtendo-se dados de algumas "manchas" com diversidade intrapopulacional maior e outras diversidade menor. Estes tipos de resultados não foram encontrados, ao contrário disso, foram encontradas as duas populações muito bem delimitadas, além de baixa diversidade genética entre as populações.

#### 5.3. Estatísticas descritivas e análises demográficas

O número de haplótipos para cada gene variou devido a diferença dos genes, ou seja, cada gene apresenta um nível de conservação, sendo assim, genes mais conservados possuem taxa de mutação menor, consequentemente levam mais tempo para fixação de mutações, e aparecimento das divergências de haplótipos. A diversidade haplotípica varia entre 0 e 1 os resultados mostraram que há alto grau de diversidade em cada gene, assim como em cada população, já que a maioria dos valores estão acima de 0,67. Apenas para a população Sudoeste do gene COI e para a região ITS que foram abaixo de 0,5, entretanto, também apresentam alguma diversidade. Os resultados também nos mostram que para o gene 16S rRNA a população do Nordeste apresenta maior variabilidade, enquanto que os genes COI e COII a população do Sudoeste que apresentam maior diversidade. A partir disso, é possível dizer que se trata de uma espécie bastante diversa, com populações também diversas.

A diversidade nucleotídica para todos os genes e populações apresentam valores baixos (<0,01), e segundo Grant & Bowen (1998), esse tipo de resultado é evidência de gargalo populacional ou eventos fundadores recentes.

Os gráficos de *mismatch distribution* apresentaram tendência bimodal para os genes 16S rRNA, COI e COII indicando a presença de duas populações distintas. Cada pico desse gráfico bimodal representa um gráfico unimodal para cada uma das duas populações formadas (Nordeste e Sudoeste), diante disso podemos dizer que quando as populações são analisadas separadamente obtemos um gráfico unimodal que representa expansão recente e proveniente de população formadora pequena (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992; Mousset, et al., 2004). A análise para a população total com a região ITS, também resultou em um gráfico unimodal. Isso é explicado por esse gene ser mais conservado que os demais, não apresentando variação interpopulacional, ou seja, não detecta duas populações diferentes.

# 6.CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que a população de Roraima não se trata da mesma espécie que as demais amostras, já que na análise da árvore filogenética não formaram um grupo monofilético. Sem as amostras de Roraima, a espécie *N. kemneri* é recuperada como grupo irmão da espécie *N. similis*. Para as amostras de *N. kemneri* que formaram grupo monofilético, pode-se dizer que, embasado na rede de haplótipos, análise de AMOVA e árvore filogenética, há quebra genética entre a população presente na Caatinga (determinado pelas populações originárias do Norte e Nordeste) e no Cerrado (determinado pelas populações originárias do Centro Oeste, Sudeste e Bolívia).

Diante dos resultados estatísticos, é possível inferir que dentre as hipóteses previamente sugeridas, a hipótese do surgimento do Planalto Central é a mais provável explicar para o padrão encontrado. Em populações derivadas de refúgios seriam encontrados

resultados que indicariam expansão populacional, e os resultados encontrados demostram estabilidade, portanto a hipótese de refúgio foi descartada.

# 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVISE, J. C. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press. 447 pp. Massachusetts. 2000.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, J. R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between Population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics. vol. 18. pp. 489-522. 1987.

BOULOGNE, I.; CONSTANTINO, R.; AMUSANT, N.; FALKOWSKI, M.; RODRIGUES, A. M. S.; HOUËL, E. Ecology of termites from the genus *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) and potential for science-based development of sustainable pest management programs. Journal of Pest Science. Doi:10.1007/s10340-016-0796-x. 2016.

CLEMENT, M.; POSADA. D.; CRANDALL. K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular ecology. vol. 9. pp. 1657-1659. 2000.

CONSTANTINO, R. On-line termite database. Disponível em: http://164.41.140.9/catal/. 2016. Acesso em: 10/10/2016.

CONSTANTINO, R.; ACIOLI, A. N. S. Termite Diversity in Brazil (Insecta: Isoptera). In: Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems (MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O., BRUSSAARD, L. eds.). CAB Internacional. pp. 117-128. Brasília. 2006. CONSTANTINO, R. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. Papéis Avulsos de Zoologia. vol. 40. pp, 387-448. 1999. DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models,

new heuristics and parallel computing. Nature methods. vol. 9. n. 8. pp. 772-772. 2012.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular Biology and Evolution. vol. 29 n. 8. pp. 1696-1673. 2012.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, Nucleic Acids Research. vol. 32 n. 5. pp. 1792-1797. 2004.

EXCOFFIER, L.; LISCHER H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. vol. 10. n. 3. pp. 564-567. 2010.

ENGEL, M. S.; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, K. Termites (Isoptera): Their Phylogeny, Classification, and Rise to Ecological Dominance. American Museum of Natural History. n. 3650. pp. 1-27. Nova Iorque. 2009.

EMERSON, A. Termitophile Distribution and Quantitative Characters as Indicators of Physiological Speciation in British Guiana Termites (Isoptera), *Annals of the Entomological Society of America*. vol. 28. n. 3. pp. 369–395. 1935.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. n. 3. pp. 294-299. 1994.

GRANT, W. A. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. Journal of Heredity, v. 89, n. 5, p. 415-426, 1998.

HAFFER, Jürgen. Speciation in Amazonian forest birds. Science, v. 165, n. 3889, pp. 131-137, 1969.

HICKERSON, M.J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C.H.; JOHNSON, J.B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P.F.; YODER, A. D.

Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. Molecular Phylogenetics and Evolution. v. 54. pp. 291-301. 2010.

INWARD, D.; BECCALONI, G.; EGGLETON, P. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. Biology letters. vol. 3. n. 3. pp. 331-335. 2007.

INWARD, D. J. G.; VOGLER, A.; EGGLETON, P. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. Molecular Phylogenetics and Evolution. vol. 44. n. 3. pp. 953-967. 2007.

JENKINS, T. M.; JONES, S. C.; LEE, C. Y.; FORSCHLER, B. T.; CHEN, Z.; LOPEZ-MARTINEZ, G.; KLEINSCHMIDT, S. Phylogeography illuminates maternal origins of exotic *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). Molecular phylogenetics and evolution, vol. 42. n. 3. pp. 612-621. 2007.

JOUQUET, P.; CHINTAKUNTA. S.; BOTTINELLI, N.; SUBRAMANIAN, S.; CANER. L. The influence of fungus-growing termites on soil macro and micro-aggregates stability varies with soil type. Applied Soil Ecology. vol. 101. pp. 117-123. 2016.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. vol. 28. n. 12. pp. 1647-1649. 2012.

KINGMAN, J. F. C. The coalescent. Stochastic Processes and their Applications. vol. 13. n. 3. pp. 235-248. 1982.

KRISHNA, K.; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, V.; ENGEL, M. S. Treatise on the isoptera of the world. Bulletin of the American Museum of Natural History. v. 377. 491 pp. 2013.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets (submitted). 2015.

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

MATHEWS, A. G. A. Studies on termites from the Mato Grosso state, Brazil. Academia Brasileira de Ciências. 267 pp. Rio de Janeiro. 1977.

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

MOUSSET, S.; DEROME, N.; VEUILLE, M. A Test of Neutrality and Constant Population Size Based on the Mismatch Distribution. Mol. Biol. Evol., vol. 21. n. 4. pp.724–731. 2004.

PARADIS E. pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. Bioinformatics. vol. 26. p. 419–420. doi:10.1093/bioinformatics/btp696. 2010.

PENNINGTON, R. T.; PRADO, D. E.; PENDRY, C. A. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. Journal of Biogeography. vol. 27. n. 2. pp. 261-273. 2000.

PORZECANSKI, A.; CRACRAFT, J. Cladistic analysis of distributions and endemism (CADE): using raw distributions of birds to unravel the biogeography of the South American Aridlands. J. Biogeogr. vol. 32. pp. 261-275. 2005.

PRESTWICH, G.D. From tetracycles to macrocycles: chemical diversity in the defense secretions of nasute termites. Tetrahedron Lett. vol. 38. n. 13. p. 1911-1919. 1982.

QUENNEDEY, A. Morphology and ultrastructure of termite defense glands. In: Defensive mechanisms in social insects (HERMANN, H. R. eds). Praeger Scientific. Nova Iorque. 1984. R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <a href="https://www.R-project.org/">https://www.R-project.org/</a>. 2016.

RAMBAUT, A. DRUMMOND, A. J. Tracer. Available at: <a href="http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer.v1.4">http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer.v1.4</a>. 2007.

ROGERS, A. R.; HARPENDINGF, H. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. Mol. Bid. Evol, vol. 9. n. 3. pp. 552-569. The University of Chicago, 1992.

ROY, V.; CONSTANTINO, R.; CHASSANY, V.; GIUSTI-MILLER, s.; DIOUF, M.; MORA, F.; HARRY, M. Species delimitation and phylogeny in the genus *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) in French Guiana. Molecular Ecology. vol. 23. n. 4. pp. 902-920. 2014.

Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Cerrado e Pantanal – Áreas e Ações Prioritárias para Conservação da Biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. 2007.

SILVA, J. Biogeographic analysis of the South American avifauna. Steenstrupia, vol. 21. pp. 49-67. 1995.

SILVA, M. P. TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. Estado de Conservação do Chaco (Savana Estépica) Brasileiro. II Simpósio Internacional Savanas Tropicais. Brasília, 2008.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the entomological Society of America, vol. 87. n. 6. pp. 651-701. 1994.

SNYDER, T. E. Catalog of the Termites (Isoptera) of the world. Smithsonian Miscellaneous Collection. vol. 112. n. 1. pp. 1-490. 1949.

SZALANSKI, A. L.; SCHEFFRAHN, R. H.; AUSTIN, J. W.; KRECEK, J.; & SU, N. Y. Molecular phylogeny and biogeography of Heterotermes (Isoptera: Rhinotermitidae) in the

West Indies. Annals of the Entomological Society of America, vol. 97. n. 3. pp. 556-566. 2004.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. vol. 123. n. 3. pp. 585-595. 1989.

TEMPLETON, A. R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C. A. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. Genetics. vol. 140. n. 2. pp. 767-782. 1995.

WERNECK. F.P.; NOGUEIRA, C.; COLLI, G. R.; SITES JR, J. W.; COSTA, C. G. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. Journal of Biogeography. vol. 39. n. 9. pp. 1695-1706. 2012.

WILSON, E. O. The Termites. In: The Insect Societies (WILSON, E. O. eds.). Belknap Press of Harvard University Press. 548 pp. Cambridge. 1971.

ZANELLA, F.C.V. Evolução da Biota da Diagonal de Formações Abertas Secas da América do Sul. In: Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos (CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. eds.). Roca. pp. 198-220. São Paulo. 2010.

# 8. ANEXOS

**Tabela 1:** Localidades das amostras de *Nasutitermes kemneri* que estão depositadas no MZUSP e que foram coletadas na Bolívia, e foram utilizadas nas análises (Figura 1).

Cód. Seq.	Estado	Lat	Long	16S	COI	COII	ITS
Kem001_GO	GO	-14.098	-48.375	X		X	X
Kem002_GO	GO	-14.098	-48.375	X	X	X	X
Kem003_TO	TO	-11.026	-47.141	X			X
Kem004_TO	ТО	-11.026	-47.141	X			X
Kem005_TO	TO	-11.026	-47.141	X		X	
Kem006_TO	ТО	-10.935	-47.334	X	X	X	X
Kem007_TO	TO	-10.938	-47.316	X	X	X	
Kem008_TO	TO	-10.336	-46.991	X		X	
Kem009_TO	ТО	-10.336	-46.991	X		X	X
Kem010_PI	PI	-5.202	-41.686	X		X	X
Kem011_PI	PI	-5.605	-41.381	X		X	X
Kem012_PI	PI	-6.161	-41.269	X		X	X
Kem013_CE	CE	-7.240	-39.499	X		X	
Kem014_CE	CE	-7.289	-39.536	X		X	
Kem015_BA	BA	-13.3167	-41.564	X	X	X	X
Kem016_BA	BA	-14.132	-42.596	X	X	X	X
Kem017_MG	MG	-15.884	-43.325	X		X	X
Kem018_MG	MG	-17.875	-44.197	X		X	X
Kem019_MT	MT	-16.638	-54.707	X	X	X	X
Kem020_GO	GO	-16.301	-51.448	X	X	X	X
Kem021_MT	MT	-15.859	-52.287	X		X	X
Kem022_MT	MT	-15.859	-52.287	X	X	X	X
Kem023_GO	GO	-16.846	-47.472	X	X		X
Kem024_MT	MT	-15.859	-52.287	X	X	X	X
Kem025_MS	MS	-18.461	-54.515	X		X	X
Kem026_MG	MG	-17.975	-46.380	X		X	X
Kem027_GO	GO	-16.724	-47.559	X		X	X
Kem028_GO	GO	-16.301	-51.448	X		X	X
Kem029_GO	GO	-16.300	-51.530	X		X	X
Kem030_GO	GO	-16.429	-51.844	X		X	X
Kem031_MT	MT	-16.638	-54.707	X		X	X
Kem032_MT	MT	-16.788	-54.664	X		X	X
Kem033_MS	MS	-17.843	-54.702	X	X		X
Kem034_MS	MS	-18.093	-54.695	X	X		X
Kem036_MS	MS	-21.801	-57.224	X	X	X	X
Kem037_MG	MG	-17.454	-46.712	X	X	X	X

Kem038_GO	GO	-16.300	-51.530	X	X	X	X
Kem039_MT	MT	-16.788	-54.664	X		X	X
Kem040_MS	MS	-18.093	-54.695	X		X	X
Kem041_MS	MS	-21.732	-57.600	X		X	X
Kem042_RR	RR	3.293	-60.134	X	X	X	X
Kem043_RR	RR	2.340	-60.908	X		X	X
Kem044_RR	RR	3.649	-61.705	X			X
Kem045_RR	RR	3.801	-61.736	X	X	X	X
Kem046_RR	RR	3.221	-60.177	X	X	X	X
Kem047_RR	RR	3.785	-61.757	X	X	X	X
Kem048_RR	RR	3.293	-60.134	X			X
Kem050_RR	RR	2.340	-60.908	X			X
Kem051_BA	BA	-12.538	-41.368	X			X
Kem057_BA	BA	-11.647	-41.269	X	X	X	X
Kem058_BA	BA	-11.647	-41.269	X	X	X	X
Kem060_BA	BA	-11.647	-41.269	X	X	X	X
Kem061_BA	BA	-12.935	-41.064	X		X	X
Kem062_BA	BA	-12.976	-40.967	X	X	X	
Kem063_BA	BA	-12.976	-40.967	X	X	X	
Kem065_RN	RN	-6.022	-37.990	X		X	
Kem069_CE	CE	-5.035	-39.010	X	X	X	X
Kem072_CE	CE	-5.035	-39.010	X	X		
Kem074_CE	CE	-5.035	-39.010	X	X	X	
Kem077_CE	CE	-5.035	-39.010	X	X	X	X
Kem078_CE	CE	-5.035	-39.010	X	X	X	
Kem081_CE	CE	-5.035	-39.010	X		X	
Kem082_CE	CE	-5.035	-39.010	X		X	X
Kem083_BO	ВО	-16.493	-62.652				
Kem084_BO	ВО	-18.107	-60.086			X	
Kem085_BO	ВО	-18.107	-60.086			X	
Kem086_BO	ВО	-18.814	-58.625			X	
Kem087_BO	ВО	-18.464	-59.477			X	
Kem088_BO	ВО	-18.464	-59.477			X	