

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC (UFABC)

GRAZIELA SÓRIA VIRGENS

**FILOGENIA MOLECULAR DO GÊNERO *SYNTERMES* HOLMGREN
(INSECTA: BLATTARIA: TERMITIDAE)**

SÃO BERNARDO DO CAMPO – SP

2022

GRAZIELA SÓRIA VIRGENS

**FILOGENIA MOLECULAR DO GÊNERO *SYNTERMES* HOLMGREN
(INSECTA: BLATTARIA: TERMITIDAE)**

Projeto científico apresentado à Universidade Federal do ABC (UFABC), como Trabalho de Conclusão de Curso como parte obrigatória para o Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.^a Dr. Tiago Fernandes Carrijo

SÃO BERNARDO DO CAMPO – SP

2022

RESUMO

Syntermes Holmgren é um gênero de cupins exclusivo da América do Sul cisandina, conhecidos pelo seu tamanho avantajado, possuem 23 espécies descritas. Este estudo fornece uma filogenia molecular datada, usando genomas mitocondriais de 16 espécies disponíveis e a datação baseada em fósseis descobertos por outros cientistas. Espera-se com essa análise obter hipóteses sobre as relações entre as espécies desse gênero e compará-las com as propostas por Reginaldo Constantino. Através desses dados, foi possível estimar a formação desse clado em aproximadamente 16 milhões de anos atrás. *Syntermes molestus* foi a primeira espécie a divergir, sendo o grupo irmão de todas as outras espécies do gênero, assim como foi inferido por Constantino; *S. praecellens* também ficou bem definido; temos um clado formado por *S. crassilabrum* como grupo interno de *S. peruanus* e outro clado com *S. grandis* e *S. obtusus* como grupo interno de *S. cearensis*; outra relação definida é a de *S. aculeosus* com *S. dirus*. Mas *Syntermes nanus* que também foi dito como basal em um clado monofilético com *Syntermes molestus*, se apresentou de forma parafilética com exemplares em posições que não formam um grupo monofilético com todos os representantes dessa espécie, deixando o gênero parafilético se considerarmos essa amostra. Isto levantou importantes questionamentos neste trabalho sobre a forma que os processos de identificação, manuseio em laboratórios e abastecimento em bancos de dados são feitos em diferentes instituições.

Palavras-chave: cupins; Isoptera; filogenética; mitogenoma; América do Sul; relógio molecular.

ABSTRACT

Syntermes Holmgren is a genus of termite found exclusively in South America cisandine, and is known for its large size, with 23 species described. This study provides a dated molecular phylogeny using mitochondrial genomes from 16 available species and based on fossils discovered by other scientists. With this analysis it is expected to obtain hypotheses about the relationships between the species of this genus and to compare them with those proposed by Reginaldo Constantino. Using this data, it was possible to estimate the origin of this clade at around 16 million years. *Syntermes molestus* was the first species to diverge, being the sister group to all other species in the genus, as inferred by Constantino; *S. praecellens* was also well defined; we have a clade formed by *S. crassilabrum* as an ingroup of *S. peruanus* and another clade with *S. grandis* and *S. obtusus* as an ingroup of *S. cearensis*; another clear relationship is that of *S. aculeosus* with *S. dirus*. But *Syntermes nanus*, also referred to as basal in a monophyletic clade with *Syntermes molestus*, presented itself paraphyletically with specimens in positions not forming a monophyletic group with all representatives of that species, leaving the genus paraphyletic when we consider this specimen. This raised important questions in this work about how the processes of identification, handling in laboratories and making available in databases are carried out in different institutions.

Keywords: termites; Isoptera; phylogenetics; mitogenome; South America; molecular clock.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	06
2 MATERIAIS E MÉTODOS	08
3 RESULTADOS	12
4 DISCUSSÃO	14
4.1 COMPARAÇÃO FILOGENÉTICA	14
4.2 HISTÓRIA GEOGRÁFICA PARA O INÍCIO DO GÊNERO	18
5 CONCLUSÃO	23
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Syntermes* Holmgren (1909) (Termitidae, Syntermitinae), possui atualmente 23 espécies conhecidas, distribuídas exclusivamente na América do Sul cisandina, na porção leste dos Andes, desde a Venezuela até o norte da Argentina (CONSTANTINO, 2020). Este gênero foi descrito em 1910 (HOLMGREN, 1910) (apesar de já ter citado o nome em 1909), mas algumas espécies que atualmente fazem parte dele, antes eram do gênero *Termes*, como *Termes spinosum* (LATREILLE, 1804, apud CONSTANTINO, 2020, p. 456). O gênero era tradicionalmente incluído na subfamília Nasutitermitinae, que incluía todos os cupins com um naso, uma estrutura no formato de tubo com a abertura de uma glândula de defesa na ponta. Em 2004, entretanto, Nasutitermitinae se restringiu aos cupins com naso e mandíbulas vestigiais, e a subfamília Syntermitinae foi descrita para incluir os “nasutos mandibulados” (ENGEL; KRISHNA, 2004).

Uma característica deste gênero são os ninhos subterrâneos, que quando se vê algo na superfície, é o material elevado para fora pela escavação dos operários, como é o caso do *Syntermes dirus*, que podem construir seus murundus (cupinzeiros ou termiteiros) embaixo de vegetações e as vezes de colônias de formigas, fazendo com que este sedimento que está acima dele possa chegar a dois metros e meio de altura (SOUZA *et al*, 2020; MARTIN *et al.*, 2018). A alimentação deste gênero pode ser separada em dois tipos: as espécies de savana, que se alimentam principalmente de gramíneas e as florestais, que se alimentam apenas de serrapilheira. Nos dois casos, as espécies forrageiam durante a noite e levam o alimento para seus ninhos (CONSTANTINO, 1995). Além dos ninhos subterrâneos ser uma dificuldade para a coleta desses insetos, que se escondem no subsolo ao serem perturbados na superfície (EMERSON, 1945), acontece em colônias jovens a presença de um soldado derivado após o terceiro instar do desenvolvimento pós embrionário (*first form*) e, em colônias intermediárias podem ter soldados derivados do terceiro e do quarto instar (*perfect form*), que podem ser considerados uma espécie distinta pelo identificador, caso não seja coletado as duas variedades de soldados (*first e perfect form*) na mesma amostra (CONSTANTINO, 1995).

Esse gênero já passou por duas revisões taxonômicas. A primeira delas foi realizada em 1945 (EMERSON, 1945), mas com uma limitação de amostras, e a segunda em 1995 (CONSTANTINO, 1995), já com uma ampla amostragem para a maioria das espécies do gênero, para criar uma filogenia morfológica. Com o avanço das tecnologias voltadas para a genética e diminuição das dificuldades para se decifrar os códigos genéticos dos seres vivos, é possível agora utilizar características moleculares, além daquelas morfológicas, para estudar

as relações e as identidades das espécies.

Quando o Dr Reginaldo Constantino revisou o gênero *Syntermes* (CONSTANTINO, 1995), o primeiro mitogenoma de inseto já havia sido sequenciado, uma espécie de *Drosophila* em 1985 (CLARY; WOLSTENHOLME, 1985). Entretanto, não se tinha tecnologia a disposição naquela época, com capacidade de processamento suficiente ou softwares ágeis em comparação aos tempos atuais (GADELHA, 2009).

Para as análises filogenéticas é utilizado o mitogenoma (o código genético extraído da mitocôndria das células), porque seu tamanho é menor em comparação com o DNA do núcleo celular, facilitando o trabalho, além do núcleo ser alvo de muitas infecções virais que podem introduzir mais pares de bases (CAMERON, 2014). É importante reforçar que nenhum marcador irá necessariamente refletir a verdadeira história evolutiva do grupo, mas o acúmulo de evidências, nos dá uma maior chance de recuperar a história evolutiva. Neste caso estamos usando as mitocôndrias como evidências para esse grupo (DUCHÊNE, *S. et al.*, 2011).

Este estudo tem como finalidade realizar uma análise filogenética molecular e datada para o gênero *Syntermes*, utilizando dados de mitogenomas e datas de fósseis para calibrar a árvore. O resultado dos dados moleculares será comparado com a filogenia apresentada por Constantino *et al.* (1995) utilizando caracteres morfológicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O gênero *Syntermes* possui 23 espécies distribuídas pela América do Sul, então as amostras usadas neste trabalho são dos seguintes países: Bolívia, Brasil, Guiana Francesa, Paraguai e Peru. No total foram utilizadas 30 amostras deste gênero, incluindo 13 espécies e dois morfotipos que não estão identificadas (*Syntermes* sp A e *Syntermes* sp C). Essas amostras foram enviadas dos acervos do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), pela Doutora Eliana Marques Cancello, e da Universidade da Flórida (UF), pelo Doutor Rudolph H. Scheffrahn, ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Okinawa (OIST), sob a responsabilidade do Doutor Thomas Bourguignon e da Doutora Menglin Wang, que estão sequenciando os genomas mitocondriais e colaborando para o desenvolvimento desse e de outros estudos.

Foram utilizados 66 mitogenomas para a reconstrução filogenética, sendo 30 de *Syntermes* e 36 de grupos externos retirados do GenBank (Quadro 1). As sequências foram alinhadas no software Geneious 9.0.5 (<https://www.geneious.com/>; KEARSE *et al.*, 2012) através do algoritmo MUSCLE (EDGAR *et al.*, 2004). As sequências anotadas de *Labiotermes labraris* e *Heterotermes crinitus* foram utilizadas para distinguir as regiões codificantes e não codificantes das demais sequências.

Quadro 1. Sequências de genomas mitocondriais utilizadas neste trabalho, incluindo os códigos daquelas extraídas do GenBank e local de coleta.

Amostras	Origem	Códigos	Local de coleta	Coordenadas	
				Latitude	Longitude
<i>Armitermes_meridionalis</i>	GenBank	KY224487			
<i>Araujotermes_parvellus</i>	GenBank	KY224477			
<i>Ateuchotermes_retifaciens</i>	GenBank	KY224497			
<i>Atlantitermes_snyderi</i>	GenBank	KY224583			
<i>Bulbitermes_spingaporensis</i>	GenBank	KY224725			
<i>Caetetermes_taquarussu</i>	GenBank	KP026285			
<i>Cavitermes_tuberosus</i>	GenBank	KY224568			
<i>Coatitermes_kartaboensis</i>	GenBank	KY224708			
<i>Constrictotermes_cavifrons</i>	GenBank	KP026290			
<i>Cornitermes_cumulans2</i>	GenBank	KY224538			
<i>Cornitermes_pugmax</i>	GenBank	KY224474			
<i>Cornitermes_sp.A</i>	GenBank	KY224702			
<i>Cubitermes_fungifaber</i>	GenBank	KP026265			
<i>Cyrrillotermes_angulariceps</i>	GenBank	KY224613			
<i>Cyrrillotermes_sp.A</i>	GenBank	KY224627			
<i>Embiratermes_brevinasus</i>	GenBank	KY224580			

<i>Embiratermes_neotenicus</i>	GenBank	KP026262			
<i>Ephelotermes_melachoma</i>	GenBank	KY224392			
<i>Hospitalitermes_hospitalis</i>	GenBank	KY224508			
<i>Leucopitermes_leucops</i>	GenBank	KY224452			
<i>Macrotermes_subhyalinus</i>	GenBank	KY224559			
<i>Microcerotermes_crassus</i>	GenBank	KY224445			
<i>Microcerotermes_parvus</i>	GenBank	KY224699			
<i>Microcerotermes_serrula</i>	GenBank	KY224710			
<i>Mirocapritermes_connectens</i>	GenBank	KY224537			
<i>Nasutitermes_macrocephalus</i>	GenBank	KY224724			
<i>Nasutitermes_neoparvus</i>	GenBank	KY224526			
<i>Nasutitermes_takasagoensis</i>	GenBank	KP026260			
<i>Nasutitermes_triodiae</i>	GenBank	KY224403			
<i>Neocapritermes_taracua</i>	GenBank	KY224527			
<i>Patawatermes_nigripunctatus</i>	GenBank	KY224476			
<i>Postsubulitermes_parviconstrictus</i>	GenBank	KP026268			
<i>Procornitermes_araujoi</i>	GenBank	KY224636			
<i>Rhynchotermes_nasutissimus</i>	GenBank	KY224701			
<i>Silvestritermes_heyeri2</i>	GenBank	KY224492			
<i>Syntermes_aculeosus_1349</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-9.588455	-65.066459
<i>Syntermes_cearensis_1438</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	3.641795	-60.99513
<i>Syntermes_cearensis_204</i>	Dados inéditos		Bolívia	-18.81425	-58.62542
<i>Syntermes_chaquimayensis_967</i>	Dados inéditos		Peru	-9.46759	-75.2367
<i>Syntermes_crassilabrum_1351</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-9.588455	-65.066459
<i>Syntermes_dirus_1501</i>	Dados inéditos		Brasil, Piauí	-9.145	-44.47472.222
<i>Syntermes_dirus_1519</i>	Dados inéditos		Brasil, Bahia	-12.4825	-40.9558333
<i>Syntermes_dirus_1542</i>	Dados inéditos		Brasil, Espírito Santo	-19.1519568	-40.07799813
<i>Syntermes_grandis_1326</i>	Dados inéditos		Brasil, Minas Gerais	-15.173	-45.72
<i>Syntermes_molestus_1025</i>	Dados inéditos		Venezuela	4.61870	-61.13539
<i>Syntermes_molestus_1321</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-9.4491	-64.357719
<i>Syntermes_molestus_1352</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-9.572735	-65.061017
<i>Syntermes_molestus_1353</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-9.588455	-65.066459
<i>Syntermes_molestus_1558</i>	Dados inéditos		Guiana Francesa	5.06323	-53.04763
<i>Syntermes_nanus_1439</i>	Dados inéditos		Brasil, São Paulo	-22.081654	-51.12027
<i>Syntermes_nanus_1440</i>	Dados inéditos		Brasil, Mato Grosso do Sul	-22.0667	-56.4017
<i>Syntermes_nanus_181</i>	Dados inéditos		Bolívia	-18.32542	-59.79337
<i>Syntermes_nr.grandis_1031</i>	Dados inéditos		Bolívia	-17.78779	-63.19880
<i>Syntermes_obtusius_741</i>	Dados inéditos		Paraguai	-24.44771	-56.43303
<i>Syntermes_peruanus_1354</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-9.572735	-65.061017
<i>Syntermes_peruanus_1355</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-9.634149	-65.451333
<i>Syntermes_praecellens_1505</i>	Dados inéditos		Brasil, São Paulo	-22.885833	-48.445
<i>Syntermes_sp_A_1557</i>	Dados inéditos		Guiana Francesa	5.06323	-53.04763
<i>Syntermes_sp_C_1556</i>	Dados inéditos		Guiana Francesa	5.06323	-53.04763
<i>Syntermes_spinosus</i>	GenBank	KP026293	Guiana Francesa, Petit Saut	5.06323	-53.04763
<i>Syntermes_spinosus_128</i>	Dados inéditos		Bolívia	-17.49893	-63.65244
<i>Syntermes_spinosus_1350</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-9.588455	-65.066459
<i>Syntermes_spinosus_1356</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-8.838231	-64.065542

<i>Syntermes_spinosus_1357</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-8.838231	-64.065542
<i>Syntermes_tanygnathus_1358</i>	Dados inéditos		Brasil, Rondônia	-9.145205	-64.496318
<i>Termes_fatalis</i>	GenBank	KY224726			

Essas sequências foram inseridas no jModelTest 2.0.1 (POSADA, D., 2004) para estimar o melhor modelo de evolução através da análise de verossimilhança, usando o critério de informação bayesiana (BIC – *Bayesian Information Criterion*), e para verificar se haveria necessidade de usar diferentes partições na análise filogenética. Todas as regiões se mostraram evoluindo sob o mesmo modelo: GTR+I+G, onde a sigla GTR é abreviação para *General Time Reversible* (modelo geral reversível no tempo), que significa que a frequência de nucleotídeos pode variar e possui taxas estimadas separadamente para todas as transições possíveis entre os quatro nucleotídeos (A, C, T e G). O I é a invariável local, que significa que alguns sítios são incapazes de mudar. E o G é a distribuição gama, que assume que a taxa de evolução em diferentes sítios ocorre em velocidades diferentes (PIE, 2016). Como todas as partições estão evoluindo sob o mesmo modelo, não houve necessidade de se particionar para realizar a análise filogenética.

O alinhamento foi inserido no programa BEAUti 1.8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2012), onde foi informado o modelo inferido: GTR+I+G. Os pontos de calibração foram informados com base em seis fósseis, que estão em clados que foram estabelecidos a priori como monofiléticos (Quadro 2). O modelo *Lognormal relaxed clock* (DRUMMOND *et al.*, 2006) foi utilizado para o relógio molecular e o modelo *Speciation: Yule Process* (GERNHARD, 2008) para a árvore. Uma corrida de 50 milhões de gerações pela MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) foi estipulada, e então foi gerado um arquivo para se inserir no BEAST 1.8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2012), no CIPRES Science Gateway V. 3.3 (MILLER *et al.*, 2011), onde foi realizada a análise filogenética por inferência bayesiana. Os resultados foram testados acerca da sua convergência no Tracer v1.6 (RAMBAUT *et al.*, 2014), onde se constatou que obteve boa consistência. Foram descartadas as primeiras árvores no TreeAnnotator 1.8.0 (DRUMMOND *et al.*, 2012), colocando um número equivalente a 10% do total da corrida, no caso, 5 milhões. O resultado foi plotado no FigTree v1.4.4 (RAMBAUT, A., 2018).

Quadro 2. Dados utilizados para calibração da análise filogenética, que foram inseridos no programa BEAUti 1.8.0

Grupo Taxonômico	Mean	Offset	Distribuição	Referência
Termitidae	10	47,80	Exponencial	(Engel et al., 2011)
Apicotermitinae	7	17,00	Exponencial	(Krishna & Grimaldi, 2009)
<i>Microcerotermes</i>	6	17,00	Exponencial	(Krishna & Grimaldi, 2009)
<i>Termes</i> + <i>Cavitermes</i> + <i>Ephelotermes</i>	5	17,00	Exponencial	(Krishna & Grimaldi, 2009)
<i>Constrictotermes</i> + <i>Caetetermes</i>	5	17,00	Exponencial	(Krishna, 1996)
<i>Araujotermes</i> + <i>Atlatitermes</i> + <i>Coatitermes</i>	3	17,00	Exponencial	(Krishna & Grimald, 2009)

3. RESULTADOS

A árvore resultante dessa análise (Figura 1) recuperou o gênero *Syntermes* como sendo parafilético, por causa das amostras da espécie *Syntermes nanus*, que se encontram fora do gênero. A amostra *S. nanus_181* se encontra como grupo irmãos de todos os gêneros, excluindo *Heterotermes*; *S. nanus_1439* deu relacionada com *Labiotermes*; e *S. nanus_1440* como grupo irmão do clado composto por *Cornitermes* + *Procornitermes*. Isto provavelmente aconteceu por alguma contaminação que antecede este trabalho e que será discutida mais a frente, pois nem as amostras dessa espécie formaram um grupo monofilético. Por ora, excluiremos essa espécie e iremos tratar dos resultados incluindo apenas as demais espécies e, assim, com *Syntermes* sendo monofilético.

Os resultados estimaram a origem do gênero há aproximadamente 16 milhões de anos (Ma), com intervalo de confiança (IC 95%) de 12-20 Ma (Figura 1), utilizando o grupo coroa, que é onde começa a diversificação. Neste ponto a espécie *Syntermes molestus* é recuperada como grupo irmão das demais espécies do gênero, divergindo primeiro há 16 Ma (IC 95%: 12-20 Ma).

O clado roxo tem *Syntermes crassilabrum* como grupo interno de *Syntermes peruanus*. Este grupo roxo divergiu das demais espécies de *Syntermes*, excluindo *S. molestus*, há aproximadamente 11 Ma (IC 95%: 8-15 Ma). E a linhagem que deu origem à espécie *S. praecellens* se divergiu há 7 Ma (IC 95%: 5-9 Ma). O grupo verde formado por *Syntermes obtusus*, *Syntermes grandis*, *Syntermes cearensis*, *Syntermes* sp A e *Syntermes* sp C teve sua origem estimada há 5 Ma, com IC 95%:4-6 Ma atrás. O grupo ciano tem sua origem estimada a 3 Ma (IC 95%: 2-5 Ma), onde *S. dirus* se diversificou de *S. aculeosus* há 1,3 Ma (IC 95%: 0,7-1,9 Ma).

O grupo laranja teve sua origem há 2,5 Ma (IC 95%: 1,6-3,5 Ma), onde *S. chaquimayensis* se diverge de *S. spinosus* há 0,6 Ma (IC 95%: 0,3-1 Ma). Mas vemos outros exemplares de *S. spinosus* no grupo vermelho, sendo assim a espécie *S. spinosus* recuperada como parafilética, pois todos os indivíduos dela não formaram um clado. Então esse grupo composto por *Syntermes spinosus* + *Syntermes tanygnathus* + *Syntermes spinosus* + *Syntermes nr. grandis* se originou a 2,500(IC 95%:1,6-3,5) Ma atrás.

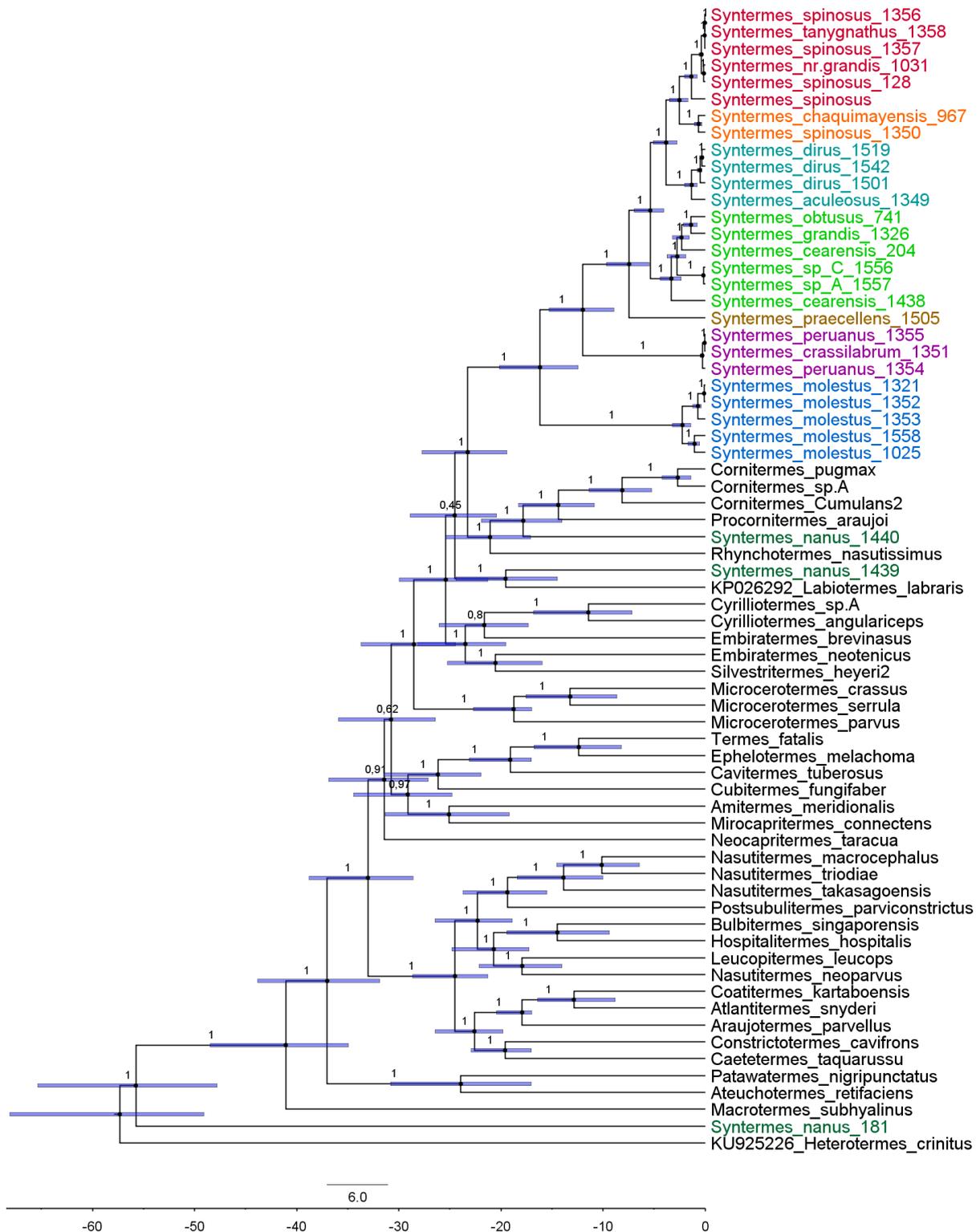


Figura 1. Árvore filogenética de *Syntermes* inferida por análise Bayesiana. A probabilidade posterior é mostrada em cada nó, junto com os intervalos de confiança dos tempos de divergência com 95% HPD (*Height Posterior Density*). Embaixo está indicado a escala em milhões de anos. As cores indicam clados que foram utilizados para discussão no texto.

4. DISCUSSÃO

4.1. COMPARAÇÃO FILOGENÉTICA

A árvore resultante da análise (Figura 1), corrobora algumas relações entre as espécies com as apresentadas nas análises feitas por Constantino (1995) (Figura 2) e, algumas das relações diferentes das apresentadas por ele.

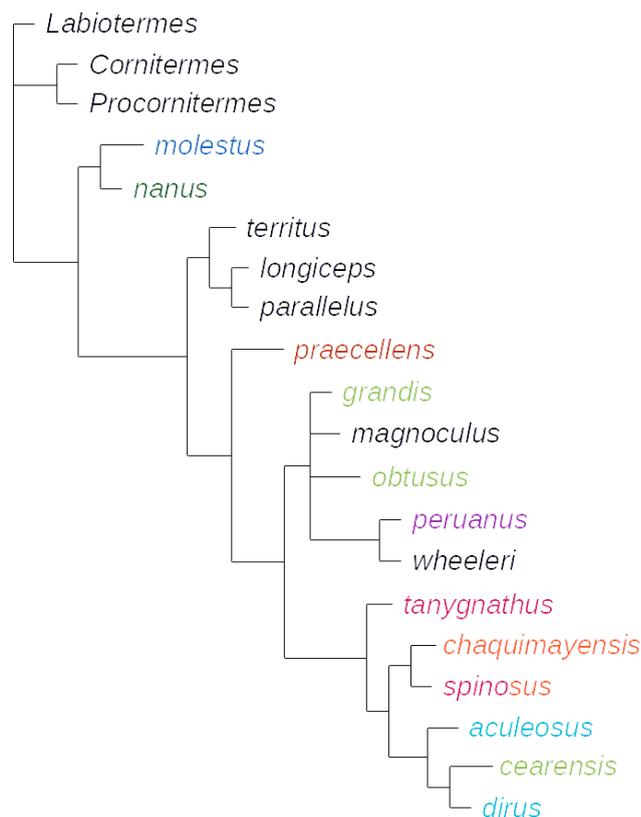


Figura 2. Árvore filogenética de consenso estrito retirada de Constantino (1995) utilizando apenas as espécies com imagens conhecidos, com as cores equivalentes a deste estudo.

A hipótese aqui obtida de *Syntermes molestus* como grupo irmão de um clado formado pelas demais espécies do gênero, corrobora em partes com o resultado recuperado por Constantino (1995) em sua análise filogenética, porque não recuperamos *Syntermes nanus* como monofilético e grupo irmão de *S. molestus*.

Mas ao observar como as amostras de *S. molestus* se dividiram em 2 clados internos, onde um é formado por amostras brasileiras, coletadas em Rondônia e, o outro por um exemplar da Venezuela e outro da Guiana Francesa. Isto nos gera uma especulação sobre um desses clados internos serem de *S. nanus*, já que são tão parecidos e a única diferença é o tamanho reduzido do soldado de *S. nanus* (CONSTANTINO, 1995). Então poderia ser uma falha na identificação ou *S. nanus* e *S. molestus* serem uma única espécie, em que sofrem

plasticidade em seu tamanho de acordo com as condições ambientais. Ou talvez sejam apenas *S. molestus* separados pela própria plasticidade de suas distribuições geográficas.

Observando as relações de *Syntermes spinosus* com outras espécies, ele conta com várias espécies como seus grupos internos, é o caso de: *S. chaquimayensis*, *S. tanygnathus* e *S. nr. grandis*. Então a espécie *S. spinosus* está sendo recuperada como parafilética. Ao observarmos a Figura 2, vemos *S. spinosus* mais próximo de *S. chaquimayensis*. Suas semelhanças podem causar confusão na identificação, o que os difere na identificação dos soldados é uma pilosidade na cápsula cefálica do *S. chaquimayensis*, suas longas e numerosas cerdas na cabeça e, o tamanho maior dos soldados de *S. spinosus* com mandíbulas mais longas e dentes marginais maiores. E o que difere *S. spinosus* de *S. tanygnathus* é a quantidade de artículos na antena do alado, que em *S. spinosus* são 20 e em *S. tanygnathus* 21 (CONSTANTINO, 1995).

Essas espécies podem realmente ser parafiléticas ou teve um erro de triagem. Pensamos na possibilidade de ser má identificação, pois em Bridge *et al.* (2003) estimaram que mais de 20% das sequências do grupo que se escolhe para estudar em bancos de dados públicos como o GenBank, podem estar identificados incorretamente (no caso deles eram fungos), podendo aqui ser todos exemplares de *Syntermes spinosus*, por conta das outras espécies estarem como grupos internos dessa espécie. Mas o material que era do Museu de Zoologia da USP foi revisado pessoalmente pelo Dr. Tiago Fernandes Carrijo, as de outros países que tinham fotos (Figura 3), foram revisadas pelas fotos e as que não tinham, foi enviado um pedido para que o responsável revisasse. E foi o caso somente de *Syntermes chaquimayensis* (Figura 3B), que antes estava como *S. spinosus* e a pedido, o Dr. Rudolph H. Scheffrahn revisou, assim o nome da amostra já foi trocado no resultado final deste trabalho. Já com as outras amostras, como por exemplo *S. nr. grandis*, que foi identificada como sendo uma espécie próxima de *S. grandis* ou sendo uma nova espécie, mas não deu nada próximo de *S. grandis*. Foi revisada e confirmada a identificação como sendo *Syntermes nr. grandis* (Figura 3E).

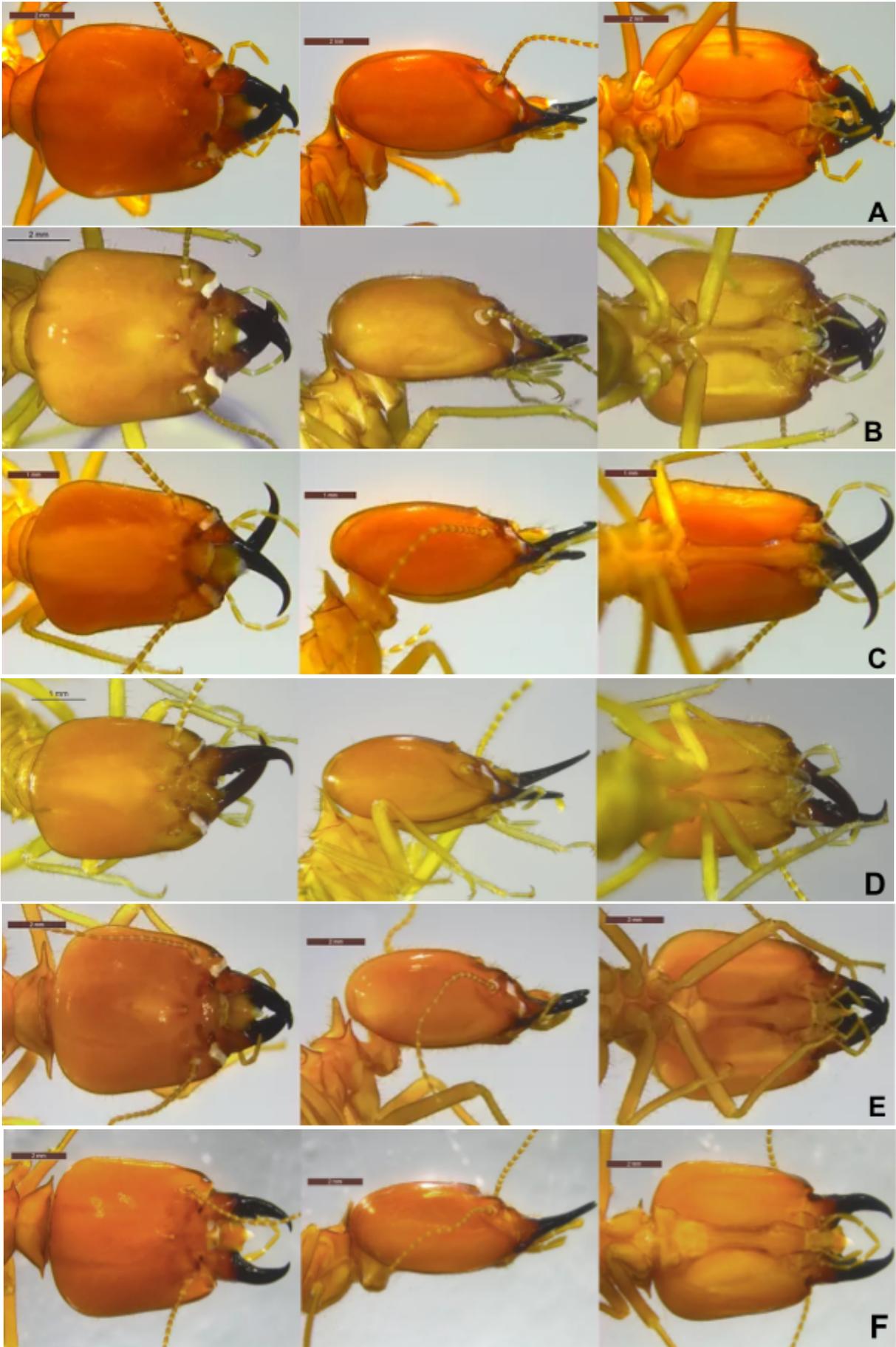


Figura 3. Fotografias disponibilizadas pelo Dr. Rudolf Scheffrahn (disponível em: <<https://www.termediversity.org/syncantho-tauri>>). A. *Syntermes cearensis*. B. *Syntermes chaquimayensis*. C. *Syntermes molestus*. D. *Syntermes nanus*. E. *Syntermes nr. grandis*. F. *Syntermes obtusus*.

No clado roxo composto por *Syntermes peruanos* e *Syntermes crassilabrum*, temos *S. crassilabrum* como grupo interno de *S. peruanos*. Observando a localização das amostras de *Syntermes peruanus*, podemos fazer uma atualização na distribuição dessa espécie descrita por Holmgren (1906), que era conhecida apenas no Peru e norte da Bolívia (Figura 6), e agora podemos estender para o Brasil, em Rondônia, que faz fronteira com o norte da Bolívia (Quadro 1).

Syntermes grandis e *Syntermes obtusus* se encontram mais relacionados e grupo interno de *S. cearensis* (Figura 1) e, no clado ciano, temos *Syntermes dirus* mais relacionado com *Syntermes aculeosus* do que com *Syntermes cearensis*, isto conflita com a inferência feita por Constantino em sua análise filogenética que incluía todas as espécies conhecidas, que encontrou ((*Syntermes dirus* + *Syntermes cearensis*) + *Syntermes aculeosus*) (Figura 4).

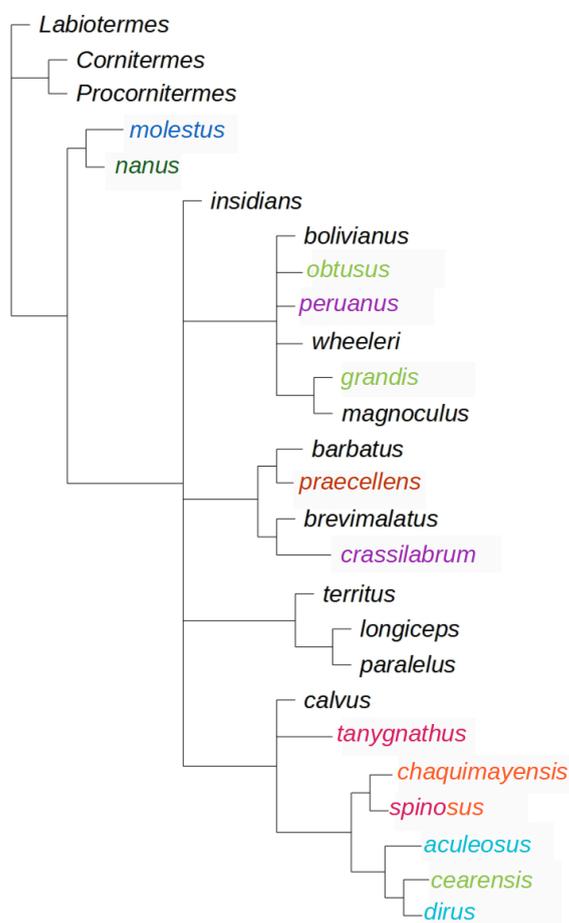


Figura 4. Árvore filogenética de consenso retirada de Constantino (1995), incluindo todas as espécies descritas na época, inclusive as que não possuíam todas as castas conhecidas com as cores equivalentes a deste estudo.

Syntermes praecellens é bem definido, assim como sua descrição taxonômica que é inconfundível com qualquer outra espécie.

Nesta análise os exemplares de *Syntermes nanus* os deixaram parafiléticos, provavelmente são um erro de triagem. A sua coleta costuma ser feita quando está forrageando e, foi observado inquilinismo de espécies de outros gêneros em ninhos de *Syntermes*, que se encontram em ninhos conspícuos, isto é, são mais fáceis de observar, tendo-se registros de dois a cinco espécies inquilinas de outros gêneros no mesmo ninho de indivíduos de *Syntermes* (CONSTANTINO, 1995), algo que pode estar ocorrendo no subterrâneo também, fazendo com que estes indivíduos usem o mesmo caminho de forrageamento. Resultando em amostras misturadas com outras espécies, de outros gêneros, podendo ter sido identificado usando um exemplar de *Syntermes nanus* (o que foi revisado e está correto), porém enviando um operário de outro que estava junto da amostra. Então não dá para ter certeza sobre qual exemplar é um legítimo representante de *S. nanus* para designar sua posição confiável na árvore filogenética. Podendo ser que um dos dois exemplares, se não os três, são possíveis misturas. Mas se realmente um desses exemplares forem um *S. nanus*, é um indício de que o gênero seja parafilético, e essa espécie então deva ser incluída em outro gênero.

4.2. HISTÓRIA GEOGRÁFICA PARA O INÍCIO DO GÊNERO

Como observamos nos resultados obtidos na Figura 1, o gênero *Syntermes* começou a se originar por volta de 16 milhões de anos atrás (entre 12 e 20 milhões de anos atrás com a margem de erro). Olhando para a história da Terra e as mudanças geográficas que ocorreram nesse período na América do Sul, podemos visualizar o cenário que tornou o ambiente propício para os ancestrais de cupins desse gênero começarem a serem selecionados ali. Esse período é o Mioceno Médio, onde as florestas eram extensas do Atlântico ao Pacífico, o clima era quente e úmido, e com isso por volta de 14 milhões de anos o mar havia encoberto boa parte da América do Sul (Figura 5), limitada no oeste pelos Andes e a leste pelo escudo brasileiro, onde algumas regiões como as Guianas, litoral brasileiro e Uruguai se tornaram

ilhas (LAVINA; FAUTH, 2016; POSADAS; ORTIZ-JAUREGUIZAR, 2016). Levando isso em conta e que as espécies basais desse gênero são *Syntermes molestus* e *Syntermes nanus* que são encontradas em toda a América do Sul, menos a oeste das Cordilheiras dos Andes (Figura 6), nos dando indícios de que o início se deu no leste das Cordilheiras dos Andes, onde não estava submerso.

A partir de 5 milhões de anos atrás, observamos uma grande diversificação de espécies nesse gênero. É o final do Mioceno onde 30% das espécies de mamíferos desapareceram, com o esfriamento e ressecamento global, assim houve a expansão de áreas abertas de savana e mais secas, formando a Caatinga, que separou a Floresta Amazônica da Mata Atlântica, o que permitiu uma alta diversificação de plantas e insetos endêmicos na Mata Atlântica, já que causava o isolamento de grupos. Quando os ciclos glaciais-interglaciais traziam períodos quentes e úmidos, esses grupos isolados conseguiam expandir sua distribuição junto com a expansão da floresta (FIASCHI *et al.*, 2016; DASILVA *et al.*, 2016).

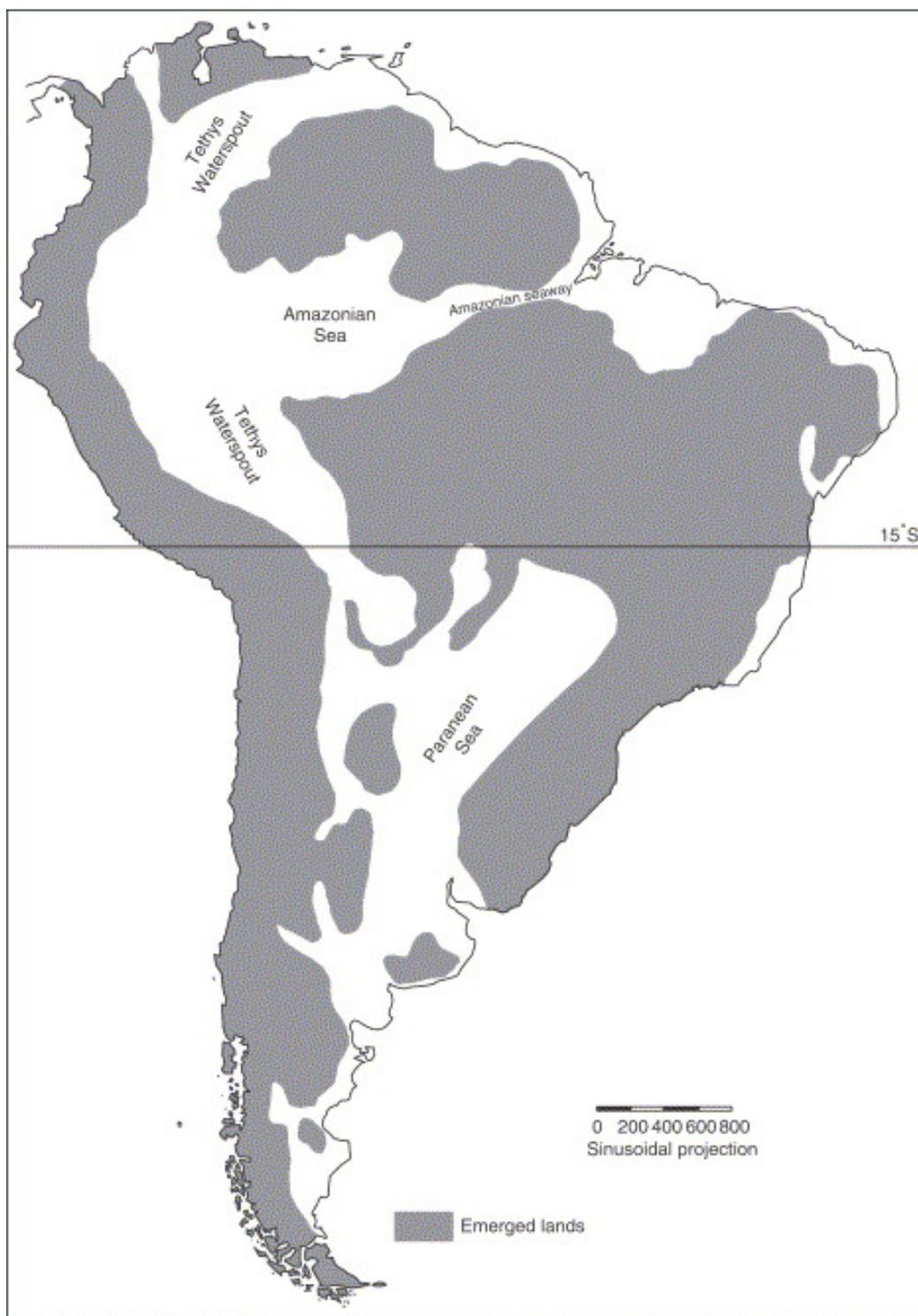


Figura 5. América do Sul com as áreas que foram encobertas pelo mar durante o Mioceno Médio (retirada do Ortiz-Jaureguizar & Cladera, 2006).



Figura 6. Mapas das distribuições geográficas das espécies do gênero *Syntermes* retirados de Constantino (1995), com os limites conhecidos em pontilhado.

5. CONCLUSÃO

Este estudo nos proporcionou novas hipóteses de relacionamento entre espécies de *Syntermes* através de dados filogenômicos, que nos possibilita comparar características moleculares para gerar hipóteses sobre a proximidade entre espécies.

Com algumas das inconsistências no posicionamento de algumas espécies na análise filogenética do grupo, este trabalho nos levanta duas possibilidades. A primeira, que as espécies de *Syntermes* sejam muito mais plásticas do que se esperava, e muitas das espécies descritas sejam na verdade sinônimos. A segunda possibilidade, que essas inconsistências sejam contaminações de amostras ou trocas durante os sequenciamentos, nos trazendo um alerta de como tem que acontecer uma mudança na forma que as amostras são preparadas para serem compartilhadas nas bases de dados.

Em frente a essas inconsistências, este trabalho é uma forma de revisar as etapas de identificação das amostras e, deve ser feito e refeito mais vezes, não apenas para este gênero. E se deve utilizar mais amostras para ter certeza dos relacionamentos, como o caso de *S. molestus* aqui, que formou um grupo consistente.

Para evitar que os erros encontrados neste trabalho e em outros sejam propagados, seria ideal que ao encontrar um erro, fosse reportado nos bancos de dados para que outras pessoas não usem de forma incorreta, para assim aumentar a confiança nos resultados filogenéticos futuros. Também se faz necessário que haja padronização no manuseio de evidências de material genético e coleções de amostras, além da disponibilidade de fotos da amostra a qual pertence a sequência para que taxonomistas experientes no grupo possam fazer a revisão da identificação, e não apenas se garantir com a identificação de um técnico do laboratório (VILGALYS, 2003).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRIDGE, P. D.; ROBERTS, P. J.; SPOONER, B. M.; PANCHAL, G. On the unreliability of published DNA sequences. **New Phytologist**. 160(1). p. 43-48. 2003.
- CAMERON, S. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. **Annual review of entomology**. 59(1). p. 95-117. 2014.
- CLARY, D. O.; WOLSTENHOLME, D. R.. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **Journal of Molecular Evolution**. 22(3). p. 252-271. 1985.
- CONSTANTINO, Reginaldo. Termite Database. Brasília, University of Brasília. 2020. Disponível em: <<http://termitologia.net>>. Acesso em: 08 de julho de 2022.
- DASILVA, Márcio Bernardino; PINTO-DA-ROCHA, Ricardo; SOUZA, Adriano Medeiros. História Biogeográfica da Mata Atlântica. *In*: Carvalho, C. J. B. D.; Almeida, E. A. B. D.. **Biogeografia da América do Sul: análise de tempo, espaço e forma**. 2ª Edição. Editora Roca. p. 301-325. 2016.
- DRUMMOND, A.J.; HO, S.Y.W.; PHILLIPS, M.J.; RAMBAUT, A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. D. Penny (Ed). **PLoS Biology**. 4, e88. 2006.
- DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. (2012) Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**. 29. p. 1969–1973. 2012.
- DUCHÊNE, S.; ARCHER, F. I.; VILSTRUP, J.; CABALLERO, S.; MORIN, P. A.. Mitogenome phylogenetics: the impact of using single regions and partitioning schemes on topology, substitution rate and divergence time estimation. **PloS one**. 6(11). e27138. 2011.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**. 5. p. 113. 2004.
- EMERSON. The Neotropical Genus *Syntermes* (Isoptera: Termitidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. Volume 83: Article 7. 1945.
- ENGEL, M. S.; KRISHNA, K. Family-Group Names for Termites (Isoptera). **American Museum Novitates**. Number 3432, 27 Feb 2004.

- FIASCHI, Pedro; PIRANI, José Rubens; HEIDEN, Gustavo; ANTONELLI, Alexandre. Biogeografia da Flora da América do Sul. *In*: Carvalho, C. J. B. D.; Almeida, E. A. B. D.. **Biogeografia da América do Sul: análise de tempo, espaço e forma**. 2ª Edição. Editora Roca. p. 287-298. 2016.
- GADELHA, J.. A evolução dos computadores. 2009. Disponível no site: <<http://www.ic.uff.br/~aconci/evolucao.html>>. Acesso em: 01 de agosto de 2022.
- GERNHARD, T.. The conditioned reconstructed process. **Journal of Theoretical Biology**. 253.p. 769–778. 2008.
- HOLMGREN, N. Termitenstudien. 1. Anatomische Untersuchungen. **Kungliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar**. 44 (3): 1-215. p. 193. 1909.
- HOLMGREN, N.. Das System der Termiten. **Zoologischer Anzeiger**. 35. p. 284-286. 1910.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONE-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S., *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**. 28(12). p. 1647-1649. 2012.
- LAVINA, Ernesto Luiz; FAUTH, Gerson. Evolução Geológica da América do Sul nos Últimos 250 Milhões de Anos. *In*: Carvalho, C. J. B. D.; Almeida, E. A. B. D.. **Biogeografia da América do Sul: análise de tempo, espaço e forma**. 2ª Edição. Editora Roca, 2016. Pg. 248-258.
- MARTIN, Stephen J. et al. A vast 4,000-year-old spatial pattern of termite mounds. **Current Biology**, v. 28, n. 22, p. R1292-R1293, 2018.
- MILLER, Mark A.; PFEIFFER, Wayne; SCHWARTZ, Terri. The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. *In*: **Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: extreme digital discovery**. 2011. p. 1-8.
- ORTIZ-JAUREGUIZAR, Edgardo; CLADERA, G. A. Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. **Journal of Arid Environments**, v. 66, n. 3, p. 498-532, 2006.
- PIE, Marcio R.. Filogenética Molecular e Estimativa de Tempos de Divergência. *In*: Carvalho, C. J. B. D.; Almeida, E. A. B. D.. **Biogeografia da América do Sul: análise de tempo, espaço e forma**. 2ª Edição. Editora Roca, 2016. Pg. 32.
- POSADAS, Paula; ORTIZ-JAUREGUIZAR, Edgardo. Evolução da Região Andina da

- América do Sul. *In*: Carvalho, C. J. B. D.; Almeida, E. A. B. D.. **Biogeografia da América do Sul: análise de tempo, espaço e forma**. 2ª Edição. Editora Roca, 2016. Pg. 260-276.
- POSADA, David; BUCKLEY, Thomas R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic biology**, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.
- RAMBAUT, A. FigTree 1.4. 2 software. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Rambaut, A., Suchard, MA & Xie, D. Tracer v. 1.6. 2014.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. FigTree 1.4. 4 (computer program). 2018.
- SOUZA, Henrique Jesus de; DELABIE, Jacques Hubert Charles; SODRÉ, George Andrade. Termite participation in the soil-forming processes of 'murundus' structures in the semi-arid region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 44, 2020.
- VILGALYS, Rytas. Taxonomic misidentification in public DNA databases. **New Phytologist**, v. 160, n. 1, p. 4-5, 2003.