UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Estudo da termitofauna (Insecta, Isoptera) da região do alto Rio Madeira, Rondônia”.

Tiago Fernandes Carrijo

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências
e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: ENTOMOLOGIA

RIBEIRÃO PRETO - SP

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Estudo da termitofauna (Insecta, Isoptera) da região do alto Rio Madeira, Rondônia”

Tiago Fernandes Carrijo

Orientadora: Eliana Marques Cancellato

Co-orientadora: Adriana Coletto Morales

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências
e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: ENTOMOLOGIA

RIBEIRÃO PRETO - SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Carrijo, Tiago Fernandes

**Estudo da termitofauna (Insecta, Isoptera) da região do alto Rio Madeira,
Rondônia**

143 p.

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
de Ribeirão Preto - USP, Área de concentração: Entomologia**

Orientadora: Eliana Marques Cancellato

Co-orientadora: Adriana Coletto Morales

**1. Cupins. 2. Diversidade beta. 3. Distribuição espacial. 4. Espécies
crípticas. 5. Barreira biogeográfica.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço agências, empresas e instituições em nome principalmente das pessoas que diretamente ou indiretamente foram responsáveis pelo desenvolvimento dessa tese.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida para o desenvolvimento dessa tese; assim como ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (Proap - Capes), pelos auxílios financeiros concedidos através do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, assim como a própria Pós em Entomologia e todos que fazem dela o que ela é. Também agradeço as empresas Energia Sustentável do Brasil, Santo Antonio Energia, Probiota e Arcadis Logos, pela criação e todo o desenvolvimento logístico e financeiro dos Programas de Monitoramento de Cupins nas áreas de influência das Usinas Hidrelétricas de Jirau e Santo Antônio. Agradeço ao Laboratório de Genética de Bactérias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Jaboticabal, SP, por disponibilizar toda a infraestrutura para a parte de molecular dessa tese.

Foram quatro anos de trabalho e, com certeza, muitas pessoas foram importantes e até mesmo fundamentais para que eu terminasse esse documento.

Obrigado a todos os professores de disciplinas que me ajudaram imensamente a construir o conhecimento que tentei aplicar aqui (e também pretendo continuar aplicando). Agradeço todas as pessoas que foram coletar para mim nas diversas campanhas de campo, inclusive todos os auxiliares de campo. Todos os amigos de Ribeirão Preto, que sempre me acolheram quando ia fazer uma disciplina. Agradeço também a Adriana e seus alunos, por toda a ajuda, apoio e orientação com a parte molecular.

Agradeço as pessoas do Museu, principalmente todos os grandes amigos que fiz na Entomologia, que fazem desse lugar minha segunda (ou primeira?) casa aqui em São Paulo. Em especial a Eliana, com quem contei com a orientação e todo o apoio, durante esses seis anos de mestrado e doutorado: muito obrigado!

Aos amigos novos e de longa data, próximos ou distantes, valeu mesmo!

Finalmente, agradeço a toda minha família, essas pessoas que sempre levaram a sério e fazem valer o significado da palavra “família”. Especialmente minha família Malta, que se sou alguma coisa hoje, devo isso à ela: amo vocês, obrigado!

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma participaram destes meus quatro anos de Tese ... meu sincero: muito obrigado!

ÍNDICE

RESUMO	7
ABSTRACT	9
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
II. OBJETIVOS GERAIS	14
III. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	15
A. ÁREAS DE ESTUDO	15
B. AMOSTRAGEM DE CUPINS	17
IV. RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
CAPÍTULO 1 - PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE DE UMA TAXOCENOSE DE CUPINS NO ALTO RIO MADEIRA	24
1.1 INTRODUÇÃO.....	25
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
1.2.1 ÁREAS DE ESTUDO	27
1.2.2 AMOSTRAGEM DE CUPINS.....	32
1.2.3 SUFICIÊNCIA AMOSTRAL.....	32
1.2.4 DIVERSIDADE BETA E PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO	33
1.2.5 ANÁLISE DOS DADOS ABIÓTICOS	35
1.3 RESULTADOS	36
1.4 DISCUSSÃO	54
1.4.1 MEGADIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO FAUNÍSTICA.....	54
1.4.2 ESTIMADORES E ESPÉCIES “NÃO VISTAS”	55
1.4.3 DIVERSIDADE BETA ENTRE OS MÓDULOS	58
1.4.4 DIVERSIDADE BETA DENTRO DOS MÓDULOS	61
1.4.5 VARIÁVEIS AMBIENTAIS	64
1.5 CONCLUSÕES	65
CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE <i>HETEROTERMES TENUIS</i> (HAGEN, 1858) (RHINOTERMITIDAE).....	67
2.1 INTRODUÇÃO.....	68
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.2.1 AMOSTRAS UTILIZADAS.....	71
2.2.2 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	71

2.2.3	ANÁLISE DOS DADOS	72
2.2.3.1	ALINHAMENTO	72
2.2.3.2	DELIMITAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES	72
2.2.3.3	ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS E PARÂMETROS DEMOGRÁFICOS	75
2.2.3.4	DIVERSIDADE GENÉTICA NO ESPAÇO E O RIO MADEIRA COMO BARREIRA BIOGEOGRÁFICA	76
2.3	RESULTADOS	76
2.3.1	DELIMITAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES CRÍPTICAS E TEMPO DE DIVERGÊNCIA	76
2.3.2	ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS E PARÂMETROS DEMOGRÁFICOS	84
2.3.3	DIVERSIDADE GENÉTICA NO ESPAÇO E O RIO MADEIRA COMO BARREIRA BIOGEOGRÁFICA	88
2.4	DISCUSSÃO	92
2.4.1	RECONHECIMENTO DE DUAS ESPÉCIES CRÍPTICAS	93
2.4.2	PARÂMETROS DEMOGRÁFICOS	97
2.4.3	RIO MADEIRA COMO BARREIRA BIOGEOGRÁFICA.....	98
V.	BIBLIOGRAFIA.....	101
ANEXO I - CARRIJO, T.F.; ROCHA, M.M.; CUEZZO, C. & CANCELLO, E.M. 2011. KEY TO THE SOLDIERS OF <i>ANGULARITERMES</i> EMERSON WITH A NEW SPECIES FROM BRAZILIAN AMAZONIA (ISOPTERA: TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE). ZOOTAXA.....		116
ANEXO II - CARRIJO, T.F.; GONÇALVES, R.B. & SANTOS, R.G. 2012. REVIEW OF BEES AS GUESTS IN TERMITE NESTS, WITH A NEW RECORD OF THE COMMUNAL BEE, <i>GAESOCHIRA OBSCURA</i> (SMITH, 1879) (HYMENOPTERA, APIDAE), IN NESTS OF <i>ANOPLOTERMES BANKSI</i> EMERSON, 1925 (ISOPTERA, TERMITIDAE, APICOTERMITINAE). ISECTES SOCIAUX.....		125
ANEXO III - ROCHA, M.M.; CARRIJO, T.F. & CANCELLO, E.M. 2012. AN ILLUSTRATED KEY TO THE SOLDIERS OF <i>CYRANOTERMES</i> ARAUJO WITH A NEW SPECIES FROM AMAZONIA (ISOPTERA: TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE). ZOOTAXA.....		135

RESUMO

Estudo da termitofauna (Insecta, Isoptera) da região do alto Rio Madeira, Rondônia. Na região conhecida como “alto Rio Madeira”, no município de Porto Velho, Rondônia, estão sendo criadas as Usinas Hidrelétricas (UHEs) de Santo Antônio e Jirau. As construções das represas das UHEs estão inundando grandes porções de floresta ao longo das duas margens do rio Madeira. Desta forma o conhecimento da biota local, especialmente de sua distribuição no espaço, é extremamente importante, ainda mais porque o alinhamento dos rios Amazonas-Madeira-Mamoré separa a região Neotropical em duas áreas de endemismo para diversos grupos de animais. Essa tese tem por objetivo apresentar os resultados gerais obtidos ao longo de três anos de monitoramento de cupins nas áreas de influência da UHE de Jirau e dois anos nas áreas de influência da UHE de Santo Antônio, assim como desenvolver um estudo de comunidades e análise da distribuição espacial dos cupins presentes nas áreas de influência da UHE de Jirau (Capítulo 1). Outro objetivo é o estudo da estrutura genética das populações de *Heterotermes tenuis* (Rhinotermitidae) ao longo das áreas de influência das duas UHEs, visando investigar a existência de fluxo gênico entre as populações de cada margem do Rio Madeira (Capítulo 2). Foram amostrados doze módulos, sete na margem esquerda do rio e cinco na margem direita. Cada um era compostos por transectos de 3 ou 4 km e parcelas perpendiculares a cada 1km, e as amostragens foram realizadas em subparcelas de 5x2m dentro das parcelas. Durante um total de 20 campanhas foram investigadas 1121 subparcelas, totalizando 7875 amostras de cupins e pelo menos 169 espécies. Esse é provavelmente o trabalho com maior esforço amostral já empregado e também o que registrou o maior número de espécies de cupins até hoje.

Para o estudo de comunidades, foram aleatorizadas 20 subparcelas nos seis módulos da UHE de Jirau, sendo cinco subparcelas dentro das parcelas marcadas nas seguintes distâncias em relação à margem do rio: P1 - 50 m, P2 - 1 km, P3 - 2 km e P4 - 3 km. A composição de cupins não está relacionada com o lado do rio. O estimador que mais se aproximou do provável número real de espécies foi o *Jackknife 2*. Como resultado das análises de diversidade beta utilizando a composição de espécies de cupins houve um agrupamento dos módulos com o mesmo tipo de solo, sugerindo que algumas espécies de cupins estejam distribuídas de acordo com esta variável. Em relação à distância para o rio, a parcela mais próxima do rio foi a mais singular, tanto

em relação à composição de espécies quanto à riqueza e abundância, sendo que existem espécies restritas à P1 e outras praticamente ausentes nessas parcelas. Das dez variáveis ambientais analisadas, a riqueza de cupins se mostrou correlacionada com a altitude, concentração de argila e silte no solo e estratificação vegetal entre 1 e 5 m.

Para o estudo da estrutura genética das populações de *H. tenuis* foram utilizadas 84 sequências dessa espécie dos 12 módulos de monitoramento, seis de colônias do Cerrado e três do *GenBank* (de Manaus, Guiana Francesa, e Equador), além de uma de *H. longiceps* como grupo externo. Nas análises iniciais, foi encontrada uma forte estruturação genética entre as sequências: todas as análises filogenéticas (máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana), assim como a rede de haplótipos, formaram dois grupos consistentes, mas sem qualquer relação espacial. A partir disso, passou-se a trabalhar com a hipótese de que há duas espécies crípticas (chamadas Ht. A e Ht. B). Desta forma, todas as análises para testar se o Rio Madeira funcionava como barreira biogeográfica foram testadas separadamente para cada uma das supostas duas espécies crípticas, entretanto, não foi constatada qualquer influência do rio como barreira ao fluxo gênico entre as populações de cada margem.

Palavras-chave: 1. Cupins. 2. Diversidade beta. 3. Distribuição espacial. 4. Espécies crípticas. 5. Barreira biogeográfica.

ABSTRACT

Study of the termitofauna (Insecta, Isoptera) from the upper Madeira River region, Rondônia, Brazil. The Santo Antônio and Jirau hydroelectric plants (HP) are being built in the Madeira River region, in Porto Velho, RO, Brazil. The HPs' will flood large portions of native forest, and thus knowledge of the local biota and its distribution in space is extremely important for the formulation of management plans for creation of protected areas. This region in particular is unique, since the alignment of Amazonas-Madeira-Mamoré Rivers divides the Neotropical region into two areas of endemism for a diversity of taxa. The main objective of this thesis was to monitor termites for three years in areas near the Jirau HP and two years in areas near the Santo Antônio HP. As well as conduct a community level study and analyze the spatial distributions of termites from the areas influenced by Jirau HP (Chapter 1); and investigate the population genetic structure of *Heterotermes tenuis* (Rhinotermitidae), for the two areas influenced by the HPs, to test whether there is genetic flow between the populations on either bank of the Madeira River (Chapter 2). Twelve modules were marked, seven on the left bank of the river and five on the right bank. Each module was composed of 3 or 4 km transects and perpendicular parcels every 1 km. The sampling was conducted in sub parcels of 5 x 2 m inside each main parcels. During 20 expeditions, 1121 subparcels were investigated and a total of 7875 samples were collected and identified to 169 species. This study incorporates greater sampling effort than already employed by other published studies to date and also registered the highest number of termites species of any similar study.

For the community study, 20 subparcels were randomized in the six modules of the Jirau HP, with five subparcels marked in relation to distance from the river margin (P1 - 50 m, P2 - 1 km, P3 - 2 km, and P4 - 3 km). The termite species composition was not related to side of the river bank. The richness estimator Jackknife 2 was the best estimator of the real number of species diversity. The beta diversity analysis with termite species composition clustered for modules with the same soil type, suggesting that some termite species may be distributed according to the soil type. Parcels closest to the river were the most unique, both in terms of termite species composition and abundance patterns, with some species restricted to the P1 and others absent. Of the ten environmental variables measured, termite species richness was correlated with

altitude, clay and silt concentration in the soil, and vegetation stratification between 1 and 5 m, among.

For the study of the genetic structure of *Heterotermes tenuis*, 84 sequences of this species were used from the 12 monitoring modules, six from colonies from the Cerrado (Brazilian Savanna), three from GeneBank (from Manaus, French Guiana and Ecuador), and one of *H. longiceps* as outgroup. In the initial analysis, relatively strong genetic structure within the samples was found: all phylogenetic analysis (maximum parsimony and likelihood, and Bayesian inference), and haplotype networks, consistently clustered two groups of haplotypes, but without any spatial relationships. Thus was assumed that there were two cryptic species (here called Ht. A and Ht. B), and all the analysis to test whether the Madeira River was a biogeographic barrier were conducted separately for each putative species. However, it was not possible to detect any influence of the river to genetic flow between the populations from either side of the river.

Key-words: 1. Termites. 2. Beta diversity. 3. Spatial distribution. 4. Cryptic species. 5. Biogeographic barrier.

I. INTRODUÇÃO GERAL

Na região conhecida como “alto Rio Madeira”, que se localiza a montante da porção do rio que passa por Porto Velho, Rondônia, estão sendo criadas as Usinas Hidroelétricas de (UHE) de Jirau e Santo Antônio (Katsuragawa *et al.* 2008). As duas juntas pretendem suprir uma demanda energética na região Norte e escoar o excedente para as regiões Centro-Oeste e Sudeste, além de levar recursos para a região, melhorando a infraestrutura e proporcionando a instalação de novas indústrias (IBAMA 2008).

No Estudo de Impacto Ambiental (EIA) realizado para os dois empreendimentos foi solicitada a elaboração de Programas de Conservação da Fauna para as duas Hidrelétricas. O Programa de Conservação da Fauna Silvestre da UHE de Jirau começou em Março de 2010 e teve fim em Setembro de 2012, com campanhas aproximadamente trimestrais, totalizou 12 campanhas para cada grupo (Artropodofauna, Avifauna, Herpetofauna, Pequenos mamíferos, Morcegos, Médios e grandes mamíferos e Mamíferos aquáticos). Já o Programa de Conservação da Fauna da UHE de Santo Antônio teve início em Setembro de 2010 e terminou em Junho de 2012, também com campanhas aproximadamente trimestrais, totalizou oito campanhas por subprograma (Entomofauna, Avifauna, Ambientes Específicos para Aves, Jacarés e Quelônios, Mastofauna Terrestre, Mamíferos Aquáticos e Semi-Aquáticos, Quirópteros, Raiva Transmitida por Morcegos Hematófagos). Inseridos no grupo de Artropodofauna do Programa do AHE de Jirau, e no subprograma de Entomofauna do Programa da UHE de Santo Antônio, estão os monitoramentos de cupins (Isoptera) nas áreas de influência de cada um dos empreendimentos.

Os cupins são insetos hemimetábolos, ortopteróides. Todas as espécies de cupins são eussociais, isto é, apresentam divisão reprodutiva do trabalho, sobreposição de gerações e cuidado cooperativo com a prole (Wilson 1971). 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). Esses insetos estão entre os mais abundantes artrópodes de solo de ecossistemas tropicais (Black & Okwakol 1997; Davies *et al.* 1999; Jouquet *et al.* 2011), e representam cerca de 10% da biomassa animal dos trópicos (Bignell 2006), sendo que há estimativas de que podem corresponder até 20% da biomassa animal em algumas áreas da Amazônia (Martius 1994). Além disso, os cupins participam do processo de ciclagem de nutrientes, formação e aeração do solo, sendo considerados engenheiros de ecossistema (Jones *et al.* 1994; Lavelle *et al.* 1997).

O alinhamento dos rios Amazonas-Madeira-Mamuré (A-M-M) foi, provavelmente, a segunda grande barreira a se formar na Amazônia (depois da separação Caribe-América do Sul), separando a região Neotropical em dois grandes compartimentos, ou áreas de endemismo: NW e SE (Amorin & Pires 1996; Camargo & Pedro 2003) (Figura i). Essa proposta é corroborada pela distribuição de diversos grupos monofiléticos, nos quais os táxons internos destes grupos apresentam disjunções ou o limite de suas distribuições ao longo do alinhamento A-M-M. Alguns exemplos estão nos trabalhos de Amorim & Pires (1996) e Silva & Oren (1996), para primatas; Cracraft & Prum (1988), Marks *et al.* (2002) e Nores (1999), para aves; Amorim (2001), Amorim & Pires (1996) e Nihei & De Carvalho (2007), para Diptera; Hall & Harvey (2002) e Racheli & Racheli (2004) para borboletas; e Camargo & Pedro (2003), para abelhas Meliponini.

Figura i – Evento de quebra e vicariância na região Neotropical, no alinhamento dos rios Amazonas-Madeira-Mamoré. Reproduzido de Camargo (2006).

Muito pouco ainda é conhecido sobre os cupins amazônicos (Ackerman *et al.* 2009), inclusive na região das UHEs de Jirau e Santo Antônio. Essa região inclui espécies novas para a ciência de diversos grupos animais (algumas coletadas pela primeira vez durante os levantamentos de EIA/RIMA dessa UHE), espécies endêmicas e espécies ameaçadas de extinção (IBAMA 2008). Lewinsohn & Prado (2005) alertam que alterações ambientais, como as de proporções de uma UHE, conferem uma grande urgência à necessidade de reconhecimento da biota local para evitar que ela se perca antes que seja reconhecida pela ciência. Além disso, Cavalcanti (2001) enfatiza que um dos principais obstáculos à conservação da biodiversidade tem sido o pouco conhecimento sobre as espécies e comunidades naturais, especialmente nas regiões de alto impacto antrópico, onde, geralmente, a necessidade de preservar é suplantada pelas necessidades humanas.

O conhecimento da diversidade, tanto de espécies, quanto genética, e sua distribuição no espaço, é extremamente importante para elaboração de planos de manejo para áreas de proteção ambiental. Nesse sentido, estudos com enfoques filogeográficos veem se mostrando bastante úteis para entender o papel de eventos históricos sobre as espécies e padrões de distribuição e estrutura genética das populações (Galetti Jr. *et al.* 2008).

II. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral desse trabalho é apresentar os resultados obtidos ao longo de três anos de monitoramento de cupins nas áreas de influência da Usina Hidrelétrica (UHE) de Jirau e dois anos nas áreas de influência da UHE de Santo Antônio. Além disso, serão desenvolvidos dois capítulos com objetivos mais específicos:

No Capítulo 1, intitulado “Padrões de distribuição e diversidade de uma taxocenose de cupins no Alto Rio Madeira”, o objetivo é realizar um estudo de comunidades e análise da distribuição espacial dos cupins presentes nas áreas de influência da UHE de Jirau, Rio Madeira, Porto Velho, Rondônia.

No Capítulo 2, intitulado “Estudo da estrutura genética de uma população de *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Rhinotermitidae)”, o objetivo é realizar um estudo da estrutura genética das populações de *Heterotermes tenuis* (Rhinotermitidae). Tendo enfoque a delimitação das espécies crípticas que foram encontradas com as primeiras análises realizadas, e investigar a existência de fluxo gênico entre as populações das espécies crípticas de cada margem do Rio Madeira, Porto Velho, Rondônia.

III. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

a. Áreas de estudo

As áreas de estudo estão localizadas no alto Rio Madeira, extremo oeste de Rondônia, a sudoeste da capital Porto Velho. Inserida no bioma Amazônico, as áreas fazem parte dos Programas de Monitoramento de Fauna das UHEs de Jirau e Santo Antônio, algumas foram inundadas, parcialmente inundadas, ou estão sofrendo influência direta devido ao represamento para a construção das Hidrelétricas.

Foram construídos módulos de monitoramento ao longo do rio Madeira, compreendendo as áreas de influência das duas UHEs (Figura ii). Os módulos foram feitos seguindo os critérios do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio) do Ministério da Ciência e Tecnologia (IBAMA 2008), mas foram modificados durante o planejamento de cada monitoramento separadamente.

Os módulos em Jirau são formados por dois transectos de 3 km, paralelos, distantes 1 km entre si. Cada transecto é formado por quatro parcelas de 250 x 40 m, distantes 1 km entre si. Já os módulos de Santo Antônio estão dispostos todos em apenas um transecto de 4 km, com parcelas na margem do rio (0 m) e depois a 500 m da margem, depois a 1 km, 2 km, 3 km e 4 km (Figura iii).

Figura ii – Módulos de coleta nas áreas de influência das UHEs de Jirau e Santo Antônio. Ae - Abunã margem esquerda; Ad - Abunã margem direita; Me - Mutum margem esquerda; Ce - Caiçara margem esquerda; Cd - Caiçara margem direita; JI - Jirau; IP - Ilha de Pedras; IB - Ilha dos Búfalos; JP - Jaci-Paraná; MO - Morrinhos; TE - Teotônio.

Figura iii – Esquema dos módulos de Monitoramento de Fauna das UHEs de Jirau e Santo Antônio (STO).

b. Amostragem de cupins

As amostragens de cupins para esse trabalho foram realizadas durante 20 campanhas de campo entre Fevereiro de 2010 e Setembro de 2012. As campanhas foram aproximadamente trimestrais para cada empreendimento, sendo que em Jirau elas duraram três anos, perfazendo 12 campanhas, e em Santo Antônio foram dois anos de amostragem em oito campanhas de campo (Tabela i).

Tabela i – Lista com as datas das 20 campanhas realizadas nos módulos de influência das UHEs de Jirau e Santo Antônio.

UHE	Campanha	Início	Fim
JIR	1	27/02/2010	11/03/2010
JIR	2	11/05/2010	18/05/2010
JIR	3	20/06/2010	01/07/2010
JIR	4	09/09/2010	20/09/2010
JIR	5	05/01/2011	15/01/2011
JIR	6	28/03/2011	08/04/2011
JIR	7	18/06/2011	28/06/2011
JIR	8	09/09/2011	18/09/2011
JIR	9	05/01/2012	13/01/2012
JIR	10	29/03/2012	06/04/2012
JIR	11	19/06/2012	28/06/2012
JIR	12	06/09/2012	15/09/2012
STO	1	12/09/2010	22/09/2010
STO	2	07/01/2011	20/01/2011
STO	3	30/03/2011	12/04/2011
STO	4	01/06/2011	14/06/2011
STO	5	02/09/2011	10/09/2011
STO	6	19/11/2011	28/11/2011
STO	7	01/03/2012	10/03/2012
STO	8	01/06/2012	10/06/2012

Como os cupins são insetos sociais com colônias teoricamente perenes, os termitólogos basearam-se em protocolos de ecologia de plantas, através de parcelas, para propor técnicas e levantamentos destes insetos (Bignell & Eggleton 2000). De Souza & Brown (1994), em um estudo de fragmentação da Floresta Amazônica, foram

os primeiros a adotar essa metodologia com limite de tempo por coletor por parcela. Esses autores utilizaram transectos de 110 x 3 m, divididos em 22 parcelas de 5 x 3 m, onde cada parcela era vasculhada por um intervalo de 1 hora/coletor em todos os micro-habitats onde os cupins pudessem ser encontrados, respeitando uma altura máxima de 2 m acima do nível do solo. Mais tarde, Brandão & Souza (1998) utilizaram, ao invés de parcelas seguidas, espaçadas 50 m uma da outra, para evitar que fossem coletados indivíduos de uma mesma colônia em duas parcelas contíguas, diminuindo assim, a probabilidade de uma superestimação de abundância. Jones & Eggleton (2000) propuseram um protocolo de amostragem rápida, onde eram marcadas 20 parcelas menores (de 5 x 2 m) em um transecto de 100 m de comprimento, ao mesmo tempo em que eram coletados 12 monólitos em cada parcela, para melhor amostrar as espécies geófagas.

A padronização de um protocolo seria ideal para que os trabalhos tivessem esforços amostrais que resultassem em dados comparáveis de riqueza e abundância relativa. Entretanto, desde que Jones & Eggleton (2000) propuseram a padronização do protocolo, os trabalhos veem sendo realizados com metodologias relativamente parecidas, mas com modificações, o que ainda dificulta a realização de comparações confiáveis entre um trabalho e outro (Roisin & Leponce 2004; Espírito-Santo Filho 2005; Cunha 2006; Cunha *et al.* 2006; Reis & Cancellato 2007; Carrijo *et al.* 2009).

No presente trabalho foram utilizados protocolos de amostragem rápida, mas também com modificações em relação aos trabalhos já realizados anteriormente, e também entre as duas UHEs:

- Em Jirau, foram realizadas amostragem em cinco parcelas aleatórias das 10 de cada módulo. Em cada parcela sorteada, foram feitas duas subparcelas de 2 x 5 m. As subparcelas também foram aleatorizadas em dois pontos (metragens) ao

longo dos 250 metros de extensão (5, 50, 100, 150, 200 ou 250 m). No total foram 10 subparcelas por módulo por campanha.

- Em Santo Antônio, foram realizadas amostragens em todas as seis parcelas de um transecto de cada módulo. Em cada parcela do transecto, foram feitas duas subparcelas de 2 x 5 m, distantes 4 m uma da outra. Em cada campanha, foi feita uma coleta em uma metragem diferente: 200, 150, 100, 50, 5, 25, 75 e 125 m, nas campanhas de 1 a 8, respectivamente. No total foram 12 subparcelas por módulo por campanha.

Em virtude de imprevistos (alagamento na época das chuvas, ou início da supressão vegetal, por exemplo), muitas vezes não era possível ter acesso a alguma parcela ou módulo. Desta forma, muitas vezes as subparcelas foram concentradas nas demais parcelas do módulo, ou em outro módulo, tentando sempre manter um esforço amostral de 10 subparcelas por módulo por campanha em Jirau e 12 em Santo Antônio, mas nem sempre foi possível. No total, foram amostradas 1121 subparcelas, sendo 665 em Jirau e 456 em Santo Antônio.

Cada subparcela foi examinada por dois coletores durante 30 minutos, ou três coletores durante 20 minutos, sendo feita a procura pelos cupins em todos os micro-habitats onde podem ser encontrados, como: cupinzeiros epígeos e arborícolas, dentro de troncos caídos (madeira seca ou em decomposição), em galerias nas árvores, nos troncos mortos em pé e galhos mortos das árvores, em meio à serapilheira, na superfície do solo, e ainda foram escavadas trincheiras, de aproximadamente 10 cm de profundidade, buscando detectar a presença de cupins abaixo do solo. Para cada amostra de cupins foi anotado o local de coleta para posterior classificação das espécies nos grupos tróficos.

Todos os indivíduos foram colocados em álcool 92% e levados para o laboratório para identificação das espécies através da utilização de chaves dicotômicas e comparação com o material da coleção de Isoptera do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). No laboratório, alguns indivíduos foram selecionados para extração do material genético.

IV. RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nas 1.121 subparcelas amostradas durante as 20 campanhas realizadas nas áreas de influência das UHEs de Jirau e Santo Antônio, foram coletadas 7875 amostras de cupins. Pelo menos 169 espécies foram registradas. Entretanto, esse número com certeza é maior, uma vez que apenas 12,7% das 2553 amostras da subfamília Apicotermatinae foram identificadas e somadas nesse total (aquelas utilizadas no Capítulo 1 desta tese: 325 amostras coletadas em 120 subparcelas de Jirau: 259 encontros e 37 espécies). A taxonomia dessa subfamília é caótica e, na maioria dos casos, a identificação das espécies é extremamente complicada (Constantino 2005). Desta forma, pela dificuldade taxonômica e quantidade de material a ser identificado e separado em morfoespécies (2553 amostras), os Apicotermatinae não foram utilizadas para essas considerações gerais.

Assim sendo, ao se excluir os Apicotermatinae, 132 espécies foram amostradas nos 12 módulos criados ao longo do Alto Madeira (Figura iv). Todas as famílias com representantes no Brasil foram amostradas: Kalotermitidae, com cinco espécies e quatro gêneros; Rhinotermitidae, quatro gêneros e seis espécies; Serritermitidae, um gênero e uma espécie; e as três subfamílias de Termitidae (excluindo-se Apicotermatinae),

Nasutitermitinae, com 20 gêneros e 56 espécies; Syntermitinae, 12 gêneros, 38 espécies e Termitinae, 15 gênero e 26 espécies.

Figura iv – Número de subparcelas e espécies amostradas por módulo de Monitoramento de Fauna das UHEs de Jirau e Santo Antônio (STO). Das espécies da subfamília Apicotermatinae, estão sendo contabilizadas neste gráfico apenas aquelas utilizadas no Capítulo 1, para os módulos de Jirau. Ae - Abunã margem esquerda; Ad - Abunã margem direita; Me - Mutum margem esquerda; Ce - Caiçara margem esquerda; Cd - Caiçara margem direita; JI - Jirau; IP - Ilha de Pedras; IB - Ilha dos Búfalos; JP - Jaci-Paraná; MO - Morrinhos; TE - Teotônio.

Este é provavelmente o trabalho com maior esforço amostral já empregado em uma região de média escala, e também é o trabalho que registrou o maior número de espécies de cupins até hoje. Mesmo considerando que esse número tem grande relação com o grande esforço amostral, ainda assim a fauna de cupins da região do Alto Madeira pode ser considerada uma das mais ricas do mundo.

Muitas das espécies de cupins amostradas nas áreas de influência da UHEs de Jirau e Santo Antônio foram classificadas apenas como morfoespécies, algumas dessas pela dificuldade taxonômica do grupo e/ou falta de amostras com identificações confiáveis na coleção de referência do Museu de Zoologia da USP. Entretanto, vale mencionar que algumas das espécies não identificadas são espécies novas para ciência, como por exemplo, *Angularitermes coninasus* Carrijo & Rocha, 2011, e *Cyranotermes*

karipuna Rocha, Carrijo & Canello, 2012, recentemente descritas pelo grupo de pesquisa no Museu de Zoologia (Anexos I e II) (Carrijo *et al.* 2011; Rocha *et al.* 2012), *Caetetermes* sp. 1 (Cuezzo *et al.*, artigo em preparação), *Rhynchotermes* sp. 1 (Joice Constantini, com. pess.) e *Velocitermes* spp. (Danilo Oliveira, com. pess.).

Além disso, diversas espécies, e até mesmo gêneros pouco amostrados, agora estão mais bem representados na coleção do Museu, e isto permite o avanço de estudos taxonômicos, requisito primordial para trabalhos com biodiversidade e conservação. Os dados provindos do monitoramento também são base direta para responder às questões maiores da biologia das espécies deste grupo, especialmente ligadas à evolução, como por exemplo, o estudo de eventos de vicariância, ou especiação, como no caso da espécie *Heterotermes tenuis*, que, provavelmente, seja na realidade duas espécies morfologicamente crípticas (Capítulo 2). Além do acúmulo de informações sobre a biologia das espécies, como o caso do primeiro registro de nidificação da abelha *Gaesochira obscura* (Apidae, Eucerini) em ninhos de *Anoplotermes banksi* (Apicotermatinae) (Anexo III) (Carrijo *et al.* 2012).

O aporte de dados provindos do monitoramento é inédito para Isoptera, principalmente em termos de amostragem e amplitude, e os dados provindos desses trabalhos vão muito além da presente tese. Estudos mostram que os cupins são bastante sensíveis a distúrbios, mas que há uma resposta de médio e longo prazo: mais de 5-10 anos após a perturbação (Eggerton *et al.* 1995, 1996, 1997; Davies *et al.* 2003), uma vez que as colônias das espécies sensíveis tendem a perdurar a curto prazo (menos de 5 anos após a perturbação). Como o represamento dos lagos das duas hidrelétricas só ocorreram em 2012, os Programas de Conservação da Fauna para as duas Hidrelétricas foram renovados e irão continuar pelo mesmo período de tempo da primeira fase. Ou seja, o monitoramento de cupins nas áreas de influência das UHEs de Jirau continuarão por

mais três anos (até 2016), e em Santo Antônio por mais dois anos (até 2015). Desta forma, haverá um mesmo tempo de estudo antes e depois do enchimento dos lagos, para realizar de forma comparativa um estudo no impacto das represas terão na comunidade de cupins. Por fim, é importante salientar que este tipo de estudo é de extrema relevância, pois as informações adquiridas aqui podem e deverão ser utilizadas para a criação de módulos de preservação (em escala regional), para compensar os impactos previstos e a perda de áreas preservadas.

Capítulo 1

Padrões de distribuição e diversidade de uma taxocenose de cupins no Alto Rio Madeira

1.1 INTRODUÇÃO

Muitas hipóteses têm sido propostas para explicar a origem e manutenção da grande diversidade que existe na Amazônia. A mais antiga, e que persiste até hoje, é a hipótese proposta por Alfred Russell Wallace durante seus estudos na região Neotropical. Wallace encontrou uma relação entre variação da riqueza de espécies de macacos e de pássaros com os grandes rios, sugerindo que esses cursos d'água funcionam como barreiras, impedindo a dispersão dos organismos (Gascon *et al.* 2000; Morrone 2006). Segundo essa teoria, as barreiras formadas pelos rios amazônicos separaram as populações de cada um dos lados do rio, de tal forma que posteriormente elas se diferenciaram em novas espécies. Essa hipótese tem como pressuposto a ideia de que os grandes rios, por serem muito largos, impossibilitam ou restringem a passagem dos indivíduos de um lado para o outro, dificultando o fluxo gênico e facilitando o evento de especiação alopátrica (Aleixo 2004; Haffer 2008).

Vários trabalhos com comunidade de cupins já foram realizados na Amazônia, entretanto, nunca se buscou entender o padrão de distribuição das espécies. Os primeiros trabalhos foram realizados pelo pesquisador Adelmar Gomes Bandeira e alguns colaboradores: esse pesquisador, no final da década de setenta, fez um estudo da termitofauna em ambientes de floresta primária e áreas abertas no Parque Nacional da Amazônia, às margens do rio Tapajós e registrou 18 gêneros e 42 espécies (Bandeira 1979). Mais tarde, Bandeira & Macambira (1988), na Serra dos Carajás, PA, fizeram um estudo dos cupins de uma área de campo rupestre e outras três áreas de floresta, encontrando 88 espécies de cupins, pertencentes a 29 gêneros. Bandeira & Torres (1985) em um estudo realizado em florestas primárias entre as cidades de Belém e Vigia, PA encontraram 92 espécies de cupins. No final da década de oitenta, Bandeira

(1989) registrou 76 espécies de cupins em áreas de floresta primária e pastagem, em Benevides, PA. A partir da década de noventa, outros pesquisadores se destacaram trabalhando com cupins na Amazônia. Constantino (1991) apresentou uma lista de 70 espécies registradas em florestas primárias do baixo rio Japurá, AM. Esse mesmo autor, mais tarde (Constantino 1992), coletou amostras de 27 espécies em uma floresta de terra firme próximo à Belém, PA, perto do rio Guamá e, no mesmo trabalho, apresentou listas de espécies de Humaitá, AM (61 espécies), Paragominas, PA (25 espécies), e de uma área no centro do estado do Amapá (36 espécies). Em uma compilação dos trabalhos já realizados na Amazônia, e no material identificado nas coleções do MZUSP e MPEG, Constantino & Cancellato (1992) levantaram 145 espécies para esse bioma. De Souza & Brown (1994) testaram se a fragmentação de habitats influenciaria a comunidade de cupins em florestas 80 km ao norte de Manaus, AM, encontrando um total de 64 espécies desses insetos. Já na década passada, Davies *et al.* (2003) encontraram 100 espécies de cupins em um complexo de ilhas na Guiana Francesa e Ackerman *et al.* (2009) encontraram 67 espécies de cupins em florestas primárias e sistemas agroflorestais 54 km ao norte de Manaus, AM. Mais recentemente Bourguignon *et al.* (2011) amostrou 95 espécies na Guiana Francesa; Palin *et al.* (2011) encontraram 49 espécies em um gradiente altitudinal no Peru; e Dambros *et al.* (2012) encontram 16 espécies em uma área de terra firme e 16 em “florestas fantasmas” em Presidente Figueiredo, AM. Hoje, já são conhecidas mais de 238 espécies que ocorrem na Amazônia legal brasileira (Constantino & Acioli 2006).

Apesar dos principais estudos realizados com comunidades de cupins na Amazônia terem sido realizados ao longo dos grandes rios, ou próximos às principais cidades (Constantino & Acioli 2006), nenhum deles entra em detalhes se esses rios são ou não barreiras biogeográficas para esses insetos. Desta forma, o objetivo principal

desse capítulo é realizar um estudo do padrão de diversidade em pequena e média escala nas áreas de influência da Usina Hidrelétrica (UHE) de Jirau, Rio Madeira, Porto Velho, Rondônia. Os objetivos específicos desse capítulo são:

- Realizar um estudo da suficiência amostral nas áreas de influência da UHE de Jirau;
- Comparar a composição de espécies de cupins de cada lado do Rio Madeira, para inferir se a composição de espécies entre os dois lados é distinta.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Áreas de estudo

As amostragens foram realizadas nos seis módulos de monitoramento da fauna da UHE de Jirau. Todos estão disposto às margens do Rio Madeira, como ilustrado nas Figuras ii e iii.

O módulo Ce é composto pelos transectos C1 e C3, localizados na margem esquerda do Rio Madeira. A área apresenta um predomínio das classes de solo de textura franco argilosa, argilosa e franco siltosa (Figura 1.1). Os dois transectos encontram-se bem preservados. No transecto C1 a vegetação é arbórea ao longo de todo o transecto, mas a altura do dossel se reduz a partir da parcela C1P3, enquanto o C3 possui um dossel alto ao longo de toda sua extensão. Em ambos, após a P3 ocorre uma redução na heterogeneidade nas espécies vegetais, predominância de bambus, “bananeiras-bravas” (*Phenakospermum* sp.), palmeiras e o “mirim” uma dicotiledônea arbórea muito comum às três grandes áreas em terrenos mais distantes do rio Madeira. O dossel é entreaberto e permite a passagem do sol em muitos pontos, atingindo o solo.

Há muitos troncos caídos em decomposição e muitas poças de água na época mais chuvosa.

O módulo Cd é composto pelos transectos C2 e C4, localizados na margem direita do Rio Madeira. A área apresenta um predomínio das classes solo de textura argilosa, franco argilosa e franca (Figura 1.1). Ambos são cortados por inúmeras estradas de terra, pastos e plantações. O transecto C2 corta trechos de mata, pastos, plantações, rios e igarapés. A parcela C2P1 é cortada um extenso igarapé e é constantemente alagada pela cheia do rio. A parcela C2P2 apresenta árvores de aproximadamente 25 m de altura e há predomínio de babaçu (*Attalea phalerata*). O sub-bosque é composto por babaçu jovem (“palheira”) de aproximadamente 5 m de altura. O dossel é aberto permitindo passagem dos raios solares, que atingem o solo. Em toda a parcela, encontra-se uma formação conhecida como “pula-pula”, que consiste em morrotes de terra (murundus) fixados por raízes de árvores e arvoretas, entre os quais há grandes depressões no qual se acumulam água das chuvas. A parcela C2P3 possui no sub-bosque muitos exemplares de “bananeira-brava”, e o dossel permanece aberto. No transecto C4 o dossel é alto e fechado na maior parte acessível do transecto, mas há um trecho aberto. Ao longo de quase toda a extensão percorrida, encontra-se a formação conhecida como “pula-pula”. A parcela C2P4 está localizada em local de solo areno-argiloso encharcado. Há bastante serapilheira e plântulas no extrato herbáceo. O extrato arbustivo é presente e denso, com muitas palmeiras e bananeira-brava. O dossel é entreaberto, permitindo a passagem dos raios solares. Há troncos caídos em decomposição.

Figura 1.1 – Porcentagem de texturas de solo por módulo. Ae - Abunã margem esquerda; Ad - Abunã margem direita; Me - Mutum margem esquerda; Ce - Caiçara margem esquerda; Cd - Caiçara margem direita. Ai – arenosa; Ag – argilosa; F – franca; S – siltosa; AA – argilo arenosa; FA – franco argilosa; FS – franco siltosa; MA – muito argilosa; AS – argilo siltosa; FAA – franco argilo arenosa e FAZ – franco argilo siltosa.

O módulo Me é composto pelos transectos M5 e M7, localizados na margem esquerda do Rio Madeira. A área apresenta um predomínio das classes de textura de solo franca e franco siltosa (Figura 1.1). Os dois transectos apresentam trechos com inclinação superior a 70 graus e ao longo dos transectos as quatro parcelas foram delimitadas nas seguintes metragens: 50, 750, 1.350 e 2.000 m distantes do rio Madeira. Ambos transectos apresentam um dossel relativamente alto, serapilheira abundante e muitos troncos caídos em decomposição. O extrato herbáceo é composto por plântulas e pteridófitas, tendo também alguns cipós e lianas. A parcela M5P2 está inserida em uma área relativamente plana presente em uma depressão no platô da primeira grande serra que o transecto M5 corta. Há um pequeno igarapé com rochas aflorantes. Já a parcela M7P2 localiza-se em uma escarpa de serra, suave no início, mas muito íngreme nos 50 m finais. As parcelas M5P3 e M7P3 estão inseridas próximas a igarapés com afloramentos de rochas.

O módulo Md é composto pelos transectos M6 e M8, localizados na margem direita do rio Madeira. A área apresenta um predomínio das classes de solo de textura argilosa, muito argilosa e franca (Figura 1.1). Em ambos os transectos, após os 150 m iniciais, a trilha se abre em um enorme pasto, com aproximadamente 700 m de extensão (sendo que o M8 passa à margem da borda da mata), mas nenhuma parcela fica dentro das pastagens. Passado o pasto, os transectos voltam ao trecho de mata, onde esta se mantém com dossel alto e estruturado. Depois da quarta parcela, a altura do dossel média cai expressivamente e passa a ocorrer predomínio de espécies como o “mirim” e a “bananeira-brava”, a serapilheira é abundante e o extrato herbáceo é composto por muitas plântulas. Na época da cheia do Rio Madeira, boa parte das parcelas ficam submersas, com camadas média de 10 cm de profundidade, e apenas alguns murundus (“pula-pula”) acima do nível da água.

O módulo Ae é composto pelos transectos A9 e A11, localizados na margem esquerda do Rio Madeira. A área apresenta um predomínio das classes de solo de textura franca e argilosa (Figura 1.1). A mata é alta e o dossel é fechado ou semi-fechado em quase toda a extensão percorrida dos transectos. Um grande igarapé que corta ambos os transectos por volta do quilômetro 1,7. Após o igarapé, no transecto A11, há um pasto, mas que não está em nenhuma parcela. A parcela A9P1 é um pouco singular, sendo bastante heterogênea ao longo dos seus 250 m. Do 0 aos 50m a vegetação é arbórea, com dossel médio de 7 m e há presença de clareiras. Até os 100 m, há um dossel mais alto, de cerca de 10m, e a serapilheira torna-se mais espessa. Até os 80 m, a área é sombreada e 30% da vegetação é bambu. Dos 80 m em diante, 90% da vegetação é composta por bambu.

O módulo Ad é composto pelos transectos A10 e A12, localizados na margem direita do rio Madeira. A área apresenta um predomínio das classes de solo de textura argilosa, muito argilosa e franca (Figura 1.1). O transecto A12 é cortado por um grande igarapé, ilhando a primeira parcela. Os dois transectos apresentam uma mata alta e heterogênea até aproximadamente os 2.500 m, quando a altura do dossel se reduz progressivamente até a vegetação passa a assumir a fisionomia de um cerrado, com predomínio de “mirim”. Nessa área, boa parte do solo é recoberta por gramíneas. A vegetação arbórea forma aglomerados de aproximadamente oito árvores em trechos de solo mais alto e não submerso (murundus), onde se acumula serapilheira. Há presença de pteridófitas no solo ao longo de toda a trilha.

1.2.2 Amostragem de cupins

Para esse capítulo foram utilizadas 120 subparcelas de 5x2m nos seis módulos de monitoramento de fauna da UHE Jirau (Figura ii), sendo 20 em cada módulo. As 20 subparcelas de cada módulo foram escolhidas de forma que em cada distância para o rio (P1 - 0 m, P2 - 1 km, P3 - 2 km e P4 - 3 km; Figura iii) fossem utilizadas cinco subparcelas, independentemente da campanhas em que foram amostradas, mas sempre tomando o cuidado para que elas estivessem sempre ao menos 50 metros distantes umas das outras. Foram sempre utilizadas duas subparcelas de um transecto e três do outro transecto do mesmo módulos (Figura iii).

A abundância de cupins foi mensurada de forma indireta, analisando o número de supostas colônias (encontros) de cada espécie, sendo um encontro considerado como a presença de determinada espécie em uma subparcela e, desta forma, cada espécie tem abundância máxima de uma colônia para cada subparcela.

1.2.3 Suficiência amostral

Com o intuito de verificar a efetividade do método utilizado para amostrar a riqueza de cupins foi feita uma curva de rarefação de espécies para toda a área de Jirau, assim como uma para cada módulo separadamente (Gotelli & Colwell 2001).

Para inferir o número de espécies não detectadas, foram calculados os estimadores de riqueza de *Chao*, *Jackknife I*, *Jackknife II* e *Bootstrap*, para toda a região e, também, para cada módulo. Como cada um desses estimadores utilizam fórmulas diferentes para calcular o número de espécies não detectadas, podendo dar mais peso para espécies raras, ou não (Colwell & Coddington 1994), foi feito um cálculo de

suficiência amostral com a média de todos os quatro estimadores. Desta forma, a porcentagem das espécies amostradas em relação àquela estimada (média dos quatro estimadores) é o valor de suficiência amostral. Depois, as estimativas foram comparadas e discutidas acerca do melhor estimador para cupins na Amazônia.

Para a construção das curvas de rarefação, foi utilizada a função *specaccum*, com 500 permutações randômicas; para o cálculo dos estimadores foi utilizada a função *specpool*, ambas do pacote *vegan*, do programa R (R Development Core Team 2010).

1.2.4 Diversidade beta e padrões de distribuição

Diversidade beta é a diferença na composição de espécies entre duas áreas (Whittaker 1960). Essa primeira definição extremamente simples e ampla, desde que foi cunhada, foi utilizada para diferentes fenômenos (Tuomisto 2010a). Nos últimos anos, vários trabalhos veem sendo publicados sobre as formas de se calcular as diferenças de diversidade entre áreas, e os conceitos que podem ser interpretados como diversidade beta (Jost 2006, 2007, 2010; Colwell 2010; Tuomisto 2010a, 2010b; Anderson *et al.* 2011; Chase *et al.* 2011). Hoje, não dá para dizer que existe uma forma única de se calcular diversidade beta, ou uma que seja "perfeita" e completamente satisfatória. Diante dessa problemática, resta aos pesquisadores dispostos a trabalhar com esse tipo de medida, escolher a forma "menos inadequada" para responder a pergunta em questão (Ricotta 2010).

Para buscar responder a pergunta principal desse trabalho, que é acerca da diferença entre a composição de espécies de cupins dos dois lados do rio, foi construída uma matriz de presença e ausência com cada um dos módulos e realizada uma análise de dissimilaridade par-a-par com o índice de diversidade beta de Jaccard. Esse índice

foi escolhido por não considerar as ausências conjuntas (*joint absences*) de espécies, ou seja, se uma espécie está ausente em duas áreas, esse índice não irá considerá-las mais similares (Anderson *et al.* 2011).

Também foi realizada uma análise de dissimilaridade par-a-par com uma matriz de abundância (número de encontros) das espécies por módulo. Essa análise foi feita com o intuito de buscar os módulos mais similares considerando não apenas a composição, mas também a abundância e dominância das espécies. Para isso foi utilizado o índice de diversidade beta de Morisita-Horn com os dados transformados em escala logarítmica: $\log_{10}(x+1)$ (Wolda 1981; Anderson *et al.* 2011).

Com o intuito de buscar um padrão margem-interior em relação ao rio, e ver se a composição de espécies e diversidade de cupins difere entre as parcelas mais próximas às margens e as parcelas mais distantes das margens (interior da mata), foram realizadas novamente as duas análises de dissimilaridade (Jaccard para matriz de presença e ausência e Morisita-Horn para matriz de abundância). Para todas as análises foi utilizado o programa R: para a análise de dissimilaridade foi utilizado o pacote *vegan* e função *vegdist*; e para construir o *cluster* de áreas foi utilizada a função *hclust* do pacote *stats*, método "average" (R Development Core Team 2010).

Para complementar as análises de diversidade beta, foi calculado o Índice de valoração de espécies (*IndVal*), para buscar espécies que são indicadoras ("fiéis"), ou são relacionadas à alguma área (Dufrêne & Legendre 1997; De Cáceres *et al.* 2010). Uma espécie com alto *IndVal* é aquela que possui uma abundância relativamente alta em alguma área e baixa em outras, sendo então considerado um bom indicador da primeira. Assim, uma espécie com um valor máximo de *IndVal* (100%) foi observada (amostrada) em todas as unidades amostrais de apenas uma única área ou conjunto de áreas, e nenhuma vez nas demais (Dufrêne & Legendre 1997). Desta forma, é possível

tentar ligar quais espécies estariam tornando os módulos ou parcelas mais similares entre si. O *IndVal* foi calculado para analisar espécies relacionadas aos módulos, e também relacionadas à distância para rio (ou seja, entre as parcelas). As análises foram feitas com a opção *IndVal.g* da função *multipatt*, do pacote *indicspecies* do software R (R Development Core Team 2010).

1.2.5 Análise dos dados abióticos

Variáveis ambientais foram medidas em todas as parcelas dos módulos de Jirau. As variáveis foram: altitude, inclinação do terreno, concentrações de argila, areia e silte no solo, além de estratificação vegetal, que foi dividida em cinco níveis de estratificação: entre 0 e 1, 1 e 5, 5 e 10, 10 e 15 e >15 metros de altura. Todas as medições de variáveis ambientais foram realizadas por empresas contratadas pela Energia Sustentável do Brasil, concessionária responsável pela construção da UHE de Jirau.

Para as medições de estratificação vegetal aplicou-se o método de quantificação da estratificação da folhagem de Hubbell & Foster (1986) modificado por Malcolm (1995), que consiste na utilização de uma vara de 3 m como mira para o estabelecimento de uma coluna imaginária de 15 cm de diâmetro, onde, com o auxílio de um telêmetro, foi anotado o limite inferior e superior das faixas cobertas por folhagem. Desta forma, realizou-se a quantificação da densidade da folhagem, e foi calculado o número de metros preenchidos pela vegetação em nove diferentes estratos (de 0 a 1, 1 a 5, 5 a 10, 10 a 15, 15 a 20, 20 a 25, 25 a 30, 30 a 35 metros e de 35 metros de altura), que foram posteriormente agrupados em cinco: entre 0 e 1, 1 e 5, 5 e 10, 10 e 15 e >15 metros de altura.

Aproximado 500 gramas de amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0-10 cm com auxílio de sonda metálica, acondicionadas em sacolas plásticas previamente identificadas. Todas foram secas ao sol por um período mínimo de 15 dias. Após secas, foram destorroadas e todo material orgânico grosseiro removido (raízes, restos de folhas, galhos). Em seguida foram tamizadas em malha de 2 mm para obtenção de TFSA (Terra Fina Seca ao AR) obtendo-se um quantitativo médio por amostra de 100 gramas. A metodologia de qualificação e quantificação utilizada na análise granulométrica foi a densimétrica de Bouyoucos, através da dispersão química do solo com NaOH 1,0N e tratamento com H₂O₂, seguindo os preceitos descritos por Pequeno (1999). A classificação foi realizada através do triângulo textural, conforme EMBRAPA (1997). As medições de argila, silte e areia foram feitas em g/kg de solo.

Como os dados de riqueza de cupins são contagens, ou seja, dados inteiros não negativos, foram utilizadas regressões de Poisson para analisar a riqueza de cupins em relação às variáveis ambientais. Para corrigir a superdispersão dos dados (*overdispersion*: quando a variância é maior que a média), foram utilizados modelos de quasipoisson (Ver Hoef & Boveng 2007). Para isso, foi utilizada a função *glm* do software R (R Development Core Team 2010).

1.3 RESULTADOS

Nas 120 subparcelas, em 704 encontros, foram amostradas 116 espécies, de 49 gêneros em três famílias. Foram cinco espécies de Rhinotermitidae (52 encontros), uma de Serritermitidae (um encontro) e 110 de Termitidae (651 encontros). Das espécies de Termitidae, 37 são de Apicotermatinae (259 encontros), 38 de Nasutitermitinae (193

encontros), 24 de Syntermitinae (100 encontros) e 11 de Termitinae (99 encontros) (Figura 1.2 e Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Lista de espécies e número de encontros por espécies registradas encontradas nas áreas de influência da UHE de Jirau; estimadores de riqueza *Chao*, *Jackknife I*, *Jackknife II* e *Bootstrap* e suficiência amostral (relativa à média dos estimadores). Ad - Abunã margem direita; Ae - Abunã margem esquerda; Cd - Caiçara margem direita; Ce - Caiçara margem esquerda; Md - Mutum margem direita; Me - Mutum margem esquerda.

Família/ Subfamília/ Espécie	Ad	Ae	Cd	Ce	Md	Me	Total
Rhinotermitidae	8	7	3	8	15	11	52
<i>Coptotermes testaceus</i>	1	1		1	3	1	7
<i>Dolichorhinotermes latilabrum</i>	1					2	3
<i>Dolichorhinotermes</i> sp. 1			1	1	1	1	4
<i>Heterotermes tenuis</i>	6	6	2	6	8	7	35
<i>Rhinotermes marginalis</i>					3		3
Serritermitidae	1						1
<i>Glossotermes sulcatus</i>	1						1
Termitidae	126	100	106	130	104	85	651
Apicotermitinae	55	42	39	48	38	37	259
<i>Anoplotermes banksi</i>	3	3	1	3	7	1	18
<i>Anoplotermes janus</i>	3		2	6	3	1	15
<i>Anoplotermes parvus</i>	3			3		1	7
<i>Anoplotermes</i> sp. 1	3	3	1	3	2	2	14
<i>Anoplotermes</i> sp. 2	3		1	1			5
<i>Anoplotermes</i> sp. 3	1	2	5		1	2	11
<i>Anoplotermes</i> sp. 7			1				1
<i>Anoplotermes</i> sp. 8		1	4			1	6
<i>Anoplotermes</i> sp. 9	3	1	1	4	4		13
<i>Anoplotermes</i> sp. 10	7	8	4	10	6	9	44
<i>Aparatermes</i> sp. 1		3				2	5
<i>Aparatermes</i> sp. 2	4						4
Apicotermitinae gen. n. 01 sp. 1						1	1
Apicotermitinae gen. n. 02 sp. 1		1		1			2
Apicotermitinae gen. n. 03 sp. 1		1					1
Apicotermitinae gen. n. 04 sp. 1	2	3	3	1	1	3	13
Apicotermitinae gen. n. 04 sp. 3	1						1
Apicotermitinae gen. n. 05 sp. 1	1	3	4		1	1	10
Apicotermitinae gen. n. 05 sp. 5			1	1		1	3
Apicotermitinae gen. n. 10 sp. 1	1	2					3
Apicotermitinae gen. n. 10 sp. 3	1	1	1	4		2	9
Apicotermitinae gen. n. 12 sp. 1	4		1	1	1	1	8
Apicotermitinae gen. n. 14 sp. 1					1		1

Família/ Subfamília/ Espécie	Ad	Ae	Cd	Ce	Md	Me	Total
<i>Grigiotermes</i> sp. 1	2	2	1	1	2		8
<i>Grigiotermes</i> sp. 2		1				2	3
<i>Grigiotermes</i> sp. 3		3					3
<i>Grigiotermes</i> sp. 4	1						1
<i>Longustitermes manni</i>	2		1	2	4	3	12
<i>Longustitermes</i> sp. 1	3	2	3	2	4	1	15
<i>Longustitermes</i> sp. 2	4		1	4		1	10
<i>Longustitermes</i> sp. 4		2				1	3
<i>Ruptitermes arboreus</i>			1		1		2
<i>Ruptitermes</i> sp. 1	2			1			3
<i>Ruptitermes</i> sp. 2			1				1
<i>Ruptitermes</i> sp. 3						1	1
<i>Ruptitermes</i> sp. 4			1				1
<i>Ruptitermes</i> sp. 5	1						1
Nasutitermitinae	31	27	41	34	33	27	193
<i>Agnathotermes</i> sp. 1	1				1		2
<i>Anhangatermes macarthuri</i>				2			2
<i>Atlantitermes oculatissimus</i>	1		1		1	1	4
<i>Atlantitermes snyderi</i>	2			2		1	5
<i>Atlantitermes</i> sp. 2	2	1	1	1			5
<i>Atlantitermes</i> sp. 4					1		1
<i>Coatitermes clevelandi</i>	1	1		3		1	6
<i>Coatitermes kartaboensis</i>	1	1	1	1	1		5
<i>Coendutermes tucum</i>			1				1
<i>Constrictotermes cavifrons</i>	1						1
<i>Diversitermes diversimiles</i>				1		1	2
<i>Ereymatermes</i> sp. 1	1		1		2		4
<i>Nasutitermes acangussu</i>				1			1
<i>Nasutitermes banksi</i>	2	3	8	5	5	3	26
<i>Nasutitermes bivalens</i>				2	1		3
<i>Nasutitermes corniger</i>		1	1		2	2	6
<i>Nasutitermes ephratae</i>	1	4	2			4	11
<i>Nasutitermes gagei</i>		3	5	2	6	2	18
<i>Nasutitermes globiceps</i>	2	3	2		1	1	9
<i>Nasutitermes guayanae</i>	2	2	2	2	3	2	13
<i>Nasutitermes major</i>			1				1
<i>Nasutitermes octopilis</i>		2	2	1			5
<i>Nasutitermes similis</i>	4		5	5	3	1	18
<i>Nasutitermes</i> sp. 03					1		1
<i>Nasutitermes</i> sp. 06			1				1
<i>Nasutitermes</i> sp. 09	2	1			1		4
<i>Nasutitermes surinamensis</i>	1					1	2
<i>Nasutitermes wheeleri</i>	1				2		3

Família/ Subfamília/ Espécie	Ad	Ae	Cd	Ce	Md	Me	Total
Nasutitermitinae gen. n. 1 sp. 1						1	1
<i>Paraconvexitermes acangapua</i>		1				1	2
<i>Rotunditermes bragantinus</i>			1				1
<i>Rotunditermes</i> sp. 1			1				1
<i>Subulitermes baileyi</i>	1	1		2	1		5
<i>Subulitermes constricticeps</i>	1						1
<i>Triangularitermes triangulariceps</i>	4	2	4	3	1	2	16
<i>Velocitermes</i> sp. 1		1					1
<i>Velocitermes</i> sp. 2			1	1		2	4
<i>Velocitermes</i> sp. 4						1	1
Syntermitinae	19	20	14	24	14	9	100
<i>Cornitermes bolivianus</i>		1					1
<i>Cornitermes ovatus</i>				2		1	3
<i>Cornitermes pilosus</i>		1					1
<i>Cornitermes pugnax</i>		1		3	3	1	8
<i>Cornitermes weberi</i>		1					1
<i>Curvitermes odontognathus</i>	1		1	1			3
<i>Cyrilliotermes angulariceps</i>			2	1	1		4
<i>Cyrilliotermes strictinasus</i>	2						2
<i>Embiratermes ignotus</i>	1	2	2	3		1	9
<i>Embiratermes latidens</i>	1						1
<i>Embiratermes neotenicus</i>	4	6	1	5	3	3	22
<i>Labiatermes guasu</i>	2				2		4
<i>Labiatermes labralis</i>		1			1		2
<i>Labiatermes pelliceus</i>	1	1		3			5
<i>Mapinguaritermes peruanus</i>	1	2			2		5
<i>Paracurvitermes manni</i>				1			1
<i>Rhynchotermes</i> sp. 1	1		3	1			5
<i>Silvestritermes holmgreni</i>	3		3	1	1		8
<i>Silvestritermes minutus</i>			1	2			3
<i>Syntermes aculeosus</i>						2	2
<i>Syntermes molestus</i>	2	2	1			1	6
<i>Syntermes peruanus</i>		1					1
<i>Syntermes spinosus</i>		1		1			2
<i>Uncitermes teevani</i>					1		1
Termitinae	21	11	12	24	19	12	99
<i>Cavitermes rozeni</i>	2						2
<i>Cavitermes tuberosus</i>		1			2		3
<i>Crepititermes verruculosus</i>	5	1	3	7	5	2	23
<i>Cylindrotermes flangiatus</i>			6	3	5	1	15
<i>Cylindrotermes parvignathus</i>	4	5		9		3	21
<i>Microcerotermes</i> sp. 1	4	2			1		7
<i>Neocapritermes pumilis</i>				2		2	4

Família/ Subfamília/ Espécie	Ad	Ae	Cd	Ce	Md	Me	Total
<i>Neocapritermes taracua</i>	4		1	1	2	1	9
<i>Neocapritermes unicornis</i>		1					1
<i>Planicapritermes planiceps</i>			1	1	2	2	6
<i>Termes</i> sp. 1	2	1	1	1	2	1	8
Total de encontros	135	107	109	138	119	96	704
Riqueza	62	53	55	55	50	54	116
<i>Chao</i>	86	83	123	81	72	83	159
<i>Jackknife 1</i>	88	79	86	78	71	82	148
<i>Jackknife 2</i>	99	93	109	90	81	96	167
<i>Bootstrap</i>	74	65	68	65	60	66	130
Suficiência	71%	66%	57%	70%	70%	66%	77%

A subfamília Nasutitermitinae foi a mais diversa somando-se todos os módulos de Jirau, entretanto, olhando-se módulo por módulo, ela foi mais diversa apenas em Mutum margem direita (Md). Em todos os demais, Apicotermitinae apresentou um maior número de espécies que os demais grupos. A maior diversidade de Rhinotermitidae foi nos módulos de Mutum margem direita (Md) e esquerda (Me). A menor diversidade da subfamília Syntermitinae foi em Mutum margem esquerda (Me) e a maior nos módulos Abunã e Caiçara margem esquerda (Ae e Ce). Termitinae foi menos diversa em Caiçara margem direita (Cd) (Figura 1.2)

Apesar do alto número de espécies encontradas em Jirau, a curva de acumulação de espécies (curva do coletor) para os seis módulos analisados em conjunto mostra apenas uma tendência à estabilização (Figura 1.3), indicando que ainda há várias espécies não amostradas. Da mesma forma, todos os estimadores de riqueza apontam para um número bem maior de espécies de cupins para Jirau. *Jackknife 2* foi o que estimou o maior número de espécies (167), enquanto *Bootstrap* foi o que estimou o menor número (130). A suficiência amostral, calculada pela média dos quatro estimadores, mostra que o total de espécies amostradas em Jirau, com 120 subparcelas, foi de aproximadamente 77% da riqueza real.

Figura 1.2 – Número de espécies e proporção por Famílias, e Subfamílias de Termitidae, por módulo das áreas de influência da UHE de Jirau. Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; Ad – Abunã margem direita; Ae – Abunã margem esquerda; e JIR – Total de todos módulos.

Figura 1.3 – Curva de acumulação de espécies para a somatória de subparcelas dos seis módulos nas áreas de influência da UHE de Jirau (120 subparcelas, 116 espécies).

Apenas no módulos Cd a subfamília Nasutitermitinae foi mais abundantes que Apicotermatinae. Em todos os demais, a subfamília Apicotermatinae foi o grupo mais abundante, seguido de Nasutitermitinae. A família Rhinotermitidae foi mais abundante no módulo Md e a única amostra da família Serritermitidae foi coletada no módulo Abunã margem direita (Ad). Tanto a subfamília Termitinae quanto Syntermitinae tiveram sua maior abundância no módulo Ce (Figura. 1.4).

Figura 1.4 – Número de encontros (abundância relativa) e proporção de Famílias e Subfamílias de Termitidae por módulo das áreas de influência da UHE de Jirau. Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; Ad – Abunã margem direita; Ae – Abunã margem esquerda; e JIR – Total de todos módulos.

Das 116 espécies, 32 foram encontradas apenas uma vez (*uniques*) e 12 apenas duas vezes (*duplicates*) (Figura 1.5). O alto número de espécies ‘únicas’ e ‘duplicatas’ também leva a inferência que existem várias espécies em Jirau ainda não amostradas. A espécie *Anoplotermes* sp. 10 foi a espécie mais abundante de Jirau (com 44 encontros),

entretanto, ela provavelmente é um complexo de espécies que agrupa uma grande variação morfológica. A espécie *Heterotermes tenuis* (com 35 encontro) foi a segunda espécie mais abundante, mas, aparentemente, são pelo menos duas espécies crípticas (veja Capítulo 2). Desta forma, não considerando os complexos de espécies, *Nasutitermes banksi* foi a espécie mais abundante nas áreas de Jirau, com 26 encontros, seguida de *Crepititermes verruculosus* (23 encontros), *Embriatermes neotenicus* (22) e *Cylindrotermes parvignathus* (21).

Figura 1.5 – Frequência de encontros das espécies de cupins nos módulos nas áreas de influência da UHE de Jirau.

O módulo onde foi amostrado o maior número de espécies foi Ad, com 62 espécies. Em seguida foi nos módulos Cd e Ce, ambos com 55 espécies amostradas. No módulo Me foram amostradas 54 espécies e em Ae 53. Já o módulo em que foi amostrado o menor número de espécies foi Md, com 50 espécies (Tabela 1.1).

As curvas de acumulação de espécies feitas para cada módulo separadamente não mostram qualquer sinal de estabilização ou inflexão (Figura 1.6). Em todos os módulos, realizando apenas 20 subparcelas, o número de espécies amostrados é bem inferior ao número apontado pelos estimadores (Tabela 1.1), e se mostrou insuficiente para uma boa representatividade do local.

Figura 1.6 – Curvas de acumulação de espécies para cada módulo para as áreas de influência da UHE de Jirau. Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; Ad – Abunã margem direita e Ae – Abunã margem esquerda.

Os módulos com as composição de espécies de cupins mais similares foram Cd e Ce, enquanto os mais dissimilares foram Ae e Cd (Tabela 1.2). Pela análise de cluster, o módulo mais singular foi Ae, e é possível notar um agrupamento entre os módulos Me, Cd e Ce, e outro entre Md e Ad. Os módulos da mesma margem do rio Madeira não foram agrupados pela composição de espécies de cupins, refutando a hipótese que o rio seja uma barreira biogeográfica para estes insetos (Figura 1.7).

Tabela 1.2 - Dissimilaridade entre os módulos de Jirau. Metade inferior, dissimilaridade de Jaccard calculado de uma matriz de presença e ausência; metade superior, dissimilaridade de Morisita-Horn calculado de uma matriz de abundância.

	Ad	Ae	Cd	Ce	Md	Me
Ad	-	0,39	0,38	0,28	0,35	0,37
Ae	0,61	-	0,41	0,41	0,40	0,31
Cd	0,57	0,67	-	0,34	0,32	0,34
Ce	0,56	0,65	0,49	-	0,33	0,29
Md	0,56	0,63	0,54	0,60	-	0,38
Me	0,60	0,61	0,55	0,53	0,63	-

Figura 1.7 – Índice de Jaccard: diversidade beta média (esquerda) e dendrograma com a dissimilaridade (direita) para cada módulo das áreas de influência da UHE Jirau. Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; Ad – Abunã margem direita e Ae – Abunã margem esquerda.

Levando-se em consideração a abundância e dominância das espécies de cupins, os módulos mais similares foram Ce e Ad, enquanto Ae em relação tanto a Cd quanto a Ce, foram os mais dissimilares (Tabela 1.2). Pela análise de cluster, o agrupamento dos módulos Ae e Me foi o mais singular, enquanto os outros quatro módulos foram agrupado em outro cluster. Dentro desse cluster maior, ainda foram formados os agrupamentos Ad e Ce, e Cd e Md (Figura 1.8).

Figura 1.8 – Índice de Morisita-Horn: diversidade beta média (esquerda) e dendrograma com a dissimilaridade (direita) para cada módulo das áreas de influência da UHE Jirau. Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; Ad – Abunã margem direita e Ae – Abunã margem esquerda.

Por meio do cálculo do Índice de Valoração (*IndVal*) das espécies presentes nos módulos de monitoramento da UHE de Jirau, foi possível observar apenas três espécies que podem ser consideradas boas indicadoras ou relacionadas a algum módulo ou conjunto de módulos (nível de probabilidade de 5%, Tabela 1.3). A espécie *Grigiotermes* sp. 3 obteve um alto índice para o módulo Ae (*IndVal* = 61,2%; $p = 0,013$); essa espécie foi encontrada três vezes nesse módulo, e em nenhum outro módulo da UHE de Jirau (Tabela 1.1). A espécie *Aparatermes* sp. 1 obteve um índice significativo para o conjunto dos módulos Ae e Me (*IndVal* = 55,9%; $p = 0,03$); no primeiro módulo sua abundância relativa foi de três encontros e no segundo de dois

encontros, não sendo encontrada em nenhum outro módulo. Por fim, a abundância de *Cylindrotermes parvignathus* foi relativamente alta em quatro módulos, estando ausente nos módulos Cd e Md (Tabela 1.1), obtendo-se um índice significativo para o conjunto de quatro módulos ($IndVal = 68,5\%$; $p = 0,016$).

Tabela 1.3 – Espécies indicadoras dos módulos ou grupo de módulos das áreas de influência da UHE de Jirau.

Local de Indicação	Espécie	<i>IndVal</i> (%)	Significância (<i>p</i>)
Ae	<i>Grigiotermes</i> sp. 3	61,2	0,013 *
Ae + Me	<i>Aparatermes</i> sp. 1	55,9	0,03 *
Ad+Ae+Ce+Me	<i>Cylindrotermes parvignathus</i>	68,5	0,016 *

Quando analisadas as parcelas como unidades amostrais (ou seja, a distância para a margem do rio), é possível notar um padrão onde a P1 (parcela disposta a menos de 100 metros da margem do rio) é muito menos rica em número de espécies de cupins do que as parcelas P2, P3 e P4, distantes 1, 2 e 3 km da margem do rio, respectivamente (Figura 1.9).

Além do menor número de espécies, a composição, e os padrões de abundância e dominância das espécies, também foram bastante singulares nas parcelas às margens do Rio Madeira (Tabela 1.4). Em relação à composição de espécies (Figura 1.10), a análise de cluster agrupou as parcelas P2 e P4, enquanto em relação aos padrões de abundância e dominância (Figura 1.11), a análise de cluster agrupou as parcelas P3 e P4, mas em ambas a P1 foi a mais singular.

Tabela 1.4 – Dissimilaridade entre as parcelas dos módulos da UHE de Jirau. Metade inferior, índice de Jaccard calculado de uma matriz de presença e ausência; metade superior, índice Morisita-Horn calculado de uma matriz de abundância.

	P1	P2	P3	P4
P1	-	0,44	0,41	0,45
P2	0,63	-	0,24	0,20
P3	0,62	0,55	-	0,20
P4	0,64	0,46	0,47	-

Figura 1.9 – Curvas de acumulação de espécies para as parcelas dos módulos da UHE de Jirau.

Figura 1.10 – Índice de Jaccard: diversidade beta média (esquerda) e dendrograma com a dissimilaridade (direita) entre as parcelas dos módulos da UHE de Jirau.

Figura 1.11 – Índice de Morisita-Horn: diversidade beta média (esquerda) e dendrograma com a dissimilaridade (direita) entre as parcelas dos módulos da UHE de Jirau.

O Índice de Valoração (*IndVal*) das espécies para as distâncias da margem do rio foi significativo para seis espécies (Tabela 1.5). As espécies *Planicapritermes planiceps* (*IndVal* = 58,9%; $p = 0,011$) e *Atlantitermes* sp. 2 (*IndVal* = 51,6%; $p = 0,038$) são relativamente boas indicadoras da parcela distante 3 km do rio (P4). A primeira foi amostrada cinco vezes na P4 e apenas uma vez na P2, enquanto a segunda foi encontrada uma vez na P3 e quatro na P4.

Tabela 1.5 – Espécies indicadoras de ambientes em relação à distância da margem do rio Madeira. P1, 50 metros do rio; P4, 3 km do rio; P2+P3+P4, distantes mais de 1km do rio.

Local de Indicação	Espécie	<i>IndVal</i> (%)	Significância (p)
P1	<i>Nasutitermes globiceps</i>	81,6%	0,001 ***
P1	<i>Nasutitermes octopilis</i>	64,5%	0,004 **
P4	<i>Planicapritermes planiceps</i>	58,9%	0,011 *
P4	<i>Atlantitermes</i> sp. 2	51,6%	0,038 *
P2+P3+P4	<i>Nasutitermes banksi</i>	74,5%	0,001 ***
P2+P3+P4	<i>Nasutitermes similis</i>	62,4%	0,04 *

As outras quatro espécies que se mostraram boas indicadoras de uma ou mais áreas em relação à distância para o a margem do rio, seguem o mesmo padrão encontrado nas análises de diversidade beta: duas espécies praticamente exclusivas da P1, e as outras duas espécies ausentes na P1, e com abundância relativamente alta nas

demais parcelas. As espécies *Nasutitermes globiceps* ($IndVal = 81,6\%$; $p = 0,001$) e *N. octopilis* ($IndVal = 64,5\%$; $p = 0,004$) são boas indicadoras das áreas próximas às margens do rio, tendo sido amostradas nove e cinco vezes, respectivamente, apenas na P1, e nenhuma vez nas parcelas mais distantes do rio (Figura 1.9). Já para as espécies *N. banksi* ($IndVal = 74,5\%$; $p = 0,001$) e *N. similis* ($IndVal = 62,4\%$; $p = 0,04$) foram obtidos índices significativos para indicação de ambientes distantes das margens do rio, estando as duas praticamente ausentes na P1 e sendo amostradas frequentemente nas demais parcelas (Figura 1.12).

Figura 1.12 – Abundância relativa (número de encontros) por parcela (distância para a margem do rio) das espécies indicadoras da P1 (esquerda), e do conjunto de parcelas P2+P3+P4 (direita), nos módulos da UHE de Jirau.

Das dez variáveis ambientais analisadas, a riqueza de cupins se mostrou significativamente relacionada à quatro: altitude (Figura 1.13), concentração de argila e silte no solo (Figura 1.14), e estratificação vegetal entre 1 e 5 m (Figura 1.15).

A riqueza de cupins teve uma relação quadrática significativa com altitude do terreno, isto é, nas menores altitudes a riqueza de cupins foi baixa, em uma altitude média, a riqueza foi maior, e em uma maior altitude a riqueza voltou a ser baixa ($p < 0,003$; Figura 1.13). A inclinação do terreno teve uma leve influência negativa na riqueza de cupins, entretanto, não foi significativa ($p < 0,193$; Figura 1.13).

Figura 1.13 – Relação entre riqueza de cupins e as variáveis de altitude e inclinação do terreno nos módulos da UHE de Jirau, RO. A linha de ajuste do modelo é derivada de uma regressão de quasipoisson. Para a variável altitude, foi utilizada uma regressão quadrática de quasipoisson, sendo essa significativa.

Das variáveis de solo medidas, a riqueza de cupins não teve uma relação significativa apenas com a concentração de areia no solo ($p < 0,201$; Figura 1.14). Com a concentração de argila, teve uma relação quadrática: com uma riqueza de cupins mais baixa em concentrações intermediárias de argila, e riqueza alta com concentrações mais baixas e mais altas ($p < 0,047$; Figura 1.14). Por fim, a riqueza de cupins teve uma relação cúbica bastante significativa com a concentração de silte, como demonstrado pelo modelo ajustado da Figura 1.14 ($p < 0,000$).

Figura 1.14 – Relação entre riqueza de cupins e as variáveis de concentração de Areia, Argila e Silte no solo nos módulos da UHE de Jirau, RO. A linha de ajuste do modelo é derivada de uma regressão de *quasipoisson*. Para a variável argila foi utilizada uma regressão quadrática e para silte uma regressão cúbica de *quasipoisson*, sendo ambas significativas.

Em relação às variáveis de estratificação vegetal, a riqueza de cupins tem uma relação quadrática significativa com o estrato entre 1 e 5 metros de altura, com uma riqueza maior quando se tem uma densidade mediana desse estrato, e riqueza menor quando a densidade desse estrato é pequena ou alta ($p < 0,000$; Figura 1.15). Além disso, a riqueza de cupins tem uma leve relação positiva com o estrato menor que 1 m e negativa com o estrato acima de 15 m, mas nenhum delas significativa (Figura 1.15).

Veg. > 0-1 m ($p < 0,189$; Disp. = 1,70)

Veg. > 1-5 m ($p < 0,000$; Disp. = 1,47)

Veg. > 5-10 m ($p < 0,626$; Disp. = 1,72)

Veg. > 10-15 m ($p < 0,711$; Disp. = 1,72)

Veg. > 15 m ($p < 0,082$; Disp. = 1,64)

Figura 1.16 – Relação entre riqueza de cupins e as variáveis de estratificação vegetal entre os intervalos de 0-1, 1-5, 5-10, 10-15 e > 15 metros. A linha de ajuste do modelo é derivada de uma regressão de quasipoisson. Para a variável do intervalo entre 1-5 m foi utilizada uma regressão quadrática de quasipoisson, sendo essa significativa.

1.4 DISCUSSÃO

1.4.1 Megadiversidade e composição faunística

A riqueza de 116 espécies de cupins amostradas em 120 subparcelas amostradas torna esse trabalho o segundo no mundo até hoje em número de espécies com protocolo comparável para esse grupo. O trabalho que registrou o maior número de espécies de cupins até hoje foi realizado por Deblauwe *et al.* (2007), nos Camarões, África. Estes autores encontraram 117 espécies em cinco áreas (100 subparcelas de 5x2m) e uma média de 61 espécies por transecto, considerando-se 20 subparcelas contíguas, como proposto por Jones & Eggleton (2000). Considerando o esforço amostral relativamente comparável (também com 20 subparcelas, mas não contíguas), os resultados do presente Capítulo também apontam para uma diversidade local um pouco abaixo daquela encontra em Camarões: média de 55 espécies coletadas por área / transecto (módulo de Jirau) (Tablea1.1).

Na Amazônia, esse é o trabalho que registrou maior número de espécies até hoje. O trabalho prévio que havia registrado o maior número de espécies até hoje foi o de Davies *et al.* (2003), que registrou 100 espécies na Guina Francesa, com um esforço amostral de 260 parcelas de 5x2 m (subparcelas no presente trabalho).

O grupo mais abundante e o segundo mais diverso em Jirau foi a subfamília Apicotermatinae, com 37 morfoespécies (32% do total, Figura 1.2) e 259 encontros (37% do total, Figura 1.3). Davies *et al.* (2003), na Guiana Francesa, acharam uma composição de cupins com 34% das espécies identificadas como Apicotermatinae. Números similares para a proporção de Apicotermatinae também foram encontrados na Amazônia por Ackerman *et al.* (2009) (30%), Bourguignon *et al.* (2011) (35%), e Palin *et al.* (2011), com 50% das espécies amostradas pertencentes a essa subfamília. Esses

trabalhos têm em comum um cuidado na delimitação de espécies de Apicotermatinae, antes não empregado, com utilização de caracteres de tubo digestivo, com especial detalhe para válvula entérica (Davies *et al.* 2003). Trabalhos anteriores a esses, provavelmente subestimavam o número de espécies de Apicotermatinae, como por exemplo Bandeira & Torres (1985), que das 92 espécies amostradas, apenas 14 eram Apicotermatinae (15%), ou Constantino (1991), que das 70 coletadas, apenas 14 eram Apicotermatinae (20%).

O grande número de espécies e alta abundância de Apicotermatinae na Amazônia mostram a importância desse grupo. Entretanto, os Apicotermatinae Neotropicais ainda são negligenciados, pois se trata de um grupo difícil de se estudar, entre outras coisas, pela falta de clareza quanto à taxonomia do grupo (Bourguignon *et al.* 2009, 2010). Nessa tese mesmo, muito provavelmente a espécie aqui referida como *Anoplotermes* sp. 10 (a espécie mais abundante nesse trabalho, com 44 encontros: Figura 1.5) trata-se de um complexo de espécies, o que faz com que a proporção de espécies dessa subfamília deva ser ainda maior em Jirau, mas também exemplifica o porquê de muitos trabalhos subestimam o número de espécies desse grupo.

1.4.2 Estimadores e espécies “não vistas”

Apesar do alto número de espécies encontradas nos módulos Jirau, a curva de acumulação de espécies ainda não mostra sinal de estabilização (Figura 1.3). Da mesma forma, os estimadores de riqueza apontam para uma diversidade ainda mais alta que aquela encontrada, variando as estimativas de 130 a 167 espécies (*Bootstrap* e *Jackknife* 2, respectivamente, Tabela 1.1). Entretanto, como discutido na introdução dessa tese, o esforço amostral empregado nos módulos de Jirau é bem maior que aquele que está sendo utilizado para esse Capítulo, permitindo então, que se tenha um número de

espécies para a região mais próximo do real. Considerando todas as 665 subparcelas amostradas nas 12 campanhas realizadas em Jirau, mas excluindo-se os Apicotermatinae (veja Resultados e Considerações Gerais), foram amostradas 110 espécies em Jirau. Somando-se com as 37 espécies de Apicotermatinae que foram identificadas (apenas) das 120 subparcelas utilizadas para o presente Capítulo, tem-se um total de 147 espécies. Levando em consideração esse número, o melhor estimador de riqueza para cupins em Jirau, seria o *Jackknife 1*, que estimou 148 espécies. Entretanto, considerando as 665 subparcelas amostradas, menos de 20% das amostras de Apicotermatinae foram identificadas até espécie/morfoespécie, o que nos faz acreditar que o número de espécies desse grupo ainda deva crescer consideravelmente. Levando esse fator em consideração, é possível dizer que, muito provavelmente, os estimadores mais “otimistas” (*Chao*, 159 e *Jackknife 2*, 167 espécies) devem ter sido os mais eficientes para estimar a riqueza de cupins em Jirau.

As curvas dos coletores para cada módulo separadamente são todas ascendentes (Figura 1.6). Assim, seguindo o mesmo raciocínio que acima, mas para cada módulo separadamente (ou seja, o número de espécies considerando todas as campanhas já realizadas, mais os Apicotermatinae das 120 subparcelas desse Capítulo), a riqueza foi de 92 espécies em Ad, 81 em Ae, 73 em Cd, 90 em Ce, 73 em Md e 91 em Me (Figura iv). Desta forma, o estimador que mais se aproximou do “número real” de espécies para a maioria dos módulos (Ad, Ce, Md e Me) foi o *Jackknife 2*, que é também, de forma geral, o mais “otimista” (sendo que a escolha do estimador sempre foi observando aquele que estimou o número mais próximo acima daquilo que já foi amostrado, e nunca para baixo, uma vez que aquele número de espécies é o “mínimo” que tem na área). Para o módulo Ae, o mais próximo foi *Chao* (estimou 83 espécies), entretanto provavelmente há mais de duas espécies não amostradas nessa área, o que tornaria o

estimador *Jackknife 2* o melhor estimador para essa área também. Por fim, para Cd o estimador que mais se aproximou foi o *Jackknife 1* (que estimou 86 espécies), mas também deve ser observado que esse é o módulo onde foi empregado o menor esforço amostral, e que o número talvez não chegue àqueles indicados pelos métodos *Chao* e *Jackknife 2*, mas muito provavelmente crescerá bastante.

O *Jackknife 1* estima a riqueza através do número de espécies que ocorrem em apenas uma amostra (*uniques*), enquanto o *Jackknife 2* utiliza tanto as amostras “únicas” quanto aquelas espécies que ocorrem em duas amostras (*duplicates*). O método *Chao* utiliza aquelas espécies em que apenas um ou dois indivíduos foram amostrados (*singletons* e *doubletons*). Por fim, o método *Bootstrap* não se restringe apenas a espécies raras, ele estima por meio de simulações de amostras aleatórias retiradas dos próprios dados (reamostragem) (Colwell & Coddington 1994). Para o método de coleta de cupins, onde a abundância máxima por unidade amostral é um (1), os *singletons* e *uniques* serão sempre iguais, da mesma forma que *duplicates* e *doubletons* também. Assim, pode-se dizer que, de uma forma geral, os dois métodos que combinam as espécies que ocorreram apenas uma vez e aquelas que ocorreram duas vezes (*Jackknife 2* e *Chao*), foram os que melhor estimaram a riqueza para cupins em Jirau.

Diversos estimadores já foram utilizados para trabalhos com cupins. Os mais utilizados foram *Jackknife 1* (Eggleton *et al.* 1995, 1997; Reis & Cancellato 2007) e *Chao 2* (Roisin & Leponce 2004; Dosso *et al.* 2010; Dambros *et al.* 2012), mas também já foram utilizados Michaelis-Menten, *Bootstrap* (Cunha *et al.* 2006), *Jackknife 2* e ICE (Roisin & Leponce 2004). Palmer (1990, 1991) argumenta que o melhor estimador não paramétrico seria o *Jackknife 1*, mas a presente tese mostra que pelo menos para cupins na Amazônia, o *Jackknife 2* dá uma estimativa mais real. Um trabalho mais aprofundado nesse tema deve ser realizado. Talvez, após a identificação de todos os

Apicotermitinae de Jirau, seja possível realizar desenhos analíticos mais apropriados para que se possa escolher o melhor estimador de riqueza para se utilizado em trabalhos com protocolos padronizados de coletas de cupins.

1.4.3 Diversidade beta entre os módulos

A relação da composição de espécies de cupins com os módulos se agruparam de forma coincidente com a classificação de solos do “Novo Mapa de Solos do Brasil”, da Embrapa (Santos *et al.* 2011). Segundo essa classificação (a mais recente encontrada, Figura 1.17), os módulos Ce, Cd e Me, que foram agrupados pela similaridade na composição de espécies de cupins, estão inseridos em um mesmo tipo de solo: Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico. Da mesma forma, os módulos Md e Ad, também agrupados pela análise, estão inseridos no mesmo tipo de solo: Gleissolo Háptico Ta Distrófico. Por fim, o módulo Ae, no qual a composição de cupins é mais singular, também é o único módulo inserido no tipo de solo classificado como: Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico.

Os Latossolos Vermelho-Amarelo Distróficos são solos em avançado estágio de intemperização, muito evoluídos, como resultado de enérgicas transformações no material constitutivo e ácidos (saturação por bases < 50%) na maior parte dos primeiros 100 cm do horizonte B. Os Gleissolos Hápticos Ta Distróficos são solos com argila de atividade alta e ácidos na maior parte dos primeiros 100 cm a partir da superfície do solo. São constituídos por material mineral com horizonte glei iniciando-se dentro dos primeiros 150 cm da superfície. O horizonte glei é um horizonte mineral caracterizado por redução de ferro e fortemente influenciado pelo lençol freático e regime de umidade redutor, sendo saturado com água periodicamente. Praticamente não há oxigênio dissolvido em razão da saturação por água durante todo o ano, ou pelo menos por um

longo período, associado à demanda de oxigênio pela atividade biológica. Por fim, os Argissolos Vermelho-Amarelo Distróficos compreendem solos constituídos por material mineral que têm como características diferenciais a presença de horizonte B textural de argila de atividade baixa, ou alta conjugada com saturação por bases baixa ou caráter alítico (alto teor de alumínio). São solos ácidos (saturação por bases < 50%) na maior parte dos primeiros 100 cm do horizonte B (EMBRAPA 2006).

Figura 1.17 – Mapa dos tipos de solo nas áreas de influência da UHE Jirau (Santos *et al.* 2011). 1) Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico + Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico; 2) Gleissolo Háptico Ta Distrófico + Neossolo Flúvico Ta Distrófico; 3) Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico + Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico. Módulos: Ae - Abunã margem esquerda; Ad - Abunã margem direita; Me - Mutum margem esquerda; Ce - Caiçara margem esquerda; Cd - Caiçara margem direita.

Desta forma, a similaridade entre a composição de espécies entre Ad e Md e entre Cd, Ce e Me, e a singularidade da composição de Ae poderiam então ser explicadas por uma possível relação da fauna de cupins com o solo. Além disso, a espécie *Grigiotermes* sp. 3 foi considerada uma boa indicadora para o módulo Ae, que foi o módulo mais singular em relação a composição de espécies e também o único

localizado em um Latossolo. Apesar de que a diferença na paisagem de um local com Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico + Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico e Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico + Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico seja considerada mínima para fins de interpretação de uso e manejo (Humberto G. Santos, com.pes.), mas nunca foi testado para cupins.

Os módulos Ad e Md são os dois únicos módulos em Gleissolos, e também são os únicos que possuem parcelas com uma formação vegetal aberta, próxima a um cerrado. Cabe verificar, então, se tanto o tipo de vegetação quanto a composição de cupins estão sendo influenciadas pelo tipo de solo, ou se a vegetação é influenciada pelo solo, e a composição de cupins influenciada pelo tipo de vegetação. Considerando a íntima associação de cupins com o solo e com a vegetação (Lavelle *et al.* 1997; Traoré *et al.* 2008; Jouquet *et al.* 2011), é possível que a ambas as hipóteses sejam plausíveis e só experimentos direcionados podem responder esse tipo de pergunta.

Entretanto, vale ressaltar que a classificação encontrada no mapa de solos da Embrapa (Santos *et al.* 2011) não é concordante com a classificação apresentada pela empresa contratada para medição de variáveis do solo. Segundo o que foi apresentado pelo relatório dessa empresa o módulo Cd apresenta um predomínio da classe de solo Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico Argiloso, o módulo Me apresenta um predomínio da classe de solo Areia Quartzosa, o módulo Ce apresenta um predomínio da classe de solo Gleissolo Distrófico Argiloso, e os módulos Md, Ae e Ad apresentam um predomínio da classe de solo Gleissolo Distrófico Franco. Em caso dessa classificação ser a mais correta, a composição de espécies de cupins não seria fiel ao tipo de solo onde se ela se encontra.

Por fim, levando-se em consideração a abundância e dominância das espécies de cupins, não foi possível encontrar um padrão na característica dos módulos agrupados.

Da mesma forma, não foi possível encontrar algum padrão para a distribuição das outras duas espécies indicadoras para grupos de módulos (*Aparatermes* sp. 1 para os módulos Ae e Me; e *Cylindrotermes parvignathus*, para os módulos Ae, Ad, Ce e Me).

1.4.4 Diversidade beta dentro dos módulos

Ao se analisar a distribuição de cupins dentro dos módulos, para ver o padrão de distribuição dos cupins em relação à distância para a margem do rio, na P1 foi encontrado um menor número de espécies e ainda, a composição mais os padrões de abundância e dominância de espécies diferentes das parcelas P2, P3 e P4. Constantino (1992) encontrou uma grande diferença entre a comunidade de cupins entre o que ele classificou como “várzea” (áreas inundáveis anualmente por rios “de água clara”) e áreas de “terra firme”. Entretanto, apesar da P1 ser a parcela mais próxima das margens do rio Madeira, durante as flutuações anuais de cheia do rio, nenhuma delas fica completamente submersa, inclusive foram realizadas amostragens nessas parcelas em várias campanhas durante a cheia (apesar do ficar com o solo bastante úmido e formar poças em alguns pontos). Além disso, várias parcelas mais distantes do rio e que são inundadas periodicamente não apresentaram essa redução de espécies de cupins (por exemplo todas as parcelas P3 e P4 dos transectos dos módulos Md e Ad). Desta forma, pode ser que a explicação para essa diferença entre a fauna de cupins da P1 com as demais parcelas mais distantes do rio seja uma resposta do efeito de borda na comunidade desses insetos, e não influência da cheia do rio Madeira.

É interessante ressaltar que esse padrão não se restringe a uma diminuição do número de espécies de cupins, mas é também a uma mudança na composição de espécies, inclusive com espécies praticamente restritas a cada um desses dois “tipos de ambientes” (perto e longe da margem), podendo inclusive ser consideradas espécies

indicadoras desses ambientes. As espécies *Nasutitermes globiceps* e *N. octopilis* foram encontradas exclusivamente em parcelas P1, enquanto *N. similis* e *N. banksi* estão ausentes nas parcelas às margens do rio. A biologia dessas espécies é relativamente parecida, apenas *N. banksi* não constrói ninhos arborícolas, mas todas são xilófagas e são encontradas forrageando no solo da mata em busca de madeira.

Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar a distribuição disjunta dessas espécies. A primeira é que essas espécies estariam se excluindo competitivamente. Casos de agressões entre espécies simpátricas de cupins, que utilizam o mesmo tipo de recurso, são bastante comuns, inclusive com registro de vários casos entre espécies competidoras de *Nasutitermes* (Thorne 1982; Thorne & Haverty 1991; Evans *et al.* 2009). Em plantações de coco da Nova Guiné, por exemplo, as colônias de *N. princeps* defendem grandes territórios ao redor de seus ninhos, tanto contra colônias da mesma espécie, quanto contra espécies simpátricas. As colônias dessa espécie foram registradas inclusive destruindo colônias de *Microcerotermes biroi*, uma espécie simpátrica de colônia normalmente menor e considerada uma competidora mais fraca. Ao redor das colônias de *N. princeps* não há outras colônias, entretanto, quando a pressão dessa espécie é enfraquecida, outras espécies se estabelecem rapidamente na área (Leponce *et al.* 1997). Espécies de *Nasutitermes* também não apresentam uma distribuição homogênea no Panamá. A espécie *N. nigriceps*, por exemplo, é normalmente encontrado no dossel, enquanto *N. guayanae* geralmente está mais próximo do nível do solo (mas ambas espécies constroem ninhos arborícolas). Além disso, aparentemente *N. corniger* está ausente em algumas áreas devido a competição com outras espécies, possivelmente *N. nigriceps* (Roisin *et al.* 2006). Entretanto, ainda são pouco conhecidos os mecanismos pelos quais os cupins evitam exclusão competitiva (Evans *et al.* 2009). Através de experimentos talvez seja possível testar a hipótese que *N. globiceps* e *N.*

octopilis estariam excluindo competitivamente *N. similis* e *N. banksi*, ou o contrário. Também através de experimentos seja possível entender o porque das espécies que coexistem não estariam se excluindo, isto é, *N. globiceps* e *N. octopilis* não se excluem, assim como *N. similis* e *N. banksi* também não se excluem.

Uma segunda explicação para o padrão de distribuição dessas espécies é que P1 está sob forte influência de efeito de borda. Efeitos de borda são o resultado da interação de dois ambientes adjacentes separados por uma transição abrupta (Murcia 1995). Normalmente os estudos de efeitos de bordas são associados à fragmentação de habitat, entretanto, uma margem de rio, como no caso do Rio Madeira, também é considerado uma borda de ecossistema (no caso, entre o ecossistema de mata e de rio). Ecossistemas adjacentes realizam trocas de energia, nutrientes e espécies através de suas bordas (Laurance & Yensen 1991), e diversos trabalhos veem mostrando que o efeito de borda pode influenciar na abundância e estrutura das comunidades biológicas sobre seu efeito (Ewers & Didham 2007; Banks-Leite *et al.* 2010; Didham & Ewers 2012). Desta forma, é possível que *N. globiceps* e *N. octopilis* seriam espécies que preferem ambientes mais instáveis, como as bordas das matas; enquanto que esses ambientes de borda, ao mesmo tempo, talvez sejam muito perturbados para que as espécies *N. similis* e *N. banksi* consigam se estabelecer. Essa hipótese é plausível principalmente para *N. globiceps*, que é uma espécie mais encontrada no bioma Cerrado (Constantino 2013), e possivelmente estende sua distribuição até essa região da Amazônia por meio de bordas de matas, mas não conseguindo se estabelecer nas matas mais fechadas.

Por fim, o *IndVal* também foi significativo para as espécies *Planicapritermes planiceps* e *Atlantitermes* sp. 2 em relação a parcela P4. Entretanto, apesar da significância do índice para essas duas espécies, esses resultados provavelmente são artefato da pequena amostragem, uma vez que essas espécies foram encontradas em

outras parcelas diversas vezes (não utilizadas para as análises desse capítulo – veja Resultados Gerais).

1.4.5 Variáveis ambientais

A riqueza de cupins se mostrou significativamente relacionada às variáveis ambientais: altitude, concentração de argila e silte no solo, e estratificação vegetal entre 1 e 5 m. A riqueza de cupins teve uma relação quadrática com a altitude do terreno (modelo em forma de U invertido). Tradicionalmente é sabido que a diversidade de cupins diminui com o aumento da altitude (Gathorne-Hardy *et al.* 2001; Palin *et al.* 2011). A variação altitudinal do presente trabalho é pequena, de apenas 88 m (85 a 173 m), mas apesar dos trabalhos que mostram o declínio de diversidade com a altitude terem trabalhado com gradientes muito maiores, variando de 1000 a 2800 m, Gathorne-Hardy *et al.* (2001) afirmam que mesmo um aumento de 100 m na altitude já é suficiente para reduzir a diversidade de cupins. O formato de U invertido do modelo de *quaispoisson* que melhor se ajustou à relação da riqueza de cupins e altitude para Jirau pode ser explicado pelo fato das P1 normalmente possuírem as menores altitudes e, como discutido acima, essas são as parcelas com menor diversidade. As parcelas com altitudes intermediárias são as mais diversas e, por fim, aquelas com maiores altitudes são as parcelas do módulo Me. Os transectos desse módulo foram feitos passando por uma serra e algumas das parcelas foram montadas próximas à igarapés com bastante rocha no solo (em cima da serra), e provavelmente levou a uma baixa diversidade de cupins. Isto é, esse padrão pode ser um simples artefato da relação da altitude com outras variáveis não medidas.

Entre as variáveis de solo medidas, concentração de argila teve uma relação quadrática, com uma riqueza de cupins, com um formato em U (riqueza mais baixa em

concentrações intermediárias de argila). Os cupins que vivem no solo utilizam a argila como fonte de matéria prima para suas construções (túneis e ninhos) (Holt & Lepage 2000). Essa seria uma possível explicação para o aumento de cupins com o aumento da concentração de argila no solo (maior tendência ao final do modelo ajustado na Figura 1.14). Entretanto, essa relação precisa ser melhor explicada para se entender o fato de que em concentrações intermediárias de argila ocorre menos espécies de cupins.

Da mesma forma, a relação cúbica encontrada entre a concentração de silte com a riqueza de cupins e relação quadrática (forma de U invertido) com o estrato vegetal entre 1 e 5 metros de altura precisam ser melhor estudadas. Ambas relações foram altamente significativas, mas é extremamente difícil achar explicações biológicas para tais ajustes dos modelos.

1.5 CONCLUSÕES

A composição de cupins não está relacionada com o lado do Rio Madeira em que se encontra. Desta forma, refutamos a hipótese que esse rio desempenha alguma função de barreira biogeográfica para esses insetos. Apesar disso, a região de estudo está entre as mais diversas para cupins do mundo.

O estimador de riqueza *Jackknife 2* é provavelmente o que melhor estima a riqueza para cupins na Amazônia, uma vez foi o que mais se aproximou ao número de espécies mínimo que se conhece da região.

O agrupamento dos módulos pela composição de espécies de cupins mostrou certa fidelidade da fauna desses insetos com o tipo de solo do ambiente. Dentro de cada módulo, o efeito de borda causado pela margem do rio, ou interações interespecíficas são as melhores explicações encontradas para o padrão de distribuição das espécies.

As relações encontradas entre a riqueza de cupins e as variáveis ambientais estudadas precisam ser melhor exploradas para que se possa entender melhor como estas variáveis estão influenciando a diversidade desses insetos. A partir daí, seria possível construir um modelo com múltiplas variáveis e mais robustos para entender o padrão de distribuição dos cupins na região e talvez extrapolar para outras regiões.

Capítulo 2

Estudo da estrutura genética de uma população de
Heterotermes tenuis (Hagen, 1858) (Rhinotermitidae)

2.1 INTRODUÇÃO

Começarei esse capítulo com uma pequena explicação para o melhor entendimento de como ele se desenvolveu. O objetivo principal aqui era realizar um estudo de estrutura genética de populações para testar a hipótese de que as populações de cupins de um lado do rio estão se inter cruzando mais entre si do que com as populações do outro lado. Para isso, seria utilizada como modelo a espécie mais abundante nos módulos de monitoramento de fauna das Usinas Hidrelétricas (UHEs) de Jirau e Santo Antônio. Como visto no Capítulo 1, *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Rhinotermitidae) foi a segunda espécie mais abundante (depois do complexo *Anoplotermes* sp. 10), ocorrendo em todos os 12 módulos amostrados, e por isso foi escolhida.

Entretanto, com o resultado das primeiras análises, percebeu-se uma estrutura genética bastante marcante nas populações de *H. tenuis*, mas sem qualquer estrutura espacial, nem mesmo em relação às margens do Rio Madeira. Desta forma, começamos a trabalhar com a hipótese que *H. tenuis* não é uma espécie, mas poderia ser dividida em duas espécies crípticas, e os objetivos desta parte da tese foram ampliados, como poderá ser notado abaixo no desenvolvimento do capítulo. As duas espécies crípticas serão chamadas aqui pelos códigos Ht. A e Ht. B, e quando for utilizado o nome *H. tenuis* será uma referência para o complexo Ht. A + Ht. B.

Feita a devida contextualização, segue a introdução.

A família Rhinotermitidae é a família de cupins mais amplamente distribuída no mundo, ocorrendo desde regiões tropicais até subtropicais e temperadas (Eggleton 2000). Esses cupins são especialmente conhecidos por seu potencial como praga,

podendo causar enormes prejuízos para os seres humanos (Constantino 2002; Vargo & Husseneder 2009).

Heterotermes Froggatt, 1900 e *Reticulitermes* Holmgren, 1913 são os dois únicos gêneros da subfamília Heterotermitinae, e apresentam uma distribuição mutuamente exclusiva: o primeiro pan-tropical e o segundo em regiões mais temperadas (Szalanski *et al.* 2004). Em todas as filogenias realizadas recentemente em que foram utilizados dados moleculares, o gênero *Coptotermes* Wasmann, 1896 torna a subfamília Heterotermitinae parafilética, com *Coptotermes* como grupo irmão de *Heterotermes*, e *Reticulitermes* na base do clado, como grupo irmão de *Coptotermes* + *Heterotermes* (Austin *et al.* 2004a; Lo *et al.* 2004; Inward *et al.* 2007; Legendre *et al.* 2008, 2013; Ware *et al.* 2010; Cameron *et al.* 2012). Apesar disso, as classificações tradicionais (Emerson 1971) e filogenias utilizando apenas morfologia não corroboram essa ideia, e a subfamília Coptotermitinae (formada apenas por *Coptotermes*) ainda é tratada como um grupo separado (Engel & Krishna 2004; Engel *et al.* 2009; Engel 2011).

O gênero *Heterotermes* compreende 51 espécies descritas no mundo, sendo que nove delas ocorrem na região Neotropical (Constantino 2000, 2013). *Heterotermes tenuis* é a espécie mais amplamente distribuída, ocorrendo desde o sul do México até o norte da Argentina, além das Bahamas e Antilhas (Constantino 1998). Constantino (2000) frisa que, antes do trabalho de Snyder (1924), apenas *H. tenuis* era conhecida da América do Sul e, na realidade, ainda hoje, apesar de outras espécies de *Heterotermes* serem conhecidas, *H. tenuis* provavelmente seja um complexo de espécies.

Espécies crípticas existem em diversos grupos em maior ou menor frequência (Mayr 2004). Entre os cupins, duas espécies crípticas do gênero *Reticulitermes* já foram descritas baseadas em dados moleculares (Szalanski *et al.* 2006; Austin *et al.* 2007). Além disso, estudos com diversidade genética em comunidades de cupins apontam para

um alto índice de espécies não caracterizáveis morfologicamente, mas que podem ser reconhecidas através de marcadores moleculares (Roy *et al.* 2006; Hausberger *et al.* 2011).

Como explicado no início deste capítulo, o objetivo principal foi testar a hipótese de que o Rio Madeira desempenha algum papel como barreira biogeográfica para os cupins, no caso, investigando cada uma das espécies crípticas do complexo *H. tenuis* (Ht. A e Ht. B). Assim, os objetivos específicos foram:

- a) Obtenção das sequências de bases do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase II* (COII) e caracterização genética dos indivíduos das duas espécies crípticas previamente identificadas como *Heterotermes tenuis*;
- b) Determinar a distância genética entre os vários haplótipos mitocondriais das espécies Ht. A e Ht.B, e também entre suas populações;
- c) Determinar as variantes genéticas existentes nas populações de cada uma das espécies crípticas, através da identificação e quantificação de sítios polimórficos, diversidade e diferenças nucleotídicas, assim como diversidade haplotípica;
- d) Estabelecer a estrutura populacional das duas espécies crípticas e verificar se eventos recorrentes, como fluxo gênico, por exemplo, contribuem para a estrutura destas populações, associando esta informação e a distância geográfica, principalmente em relação à verificação do Rio Madeira como barreira biogeográfica para essas espécies.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Amostras utilizadas

Foram utilizadas 84 amostras de *Heterotermes tenuis* coletadas em todos os 12 módulos de monitoramento das UHEs de Jirau e Santo Antônio. Para utilização como grupo externo, foram sequenciadas seis amostras de *H. tenuis* do bioma Cerrado, sendo três da Chapada do Guimarães (MT), duas do município de Três Lagoas (MS) e uma da Serra da Canastra (MG). Foram ainda utilizadas quatro sequências do GeneBank (Lo *et al.* 2004; Inward *et al.* 2007), sendo três de *H. tenuis*: número de acesso DQ442139 (Guiana Francesa), DQ442136.1 (Equador) e AY553139 (Manaus, AM, Brasil) e uma, como grupo externo, de *H. longiceps*: AY553138 (Manaus, AM, Brasil).

2.2.2 Extração, amplificação, purificação e sequenciamento

O DNA foi extraído de um único indivíduo da colônia (cabeça e tórax de soldados ou operários) utilizando o Kit de extração de DNA: *DNeasy Blood & Tissue Kit* – *QIAGEN*, seguindo as instruções do fabricante. O isolamento da região do DNA de interesse foi realizado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com o reagente *Master Mix* (*Prodimol*) com os oligonucleotídeos: **F - Leu** (5'TCT AAT ATG GCA GAT TAG TGC 3') e **R - Lys** (5'GAG ACC AGT ACT TGC TTT CAG TCA TC 3') para o gene COII (Whiting 2002). As condições da PCR para os genes estão descritos em Legendre *et al.* (2008). A purificação do fragmento de DNA isolado foi realizada através de *ExoSap* (*GE Technology Infrastructure*), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram sequenciados em sequenciador automático de

DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, CA) utilizando o kit de sequenciamento *Big Dye* (Perkin-Elmer), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções, *forward* e *reverse* para montagem da fita consenso.

Os processos de extração, amplificação e purificação do DNA foram feitos no Laboratório de Genética de Bactérias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Jaboticabal, SP, e o sequenciamento foi realizado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica na UNESP de Jaboticabal (CREBIO).

2.2.3 Análise dos dados

2.2.3.1 Alinhamento

As sequências *forward* e *reverse* do gene mitocondrial COII foram analisadas e as fitas consenso montadas e editadas utilizando os programas Chromas 2.01. (Copyright©, 1998-2005, Technelysium Pty Ltda) e BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Posteriormente as sequências foram alinhadas, através do programa MUSCLE 3.6 (Edgar 2004), e editadas por inspeção visual.

2.2.3.2 Delimitação molecular das espécies

Foram feitas análises filogenéticas utilizando os métodos da máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana com todos os indivíduos citados no item 2.2.1. A análise de máxima parcimônia foi realizada através de uma busca Heurística utilizando o método TBR (*Tree bisection and reconnection*) + TBR

pelo programa NONA (Goloboff 1999), interface WinClada (Nixon 2002): *hold* 1000; *mult*N* 100; *hold/* 10; e *Random seed* 10. Para suporte de ramos foi utilizado *Bootstrap* com 500 randomizações.

O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para as análises de verossimilhança e inferência bayesiana foi o HKY+I, selecionado através do programa JModelTest, utilizando-se o *Bayesian Information Criterion* (Darriba *et al.* 2012).

A análise de máxima verossimilhança foi realizada pelo programa GARLI 0.96 (Zwickl 2006), com os seguintes parâmetros do arquivo *.conf*: *ratematrix* = 2rate, *statefrequencies* = estimate, *ratehetmodel* = none, *numratecats* = 1, *invariantsites* = estimate. O suporte de ramos foi utilizado *Bootstrap* com 500 randomizações (*Bootstrapreps* = 500).

A reconstrução filogenética por inferência Bayesiana foi realizada através do programa BEAST 1.7.4 (Drummond *et al.* 2012), utilizando o modelo de coalescência (Kingman 1982) e com as características do modelo evolutivo de substituição HKY+I. Pelo mesmo programa, foi calculada a estimativa do tempo de divergência das linhagens através de um relógio molecular relaxado (*uncorrelated lognormal relaxed clock*) (Drummond *et al.* 2006), com taxa de substituição por ano de $1.87 \times 10^{-9} \pm 1.05 \times 10^{-11}$. A taxa de substituição por ano utilizada foi baseada na taxa de substituição encontrada para *Reticulitermes* na Europa (A. Luchetti com. pes.; Velonà *et al.* 2010). A MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) foi realizada com 30000000 corridas. A convergência e estabilização das corridas foi observada pelo programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2007), tendo a análise apresentado valor de tamanho efetivo da amostra (ESS) maior que 200. As 10000 primeiras gerações foram descartadas por *burn-in* pelo programa TreeAnnotator 1.7.4 e a melhor árvore foi visualizada e editada usando o programa FigTree 1.3.1.

Uma rede de haplótipos foi construída utilizando o critério da parcimônia, que une os haplótipos através de passos evolutivos, utilizando o programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000). As redes são construídas baseadas na união de árvores com o menor número de mudanças entre nós ou haplótipos. Para esta análise, foram dados pesos iguais para os caracteres (cada base) e os *gaps* foram tratados como quinto estado. A probabilidade de parcimônia foi calculada por diferenças par-a-par até a probabilidade exceder 96%.

Foi realizado ainda um teste de significância das estatísticas F , entre os dois grupos encontrados na rede de haplótipos e nas análises filogenéticas, pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Os valores de F_{st} variam de 0, quando não há diferenciação entre as populações, a 1, quando há fixação de diferentes alelos em cada população. Este índice indica a proporção de endocruzamento total em uma população devido à diferenciação das subpopulações (Frankham *et al.* 2008).

Por fim, uma análise de distribuição do número de diferenças dos pares de sequências dos alelos (distribuição das diferenças = *mismatch distribution*) foi realizada pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). As análises de distribuição das diferenças mede a distribuição das diferenças de pares de nucleotídeos entre os indivíduos. O gráfico dessa análise apresenta formas características para populações com diferentes histórias demográficas, podendo ser utilizados para identificar populações que apresentam tamanho estável, que estão em expansão, passado por gargalos, ou ainda que tenham tido um contato secundário, após longos períodos de isolamento (Frankham *et al.* 2008), como no caso de diferentes espécies.

Após a rede de haplótipos, as árvores filogenéticas, o valor de F_{st} e a distribuição de diferenças terem corroborado quanto à existência de dois grandes grupos (Ht. A e Ht. B), foi calculada a distância genética entre ambos sob o modelo K2P

(*Kimura 2-parameter*), pelo programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). O cálculo da distância genética visa testar a hipótese de que os dois grupos encontrados se tratam realmente de duas espécies crípticas. Esse método vem sendo bastante utilizado para delimitação de espécies com auxílio de ferramentas moleculares. Os proponentes da técnica de DNA Barcoding propõem que distâncias genéticas, sob esse modelo, maiores que 2% dificilmente seriam intraespecíficas (Hebert *et al.* 2003, 2004).

2.2.3.3 Estatísticas descritivas e parâmetros demográficos

Considerando então Ht. A e Ht. B como duas espécies (ou pelo menos duas linhagens) distintas, com suas histórias evolutivas separadas há bastante tempo (ver resultados), as estatísticas descritivas e as análises demográficas serão apresentadas para cada uma separadamente, assim como para as populações de Rondônia separadamente.

A porcentagem média da composição de bases por grupo foi obtida pelo programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). Os parâmetros de estatística descritiva, como o número total de mutações, o número de haplótipos (h), a diversidade haplotípica (H_d), a diversidade nucleotídica (π), e o parâmetro Theta por sítio (θ) foram obtidos a partir do programa DnaSP 5 (Librado & Rozas 2009).

Os testes de neutralidade de D de Tajima e as análises de distribuição das diferenças foram realizados pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). O teste de D de Tajima é baseado nas diferenças dos números de sítios segregantes e o número de diferenças de nucleotídeos. Os valores negativos e significativos desse teste indicam que a população está em expansão (Tajima 1989).

2.2.3.4 Diversidade genética no espaço e o Rio Madeira como barreira biogeográfica

Para testar a hipótese se o Rio Madeira desempenha um papel de barreira biogeográfica para *Heterotermes* foram realizados testes de significância das estatísticas F , testes de Mantel com matrizes de distância genética e geográfica, e uma Análise da Variância Molecular (AMOVA), pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). O teste de Mantel busca testar a hipótese de que a distância geográfica está correlacionada com a distância genética entre as populações (Smouse *et al.* 1986). E, por fim, a AMOVA busca investigar a estrutura genética das populações, baseado-se nas análises da variância das frequências dos genes no número de substituições entre os haplótipos (Excoffier *et al.* 1992).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Delimitação de duas espécies crípticas e tempo de divergência

O alinhamento de 94 sequências da região mitocondrial COII de *Heterotermes tenuis* e uma de *H. longiceps* resultou um total de 670 pares de base. Todas as análises filogenéticas com essas 94 sequências convergiram quanto ao monofiletismo de duas linhagens distintas dentro do que havia sido previamente identificado como *H. tenuis* (chamadas aqui de espécies Ht. A e Ht. B, Tabela 2.1). Essas duas espécies foram corroboradas com altos valores de suporte tanto pela análise de máxima parcimônia como pela de máxima verossimilhança, principalmente Ht. B (Figura 2.1). Da mesma

forma, na reconstrução filogenética pela inferência Bayesiana, a espécie Ht. A obteve 98% de probabilidade posterior, e Ht. B 100% (Figura 2.2).

Tabela 2.1 – Lista com o número de indivíduos analisados por população para cada grupo (*Heterotermes tenuis*, e as duas espécies crípticas Ht. A e Ht. B).

População	Ht. A	Ht. B	<i>H. tenuis</i>
Abunã margem direita (JIR)	7	3	10
Abunã margem esquerda (JIR)	6	3	9
Caiçara margem direita (JIR)	3	2	5
Caiçara margem esquerda (JIR)	8	2	10
Mutum margem direita (JIR)	10	0	10
Mutum margem esquerda (JIR)	9	2	11
Ilha dos Búfalos (STO)	3	2	5
Ilha das Pedras (STO)	0	1	1
Jirau margem esquerda (STO)	5	1	6
Jaci-Paraná margem direita (STO)	1	2	3
Morrinhos (STO)	2	4	6
Teotônio (STO)	3	6	9
Minas Gerais	1	0	1
Mato Grosso do Sul	2	0	2
Mato Grosso	3	0	3
Manaus, Amazonas	0	1	1
Equador	1	0	1
Guiana Francesa	0	1	1
Total	64	30	94

A espécie Ht. A compreende indivíduos de todos os módulos dos monitoramentos realizados em Rondônia, exceto IP (da UHE de Santo Antônio), além de todos os indivíduos do bioma Cerrado amostrados, e o indivíduo do Equador. O indivíduo do Equador obteve um posicionamento basal em relação aos demais Ht. A, como grupo irmão do clado formado pelos indivíduos do Cerrado e do Alto Madeira. A espécie Ht. B também compreende amostras de praticamente todos os módulos, exceto Md (da UHE de Jirau), além das amostras de Manaus, AM e da Guiana Francesa.

O relógio molecular relaxado estimou que Ht. A se separou de Ht. B há 20 ± 8 milhões de anos, e que *H. tenuis* (Ht. A + Ht. B) teria divergido de *H. longiceps* há $38 \pm$

18 milhões de anos. As populações do Cerrado e Alto Madeira teriam se separado há 9 ± 3 milhões de anos atrás (Figura 2.2).

A rede de haplótipos (Figura 2.3) se colapsou entre os grupos Ht. A e Ht. B por terem mais que 10 passos mutacionais entre ambas (Clement *et al.* 2000). Além disso, o grupo Ht. A também se rompeu em mais de um grupo, mostrando que o indivíduo do Equador e os do bioma Cerrado, apesar de se agruparem com as populações de Ht. A de Rondônia nas análises filogenéticas são indivíduos (ou populações) bem diferenciados.

Ao analisar a divergência entre os dois grandes grupos encontrados dentro do que estava se chamando previamente de *H. tenuis* (Ht. A e Ht. B), foram obtidos altos e significativos valores tanto de distância genética através do modelo K2P ($d = 0,058$; $p < 0,009$), quanto da estatística F ($F_{st} = 0,88$, $p < 0,0001$). Esses valores corroboram fortemente que Ht. A e Ht. B são duas espécies crípticas. O gráfico com o número de diferenças par-a-par também evidencia o grau de divergência intra e interespecíficos de Ht. A e Ht. B (Figura 2.4), assim como a distribuição das diferenças, que apresenta uma distribuição bimodal (Figura 2.5). Esse tipo de distribuição é característica de populações que se divergiram há bastante tempo e tiveram um contato secundário posterior (Avise 2000), o que corrobora a hipótese de que se tratam de duas populações já bem diferenciadas, ou duas espécies. Por fim, uma pequena região das sequências de alguns indivíduos das duas espécies é mostrada na Figura 2.6 para ilustrar algumas mutações características das duas espécies.

Figura 2.1 – Árvore obtida pela análise de máxima verossimilhança (lnL= - 1696,57) utilizando-se o gene mitocondrial COII, para 84 indivíduos de *Heterotermes tenuis* do Alto Madeira, um indivíduo de Manaus, um da Guiana Francesa, um do Equador, seis do bioma Cerrado (MS, MT e MG – referente aos estados onde foram amostradas), e um indivíduo de *H. longiceps* (grupo externo). Os números nos ramos são o suporte de *bootstrap* para máxima verossimilhança e parcimônia, respectivamente. O símbolo # indica que aquele ramo não foi recuperado para a análise de parcimônia. Siglas dos módulos do Alto Madeira: Ad – Abunã margem direita; Ae – Abunã margem esquerda; Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; IB – Ilha dos Búfalos; IP – Ilha de Pedras; JP – Jaci-Paraná; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; MO – Morrinho; e TE – Teotônio.

Figura 2.2 – Árvore obtida por inferência Bayesiana utilizando-se o gene mitocondrial COIL, para 84 indivíduos de *Heterotermes tenuis* do Alto Madeira, um indivíduo de Manaus, um da Guiana Francesa, um do Equador e seis do bioma Cerrado (MS, MT e MG – referente aos estados onde foram amostrados), e um indivíduo de *H. longiceps* (grupo externo). Os números nos ramos são o suporte de probabilidade posterior. Os comprimentos dos ramos são proporcionais ao tempo. As barras horizontais indicam os intervalos de confiança de 95% para as idades dos nós. A escala mede o tempo em milhões de anos. Siglas dos módulos do Alto Madeira: Ad – Abunã margem direita; Ae – Abunã margem esquerda; Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; IB – Ilha dos Búfalos; IP – Ilha de Pedras; JP – Jaci-Paraná; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; MO – Morrinho; e TE – Teotônio.

Figura 2.3 – Rede de haplótipos construída utilizando o gene mitocondrial COII, para 84 indivíduos de *Heterotermes tenuis* do Alto Madeira, um indivíduo de Manaus (AM), um da Guiana Francesa (GF) e um do Equador (EQ) e seis do bioma Cerrado (MS, MT e MG – referente aos estados onde foram amostradas). Os haplótipos “A” são da espécie Ht. A e os “B” da espécie Ht. B. O tamanho da forma é proporcional à frequência do haplótipo, e o tamanho das subdivisões, proporcional à frequência do haplótipo em cada módulo; os números entre parêntese é a frequência de indivíduos, quando ausente, é igual a 1. Cada passo é uma mutação, as bolinhas brancas (nós) representam passos intermediários não amostrados, e quando não há ligação entre as formas, é porque elas são separadas entre si por mais de 10 passos. Siglas dos módulos do Alto Madeira: Ad – Abunã margem direita; Ae – Abunã margem esquerda; Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; IB – Ilha dos Búfalos; IP – Ilha de Pedras; JP – Jaci-Paraná; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; MO – Morrinho; e TE – Teotônio.

Figura 2.4 – Número de diferenças par-a-par entre as sequências do gene mitocondrial COII de 84 indivíduos de *Heterotermes tenuis* do Alto Madeira, um indivíduo de Manaus, um da Guiana Francesa, um do Equador, e seis do bioma Cerrado. Indivíduos marcados com barra cinza em frente ao código são aqueles da espécie críptica Ht. B, os demais, da espécie Ht. A.

Figura 2.5 – Distribuição das diferenças de pares de nucleotídeos entre os indivíduos (*mismatch distribution*) observada e esperada em caso de população estável para os pares de sequências do gene mitocondrial COII de 84 indivíduos de *Heterotermes tenuis* do Alto Madeira, um indivíduo de Manaus, um da Guiana Francesa, um do Equador, e seis do bioma Cerrado (Índice de *Raggednes* = 0,06; $p = 0,48$).

Figura 2.6 – Região das sequências de alguns indivíduos de Ht. A e Ht. B para ilustrar algumas mutações características das duas espécies.

2.3.2 Estatísticas descritivas e parâmetros demográficos

As porcentagens da composição nucleotídica dos 670 pares de base para cada uma das espécies crípticas, e também para as populações de RO de ambas separadamente, são apresentadas na Tabela 2.2. Como era esperado para um gene mitocondrial de insetos, as proporções de A e C foram maiores que de G e T (Lin & Danforth 2004). As proporções de uma forma geral de Ht. A e Ht. B foram bem parecidas, com Ht. B tendo um pouco mais de Adenina, e menos Citosina. Praticamente não houve diferença entre a composição nucleotídica geral de cada espécie críptica, e aquelas quando analisadas apenas das populações de RO de ambas (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Composição nucleotídica de 670 pares de base da região COII para cada espécie críptica Ht. A e Ht. B, e separadamente para as populações de Rondônia de cada uma das espécies.

Grupo	A (%)	C (%)	G (%)	T (%)
Ht. A	38,9	25,0	14,4	21,7
Ht. B	39,3	24,6	14,1	21,9
Ht. A - RO	38,9	25,0	14,4	21,7
Ht. B - RO	39,3	24,6	14,1	22,0

A espécie Ht. A apresentou um maior número de mutações (m = sítios polimórficos) do que Ht. B, tanto no global quanto apenas para as populações de Rondônia (Tabela 2.3). Foram encontrados 14 haplótipos em Ht. A e 9 em Ht. B, entretanto, a diversidade haplotípica de Ht. B foi maior que de Ht. A. A diversidade nucleotídica de Ht. A foi maior que a de Ht. B quando considerados todos os indivíduos amostrados, mas olhando-se apenas as populações de Rondônia, Ht. B teve uma diversidade nucleotídica maior. Os altos valores de Theta (θ) para Ht. A sugerem populações com tamanho efetivo grande e alta taxa de substituição. Um padrão

contrário foi encontrado para Ht. B e também para as populações de Rondônia separadamente das duas espécies crípticas Ht. A e Ht. B.

As análises de distribuição das diferenças para Ht. A e Ht. B apresentaram resultados concordantes ($Raggednes = 0,07$; $p = 1$), não havendo efeito significativo de expansão populacional, ou seja, indicando as populações estão estáveis (Figura 2.7 e 2.8, respectivamente). Entretanto, o teste de Tajima foi completamente discordante com os resultados da distribuição das diferenças, sendo significativo para ambas as espécies, ou seja, indicando que elas estão em expansão (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Número de indivíduos analisados (n), número de mutações ou sítios polimórficos (m), número de haplótipos (k), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (Pi), parâmetro Theta por sítio (θ) e D de Tajima (D) com seu valor de p ($p(D)$), para 670 pares de base da região COII para cada espécie críptica Ht. A e Ht. B, e para as populações de Rondônia de ambas as espécies crípticas.

Grupo	n	m	k	Hd	Pi	θ	D	$p(D)$
Ht. A	64	62	14	0,597	0,009	0,020	-1,78	0.02
Ht. B	30	15	9	0,634	0,003	0,006	-1,56	0.04
Ht. A - RO	57	11	8	0,492	0,001	0,004	-1,80	0.01
Ht. B - RO	28	8	7	0,579	0,002	0,003	-1,08	0.13

Figura 2.7 – Distribuição das diferenças (*mismatch distribution*) observada e esperada em caso de população estável para os pares de sequências do gene mitocondrial COII de 57 indivíduos da espécie críptica Ht. A do Alto Madeira, um do Equador, e seis do bioma Cerrado (Índice de *Raggednes* = 0,07; $p = 1$).

Figura 2.8 – Distribuição das diferenças (*mismatch distribution*) observada e esperada em caso de população estável para os pares de sequências do gene mitocondrial COII de 28 indivíduos da espécie críptica Ht. B do Alto Madeira, um de Manaus, AM e um da Guiana Francesa (Índice de *Raggednes* = 0,07; $p = 1$).

As análises de distribuição das diferenças para apenas as populações de RO de Ht. A e Ht. B apresentaram resultados concordantes (Ht. A - RO: *Raggednes* = 0,10; $p = 0,69$; Ht. B - RO: *Raggednes* = 0,09; $p = 1$), não havendo efeito significativo de expansão populacional (Figura 2.9 e 2.10, respectivamente). O teste de neutralidade de Tajima corroborou o resultado da distribuição de diferenças para as populações de RO da espécie Ht. B (D de Tajima = -1,08; $p = 0,13$), indicando que esta população encontra-se em equilíbrio demográfico. Entretanto, para a população de RO da espécie Ht. A, o teste de Tajima apresentou valores significativos (D de Tajima = -1,80; $p = 0,01$), o que sugere que a população está em expansão (Tabela 2.2).

Figura 2.9 – Distribuição das diferenças (*mismatch distribution*) observada e esperada em caso de população estável para os pares de sequências do gene mitocondrial COII dos 57 indivíduos da espécie críptica Ht. A do Alto Madeira (Índice de *Raggednes* = 0,10; $p = 0,69$).

Figura 2.10 – Distribuição das diferenças (*mismatch distribution*) observada e esperada em caso de população estável para os pares de sequências do gene mitocondrial COII dos 28 indivíduos da espécie críptica Ht. B do Alto Madeira (Índice de *Raggednes* = 0,09; $p = 1$).

2.3.3 Diversidade genética no espaço e o Rio Madeira como barreira biogeográfica

O haplótipo mais comum em Ht. A (A1, Figura 2.3) foi encontrado em 40 indivíduos distribuídos em nove módulos, sendo três deles na margem direita do Rio Madeira e seis na margem esquerda. Da mesma forma, o haplótipo mais comum em Ht. B (B1, Figura 2.3) foi encontrado em 18 indivíduos procedentes de nove módulos, sendo quatro na margem direita e cinco na margem esquerda. Nenhum padrão pôde ser observado acerca da distribuição dos haplótipos e especificidade por algum módulo ou lado do rio.

O teste de Mantel para Ht. A foi significativo para todas as populações e indivíduos, incluindo as amostras do Cerrado e do Equador ($r^2 = 0,508$; $p < 0,0001$). Portanto a distância geográfica explica 51% da variação distância genética entre as

populações. Quando analisadas as amostras apenas das populações de Rondônia referentes à Ht. A, o teste de Mantel não foi significativo, com a distância geográfica explicando apenas 7% da variação genética ($r^2 = 0,073$; $p < 0,996$). O teste de diferenciação genética para inferir se o Rio Madeira comporta como barreira para o fluxo gênico para Ht. A, utilizando todos os indivíduos da margem esquerda como uma população, e aqueles da margem direita como outra população, não foi significativo ($F_{st} = -0,01$; $p < 0,396$).

Os resultados da AMOVA também foram significativos para Ht. A ($F_{st} = 0,73$; $p < 0,000$, geral; $F_{st} = 0,26$; $p < 0,000$, apenas para RO). Os valores de F_{st} par-a-par entre as populações foram bem altos quando comparadas as populações fora de Rondônia com elas mesmas, mas não significativos para as populações representadas apenas por um indivíduo (e.g. MG e EQ). Os valores de F_{st} foram significativos entre a população do Mato Grosso (MT) e do Mato Grosso do Sul (MS) e vários módulos de Rondônia. Entre as populações de Rondônia de Ht. A, aquelas dos módulos Ce e Cd apresentaram um maior isolamento genético, sendo suas diferenças significativas para Ad, Ae, Md e Me, além de JI para Cd (Figura 2.11).

Figura 2.11 – Valores de F_{st} para as populações de Ht. A. Aqueles marcados com círculo são valores significativos ($p < 0,05$). Siglas: Ad – Abunã margem direita; Ae – Abunã margem esquerda; Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; IB – Ilha dos Búfalos; IP – Ilha de Pedras; JP – Jaci-Paraná; MO – Morrinho; TE – Teotônio; MS – Mato Grosso do Sul; MT – Mato Grosso; MG – Minas Gerais; e EQ – Equador.

O teste de Mantel para Ht. B foi significativo para todas as populações e indivíduos, incluindo aquelas amostras de Manaus, AM e Guiana Francesa ($r^2 = 0,380$; $p < 0,001$). Portanto, a distância geográfica explica 38% da variação distância genética entre as populações. Quando analisadas as amostras apenas das populações de Rondônia, o teste de Mantel não foi significativo, com a distância geográfica explicando apenas 3% da variação genética ($r^2 = 0,027$; $p < 0,129$). O teste de diferenciação

genética para inferir se o Rio Madeira comporta como barreira para o fluxo gênico para Ht. B, não foi significativo ($F_{st} = 0,007$; $p < 0,360$).

Os resultados da AMOVA foram significativos para Ht. B quando as amostras de Manaus, AM e Guiana Francesa foram incluídas ($F_{st} = 0,46$; $p < 0,0001$), entretanto, quando analisadas apenas para Rondônia, não houve diferenciação entre as populações dos módulos ($F_{st} = 0,16$; $p < 0,143$, para RO). Apesar de alguns altos valores de F_{st} par-a-par, nenhum deles foi significativo entre as populações de Ht. B (Figura 2.12).

Figura 2.12 – Valores de F_{st} para as populações de Ht. B. Não houveram valores significativos ($p < 0,05$). Siglas: Ad – Abunã margem direita; Ae – Abunã margem esquerda; Cd – Caiçara margem direita; Ce – Caiçara margem esquerda; Md – Mutum margem direita; Me – Mutum margem esquerda; IB – Ilha dos Búfalos; IP – Ilha de Pedras; JP – Jaci-Paraná; MO – Morrinho; TE – Teotônio; GF – Guiana Francesa; e AM – Manaus.

2.4 DISCUSSÃO

Ao buscar uma espécie para testar se o Rio Madeira desempenhava um papel como barreira biogeográfica para cupins, foi escolhida aquela que apresentou a maior abundância nos módulos de monitoramento das UHEs de Jirau e Santo Antônio: *Heterotermes tenuis*. Essa espécie foi achada em todos os módulos amostrados, e foi identificada com base na chave de identificação para soldados de *Heterotermes* da América do Sul (Constantino 2000).

Essa espécie apresenta soldados dimórficos e pilosidade característica no pronoto, sendo relativamente de fácil diagnose morfológica segundo a chave acima citada. Entretanto, nesse mesmo trabalho, Constantino (2000) afirma que possivelmente *H. tenuis* seja um complexo de espécies, com relativa variação morfológica ao longo de toda sua extensa distribuição espacial (desde o México até a Argentina).

Ao realizar as primeiras análises moleculares com o gene COII para as amostras de Rondônia, notou-se uma clara formação de dois grupos bastante estruturados. Entretanto, esses dois grupos não tinham qualquer relação com a margem do Rio Madeira em que os indivíduos estavam. Ou seja, a estruturação não era devido a uma barreira ao fluxo gênico entre populações do lado esquerdo e direito do rio, uma vez que nos dois grupos havia indivíduos amostrados dos dois lados do rio e em praticamente todos os módulos (Figuras 2.1-4).

Após estes resultados, foram realizadas comparações minuciosas na morfologia tanto da casta do soldado, quanto do operário, e não foi possível achar caracteres diagnósticos entre os grupos, ou espécies, Ht. A e Ht. B. A partir desse ponto, começamos a trabalhar com a hipótese que estávamos lidando, na realidade, com duas espécies crípticas, e buscamos testar essa hipótese.

Entretanto, vale resaltar que da casta reprodutora não foi estudada, uma vez que raramente é coletada com o protocolo de amostragem utilizado nesse trabalho (Capítulo 1) e está ausente em praticamente todas as amostras coletadas em RO. Não pode ser descartada, então, a possibilidade que haja algum tipo de distinção entre as espécies nessa casta.

2.4.1 Reconhecimento de duas espécies crípticas

Todas as análises filogenéticas com as 94 sequências da região mitocondrial COII de *Heterotermes tenuis* convergiram, com altos valores de suporte, quanto à monofilia de duas linhagens distintas dentro do que havia sido previamente identificado como *H. tenuis* (Ht. A e Ht. B, Figuras 2.1 e 2.2). Além disso, o fato das populações de Rondônia (simpátricas) de cada uma das duas linhagens terem se mostrado mais relacionadas com indivíduos geograficamente distantes (Ht. A agrupou indivíduos de Rondônia, do bioma Cerrado, e do Equador e Ht. B agrupou indivíduos de Rondônia, Manaus, AM e Guiana Francesa), fortalece a hipótese que se tratam de duas linhagens com histórias evolutivas independentes. Isto é, mesmo sobrepondo suas distribuições geográficas (em Rondônia, onde ambas são bem abundantes), Ht. A e Ht. B aparentemente não apresentam eventos de intercruzamento, preservando a estrutura genética adquirida por um isolamento anterior, seguido de especiação. Da mesma forma, a rede de haplótipos construída (Figura 2.3) isolou Ht. A e Ht. B, uma vez que a divergência genética entre esses dois grupos é superior a 10 passos mutacionais.

Esse tipo de abordagem, com a utilização de marcadores moleculares para delimitação de espécies, vem sendo bastante utilizada nas últimas décadas para diversos grupos (Hebert *et al.* 2003, 2004; Pons *et al.* 2006; Leaché & Fujita 2010), inclusive para cupins (Austin *et al.* 2005, 2007; Scheffrahn *et al.* 2005a, 2005b; Roy *et al.* 2006;

Hausberger *et al.* 2011). A técnica de DNA Barcoding, por exemplo, foi proposta com o intuito de realizar a delimitação de espécies utilizando-se apenas um marcador molecular. Desta forma, os proponentes dessa técnica argumentam que seria muito mais rápido realizar inventários biológicos e até mesmo descoberta de novas espécies (Hebert *et al.* 2003, 2004).

Segundo o que vem sendo utilizado pelas técnicas de DNA Barcoding e similares, os valores de *Fst* e distância genética altamente significativos encontrados entre Ht. A e Ht. B são evidências bastante consistentes a cerca da existência de duas espécies. Os adeptos dessas técnicas afirmam, por exemplo, que distâncias genéticas sob o modelo K2P maiores que 2% indicam divergências interespecíficas (Hebert *et al.* 2003, 2004), e aquela encontrada em Ht. A e Ht. B, foi de 5,8%. Da mesma forma, o gráfico com o número de diferenças par-a-par também mostra claramente o grau de divergência intra e inter específico de Ht. A e Ht. B (Figura 2.4), assim como a própria caracterização das sequências das duas espécies, onde mutações características de cada espécie podem ser claramente reconhecidas (Figura 2.5). Desta forma, poucas dúvidas existem acerca das evidências que o gene mitocondrial COII nos confere sobre a existência de duas espécies dentro do que havia sido previamente identificado como *H. tenuis*.

Entretanto, a utilização de apenas um gene para realizar inferências sobre os limites interespecíficos é uma das críticas mais fortes à utilização de um procedimento similar ao DNA Barcoding. Eventos como hibridização, ocorrência cópias parálogas de genes, ou o separação incompleta de linhagens (*incomplete lineage sorting*) podem afetar as análises, levando a inferências erradas acerca do limite de algumas espécies (Funk & Omland 2003; Elias *et al.* 2007; Mitchell 2008; Nicholls *et al.* 2012). Uma solução para esses problemas seria utilizar o maior número possível de evidências

possíveis, como por exemplo, regiões do DNA independentes, além de caracteres morfológicos, etológicos, fisiológicos, dentre outros (Dayrat 2005; Yeates *et al.* 2011).

Apesar dessas críticas sobre a técnica de DNA Barcoding e a utilização de marcadores moleculares para delimitar espécies (Moritz & Cicero 2004; Song *et al.* 2008; Lohse 2009), essas técnicas podem servir como ferramentas úteis para a taxonomia, como forma de auxílio aos estudos de morfologia e, especialmente, em casos como o reconhecimento de espécies crípticas (Dayrat 2005; Yeates *et al.* 2011).

Alguns estudos vêm indicando que existe uma grande quantidade de espécies que não são diagnosticáveis morfolologicamente em diversos grupos de cupins (Roy *et al.* 2006; Szalanski *et al.* 2006; Austin *et al.* 2007; Hausberger *et al.* 2011). Com base em divergências do gene mitocondrial rRNA 16S, por exemplo, Szalanski *et al.* (2006) reportaram uma espécie críptica nos Estados Unidos, *Reticulitermes okanaganensis*. Austin *et al.* (2007), utilizando o mesmo marcador molecular, somado a evidências de hidrocarboneto de cutícula e dados comportamentais, descreveram a espécie *Reticulitermes malletei*, também dos Estados Unidos.

Roy *et al.* (2006) encontraram quatro linhagens em *Cubitermes* sp. *affinis subarquatus*, sendo três delas simpátricas. Esses autores utilizaram tanto marcadores nucleares (ITS2) quanto mitocondriais (COII), e estes marcadores independentes foram concordantes em relação à existência das quatro linhagens. Hausberger *et al.* (2011), em um trabalho de diversidade genética em uma comunidades de cupins na África, destacam a importância de utilizar ferramentas moleculares para auxiliar a identificação de cupins. Estes autores também utilizaram tanto marcadores nucleares (28S) quanto mitocondriais (COI e COII), que concordaram quanto à existência de diversas espécies crípticas, especialmente dos gêneros *Microtermes* e *Odontotermes* (Macrotermitinae).

A concordância entre os genes mitocondriais e nucleares nos trabalhos de Roy *et al.* (2006) e Hausberger *et al.* (2011) não implica necessariamente que em *Heterotermes* ocorra o mesmo. Kutnik *et al.* (2004), por exemplo, em um trabalho de filogeografia de duas espécies de *Reticulitermes* na Europa, conseguiram diferenciar as duas espécies em questão através de hidrocarbonetos de cutícula e do gene nuclear ITS2, mas encontraram discordância desse resultado com as análises dos genes mitocondriais 16S rRNA e COII. Esses autores sugerem que essa divergência entre genes mitocondriais e nucleares teria sido devido a uma especiação parapátrica decorrente de eventos históricos de migração, e expansão / contração populacionais, durante as glaciações do Quaternário, quando refúgios foram formados no sul da Europa (Kutnik *et al.* 2004).

As evidências sobre o grau de diferenciação entre Ht. A e Ht. B também são encontradas através da utilização do relógio molecular relaxado, que aponta para uma divergência bastante antiga entre as duas espécies crípticas, tendo sido aproximadamente há 20 ± 8 milhões de anos, provavelmente no Mioceno (Figura 2.2). Esse tempo de divergência está de acordo com o tempo de divergência encontrado entre algumas espécies de *Reticulitermes* na Europa (Velonà *et al.* 2010). Na Amazônia, rãs venenosas (Dendrobatidae) aparentemente apresentam divergências de linhagens datadas para o Mioceno (Santos *et al.* 2009). Após as incursões marinhas do Mioceno, por volta de 10 milhões de anos (Hoorn 1993; Silva & Garda 2010), as linhagens teriam dispersado da região dos Andes.

Vale resaltar que a biologia do gênero *Heterotermes* ainda é muito pouco conhecida se comparada com outros gêneros da mesma família. No gênero *Reticulitermes*, por exemplo, a biologia é extremamente flexível, com algumas espécies inclusive com sistemas de reprodução por partenogênese (Matsuura *et al.* 2009). Apesar de os dados de COII mostrarem que essas duas espécies não estão se inter cruzando,

muito ainda é preciso se estudar para entender quais os mecanismos que os indivíduos de cada espécie utilizam para se reconhecer (e se evitarem) durante os eventos de intercruzamento.

2.4.2 Parâmetros demográficos

O gene mitocondrial COII apresentou diversidade haplotípica mais alta para Ht. B tanto para toda a distribuição, como apenas considerando-se a as populações de Rondônia (Hd, Tabela 2.3). Não houve relação direta entre maior número de haplótipos e valor de diversidade haplotípica comparando Ht. A e Ht. B (k, Tabela 2.3). Esse padrão deve ter ocorrido devido à diferença no número de indivíduos amostrados em cada espécie (64 em Ht. A e 30 em Ht. B).

A diversidade haplotípica encontrada para as espécies crípticas Ht. A e Ht. B, e também para as populações de RO dessas espécies, foi bem abaixo daquelas encontradas para o gene mitocondrial 16S rRNA para *Reticulitermes flaviceps* em populações as populações do Texas, Oklahoma, Arkansas, e Louisiana, nos Estados Unidos (Austin *et al.* 2004b). Entretanto, a diversidade nucleotídica encontrada por Austin *et al.* (2004b) para populações de *R. flaviceps* foi similar àquelas encontradas para Ht. A e Ht. B, porém maior que para as populações apenas de RO dessas espécies (Pi, Tabela 2.3).

As diversidades nucleotídicas dos grupos foram acompanhadas pelos valores de Theta (θ , Tabela 2.3). Os altos valores de Theta para Ht. A sugerem populações com tamanho efetivo grande e alta taxa de substituição. Um padrão contrário foi encontrado para Ht. B e para as populações de RO tanto de Ht. A e Ht. B. Baixos valores do parâmetro de Theta sugerem populações com tamanho efetivo pequeno e/ou com baixa taxa de substituição (Watterson 1975).

Apesar de as análises da distribuição das diferenças não serem significativas para nenhuma espécie ou população (Ht. A, Ht. B e populações de RO de Ht. A e Ht. B – Figuras 2.7 a 2.10), o teste de neutralidade D de Tajima foi significativo para Ht. A, Ht. B e Ht. A - RO, indicando que estes grupos podem estar em expansão. O teste de neutralidade de Tajima compara dois estimadores de parâmetro Theta populacional, sendo um deles com base no número de sítios segregantes da amostra, e outro baseado no número médio de diferenças entre pares, entre os haplótipos. Sob o modelo de sítios infinitos os dois estimadores devem gerar o mesmo valor, porém diferenças podem surgir quando as populações estão sob seleção, ou existe heterogeneidade das taxas de mutação entre os locais. Da mesma forma, a seleção direcional positiva (*selective sweep*) também pode deixar um sinal na genealogia similar ao de expansão demográfica, gerando resultados significativos que não indiquem propriamente expansão (Tajima 1989). O valor de D para Ht. A, Ht. B e Ht. A - RO, apesar de negativo e significativo (Tabela 2.3), é pequeno e possivelmente indica um tamanho populacional constante para esses grupos, como indicado pela análise de distribuição das diferenças (Figuras 2.7 a 2.9).

2.4.3 Rio Madeira como barreira biogeográfica

Como já discutido acima, ao se analisar todos os indivíduos de *H. tenuis*, logo ao se observar as filogenias e a rede de haplótipos, nota-se que existem indivíduos de praticamente todos os módulos nos dois grandes grupos formados (Ht. A e Ht. B). E seguindo essa linha de raciocínio, aqui será discutido o papel do Rio Madeira como barreira biogeográfica para as espécies Ht. A e Ht. B.

Para nenhuma das espécies crípticas foram encontrados haplótipos exclusivos para qualquer módulo ou grupo de módulos, assim como para as margens do rio (Figura

2.3). Portanto os agrupamentos de Rondônia não suportam a hipótese inicial de que o Rio Madeira forma uma quebra biogeográfica para distribuição de Ht. A e Ht. B.

Os valores de *Fst* entre as populações de Ht. A mostrou os módulos Ce e Cd com diferenças significativas em relação aos demais de Jirau (Md, Me, Ad e Ae) e também Cd em relação a JI (Figura 2.12). Entretanto, os módulos Ce e Cd estão bem ao centro de todos os módulos amostrados (Figura ii), e estão bem próximos tanto de JI, quanto de Md e Me, o que sugere que essas populações não estão diferenciadas apenas pela questão da distância geográfica. Isso, inclusive, foi comprovado pelo teste de Mantel não significativo para as populações de RO de Ht. A. Não foi possível encontrar uma explicação para essa diferenciação das populações dos módulos Ce e Cd, talvez apenas o fato de terem sido amostrados mais indivíduos das populações com os haplótipos A3, principalmente, e A2 (Figura 2.3).

Para a espécie Ht. B, não houve diferenças genéticas significativas entre qualquer par de populações (Figura 2.13). Da mesma forma o teste de mantel Mantel não foi significativo, mostrando não haver diferenciação genética entre populações com menos de 200 km por distância uma da outra. Quando incluídas as populações mais distantes (do Cerrado e Equador para Ht. A, e de Manaus e Guiana Francesa para Ht. B), o teste de Mantel foi significativo para ambas espécies. O que indica diferenciação genética por distâncias maiores que 200 km.

Os dados dessa tese refutam a hipótese que o Rio Madeira desempenha qualquer tipo de barreira ao fluxo gênico de *Heterotermes*. O Rio Madeira, na região deste estudo, em Rondônia, tem sua largura mínima entre 600 e 700 metros. Apesar dos cupins alados, durante a fase de dispersão (revoada), de uma forma geral não serem considerados bons voadores (Mill 1983), existem registros de *Coptotermes* (Rhinotermitidae), por exemplo, que voam distâncias de até 1 km (Messenger &

Mullins 2005). Isso poderia explicar porque o rio não é barreira para cupins. Entretanto, é interessante notar que diversos grupos que são considerados “bons voadores” (ou pelo menos melhores que os cupins) possuem seus limites de distribuição no Rio Madeira. Por exemplo, moscas, borboletas ou abelhas, e até mesmo aves (Amorim & Pires 1996; Hall & Harvey 2002; Camargo & Pedro 2003; Aleixo 2004).

As espécies Ht. A e Ht. B provavelmente são espécies irmãs. A divergência entre elas se deu provavelmente no Mioceno, como já discutido acima, durante as flutuações oceânicas. Essas incursões do mar teriam inundado as planícies baixas amazônicas, isolando pelo menos três grandes regiões mais altas: o escudo da Guiana, o escudo do Brasil, e a base dos Andes (Webb 1995). Essas áreas teriam isolado populações ancestrais, que finalmente se diferenciaram e, após a retração oceânica, teriam entrado em contato novamente, tornando-se simpátricas (Aleixo 2004). Essa é provavelmente a hipótese mais plausível para explicar como teria sido a história evolutiva das espécies Ht. A e Ht. B.

V. BIBLIOGRAFIA

- Ackerman, I. L., Constantino, R., Gauch, Jr, H. G., Lehmann, J., Riha, S. J. & Fernandes, E. C. M. 2009. Termite (Insecta: Isoptera) species composition in a primary rain forest and agroforests in Central Amazonia. *Biotropica*, 41, 226–233.
- Aleixo, A. 2004. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, 58, 1303–17.
- Amorim, D. S. 2001. Dos Amazonas. In: *Introducción a la Biogeografía en Latinoamérica: Teorías, Conceptos, Métodos y Aplicaciones.*, (Ed. by J. Llorente-Bousquets & J. J. Morrone), pp. 245–255. México D.F.: Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Amorim, D. S. & Pires, M. R. S. 1996. Neotropical biogeography and a method for maximum biodiversity estimation. In: *Biodiversity in Brazil, a first approach*, (Ed. by C. E. M. Bicudo & N. A. Menezes), pp. 183–219. São Paulo, SP: CNPq.
- Anderson, M. J., Crist, T. O., Chase, J. M., Vellend, M., Inouye, B. D., Freestone, A. L., Sanders, N. J., Cornell, H. V., Comita, L. S., Davies, K. F., Harrison, S. P., Kraft, N. J. B., Stegen, J. C. & Swenson, N. G. 2011. Navigating the multiple meanings of β diversity: a roadmap for the practicing ecologist. *Ecology letters*, 14, 19–28.
- Austin, J. W., Szalanski, A. L. & Cabrera, B. J. 2004a. Phylogenetic analysis of the subterranean termite family Rhinotermitidae (Isoptera) by using the mitochondrial Cytochrome Oxidase II gene. *Annals of the Entomological Society of America*, 97, 548–555.
- Austin, J. W., Szalanski, A. L. & Messenger, M. T. 2004b. Mitochondrial DNA variation and distribution of the subterranean termite genus *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Arkansas and Louisiana. *Florida Entomologist*, 87, 473–480.
- Austin, J. W., Szalanski, A. L., Scheffrahn, R. H., Messenger, M. T., Dronnet, S. & Bagnères, A.-G. 2005. Genetic evidence for the synonymy of two *Reticulitermes* species: *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes santonensis*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 98, 395–401.
- Austin, J. W., Szalanski, A. L., Scheffrahn, R. H., Heintschel, B. P., Messenger, M. T. & Gold, R. E. 2007. *Reticulitermes malletei* (Isoptera: Rhinotermitidae): a valid Nearctic subterranean termite from Eastern North America. *Zootaxa*, 1554, 1–26.

- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, 464 p.
- Bandeira, A. G. 1979. Notas sobre a fauna de cupins (Insecta: Isoptera) do Parque Nacional da Amazônia (Tapajós), Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Serie Zoologia*, 96, 1–12.
- Bandeira, A. G. 1989. Análise da termitofauna (Insecta: Isoptera) de uma floresta primária e de uma pastagem na Amazônia Oriental, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Serie Zoologia*, 5, 225–241.
- Bandeira, A. G. & Macambira, M. L. J. 1988. Térmitas de Carajás, estado do Pará, Brasil: composição faunística, distribuição e hábito alimentar. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Serie Zoologia*, 4, 175–190.
- Bandeira, A. G. & Torres, M. F. P. 1985. Abundância e distribuição de invertebrados do solo em ecossistemas da Amazônia Oriental. O papel ecológico dos cupins. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Serie Zoologia*, 2, 13–38.
- Banks-Leite, C., Ewers, R. M. & Metzger, J.-P. 2010. Edge effects as the principal cause of area effects on birds in fragmented secondary forest. *Oikos*, 119, 918–926.
- Bignell, D. E. 2006. Termites as soil engineers and soil processors. In: *Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates*, (Ed. by H. König & A. Varma), pp. 183–220. Berlin Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg.
- Bignell, D. E. & Eggleton, P. 2000. Termites in ecosystems. In: *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*, (Ed. by T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi), pp. 363–387. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Black, H. & Okwakol, M. J. N. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of termites. *Applied Soil Ecology*, 6, 37–53.
- Bourguignon, T., Sobotník, J., Lepoint, G., Martin, J. M. & Roisin, Y. 2009. Niche differentiation among neotropical soldierless soil-feeding termites revealed by stable isotope ratios. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2038–2043.
- Bourguignon, T., Scheffrahn, R. H., Krecek, J., Nagy, Z. T., Sonet, G. & Roisin, Y. 2010. Towards a revision of the Neotropical soldierless termites (Isoptera: Termitidae): redescription of the genus *Anoplotermes* and description of *Longustitermes*, gen. nov. *Invertebrate Systematics*, 24, 357–370.
- Bourguignon, T., Leponce, M. & Roisin, Y. 2011. Beta-Diversity of termite assemblages among primary French Guiana rain forests. *Biotropica*, 43, 473–479.

- Brandão, D. & Souza, R. F. 1998. Effects of deforestation and implantation of pastures on the termite fauna in the Brazilian “cerrado” region. *Tropical Ecology*, 39, 175–178.
- Camargo, J. M. F. 2006. A Amazônia não é uma unidade histórica! In: *Anais do VII Encontro sobre Abelhas*, (Ed. by W. C. Santana, C. H. Lobo, & K. H. Hartfelder), pp. 47–49. Ribeirão Preto, SP: FFCLRP-USP, FMRP-USP.
- Camargo, J. M. F. & Pedro, S. R. M. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47, 311–372.
- Cameron, S. L., Lo, N., Bourguignon, T., Svenson, G. J. & Evans, T. A. 2012. A mitochondrial genome phylogeny of termites (Blattodea: Termitoidae): Robust support for interfamilial relationships and molecular synapomorphies define major clades. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65, 163–173.
- Carrijo, T. F., Brandão, D., Oliveira, D. E., Costa, D. A. & Santos, T. 2009. Effects of pasture implantation on the termite (Isoptera) fauna in the Central Brazilian Savanna (Cerrado). *Journal of Insect Conservation*, 13, 575–581.
- Carrijo, T. F., Rocha, M. M., Cuezco, C. & Cancellato, E. M. 2011. Key to the soldiers of *Angularitermes* Emerson with a new species from Brazilian Amazonia (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). *Zootaxa*, 2967, 61–68.
- Carrijo, T. F., Gonçalves, R. B. & Santos, R. G. 2012. Review of bees as guests in termite nests, with a new record of the communal bee, *Gaesochira obscura* (Smith, 1879) (Hymenoptera, Apidae), in nests of *Anoplotermes banksi* Emerson, 1925 (Isoptera, Termitidae, Apicotermatinae). *Insectes Sociaux*, 59, 141–149.
- Cavalcanti, R. B. 2001. A experiência de workshops regionais e sistemas de informação geográfica para sintetizar informações. In: *Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais*, (Ed. by I. Garay & B. Dias), pp. 190–196. Petrópolis: Editora Vozes.
- Chase, J. M., Kraft, N. J. B., Smith, K. G., Vellend, M. & Inouye, B. D. 2011. Using null models to disentangle variation in community dissimilarity from variation in α -diversity. *Ecosphere*, 2, art24.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*, 9, 1657–9.
- Colwell, R. K. 2010. Beta diversity: synthesis and a guide for the perplexed. *Ecography*, 33, 1–1.

- Colwell, R. K. & Coddington, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 345, 101–18.
- Constantino, R. 1991. Termites (Isoptera) from the lower Japurá River, Amazonas State, Brazil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia*, 7, 189–224.
- Constantino, R. 1992. Abundance and diversity of termites (Isoptera) in two sites of primary rain forest in Brazilian Amazonia. *Biotropica*, 24, 420–430.
- Constantino, R. 1998. Catalog of the living termites of the New World (Insecta: Isoptera). *Arquivos de Zoologia*, 35, 135–231.
- Constantino, R. 2000. Key to the soldiers of South American *Heterotermes* with a new species from Brazil (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insect Systematics and Evolution*, 31, 463–472.
- Constantino, R. 2002. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. *Journal of Applied Entomology*, 126, 355–365.
- Constantino, R. 2005. Padrões de diversidade e endemismo de térmitas no bioma Cerrado. In: *Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação*, (Ed. by A. O. Scariot, J. C. S. Silva, & J. M. Felfili), pp. 319–333. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Constantino, R. 2013. On-line termite database. Disponível em: <http://164.41.140.9/catal/>. Acesso em: 01/02/2013.
- Constantino, R. & Acioli, A. N. S. 2006. Termite diversity in Brazil (Insecta: Isoptera). In: *Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems*, (Ed. by F. Moreira, J. O. Siqueira, & L. Brussaard), pp. 117–128. Wallingford: CAB International.
- Constantino, R. & Cancellato, E. M. 1992. Cupins (Insecta, Isoptera) da Amazônia Brasileira: distribuição geográfica e esforço de coleta. *Revista Brasileira de Biologia*, 52, 401–413.
- Cracraft, J. & Prum, R. O. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some neotropical birds. *Evolution*, 42, 603–620.
- Cunha, H. F. 2006. Cupins (Isoptera) bioindicadores para conservação do Cerrado em Goiás. Universidade Federal de Goiás, 79 p.
- Cunha, H. F., Costa, D. A. & Brandão, D. 2006. Termite (Isoptera) assemblages in some regions of the Goiás State, Brazil. *Sociobiology*, 47, 505–517.

- Dambros, C. S., Mendonça, R. M. M., Rebelo, T. G. & Morais, J. W. 2012. Termite species list in a terra firme and ghost forest associated with a hydroelectric plant in Presidente Figueiredo, Amazonas, Brazil. *Check List*, 8, 718–721.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9, 772.
- Davies, R. G., Eggleton, P., Dibog, L., Lawton, J. H., Bignell, D. E., Brauman, A., Hartmann, C., Nunes, L., Holt, J. & Rouland, C. 1999. Successional response of a tropical forest termite assemblage to experimental habitat perturbation. *Journal of Applied Ecology*, 36, 946–962.
- Davies, R. G., Hernández, L. M., Eggleton, P., Didham, R. K., Fagan, L. L. & Winchester, N. N. 2003. Environmental and spatial influences upon species composition of a termite assemblage across Neotropical forest islands. *Journal of Tropical Ecology*, 19, 509–524.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 407–415.
- De Cáceres, M., Legendre, P. & Moretti, M. 2010. Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos*, 119, 1674–1684.
- De Souza, O. & Brown, W. L. 1994. Effects of habitat fragmentation on amazonian termite communities. *Journal of Tropical Ecology*, 10, 197–206.
- Deblauwe, I., Dibog, L., Missoup, A. D., Dupain, J., Elsacker, L. Van, Dekoninck, W., Bonte, D. & Hendrickx, F. 2007. Spatial scales affecting termite diversity in tropical lowland rainforest: a case study in southeast Cameroon. *African Journal of Ecology*, 46, 5–18.
- Didham, R. K. & Ewers, R. M. 2012. Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats: Laurance and Yensen's core area model revisited. *Biological Conservation*, 155, 104–110.
- Dosso, K., Konaté, S., Aidara, D. & Linsenmair, K. E. 2010. Termite diversity and abundance across fire-induced habitat variability in a tropical moist savanna (Lamto, Central Côte d'Ivoire). *Journal of Tropical Ecology*, 26, 323–334.
- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J. & Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS biology*, 4, e88.
- 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, 1969–1973.

- Dufrêne, M. & Legendre, P. 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67, 345–366.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32, 1792–7.
- Eggleton, P. 2000. Global patterns of termite diversity. In: *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*, pp. 25–51.
- Eggleton, P., Bignell, D. E., Sands, W. A., Waite, B., Wood, T. G. & Lawton, J. H. 1995. The species richness of termites (Isoptera) under differing levels of forest disturbance in the Mbalmayo Forest Reserve, Southern Cameroon. *Journal of Tropical Ecology*, 11, 85–98.
- Eggleton, P., Bignell, D. E., Sands, W. A., Mawdsley, N. A., Lawton, J. H., Wood, T. G. & Bignell, N. C. 1996. The diversity, abundance and biomass of termites under differing levels of disturbance in the Mbalmayo Forest Reserve, Southern Cameroon. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 351, 51–68.
- Eggleton, P., Homathevi, R., Jeeva, D., Jones, D. T., Davies, R. G. & Maryati, M. 1997. The species richness and composition of termites (Isoptera) in primary and regenerating lowland dipterocarp forest in Sabah, East Malaysia. *Ecotropica*, 3, 119–128.
- Elias, M., Hill, R. I., Willmott, K. R., Dasmahapatra, K. K., Brower, A. V. Z., Mallet, J. & Jiggins, C. D. 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 274, 2881–9.
- EMBRAPA. 1997. *Manual de métodos de análise de solos*. 2nd edn. Rio de Janeiro, RJ: Centro Nacional de Pesquisas de Solos, 212 p.
- EMBRAPA. 2006. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. 2^a edn. Rio de Janeiro, RJ: EMBRAPA-SPI, 306 p.
- Emerson, A. E. 1971. Tertiary fossil species of the Rhinotermitidae (Isoptera), phylogeny of genera, and reciprocal phylogeny of associated flagellata (Protozoa) and the Staphylinidae (Coleoptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 146, 243–304.
- Engel, M. 2011. Family-group names for termites (Isoptera), redux. *ZooKeys*, 148, 171.
- Engel, M. . S. & Krishna, K. 2004. Family-group names for termites (Isoptera). *American Museum Novitates*, 3432, 1–9.

- Engel, M. S., Grimaldi, D. A. & Krishna, K. 2009. Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *American Museum Novitates*, 3650, 28.
- Espírito-Santo Filho, K. 2005. Efeitos de distúrbios ambientais sobre a fauna de cupins (Insecta: Isoptera) e seu papel como bioindicador. Universidade Estadual de São Paulo, 104 p.
- Evans, T. A., Inta, R., Lai, J. C. S., Prueger, S., Foo, N. W., Fu, E. W. & Lenz, M. 2009. Termites eavesdrop to avoid competitors. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 276, 4035–41.
- Ewers, R. M. & Didham, R. K. 2007. The effect of fragment shape and species' sensitivity to habitat edges on animal population size. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology*, 21, 926–36.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10, 564–7.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.
- Frankham, R., Ballou, J. D. & Briscoe, D. A. 2008. *Fundamentos de genética da conservação*. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 280 p.
- Funk, D. J. & Omland, K. E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 397–423.
- Galetti Jr., P. M., Rodrigues, F. P., Solé-Cava, A. M., Miyaki, C. Y., Carvalho, D. De, Eizirik, E., Veasey, E. A., Santos, F. R., Farias, I. P., Viana, J. A., Oliveira, L. R., Weber, L. I., Almeida Toledo, L. F., Francisco, M. R., Redondo, R. A. F., Siciliano, S., Del Lama, S. N., Freitas, T. R. O., Hrbek, T. & Molina, W. F. 2008. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: *Fundamentos de Genética da Conservação*, (Ed. by R. Frankham, J. D. Ballou, & D. A. Briscoe), pp. 244–274. Editora SBG.
- Gascon, C., Malcolm, J. R., Patton, J. L., Da Silva, M. N., Bogart, J. P., Loughheed, S. C., Peres, C. A., Neckel, S. & Boag, P. T. 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13672–7.

- Gathorne-Hardy, F., Syaukani & Eggleton, P. 2001. The effects of altitude and rainfall on the composition of the termites (Isoptera) of the Leuser Ecosystem (Sumatra, Indonesia). *Journal of Tropical Ecology*, 17, 379–393.
- Goloboff, P. A. 1999. NONA. ver. 2.0. Publicado pelo autor, Tucumán, Argentina.
- Gotelli, N. J. & Colwell, R. K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, 4, 379–391.
- Haffer, J. 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Brazilian Journal of Biology*, 68, 917–947.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hall, J. P. W. & Harvey, D. 2002. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from riordinid butterflies. *Evolution*, 56, 1489–1497.
- Hausberger, B., Kimpel, D., Van Neer, A. & Korb, J. 2011. Uncovering cryptic species diversity of a termite community in a West African savanna. *Molecular phylogenetics and evolution*, 61, 964–9.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270, 313–21.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. & Francis, C. M. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS biology*, 2, e312.
- Higashi, M. & Abe, T. 1997. Global diversification of termites driven by the evolution of symbiosis and sociality. In: *Biodiversity - an ecological perspective*, (Ed. by T. Abe, S. A. Levin, & M. Higashi), pp. 83–112. New York: Springer.
- Holt, J. A. & Lepage, M. 2000. Termites and soil properties. In: *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, 1st edn. (Ed. by T. Abe, D. E. Bignell, & M. Higashi), pp. 389–407. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Hoorn, C. 1993. Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 105, 267–309.

- Hubbell, S. P. & Foster, R. B. 1986. Canopy gaps and the dynamics of a Neotropical forest. In: *Plant Ecology*, (Ed. by M. J. Crawley), pp. 77–96. Oxford: Blackwell Scientific.
- IBAMA. 2008. Programa de conservação da fauna - Seção 14. In: *Projeto Básico Ambiental - AHE Santo Antonio*, pp. Doc. N° DT – 079–515–5025–0014–00–J.
- Inward, D. J. G., Vogler, A. P. & Eggleton, P. 2007. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Molecular phylogenetics and evolution*, 44, 953–967.
- Jones, D. T. & Eggleton, P. 2000. Sampling termite assemblages in tropical forests: testing a rapid biodiversity assessment protocol. *Journal of Applied Ecology*, 37, 191–203.
- Jones, C. G., Lawton, J. H. & Shachak, M. 1994. Organisms as Ecosystem Engineers. *Oikos*, 69, 373–386.
- Jost, L. 2006. Entropy and diversity. *Oikos*, 113, 363–375.
- Jost, L. 2007. Partitioning diversity into independent alfa and beta components. *Ecology*, 88, 2427–2439.
- Jost, L. 2010. Independence of alpha and beta diversities. *Ecology*, 91, 1969–1974.
- Jouquet, P., Traoré, S., Choosai, C., Hartmann, C. & Bignell, D. 2011. Influence of termites on ecosystem functioning. Ecosystem services provided by termites. *European Journal of Soil Biology*, 47, 215–222.
- Katsuragawa, T. H., Gil, L. H. S., Tada, M. S. & Silva, L. H. P. 2008. Malaria e doenças emergentes no Rio Madeira. Um caso de escola. *Estudos Avançados*, 22, 111–141.
- Kingman, J. F. C. 1982. The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications*, 13, 235–248.
- Kutnik, M., Uva, P., Brinkworth, L. & Bagneres, A.-G. 2004. Phylogeography of two European *Reticulitermes* (Isoptera) species: the Iberian refugium. *Molecular ecology*, 13, 3099–113.
- Laurance, W. F. & Yensen, E. 1991. Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats. *Biological Conservation*, 55, 77–92.
- Lavelle, P., Bignell, D. E., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, O. W. & Dhillon, S. 1997. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology*, 33, 159–193.

- Leaché, A. D. & Fujita, M. K. 2010. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 277, 3071–7.
- Legendre, F., Whiting, M. F., Bordereau, C., Canello, E. M., Evans, T. A. & Grandcolas, P. 2008. 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*, 48, 615–627.
- Legendre, F., Whiting, M. F. & Grandcolas, P. 2013. Phylogenetic analyses of termite post-embryonic sequences illuminate caste and developmental pathway evolution. *Evolution & Development*, 15, 146–157.
- Leponce, M., Roisin, Y. & Pasteels, J. M. 1997. Structure and dynamics of the arboreal termite community in New Guinean coconut plantations. *Biotropica*, 29, 193–203.
- Lewinsohn, T. M. & Prado, P. I. 2005. How many species are there in Brazil? *Conservation Biology*, 19, 619–624.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Lin, C.-P. & Danforth, B. N. 2004. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular phylogenetics and evolution*, 30, 686–702.
- Lo, N., Kitade, O., Miura, T., Constantino, R. & Matsumoto, T. 2004. Molecular phylogeny of the Rhinotermitidae. *Insectes Sociaux*, 51, 365–371.
- Lohse, K. 2009. Can mtDNA barcodes be used to delimit species? A response to Pons *et al.* (2006). *Systematic biology*, 58, 439–42; discussion 442–4.
- Malcolm, J. R. 1995. Forest structure and the abundance and diversity of Neotropical small mammals. In: *Forest canopies*, (Ed. by N. E. Stork, J. Adis, & R. K. Didham), pp. 179–197. San Diego: Academic Press.
- Marks, B. D., Hackett, S. J. & Capparella, A. P. 2002. Historical relationships among Neotropical lowland forest areas of endemism as determined by mitochondrial DNA sequence variation within the Wedge-billed Woodcreeper (Aves: Dendrocolaptidae: *Glyphorynchus spirurus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24, 153–167.
- Martius, C. 1994. Diversity and ecology of termites (Isoptera) in Amazonian forests. *Pedobiologia*, 38, 407–428.

- Matsuura, K., Vargo, E. L., Kawatsu, K., Labadie, P. E., Nakano, H., Yashiro, T. & Tsuji, K. 2009. Queen succession through asexual reproduction in termites. *Science (New York, N.Y.)*, 323, 1687.
- Mayr, E. 2004. *What Makes Biology Unique?: Considerations on the Autonomy of a Scientific Discipline*. Cambridge University Press, 246 p.
- Messenger, M. T. & Mullins, A. J. 2005. New flight distance record for *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Florida Entomologist*, 88, 99–100.
- Mill, A. E. 1983. Observations on Brazilian termite alate swarms and some struture used in the dispersal of reproductives (Isoptera: Termitidae). *Journal of Natural History*, 17, 309–320.
- Mitchell, A. 2008. DNA barcoding demystified. *Australian Journal of Ecology*, 47, 169–173.
- Moritz, C. & Cicero, C. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS biology*, 2, e354.
- Morrone, J. J. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology*, 51, 467–494.
- Murcia, C. 1995. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 10, 5.
- Nicholls, J. A., Challis, R. J., Mutun, S. & Stone, G. N. 2012. Mitochondrial barcodes are diagnostic of shared refugia but not species in hybridizing oak gallwasps. *Molecular ecology*, 21, 4051–62.
- Nihei, S. S. & Carvalho, C. J. B. 2007. Systematics and biogeography of *Polietina Schnabl & Dziedzicki* (Diptera, Muscidae): Neotropical area relationships and Amazonia as a composite area. *Systematic Entomology*, 32, 477–501.
- Nixon, K. C. 2002. WinClada. ver. 2.0. Publicado pelo autor, Nova York, EUA.
- Nores, M. 1999. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography*, 26, 475–485.
- Palin, O. F., Eggleton, P., Malhi, Y., Girardin, C. A. J., Rozas-Dávila, A. & Parr, C. L. 2011. Termite diversity along an Amazon-Andes elevation gradient, Peru. *Biotropica*, 43, 100–107.
- Palmer, M. W. 1990. The estimation of species richness by extrapolation. *Ecology*, 71, 1195.

- Palmer, M. W. 1991. Estimating species richness: the second-order Jackknife reconsidered. *Ecology*, 72, 1512.
- Pequeno, P. L. L. 1999. Sistema radicular de leguminosas: efeito em algumas propriedades de um Podzólico Vermelho Amarelo. Universidade Federal da Paraíba, 110 p.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D. & Vogler, A. P. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic biology*, 55, 595–609.
- R Development Core Team. 2010. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
- Racheli, L. & Racheli, T. 2004. Patterns of Amazonian area relationships based on raw distributions of papilionid butterflies (Lepidoptera: Papilioninae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 82, 345–357.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. 2007. Tracer v1.4. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Reis, Y. T. & Cancellato, E. M. 2007. Riqueza de cupins (Insecta, Isoptera) em áreas de Mata Atlântica primária e secundária do sudeste da Bahia. *Iheringia, Série Zoologia*, 97, 229–234.
- Ricotta, C. 2010. On beta diversity decomposition: trouble shared is not trouble halved. *Ecology*, 91, 1981–3.
- Rocha, M. M., Carrijo, T. F. & Cancellato, E. M. 2012. An illustrated key to the soldiers of *Cyranotermes* Araujo with a new species from Amazonia (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). *Zootaxa*, 3196, 50–57.
- Roisin, Y. & Leponce, M. 2004. Characterizing termite assemblages in fragmented forests: a test case in the Argentinian Chaco. *Austral Ecology*, 29, 637–646.
- Roisin, Y., Dejean, A., Corbara, B., Orivel, J., Samaniego, M. & Leponce, M. 2006. Vertical stratification of the termite assemblage in a neotropical rainforest. *Oecologia*, 149, 301–311.
- Roy, V., Demanche, C., Livet, A. & Harry, M. 2006. Genetic differentiation in the soil-feeding termite *Cubitermes* sp. affinis subarquatus: occurrence of cryptic species revealed by nuclear and mitochondrial markers. *BMC evolutionary biology*, 6, 102.

- Santos, J. C., Coloma, L. A., Summers, K., Caldwell, J. P., Ree, R. & Cannatella, D. C. 2009. Amazonian amphibian diversity is primarily derived from late Miocene Andean lineages. *PLoS biology*, 7, e56.
- Santos, H. G., Carvalho Júnior, W., Dart, R. O., Áglio, M. L. D., Sousa, J. S., Pares, J. G., Fontana, A., Martins, A. L. S. & Oliveira, A. P. 2011. *O novo mapa de solos do Brasil: legenda atualizada*. Embrapa So edn. Rio de Janeiro, RJ.
- Scheffrahn, R. H., Krecek, J., Szalanski, A. L. & Austin, J. W. 2005a. 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*, 98, 273–281.
- Scheffrahn, R. H., Krecek, J., Szalanski, A. L., Austin, J. W. & Roisin, Y. 2005b. Synonymy of two arboreal termites (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae): *Nasutitermes corniger* from the Neotropics and *N. polygynus* from New Guinea. *Florida Entomologist*, 88, 28–33.
- Silva, J. M. C. & Garda, A. A. 2010. Padrões e processos biogeográficos na Amazônia. In: *Biogeografia da América do Sul: padrões e processos*, (Ed. by C. J. B. Carvalho & E. A. B. Almeida), pp. 189–197. São Paulo, SP: Roca.
- Silva, M. N. F. & Oren, D. C. 1996. Application of parsimony analysis of endemism in Amazonian biogeography: an example with primates. *Biological Journal of the Linnean Society*, 59, 427–437.
- Smouse, P. E., Long, J. C. & Sokal, R. R. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, 35, 627–632.
- Snyder, T. E. 1924. Descriptions of new species and hitherto unknown castes of termites from America and Hawaii. *Proceedings of the U.S. National Museum*, 64, 1–45.
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F. & Crandall, K. A. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 13486–91.
- Szalanski, A. L., Scheffrahn, R. H., Austin, J. W., Krecek, J. & Su, N.-Y. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of *Heterotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in the West Indies. *Annals of the Entomological Society of America*, 97, 556–566.

- Szalanski, A. L., Austin, J. W., Mckern, J. & Messenger, M. T. 2006. Genetic evidence for a new subterranean termite species (Isoptera: Rhinotermitidae) from western United States and Canada. *Florida Entomologist*, 89, 299–304.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28, 2731–9.
- Thorne, B. L. 1982. Termite-termite interactions: workers as an agonistic caste. *Psyche*, 89, 133–150.
- Thorne, B. L. & Haverty, M. I. 1991. A review of intracolony, intraspecific, and interspecific agonism in termite. *Sociobiology*, 19, 115–145.
- Traoré, S., Nygård, R., Guinko, S. & Lepage, M. 2008. Impact of *Macrotermes* termitaria as a source of heterogeneity on tree diversity and structure in a Sudanian savannah under controlled grazing and annual prescribed fire (Burkina Faso). *Forest Ecology and Management*, 255, 2337–2346.
- Tuomisto, H. 2010a. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography*, 33, 2–22.
- Tuomisto, H. 2010b. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 2. Quantifying beta diversity and related phenomena. *Ecography*, 33, 23–45.
- Vargo, E. L. & Husseneder, C. 2009. Biology of subterranean termites: insights from molecular studies of *Reticulitermes* and *Coptotermes*. *Annual review of entomology*, 54, 379–403.
- Velonà, A., Ghesini, S., Luchetti, A., Marini, M. & Mantovani, B. 2010. Starting from Crete, a phylogenetic re-analysis of the genus *Reticulitermes* in the Mediterranean area. *Molecular phylogenetics and evolution*, 56, 1051–1058.
- Ver Hoef, J. M. & Boveng, P. L. 2007. Quasi-Poisson vs. negative binomial regression: how should we model overdispersed count data? *Ecology*, 88, 2766–72.
- Ware, J. L., Grimaldi, D. A. & Engel, M. S. 2010. The effects of fossil placement and calibration on divergence times and rates: an example from the termites (Insecta: Isoptera). *Arthropod structure & development*, 39, 204–19.

- Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7, 256–276.
- Webb, S. D. 1995. Biological implications of the middle miocene Amazon seaway. *Science (New York, N.Y.)*, 269, 361–2.
- Whiting, M. F. 2002. Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zoologica Scripta*, 31, 93–104.
- Whittaker, R. H. 1960. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30, 279–338.
- Wilson, E. O. 1971. *The insect societies*. Cambridge: Belknap Press, 548 p.
- Wolda, H. 1981. Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia*, 50, 296–302.
- Yeates, D. K., Seago, A., Nelson, L., Cameron, S. L., Joseph, L. & Trueman, J. W. H. 2011. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology*, 36, 209–217.
- Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. University of Texas, 115 p.

ANEXO I

Carrijo, T.F.; Rocha, M.M.; Cuezco, C. & Canello, E.M. 2011. **Key to the soldiers of *Angularitermes* Emerson with a new species from Brazilian Amazonia (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae).** Zootaxa 2967: 61-68

Key to the soldiers of *Angularitermes* Emerson with a new species from Brazilian Amazonia (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae)

TIAGO F. CARRIJO^{1,2,4}, MAURICIO M. ROCHA¹, CAROLINA CUEZZO³ & ELIANA M. CANCELLO¹

¹Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Cx. Postal 42.494, 04218-970 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail: tiagocarrijo@gmail.com; mrocha@usp.br; ecancell@usp.br

²Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

³CONICET- Instituto Superior de Entomología “Dr. A. Willink”, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, UNT, Miguel Lillo 205, T4000JFE, San Miguel de Tucumán, Argentina. E-mail: carolinacuezzo@csnat.unt.edu.ar

⁴Corresponding author. E-mail: tiagocarrijo@gmail.com

Abstract

An identification key based on characters of the soldier caste is provided for species of *Angularitermes*. Soldiers of previously described species in the genus, *A. clypeatus*, *A. nasutissimus*, *A. orestes*, *A. pinocchio* and *A. tiguassu*, are illustrated along with a new species, *Angularitermes coninasus*, **n. sp.**, that is described and illustrated from soldier and worker castes. Samples of the new species were collected from epigeal nests at the Brazilian Amazon rainforest. The soldier of *A. coninasus*, **n. sp.** is distinguished from its congeners by having a short conical frontal tube, much wider at its base.

Key words: termites, taxonomy, Neotropical region, identification key

Introduction

The Nasutitermitinae genus *Angularitermes* was described by Emerson (1925) as a new subgenus of *Nasutitermes* Dudley, based on imago and soldier castes from the rain forest of Kartabo, Guyana (South America). Later, Snyder (1949) raised *Angularitermes* to generic level and Mathews (1977) considered it as a senior synonym of *Tintermes* Araujo.

Angularitermes is a well defined genus, whose soldiers are characterized by bilobed postclypeus, the intricate microsculpture on the frontal tube base (Cancello *et al.* 1996) and the relatively large mandible “points”, while workers have mandibles with reduced marginal teeth. The genus ranges from Trinidad to southeastern Brazil (Constantino, 1998).

Five species were included in *Angularitermes* until now. *A. nasutissimus* Emerson 1925, the type-species, is known from Amazonia and Trinidad. Emerson (1925) did not mention the microhabitat of the type material. One sample from the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) from Amapá, Brazil, has an observation made by the collector as “in rotten wood”.

A. clypeatus Mathews 1977 was described from Mato Grosso State and was found as an inquiline in nests of *Cornitermes silvestrii*. *A. orestes* (Araujo 1970) shows a distribution in the Cerrado vegetation in central Brazil, and was found by Araujo (1970) as an inquiline of nests of *Armitermes euamignathus* and by Mathews (1977) in nest of *Embiratermes neotenicus*. *A. pinocchio* Cancello & Brandão 1996 is known from the Cerrado region in the State of Goiás (Brazil), and also from the Atlantic Forest (Reis & Cancello, 2007); this species was found by D. Brandão (Cancello *et al.* 1996) as an inquiline in nests of *C. silvestrii*. Finally, *A. tiguassu* Cancello & Brandão 1996 is known only from the State of Goiás, and was collected in the soil drawn up by the raised roots of a fallen tree, in a semi-deciduous tropical forest (Cancello *et al.* 1996) and also found as an inquiline in nests of *Cornitermes cumulans* by Costa *et al.* (2009).

Herein, *Angularitermes coninasus*, **n. sp.**, from Brazilian Amazonia, is described and illustrated, based on characters of soldier and worker castes. Also, for the first time an epigeal nest is characterized for a species of *Angularitermes*. A key for the identification of the soldiers of the six species of *Angularitermes* is provided.

Material and methods

The examined material is deposited in the Isoptera collection of the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) and comprises the following samples of each species: *A. nasutissimus*: 3460, paratype (Guyana, Kartabo; A.E. Emerson coll.; 11.viii.1920), and 9433 (Brazil, Amapá, Macapá; R. Constantino coll.; 28.x.1989); *A. clypeatus*: 7388, holotype (Brazil, Mato Grosso, 12°49'S 51°46'W; A.G.A. Mathews coll.; 11.i.1968); *A. orestes*: 4708, holotype (Brazil, Minas Gerais, Serra do Curral; R.L. Araujo coll.; 2.xii.1956); *A. pinocchio*: 10040, holotype (Brazil, Goiás, Goiânia; D. Brandão coll.; x.1987); *A. tiguassu*: 10041, holotype (Brazil, Goiás, Goiânia; D. Brandão coll.; x.1987) and two samples of the new species described herein (9425 and 13445, detailed below).

The morphometric characters used in this paper and their correspondence with Roonwal's system (Roonwal 1970) are indicated in parentheses when possible, as follows: LT, length of hind tibia (85); maximum width of head (17, Fig. 1D), LN, length of frontal tube (figure 1A); LH, length of head to lateral base of mandibles (5, Fig. 1B); WN, maximum width of frontal tube (Fig. 1C); and LN/WN, LN/LH, and LH/LT indices. All measurements, provided in millimeters, were taken with a micrometric reticule adapted to a binocular stereomicroscope. The number of specimens measured for each caste of *Angularitermes coninasus* **n. sp.** is provide in descriptions; also three soldiers of *A. nasutissimus*, three of *A. tiguassu* and the type of *A. clypeatus* had the LN/WN index measured to be used into the key.

Line drawings were prepared with a *camera lucida* coupled to a stereomicroscope and then scanned. Photographs of soldiers were taken with a digital camera adapted to a stereomicroscope at different focal points of each individual and then combined using *Combine ZP* software (Hadley 2010). The worker enteric valve was mounted on a microscope slide with alcohol gel and photographed under an optic microscope Axio Imager A1 and digital camera ICc 1, Zeiss.

FIGURE 1. Morphometric characters of soldier head. In lateral view (left) and in dorsal view (right): A, length of frontal tube; B, length of head to lateral base of mandibles; C, maximum width of frontal tube; and D, maximum width of head.

The terms used for pilosity are comparative: “thick bristles” are erect hairs with well-marked bases and thicker than the “bristles”; bristles are thinner than the first (see the differences between them comparing the bristles in the soldier head: figures 2A—*A. coninasus* **n. sp.** with 2D—*A. tiguassu*); “hairs” are shorter than bristles, less rigid and with inconspicuous bases; “microscopic hairs” are very short and only visible under high magnification, usually 50× or more. The term epicranial suture is used as explained by Grassé (1982, p. 7). The terminology adopted for the worker mandibles follows Fontes (1987), and the terminology for the digestive tube is after Noirot (2001).

Key to species of *Angularitermes*

1. Frontal tube very conical with a wide base, almost half of the length of frontal tube (Fig. 2A) *A. coninasus* Carrijo & Rocha, **n. sp.**
- Frontal tube longer, not as conical as above, width of base much shorter than half of the length of frontal tube (Figs. 2B–F) .. 2
2. Short hairs on frontal tube, when present, only in the first basal third 3
- Short hairs along the length of frontal tube 4
3. Postclypeus very large and projected forward; length of frontal tube proportionally longer compared to cephalic capsule size (Fig. 2E) *A. pinocchio* Cancellato & Brandão
- Postclypeus smaller; length of frontal tube proportionally shorter compared to cephalic capsule size (Fig. 2C) *A. orestes* (Araujo)
4. Antennae with 14 articles; ratio LN/WH more than 1.85 (Figs. 2B and 2F) 5
- Antennae with 15 articles; ratio LN/WH less than 1.55; (Figs. 2D)..... *A. tiguassu* Cancellato & Brandão
5. Postclypeus very prominent and upward oriented (Fig. 2F)..... *A. clypeatus* Mathews
- Postclypeus short (Fig. 2B) *A. nasutissimus* Emerson

FIGURE 2. *Angularitermes* soldier head, in profile: A, *A. coninasus* **n. sp.** (paratype); B, *A. nasutissimus*; C, *A. orestes* (paratype); D, *A. tiguassu* (holotype); E, *A. pinocchio* (paratype); and F, *A. clypeatus* (holotype).

Angularitermes coninasus Carrijo & Rocha, new species

Holotype. Soldier, part of lot MZUSP 13445, Brasil, Rondônia, Porto Velho, Jaci-Paraná, Ilha da Pedra module from the Fauna Monitoring Program of Santo Antônio UHE, transect two, 3850 meters, 09°09'S 64°35'W; T. F. Carrijo & R. G. Santos coll.; 14.ix.2010.

Paratypes. The remain specimens from holotype's sample (workes and soldiers) and Brazil, Amazonas, Humaitá, 13.ix.1990, R. Constantino coll. (MZUSP 9425), part of the sample from the Museu Paraense Emílio Goeldi, (MPEG 3680).

Etymology. The specific epithet *coninasus* is a combination of the Latin term *conus* (meaning cone) and frontal tube as a reference to the conical shape of the soldier frontal tube.

Description. Imago. Unknown.

Soldier (Figs. 2A and 3). Monomorphic. Head capsule pyriform in dorsal view. frontal tube conical, with a slight to strong constriction at the base (Fig. 3A), pointing upward in profile. Postclypeus well-developed; projected upward and forward (Fig. 3B). Mandibular blade reduced to conspicuous "points". Labrum shorter than wider; anterior margin of labrum rounded. Antennae with 14 articles; 1st article is the largest with at least twice the length of 2nd; 3rd longer than 2nd; from 4th to 7th or 8th slightly longer than the anterior; from the 8th to the last, one shorter than the next, the last is as long as the 2nd. Anterior lobe of pronotum trapezoidal, almost rectangular, with anterior margin slightly emarginated. Legs very long; tibiae longer than head capsule length. Frontal tube with a microsculpturing of irregular pits concentrated at the first half, some pits may reach near the apex. Surface of the head capsule covered by thick bristles and hairs. Frontal tube surface with a few sparse bristles and a dense layer of decumbent short hairs; frontal tube apex with four rigid bristles smaller than those of head. Labrum glabrous. Bristles of the antennae concentrated at the apex of each article with short hairs on their surface; first article with bristles restricted to the apex. Pronotum with bristles on margins and two or three over its surface. Meso- and metanotum with many thick bristles on lateral and posterior margins. Abdominal tergites covered by many thick bristles of different sizes. Abdominal sternites with a line of thick, erected bristles and sparse short hairs oriented backward. Legs with many thick bristles and hairs over their surfaces. Tibial spurs 2:2:2. Head capsule varying from ferruginous orange to pale yellow, frontal tube brown/red, always darker than the head capsule. Body yellow to pale yellow. Measurements of four soldiers from MZUSP 9425 and four from MZUSP 13445: LN (1.38–1.44), LH (1.32–1.38), WN (0.61–0.67), WH (1.17–1.25), LT (2.27–2.40), LN/WH (1.11–1.18), LN/ LH (1.00–1.05), LH/LT (0.57–0.60).

FIGURES 3. *Angularitermes coninasus* n. sp.: 3A, soldier head capsule, dorsal view. 3B, postclypeus, frontal view.

FIGURES 4–6. Worker of *Angularitermes coninasus* n. sp.: 4, mandibles; 5, digestive tube *in situ*: A, dorsal; B, right; C, ventral; and D, left views; 6, detail of mesenteric tongue and Malpighian tubules: A, profile; and B, internal views.

Worker (Figs. 4–8). Dimorphic. Differences among the dimorphic workers are restricted to their size. Head capsule trapezoidal, fontanelle and epicranial suture inconspicuous. Antennae with 15 articles, if 14 the 3rd is always subdivided. Postclypeus inflated. Anterior lobe of pronotum slightly emarginated. Tibial spurs 2:2:2. Head capsule with many bristles. Pronotum with bristles on the anterior and posterior margins; meso- and metanotum with bristles on posterior margins; abdominal tergites covered with many bristles and hairs; sternites with bristles and a dense layer of short hairs. Legs covered by scattered bristles and hairs. Measurements of four major and four minor workers from MZUSP 9425 and MZUSP 13445 are given as a range: major, WH (1.32–1.36), LT (1.87–1.96); and minor, WH (1.17–1.19), LT (1.64–1.74).

FIGURE 7. *Angularitermes coninasus* n. sp.: A, gizzard; and B, detail of the pulvillus I. f1, f2 and f3: first, second and third order folds, respectively, p1 and p2: pulvillus I and II respectively; and arrow: spines on the folds.

FIGURE 8. Enteric valve armature of the worker of *Angularitermes coninasus* n. sp., showing major cushions (large arrows) intercalated by minor cushions (thinner arrows). Observation: when enteric valve was mounted major cushions adopted different positions but there are no differences between them.

Mandibles (Fig. 4). Left mandible: apical tooth slightly larger than M_{1+2} ; angle between apical tooth and M_{1+2} tooth nearly acute; M_3 with half size of M_{1+2} ; notable gap between M_3 and molar prominence; molar tooth apex hidden by molar prominence; molar prominence very concave and without ridges. Right mandible: apical tooth approximately twice the size of M_1 ; M_2 reduced or absent; molar plate very concave and without ridges.

Digestive tube (Figs. 5–8). Crop well developed. Gizzard armature complete, surface of folds I and II ornamented with small and sparse spines (Fig. 7A); pulvillus I well developed, covered with long aciculiform spines on the superior portion and many lines with very small spines (4–6) on the inferior portion (Fig. 7B), pulvillus II reduced, surface smooth. Anterior end of midgut with a distinct hump dorsal to the insertion of the gizzard. Mixed segment very short, mesenteric tongue external to mesenteric arch (Fig. 6A). Malpighian tubules attached individ-

ually but closely adjacent in pairs at mesenteron-proctodeum junction; each tubule conspicuously dilated in its proximal part (Fig. 6A and B). Proctodeal segment (P_1) short and tubular throughout its length. Enteric valve (P_2) visible at left side (Fig. 5B). P_2 with three major cushions intercalated with three minor ones (Fig. 8): major cushions with shorter spines on its surface and, after a deflection on the distal portion, a row of 4–6 larger spines pointing inward to gut lumen (Fig. 8, large arrows); minor cushions with only sparse small spines (Fig. 8, thinner arrows). Paunch (P_3) with P_{3a} and P_{3b} dilated; proximal part of colon (P_{4a}) dilated; U-turn short and visible at right view.

Biology. All samples were collected in a primary rainforest. *A. coninasus* **n. sp.** type material was sorted out of a domed shaped epigeal nest, measuring 29 cm in height and 55 cm in width at its base (Fig. 9). The surface of the nest was covered by loose soil, which also formed the peripheral layer of about 5 cm in depth with noticeable galleries larger than 1 cm in diameter. Galleries at the internal layer had 0.5 cm diameter and were occupied by intertwined roots extending almost 10 cm down in soil. There were no chimneys communicating interior with exterior. The nest was surrounded by a shallow litter layer and some sticks. Neither inquilines nor real pair were found within *A. coninasus* **n. sp.** nest.

FIGURE 9. Nest of *Angularitermes coninasus* **n. sp.** from Rondônia, Brazil.

Comparisons. Soldiers of *Angularitermes coninasus* **n. sp.**, can be easily recognized among its congeners by having a short and strongly conical frontal tube, with a wide base. The combination of characters as microsculpture of the head capsule and frontal tube, pilosity and coloration distinguish *A. coninasus* **n. sp.** from the other species. *A. tiguassu* is morphologically similar to the new species but has a much narrower frontal tube at the base; antennae with 15 articles and LH/LT index 0.66–0.68. Workers are dimorphic. No other species of *Angularitermes* was reported as nest-building.

Acknowledgements

We are grateful to “PROBIOTA Consultoria Ambiental and Santo Antônio Energia” for the execution of the Entomological Monitoring Program from Santo Antônio UHE and for field support. We thank Rodrigo B. Gonçalves, Gláucia Marconato and Rodrigo Feitosa for reading an earlier draft of this paper and offering helpful advice and criticism; and Rafaella G. Santos who helped the first author in collecting the type material of *A. coninasus*. This work was partially supported by a doctoral scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brazil, to T. Carrijo and M. M. Rocha; a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. CNPq No. 304765/2007-4), Brazil, to E. M. Canello; and a doctoral scholarship from CONICET, Argentina, to C. Cuezso.

References

- Araujo, R.L. (1970) *Tintermes orestes*, new genus and species of Brazilian Isoptera (Termitidae, Nasutitermitinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 14, 41–45.
- Cancello, E.M., Brandão, D. & Amarante, S.T.P. (1996) Two new *Angularitermes* species (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) from Brazil with discussion of the cephalic microsculpture of the soldier. *Sociobiology*, 27, 277–286.
- Constantino, R. (1998) Catalog of the living termites of the New World (Insecta: Isoptera). *Arquivos de Zoologia*, 35, 135–231.
- Costa, D.A., Carvalho, R.A. de, Lima Filho, G.F. & Brandão, D. (2009) Inquilines and invertebrate fauna associated with termite nests of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) in the Emas National Park, Mineiros, Goiás, Brazil. *Sociobiology*, 53, 443–453.
- Emerson, A.E. (1925) The termites of Kartabo, Bartica District, British Guiana. *Zoologica*, 6, 291–459.
- Fontes, L.R. (1987) Morphology of the alate and worker mandibles of the soil-feeding nasute termites (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) from the Neotropical Region. *Revista Brasileira de Zoologia*, 3, 503–531.
- Grassé, P.P. (1982) *Termitologia I. Anatomie, physiology, reproduction*. Masson, Paris, 676 pp.
- Hadley, A. (2010) Combine ZP software. Available from: <http://www.hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk> (Date of access: November of 2010)
- Mathews, A.G.A. (1977) *Studies on termites from the Mato Grosso State, Brazil*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 267 pp.
- Noirot, C. (2001) The gut of termites (Isoptera) comparative anatomy, systematics, phylogeny. II. – Higher termites (Termitidae). *Annales de la Société Entomologique de France*, 37, 431–471.
- Reis, Y.T. & Cancello, E.M. (2007) Riqueza de cupins (Insecta, Isoptera) em áreas de Mata Atlântica primária e secundária do sudeste da Bahia. *Iheringia, Série Zoológica*, 97, 229–234.
- Roonwal, M.L. (1970) Measurement of termites (Isoptera) for taxonomic purposes. *Journal of the Zoological Society of India*, 21, 9–66.
- Snyder, T.E. (1949) Catalog of the termites (Isoptera) of the world. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 112, 1–490.

ANEXO II

Carrijo, T.F.; Gonçalves, R.B. & Santos, R.G. 2012. **Review of bees as guests in termite nests, with a new record of the communal bee, *Gaesochira obscura* (Smith, 1879) (Hymenoptera, Apidae), in nests of *Anoplotermes banksi* Emerson, 1925 (Isoptera, Termitidae, Apicotermitinae).** Insectes Sociaux 59: 141–149. DOI 10.1007/s00040-012-0218-x

Review of bees as guests in termite nests, with a new record of the communal bee, *Gaesochira obscura* (Smith, 1879) (Hymenoptera, Apidae), in nests of *Anoplotermes banksi* Emerson, 1925 (Isoptera, Termitidae, Apicotermitinae)

T. F. Carrijo · R. B. Gonçalves · R. G. Santos

Received: 26 September 2011 / Revised: 27 December 2011 / Accepted: 3 January 2012 / Published online: 19 January 2012
© International Union for the Study of Social Insects (IUSI) 2012

Abstract Associations between bees and termites are documented infrequently, but records are available for bee species ranging in behavior from solitary to highly eusocial. The subtribe Meliponina (stingless bees) is the most common bee group reported in termite nests, and, for some species, the occupancy of termite nests may be obligatory. The records of solitary bees nesting within termite nests include species of the tribes Emphorini, Centridini, Megachilini, and Paracolletini. Most of these bees can probably nest in other substrates, and their relationships with termite nests are presumably opportunistic. This study provides a review of published records of bees as guests in termite nests, and also describes the aggregation of nests of *Gaesochira obscura* within one nest of *Anoplotermes banksi* in Brazilian Amazonia. One termite nest contained at least ten nest entrances of *G. obscura*, with burrows 4–6 mm in diameter and about 10 cm long. Each burrow ended in brood cells in different stages of food provisioning and larval development. As commonly reported for other associations of this nature, there was no connection between the tunnels of bees and those of termites. This record adds important data on the biology of *A. banksi*. Because this is a single record, it is

impossible to classify *G. obscura* either as a termitophile or termitariophile; this species may be opportunistic in relation to nesting substrate.

Keywords Nesting biology · Termitophiles · Termitariophiles · Termites · Bees · Association

Introduction

A great number of animals can be found in an association with social insect nests. These animals range from obligatory symbionts to occasional occupants. According to the host group, these animals can be classified as *sphecophiles* (when the hosts are wasps), *myrmecophiles* (ants), *mellitophiles* (bees) or *termitophiles* (termites) (Wilson, 1971). Furthermore, other classifications are available according to the nature of the association, i.e., parasitism, commensalism or symbiosis (for a detailed discussion, see Kistner, 1979, 1982 and Wilson, 1971).

Many classifications have been proposed according to the nature of the association between termitophiles and termites. However, most of these classifications are controversial or not considered as useful (Grassé, 1986). The term termitophile has been used, basically, in two different ways (Kistner, 1969): (1) termitophiles sensu *lato*, for animals other than termites that live inside the nest of termites (e.g., Silvestri, 1903); and (2) termitophiles sensu *stricto*, used for animals, other than termites, that have obligatory relationships to the termite society, spending at least part of their life cycle within the termite colony (e.g., Wilson, 1971). The term termitariophile can be used for facultative occupants of termite nests (Araujo, 1970; Berg, 1900), or for those animals that use the termitarium only as a shelter, and do not interact with their hosts (Constantino and Acioli,

T. F. Carrijo (✉) · R. B. Gonçalves · R. G. Santos
Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo,
Av. Nazaré 481, São Paulo, SP 04263-000, Brazil
e-mail: tiagocarrijo@gmail.com

T. F. Carrijo · R. G. Santos
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900,
Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

Present Address:

R. B. Gonçalves
Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina,
Rua Pioneiro 2153, Palotina, PR 85950-000, Brazil

2006). The latter is equivalent to the term “alloicoxenus termitophiles” of Silvestri (1903).

Grassé (1986) emphasized the lack of knowledge on the interactions among termites and their guests. Grassé recommended a systematic classification, instead of attempting to group these guests by biological function. Here we review the data on bees nesting within termite nests, and discuss the nature of the relationships (facultative vs. obligatory). Additionally, we describe the first record of a eucerine bee using a termite nest as substrate. An aggregation of nests of *Gaesochira obscura* (Smith, 1879) is reported within the nest of *Anoplotermes banksi* Emerson, 1925 (Termitidae, Apicotermatinae) from the Amazonia, Rondônia, Brazil.

Table 1 lists all bee species known to nest in termite nests, and literature references for these associations. The classification of bees adopted here follows Melo and Gonçalves (2005). All bees are considered under a single family, Apidae, and the families of Michener's classifications (2000) are treated as subfamilies (e.g., Megachilidae, in the classification of Michener, is treated here as Megachilinae).

Corbiculate bees (Apinae, Apini)

Ratnieks et al. (1991), in observing 30 nests of *Apis mellifera* in Central America, found six of them within arboreal nests of a species of the genus *Nasutitermes* Dudley, 1890. *Apis mellifera* is a very opportunistic bee, which nests in a wide variety of sites and situations. Bumble bees are primitively eusocial and normally nest inside empty burrows and cavities under bunch grass; the use of abandoned termite nests by these bees was mentioned by Silveira et al. (2002).

Stingless bees, with a few exceptions, have aerial nests. Their association with termitaria is very common; particular examples are species of *Partamona* Schwarz, 1939, frequently associated with cavities in termite nests. Camargo and Pedro (2003) listed 19 species of this genus nesting within termite nests, and 13 of these are known for nesting only in termite nests. The other six can also be found in ant and bird nests, tree trunks, and buildings crevices. Barreto and Castro (2007) found a spatial aggregated pattern of *Partamona* nests in an area of the state of Bahia, Brazil. This pattern is related to the spatial aggregated pattern of their nesting substrates, the nests of *Constrictotermes cyphergaster* (Silvestri, 1901) (Termitidae, Nasutitermitinae), as well as the behavior of parakeets that open cavities in the termite nest, thus allowing space for bee occupation.

Records are also available for other stingless bee genera. Many species of *Trigona* Jurine, 1807 are also reported to live in termite nests, usually those of *Nasutitermes* and *Cornitermes* Wasmann, 1897 (Camargo, 1970; Camargo and Posey, 1990; Kerr et al., 1967; Lenko, 1971; Posey and Camargo, 1985; Roubik, 1979; Roubik, 1983; Schwarz, 1948; Silvestri,

1903); but apparently, none of these species of *Trigona* are obligatory guests of termites. The only two species of *Aparatrigona* Moure, 1951 were reported to necessarily build their nests in termitaria: *A. isopterophila*, with no information about the termite hosts, and *A. impunctata*, reported in nests of *Nasutitermes similis*, *N. costalis*, and another unidentified species of termite (Camargo and Moure, 1994). The bee *Scaura latitarsis* was also reported as a guest of *Nasutitermes* nest (Camargo, 1984). Associations of African stingless bees with termites are also known: *Plebeina hildebrandti* (Eardley, 2004; Smith, 1854) and species of *Meliponula* (*Meliplebeia*) and *M. (Axestotrigona)* (Michener, 2007).

Contrasting with other corbiculate bees, the orchid bees (Euglossina) are solitary and sometimes communal. There are records of three species of Euglossina nesting in termite nests: *Eufriesea laniventris*, *Eufriesea surinamensis* and *Euglossa intersecta*. *Eufriesea laniventris* was found in a nest of *Nasutitermes guayanae* Holmgren, 1910 in Guyana (Kimsey, 1982), but there are also records of the occupancy of ant nests by this bee. *Eufriesea surinamensis* was recorded occupying abandoned termite nests previously occupied by *Centris trigonoides* Lepeletier, 1841 (Centridini, see below) and *Monobia nigripennis* Saussure, 1875 (Vespidae) (Kimsey, 1982). Two nests of *Euglossa intersecta* were recorded in termite nests on the side of a dead tree in Peru. One of the nests had four females, larvae, and pupae; the second nest was in the initial phase of construction, and there was only one female (Dodson, 1966).

Centris and its cleptoparasites (Apinae, Centridini and Ericrocidini)

Among noncorbiculate apines, *Centris* is the group most commonly reported in association with termites. Silvestri (1903) registered a *Centris*, identified by him as *C. (Mela-centris) thoracica*, in epigeal (above-ground) nests of *Armitermes euamignathus* (Termitidae, Syntermitinae) and in arboreal nests of *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae). *Centris (Trachina) longimana* is another species recorded in association with termite nests, despite the lack of identification of the termite species (Roubik, 1983).

Other records for *Centris* are restricted to the subgenus *Ptilotopus*. Gaglianone (2001) reported nests of *C. scopipes* in active epigeal mounds of the termite *Procornitermes araujo* (Termitidae, Syntermitinae). Although some active termites were seen in galleries near the bee nests, the tunnels of the bee and the termite were isolated from each other, probably without contact between them. The species *C. sponso* (Laroca et al., 1993) and *C. derasa* (Bennet, 1964; Vesey-Fitzgerald, 1939) were found nesting in the arboreal nests of *Microcerotermes* spp. (Termitidae, Termitinae). Bennet (1964) found more than one nest of *C. derasa* in the

Table 1 Records of bees nesting within termite nests

Bee species	Termite species	Reference
APINAE		
APINI, APINA		
<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	<i>Nasutitermes</i> sp.	Ratnieks et al. (1991)
APINI, BOMBINA		
<i>Bombus</i> spp.	Unknown	Silveira et al. (2002)
APINI, EUGLOSSINA		
<i>Eufriesea surinamensis</i> (Linnaeus, 1758)	Unknown	Kimsey (1982)
<i>Ef. Laniventris</i> (Ducke, 1902) ^a	<i>Nasutitermes guayanae</i> (Holmgren, 1910)	Kimsey (1982)
<i>Euglossa intersecta</i> Latreille, 1838	Unknown	Dodson (1966)
APINI, MELIPONINA		
<i>Aparatrigona isopterophila</i> (Schwarz, 1934)	Unknown	Camargo and Moure (1994)
<i>A. impunctata</i> (Ducke, 1916)	<i>Nasutitermes similis</i> , Emerson, 1935; <i>Nasutitermes costalis</i> (Holmgren, 1910)	Camargo and Moure (1994)
<i>Meliponula (Meliplebeia)</i> spp.	Unknown	Michener (2007)
<i>M. (Axestotrigona)</i> spp.	Unknown	Michener (2007)
<i>Partamona nhambiquara</i> Pedro and Camargo, 2003	Unknown	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. batesi</i> Pedro and Camargo, 2003	<i>Nasutitermes</i> sp.	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. vicina</i> Camargo, 1980	Unknown	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. mourei</i> Camargo, 1980	<i>Amitermes excellens</i> Silvestri, 1923	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. pearsoni</i> (Schwarz, 1938)	<i>Nasutitermes peruanos</i> (Holmgren, 1910); <i>Amitermes excellens</i> Silvestri, 1923	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. ferreirai</i> Pedro and Camargo, 2003	<i>Termes hispaniolae</i> (Banks, 1918)	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. gregaria</i> Pedro and Camargo, 2003	<i>Nasutitermes tatarendae</i> (Holmgren, 1910); <i>Nasutitermes acangussu</i> Bandeira and Fontes, 1979; <i>Amitermes excellens</i> Silvestri, 1923	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. testacea</i> (Klug, 1807) ^a	<i>Syntermes spinosus</i> (Latreille, 1804)	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. auripennis</i> Pedro and Camargo, 2003 ^a	Unknown	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. combinata</i> Pedro and Camargo, 2003	<i>Nasutitermes kemneri</i> Snyder & Emerson in Snyder, 1949; <i>Microcerotermes strunki</i> (Sørensen, 1884); <i>Microcerotermes</i> sp.	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. chapadicola</i> Pedro and Camargo, 2003	Unknown	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. seridoensis</i> Pedro and Camargo, 2003	Unknown	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. cupira</i> (Smith, 1863)	<i>Constrictotermes cyphergaster</i> (Silvestri, 1901)	Camargo and Pedro (2003); Barreto and Castro (2007)
<i>P. mulata</i> Moure and Camargo, 1980 ^a	Unknown	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. ailyae</i> Camargo, 1980	<i>Syntermes molestus</i> (Burmeister, 1839); <i>Termes medioculatus</i> Emerson in Snyder, 1949	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. criptica</i> Pedro and Camargo, 2003	Unknown	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. rustica</i> Pedro and Camargo, 2003 ^a	<i>Constrictotermes cyphergaster</i> (Silvestri, 1901); <i>Nasutitermes corniger</i> (Motschulsky, 1855)	Camargo and Pedro (2003); Barreto and Castro (2007)
<i>P. orizabaensis</i> (Strand, 1919) ^a	Unknown	Camargo and Pedro (2003)
<i>P. peckolti</i> (Friese, 1901) ^a	Unknown	Camargo and Pedro (2003)
<i>Plebeina hildebrandti</i> (Friese, 1900)	Unknown	Smith (1854); Eardley (2004)
<i>Scaura latitarsis</i> (Friese, 1900)	<i>Nasutitermes</i> sp.; <i>Nasutitermes rippertii</i> (Rambur, 1842)	Camargo (1984); Silvestri (1903)
<i>Trigona cilipes</i> (Fabricius, 1804) ^a	<i>Nasutitermes</i> sp.	Kerr et al. (1967); Roubik (1979); Wille and Michener (1973)
<i>T. chanchamayoensis</i> Schwarz, 1948	<i>Nasutitermes brevioculatus</i> (Holmgren, 1910)	Schwarz (1948)
<i>T. ferricauda</i> Cockerell, 1917	<i>Nasutitermes corniger</i> (Motschulsky, 1855)	Roubik (1983)

Table 1 continued

Bee species	Termite species	Reference
<i>T. fuscipennis</i> Friese 1900	<i>Nasutitermes ephratae</i> (Rambur, 1842); <i>Nasutitermes breviculatus</i> (Holmgren, 1910)	Roubik (1983)
<i>T. guianae</i> Cockerell, 1910	Unknown	Wille and Michener (1973)
<i>T. pallens</i> (Fabricius, 1798)	<i>Nasutitermes</i> sp.; <i>Nasutitermes rippertii</i> (Rambur, 1842)	Roubik (1983), Silvestri (1903)
<i>T. recursa</i> Smith, 1863	<i>Cornitermes bequaerti</i> Emerson, 1952	Camargo (1970); Camargo and Posey (1990); Lenko (1971); Posey and Camargo (1985)
CENTRIDINI		
<i>Centris (Melacentris) thoracica</i> Lepeletier, 1841 ^b	Unknown	Silvestri (1903)
<i>C. (Ptilotopus) sponsa</i> Smith, 1854	<i>Microcerotermes bouvieri</i> (Desneux, 1904)	Pickel (1928)
<i>C. (P.) derasa</i> Lepeletier, 1841	<i>Microcerotermes</i> sp.	Vesey-Fitzgerald (1939); Bennet (1964); Callan (1977)
<i>C. (P.) scopipes</i> Friese, 1899	<i>Procornitermes araujoi</i> Emerson, 1952	Gaglianone (2001)
<i>C. (P.) maranhensis</i> Ducke, 1910	<i>Amitermes amifer</i> Silvestri, 1901	Ramos et al. (2007)
<i>C. (Trachina) longimana</i> Fabricius, 1804	Unknown	Roubik (1983)
EMPHORINI		
<i>Ancylosceles</i> sp. ^c	<i>Cornitermes cumulans</i> (Kollar in Pohl, 1832)	Costa et al. (2009)
EUCERINI		
<i>Gaesochira obscura</i>	<i>Anoplotermes banksi</i> Emerson, 1925	This study
COLLETINAE		
<i>Leioproctus (Leioproctus) nigrofulvus</i> Cockerell, 1914	<i>Coptotermes lacteus</i> (Froggatt, 1898)	Maynard and Rao (2010)
MEGACHILINAE		
<i>Megachile (Callomegachile) pluto</i> Smith, 1860	<i>Microcerotermes amboinensis</i> Kemner, 1931	Messer (1984)

^a Can be found in substrates other than termite nests

^b Possibly incorrect identification

^c No information about the bee identification

termite nest, with many abandoned cells. Ramos et al. (2007) described one nest of *C. maranhensis* in a nest of *Amitermes amifer* (Termitidae, Termitinae).

Although it is premature to claim an obligatory association of these species, the records clearly point to the use of termite nests as substrate for *Centris (Ptilotopus)*. This tendency is repeated by the available records of cleptoparasitic bees associated with *Ptilotopus*: *Acanthopus excellens* Schrottky, 1902 (Gaglianone, 2001; Laroca et al., 1993; Pickel, 1928), and *A. palmatus* (Olivier, 1789) (Bennet, 1964; Rozen, 1969) which emerged from *Centris* nests within termite nests.

Gaesochira (Apinae, Eucerini)

Eucerini is a worldwide bee tribe (although absent in Oceania) with 33 genera and approximately 750 species (Michener, 2007). Its nesting biology and detailed descriptions of larvae have been studied for at least nine

taxa, genus or subgenus (i.e., Michelette et al., 2000; Rozen, 1965, 1991; Rozen and Ayala, 1987). The nests are usually excavated in the ground. The main burrow is more or less vertical with lateral burrows each ending in a cell; the cells are vertical, elongate, and lined with a wax-like material (Rozen, 1991; Michener, 2007). The eucerine genus *Gaesochira* has only one described species, *G. obscura*, known from Colombia and Brazil (states of Amazonas, Pará and Rondônia). Its biology has been heretofore unknown.

Nests of *A. banksi* were studied during an expedition on 10 September 2010, to the banks of Madeira River, municipality of Porto Velho, state of Rondônia, Brazil. The expedition was coordinated by PROBIOTA Consultoria Ambiental during Wildlife Conservation Program/Entomological Monitoring Subprogram of Santo Antônio Energia. Santo Antônio Energia is the concessionaire responsible for build and operating Santo Antônio Hydroelectric Power Plant in Madeira River, as well as implementing its Environmental Programs.

Anoplotermes banksi builds arboreal nests and occurs in Amazonian rain forests from French Guiana (Emerson,

1925; Bourguignon et al., 2009) to the Brazilian state of Rondônia. It feeds on humus (Bourguignon et al., 2009) and, according to Martius and Ribeiro (1996), the nest density of *A. banksi* can reach 18 nests/ha (15% of all epigeal termite nests) in some localities of Amazonia. Along Madeira River banks, at Rondônia, the nest density of this species is also very high (Carrijo, pers. obs.). The nests of this termite are dark gray or brown and are made from feces, fine mineral soil (Martius and Ribeiro, 1996), and probably some wood pieces. The nest is very solid and hard, with the inner walls dark, probably composed of more feces than the lighter outer walls.

The nest of *A. banksi* associated with *G. obscura* was found at the geographic coordinates 9°10'16"S, 64°37'05"W. The termite nest (Fig. 1) was 20 cm wide and 30 cm long, was 20 cm above the soil level, at the base of a tree trunk of 1.3 m in diameter. At least ten entrances of the nests of *G. obscura* were visible, apparently randomly positioned on the surface of the termite nest (Figs. 1, 2). The entrances were circular, 6–7 mm in diameter (Fig. 3). The burrows, also circular, were 4–6 mm in diameter, and extended downward as much as 10 cm from the entrance; although most were 5–7 cm long. A linear series of vertical cells extended downward from each tunnel; the longest such series consisted of seven cells (Figs. 4, 5).

The nests of *Centris* (*Ptilotopus*) are very similar to that described here for *Gaesochira*. As described by Corville et al. (1983), “Burrows enter the walls of the termite nest horizontally, but after a short distance they descend vertically, approximately parallel to the outer surface of the carton. Cells are stacked on top of each other in the vertical section”.

The nests of *G. obscura* were in different stages of development and many adults were found inside the termite nest, making difficult to infer if they were recently emerged or were just cooperating to build the nests and laying eggs. The cells had 5–7 mm in diameter and 7–10 mm in length, with a shiny inner surface (Figs. 4, 5). The cells were full to the middle, or few after the middle, with a soft dark yellow pollen mass provision (Figs. 5, 6c). There were no connections between the cells and burrows of the bees, and the galleries of the termites, suggesting a lack of interaction between host and guest species (Fig. 6).

With this first encounter of *G. obscura* in an *Anoplotermes* nest, it is impossible to classify the associated bee either as a termitophile or termitariophile. It is plausible that *G. obscura* is opportunistic in relation to the nesting substrate, which would make it a termitariophile. It is particularly interesting that, despite the high density of nests, *A. banksi* infrequently has guest animals associated with its nests, if compared to other termite species that build epigeal or arboreal nests (Carrijo, unpubl. data). *Anoplotermes* is a soldierless genus and the guest bee is probably

not looking for defense of the termite individuals (but see discussion below, in overview section), but the nest of this species is quite hard, and could give protection to the bees.

Gaesochira has an unusual morphology among the Eucerini, due to the flattened clypeus and extremely long tibial spurs. Other feature, the elongate scutellum, is indicative of a possible relationship with *Platysvastra* Moure, 1967 and *Florilegus* (*Floriraptor*) Moure and Michener, 1965 (Moure, 1967; Michener, 2007); unfortunately, no comprehensive phylogenetic study for Eucerini is available, and the phylogeny of Apinae (Cardinal et al., 2010) does not include the genera cited above. Without any observation of nest building, it is impossible to link the anatomical structures of *Gaesochira* to the kind of substrate. The basitibial and pygidial plates are not developed enough in comparison to other eucerines to infer a direct adaptation to a hard substrate such as the *Anoplotermes* nest. We speculate that the long tibial spurs might in some way assist in locomotion in tunnels.

The larva of *G. obscura* conforms well to the description of Eucerini larvae presented by Rozen (1965), which have very uniform larval morphology (i.e., Rozen, 1991): labrum extremely broad, bearing a pair of low tubercles, mandibles apically bifid, and tenth abdominal segment small, triangular in lateral view and apically pointed.

Leioproctus (Colletinae, Paracolletini)

Maynard and Rao (2010) reported an association between the solitary *Leioproctus* (*Leioproctus*) *nigrofulvus* and the epigeal nest of *Coptotermes lacteus* in Australia. The authors speculate that *L. (L.) nigrofulvus* should be an obligatory commensal, since there were available nests of other termite species (*Nasutitermes* sp.), but the bee was not using them to nest. The authors also speculate that the bee was probably using the termite nest for protection and access to thermostable sites. In contrast, the termite does not appear to be either positively or negatively affected by the presence of the bee.

Megachile (Megachilinae, Megachilini)

In Indonesia, nests of *Megachile* (*Callomegachile*) *pluto*, the largest known bee, were found in inhabited *Microcerotermes amboinensis* nests, despite the abundance of potential nesting sites. This bee appears to be rare and not found in any other substrate beyond that nest. This association is not yet understood, and Messer (1984) speculated that it may be related to microclimate or protection from predators and parasites.

◀ **Figs. 1–6** Fig. 1 Nest of *Anoplotermes banksi* with the entrances of the nests of *Gaesochira obscura* (arrows); Fig. 2 Nest of *Anoplotermes banksi* opened, showing the burrows and cells in different states of the nest of *Gaesochira obscura*; Fig. 3 Entrance of the nest of *Gaesochira obscura*; Fig. 4 Empty cells of the nest of *Gaesochira obscura*, showing their waxy inner wall; Fig. 5 Cells of the nest of *Gaesochira obscura* with provision and egg (left) and with a larva in advanced stage; Fig. 6 Piece of the nest of *Anoplotermes banksi* showing galleries of both termite and bee: *a* an adult of *Gaesochira obscura* in a burrow; *b* individuals of the termite going out of a gallery of their nest; and *c* a cell of *Gaesochira obscura* with provision

Overview of bee-termite associations

An association between a bee and a nest of Apicotermittinae is provided here for the first time. The Apicotermittinae from the Neotropics are all soldierless termites with poorly known biology (Constantino, 2005; Eggleton, 2000); *A. banksi* is no exception. Despite the lack of soldiers, this species is not defenseless; the workers of *A. banksi* can be aggressive and also defecate in response to threat (Sobotník et al., 2010; Carrijo and Santos, pers. obs.). Also, the arboreal nests of this species are built of a relatively hard soil. Similarly, the pantropical termitine genus *Microcerotermes* can build a very hard carton nest (Constantino, 1999; Roisin and Pasteels, 2000). *Microcerotermes* have proportionally fewer soldiers and the hardness of the nest may also be the reason why some bees search for the nests of this termite.

Because of the diversity of other animals that uses their nests as guests, some termite species are considered as keystone species (Redford, 1984). Many species of the subfamily Syntermitinae build epigeal nests of soil, and these nests host a great variety of guest animals (Costa et al., 2009; Costa and Vanin, 2010). However, in comparison to nests of Nasutitermitinae, the nests of Syntermitinae have fewer bee species. Most bee species are associated with termites of the genus *Nasutitermes* (Fig. 7), the most speciose genus in the Neotropics (Constantino, 1999). *Nasutitermes* species normally build soft carton nests, and soldiers of these species have reduced mandibles (Constantino, 1999). Despite this, the defense of soldiers of Nasutitermitinae is one of the most ecologically successful among termites (Higashi and Abe, 1997); they have a frontal gland associated with a frontal tube (nasus) and a small frontal pore in the tip of the nasus, which is used as a weapon to project a sticky chemical secretion that is irritating and toxic to arthropod predators (Deligne et al., 1981; Prestwich, 1984). The successfully armed soldiers and relative abundance of *Nasutitermes* may be the reason that it is an attractive host for bees (Fig. 7).

Bees that nest on soil must often deal with the serious problem of excessive humidity (Michener, 2007), especially in the tropics. Nesting in cavities such as in rotten wood or in the nests of social insects may allow them to avoid the problem of too much of moisture. This may explain the habit of nesting in termite nests. Another benefit might be

Fig. 7 Number of bee species found in nests of different termite genera. Ap. Apicotermittinae, Nasutitermit. Nasutitermitinae, Rhi. Rhinotermitidae

the protection system offered by the termites, especially in the cases of *Nasutitermes*. Thus, the relationship between these organisms can be seen as an opportunity for the bee, and not harmful for termites.

The primary costs of bee nests for termites may be the use of space. Corville et al. (1983) remarked that after the new adults of *Centris* emerge from the termite nest, the termites incorporate the old bee cells into their nest. This suggests that the bee does not negatively influence the termite colony and probably is commensal, without any important disadvantage for the hosts. Most species associated with termites are eusocial bees, and the space cost for the host species is probably higher, at least in terms of the space that is used by a whole colony of stingless bees. Despite this, most species of Meliponina reported as termitariophiles or termitophiles are known to be very aggressive and may help defend the termite colony from possible aggressors or predators; some of these associations may, therefore, be true mutualisms.

Acknowledgments We are very grateful to PROBIOTA Consultoria Ambiental and Santo Antônio Energia for the execution of the Entomological Monitoring Program from Santo Antônio UHE, and full support in the field during the report of the association between *Gaesochira obscura* and *Anoplotermes banksi*. Partial support was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ph.D. scholarship (to TFC) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Ph.D. Scholarship 07/01296-0 (to RBG). Special thanks for Jerome G. Rozen Jr., Eliana M. Cancellato, Felipe Vivallo, the Associate Editor of this Journal, Miriam Richards, and an anonymous review for comments on the manuscript.

References

- Araujo R.L. 1970. Termites of the Neotropical region. In: *Biology of Termites, Vol. II* (Krishna K. and Weesner F.M., Eds), Academic Press, New York. pp 527–576

- Barreto L.S. and Castro M.S. 2007. Ecologia de nidificação de abelhas do gênero *Partamona* (Hymenoptera: Apidae) na caatinga, Milagres, Bahia. *Biot. Neotrop.* **7**: 87–92
- Bennet F.D. 1964. Notes on the nesting site of *Centris derasa* (Hymenoptera; Apoidea). *Pan-Pac. Entomol.* **49**: 125–135
- Berg K. 1900. Termitariophilie. *Comm. Mus. Nacl. Buenos Aires* **1**: 212–215
- Bourguignon T., Šobotník J., Lepoint G., Martin J.M. and Roisin Y. 2009. Niche differentiation among neotropical soldierless soil-feeding termites revealed by stable isotope ratios. *Soil Biol. Biochem.* **41**: 2038–2043
- Callan E.C. 1977. Observations on *Centris rufosuffusa* Cockerell (Hymenoptera: Anthophoridae) and its parasites. *J. Nat. Hist.* **11**: 127–135
- Camargo J.M.F. 1984. Notas sobre hábitos de nidificação de *Scaura* (*Scaura*) *latitarsis* (Fries). *Bol. Mus. Paraense Emilio Goeldi, Zool.* **1**: 89–95
- Camargo J.M.F. 1970. Ninhos e biologia de algumas espécies de meliponídeos (Hymenoptera: Apidae) da região de Porto Velho, Território de Rondônia, Brasil. *Ver. Biol. Tropic.* **16**: 207–239
- Camargo J.M.F. 1980. O grupo *Partamona* (*Partamona*) *testacea* (Klug): suas espécies, distribuição e diferenciação geográfica. *Acta Amazon.* **10**: 1–175
- Camargo J.M.F. and Moure J.S. 1994. Meliponinae neotropicais: Os gêneros *Paratrígona* Schwarz, 1938 e *Aparatrígona* Moure, 1951. *Arq. Zool.* **32**: 33–109
- Camargo J.M.F. and Pedro S.R.M. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. *Rev. Bras. Entomol.* **47**: 311–372
- Camargo J.M.F. and Posey D.A. 1990. O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera): notas adicionais. *Bol. Mus. Paraense Emilio Goeldi, Zool.* **6**: 17–42
- Cardinal S., Straka J. and Danforth B.N. 2010. Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of cleptoparasitism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**: 16207–16211
- Constantino R. 1999. Chave ilustrada para a identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. *Pap. Avulsos Zool.* **40**: 387–448
- Constantino R. 2005. Padrões de diversidade e endemismo de térmitas no bioma cerrado. In: *Biodiversidade, ecologia e conservação do Cerrado* (Scariot A.O., Silva J.C.S. and Felfili J.M., Eds), Ministério do Meio Ambiente, Brasília. pp 319–333
- Constantino R. and Acioli A.N.S. 2006. Termite diversity in Brazil (Insecta: Isoptera). In: *Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems* (Moreira F., Siqueira J.O. and Brussaard L., Eds), CAB International, Wallingford. pp 117–128
- Corville R.E., Gordon W.F. and Vinson B.S. 1983. Nests of *Centris segregata* (Hymenoptera: Anthophoridae) with a review of the nesting habits of the genus. *J. Kans. Entomol. Soc.* **56**: 109–122
- Costa C. and Vanin S.A. 2010. Coleoptera larval fauna associated with termite nests (Isoptera) with emphasis on the “bioluminescent termite nests” from Central Brazil. *Psyche* **2010**: 1–13
- Costa D.A., Carvalho R.A., Lima Filho G.F. and Brandão D. 2009. Inquilines and invertebrate fauna associated with termite nests of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) in the Emas National Park, Mineiros, Goiás, Brazil. *Sociobiology* **53**: 443–453
- Deligne J., Quennedey A. and Blum M.S. 1981. The enemies and defense mechanisms of termites. In: *Social Insects, Vol. II* (Hermann H.R., Ed), Academic Press, New York. pp 1–76
- Dodson C.H. 1966. Ethology of some bee of the tribe Euglossini (Hymenoptera; Apidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* **39**: 507–629
- Eardley C.D. 2004. Taxonomic revision of the African stingless bees. *Afr. Plant. Prot.* **10**: 63–96
- Eggleton P. 2000. Global patterns of termite diversity. In: *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology* (Abe T., Bignell D.E. and Higashi M., Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 25–53
- Emerson A.E. 1925. The termites from Kartabo, Bartica District, British Guiana. *Zoologica* **6**: 291–459
- Gaglianone M.C. 2001. Nidificação e forrageamento de *Centris* (*Ptilotopus*) *scopipes* Friese. *Rev. Bras. Zool.* **18**: 107–117
- Grassé P.P. 1986. *Termitologia, Tome III. Comportement, Socialité, Ecologie, Evolution, Systématique*. Masson, Paris.
- Higashi M. and Abe T. 1997. Global diversification of termites driven by the evolution of symbiosis and sociality. In: *Biodiversity: an ecological perspective* (Abe T., Levin S.A. and Higashi M. Eds), Springer, New York, pp 83–112
- Kerr W.E., Sakagami S.F., Zucchi R., Portugal-Araujo V. and Camargo J.M.F. 1967. Observações sobre a arquitetura dos ninhos e comportamento de algumas espécies de abelhas sem ferrão das vizinhanças de Manaus, Amazonas. *Acta Simp. Biota Amazônica, Zool.* **5**: 255–309
- Kimsey L.S. 1982. Systematics of bees of the genus *Eufriesea* (Hymenoptera, Apidae). *Univ. Calif. Publ. Entomol.* **95**: 1–125
- Kistner D.H. 1979. Social and evolutionary significance of social insect symbionts. In: *Social insects, Vol. I* (Hermann H.R., Ed), Academic Press, New York. pp 339–413
- Kistner D.H. 1982. The social insect's bestiary. In: *Social Insects, Vol. III* (Hermann H.R., Ed), Academic Press, New York. pp 1–244
- Kistner D.H. 1969. The biology of termitophiles. In: *Biology of Termites, Vol. I* (Krishna K. and Weesner F.M., Eds), Academic Press, New York. pp 525–557
- Laroca S., Reynaud dos Santos D.T. and Schwartz Filho D.L. 1993. Observations on the nesting biology of three Brazilian Centridini bees: *Melanocentris dorsata* (Lepeletier 1841), *Ptilotopus sponsa* (Smith 1854) and *Epicharitides obscura* (Fries 1899) (Hymenoptera Anthophoridae). *Trop. Zool.* **6**: 151–163
- Lenko K. 1971. Nota bionômica sobre a abelha *Trigona recursa* F. Smith (Hymenoptera: Apidae). *Arq. Inst. Biol.* **38**: 75–77
- Martius C. and Ribeiro J.d'A. 1996. Colony populations and biomass in nests of the Amazonian Forest termite *Anoplotermes banksi* Emerson (Isoptera: Termitidae). *Stud. Neotrop. Fauna Environm.* **31**: 82–86
- Maynard G. and Rao S. 2010. The solitary bee, *Leioproctus* (*Leioproctus*) *nigrofulvus* (Cockerell 1914) (Hymenoptera: Colletidae), in SE Australia: Unique termite-mound-nesting behavior and impacts of bushfires on local populations. *Pan-Pac. Entomol.* **86**: 14–19
- Melo G.A.R. and Gonçalves R.B. 2005. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apida sensu lato). *Rev. Bras. Zool.* **22**: 153–159
- Messer A.C. 1984. *Chalicodoma pluto*: the world's largest bee rediscovered living communally in termite nests (Hymenoptera: Megachilidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* **57**: 165–168
- Michener C.D. 2000. *The Bees of the World*. John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Michener C.D. 2007. *The Bees of the World, 2nd Ed*. John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Michelette E.R.F., Camargo J.M.F. and Rozen J.G. 2000. Biology of the bee *Canephorula apiformis* and its cleptoparasite *Melectoides bellus*: nesting habits, floral preferences, and mature larvae (Hymenoptera, Apidae). *Am. Mus. Nov.* **3308**: 1–23
- Moure J. 1967. A new genus and two new species of eucerine bee from South America (Hymenoptera, Apoidea). *Dusenja* **8**: 147–152
- Pickel B. 1928. Contribuição para a biologia de *Centris sponsa* e *Acanthopus excellens* (Hymen.). *Bol. Biol.* **14**: 135–143
- Posey D.A. and Camargo J.M.F. 1985. Additional notes on the classification and knowledge of stingless bees (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera) by the Kayapó Indians of Gorotire, Pará, Brazil. *Ann. Carnegie Mus.* **54**: 247–274

- Prestwich G.D. 1984. Defense mechanisms of termites. *Annu. Ver. Entomol.* **29**: 201–232
- Ramos M., Mendes F., Aluquerque P. and Rêgo M. 2007. Nidificação e forrageamento de *Centris (Ptilotopus) maranhensis* Ducke (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Rev. Bras. Zool.* **24**: 1006–1010
- Ratnieks F.L.W., Piery M.A. and Cuadriello I. 1991. The natural nest and nest density of the Africanized Honey Bee (Hymenoptera, Apidae) near Tapachula, Chiapas, Mexico. *Can. Ent.* **123**: 353–359
- Redford K.H. 1984. The Termitaria of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) and their role in determining a potential keystone species. *Biotropica* **16**: 112–119
- Roisin Y. and Pasteels J.M. 2000. The genus *Microcerotermes* (Isoptera: Termitidae) in New Guinea and the Solomon Islands. *Invertebr. Taxon.* **14**: 137–174
- Roubik D.W. 1979. Nest and colony characteristics of stingless bees from French Guiana (Hymenoptera: Apidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* **53**: 443–470
- Roubik D.W. 1983. Nest and colony characteristics of stingless bees from Panama. *J. Kans. Entomol. Soc.* **56**: 327–355
- Rozen J.G. 1965. The larvae of the Anthophoridae (Hymenoptera, Apoidea). Part 1. Introduction, Eucerini, and Centridini (Anthophorinae). *Am. Mus. Nov.* **2233**: 1–27
- Rozen J.G. 1969. The larvae of the Anthophoridae (Hymenoptera, Apoidea). Part 3. The Melectini, Ericrocini, and Rhathymini. *Am. Mus. Nov.* **2382**: 1–24
- Rozen J.G. 1991. Nesting biology and mature larva of the bee *Idiomelissodes duplocincta* (Hymenoptera: Anthophoridae: Eucerini). *Am. Mus. Nov.* **3012**: 1–11
- Rozen J.G. and Ayala R. 1987. Nesting biology of the squash bee *Peponapis utahensis* (Hymenoptera; Anthophoridae; Eucerini). *J. N.Y. Entomol. Soc.* **95**: 28–33
- Schwarz M. 1948. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **90**: 1–546
- Silvestri F. 1903. Contribuzione alla conoscenza dei Termiti e Termitofili dell'America Meridionale. *Redia* **1**: 1–234
- Silveira F.A., Melo G.A.R. and Almeida E.A.B. 2002. *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação*. Silveira, Belo Horizonte. 253 pp
- Smith F. 1879. *Descriptions of New Species of Hymenoptera in the Collection of the British Museum*. British Museum, London. 240 pp
- Smith F. 1854. Notes on the biology and waxes of four species of African *Trigona* bees (Hymenoptera: Apidae). *Proc. R. Entomol. Soc. Lond.* **29**: 62–70
- Sobotník J., Jirsová A. and Hanus R. 2010. Chemical warfare in termites. *J. Insect Physiol.* **56**: 1012–1021
- Vesey-Fitzgerald D. 1939. Observations on bees (Hymenoptera: Apoidea) in Trinidad, BWI. *Proc. R. Entomol. Soc. Lond.* **14**: 107–110
- Wille A. and Michener C.D. 1973 The nest architecture of stingless bee with special reference to those of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **21**: 1–278
- Wilson E.O. 1971. *The Insect Societies*. Belknap Press, Cambridge.

ANEXO III

Rocha, M.M.; Carrijo, T.F. & Canello, E.M. 2012. **An illustrated key to the soldiers of *Cyranotermes* Araujo with a new species from Amazonia (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae)**. Zootaxa 3196: 50–57

An illustrated key to the soldiers of *Cyranotermes* Araujo with a new species from Amazonia (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae)

MAURICIO M. ROCHA^{1,3}, TIAGO F. CARRIJO^{1,2} & ELIANA M. CANCELLO¹

¹Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Cx. Postal 42.494, 04218-970 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail: mmrocha.cupim@gmail.com; tiagocarrijo@gmail.com, ecancell@usp.br

²Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

³Corresponding author. E-mail: mmrocha.cupim@gmail.com

Abstract

Until now, the Neotropical termite genus *Cyranotermes* was known from three species: *C. timuassu* Araujo, *C. glaber* Constantino, and *C. caete* Cancelló. In this paper a new species, *Cyranotermes karipuna*, **n. sp.**, is described and illustrated from imago, worker, and soldier castes, along with its nest. It is also provided an illustrated identification key to species of *Cyranotermes*, a map with the occurrence of all species, and the first description of the imago caste of *Cyranotermes*, based on the first description of the imago of *C. timuassu*, and the imago of the new species.

Key words: termites, taxonomy, South America, nest, imago

Introduction

The Nasutitermitinae genus *Cyranotermes* was originally described by Araujo (1970), based on the soldier caste of *C. timuassu*, the type species. Mathews (1977) redescribed the genus, adding the description of the worker caste, and new data about the biology and the nest. Fontes described the mandibles and the digestive tube of the worker of *C. timuassu*, including the enteric valve (1987a, b).

Cancelló (1987) described *C. caete*, with illustrations of the soldier and worker mandibles, adding a description and drawings of the nest of *C. timuassu*.

Constantino (1990) described *C. glaber*, with illustrations of the soldier, worker (head, mandibles, and enteric valve), and the nest. In the same work the author included a description of the nest of *C. caete* and an illustrated key for the three species of the genus.

In the current paper, we describe a new species, *C. karipuna* **n. sp.**, from Brazilian Amazonian forest, with details of the imago, soldier, work mandible, and nest. We also provide an illustrated identification key to species of *Cyranotermes* based on the soldier caste, a map with the records of the species, and the description of the imago of *C. timuassu*.

Material and methods

The material used for comparisons and photographs are all paratypes, except for the imago of *C. timuassu*. All the material is deposited in the Isoptera collection of the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). The respective lot numbers are indicated in parenthesis and comprise the following samples (all from Brazil): *C. timuassu*: Distrito Federal, Brasília, Fazenda Água Limpa, 28.xii.1953, R.L. Araujo col. (6868, imagoes, soldiers, and workers), Minas Gerais, Belo Horizonte, 14.ix.1976, R.L. Araujo col. (4233, soldiers and workers). *C. caete*: Pará, Serra dos Carajás, vii–viii.1985, R. Constantino col. (8711, soldiers and workers). *C. glaber*: Amapá, Macapá, 28.x.1984, R. Constantino col. (9221, soldiers and workers).

All geographic coordinates were provided by PROBIOTA Consultoria Ambiental and Santo Antônio Energia. Also, all the specimens of *Cyranotermes karpuna* n. sp. were collected by Probiota Consultoria Ambiental during Santo Antônio Energia's Wildlife Conservation Program/ Entomological Monitoring Subprogram. Santo Antônio Energia is the concessionary responsible for building and operating Santo Antônio Hydroelectric Power Plant in Madeira River, Rondônia State, Brazil, as well as implementing the Environmental Programs of the Hydroelectric.

The terms used for pilosity are comparative: bristles are long erect setae with well-marked bases; hairs are shorter than bristles, less rigid, and with inconspicuous bases; microscopic hairs are very short and visible only under at least 50× magnification. The terminology adopted for the worker mandibles follows Fontes (1987b) and for the digestive tube, Noirot (2001).

The morphometric characters used here and their correspondence with Roonwal's system (Roonwal 1970) are indicated in parentheses as follows: length of head to lateral base of mandibles, LH (5); length of the head with the frontal tube, LR (12); length of the frontal tube, LF (13); maximum width of the head, with eyes when present, WH (17); height of head excluding postmentum, HH (21); maximum diameter of compound eye with ocular sclerite, DE (48); maximum diameter of lateral ocellus, DO (55); maximum width of pronotum, WP (68); length of the tibia, LT (85). All measurements were taken with a micrometric reticle and are presented in millimeters.

Line drawings were made with a camera lucida. The photographs were taken with a digital camera coupled to stereomicroscope at different focal points and then combined using *Combine ZP* software (Hadley 2010). The worker enteric valve was mounted on a slide with glycerin and photographed under an optic microscope. Scales are indicated in each illustration.

Key to the soldiers of *Cyranotermes*

1. Dorsal surface of the head with four sparse bristles, tip of the frontal tube with more than four bristles (Figs. 2A and 3A) *C. timuassu*
- Dorsal surface of the head glabrous; only four bristles at tip of frontal tube 2
2. Ratio "length of frontal tube / length of head without frontal tube" greater than 1.2; head capsule elongated in dorsal view, with the lateral margins almost parallel (Figs. 2B and 3B). *C. caete*
- Ratio "length of frontal tube / length of head without frontal tube" equal or less than 1.0; head capsule rounded in dorsal view, lateral margins converging frontward 3
3. Maximum width of the head equal or larger than 0.80 mm; in profile, frontal tube aligned with the dorsal line of the head (Figs. 2C and 3C) *C. glaber*.
- Maximum width of the head less than 0.75 mm; in profile, a slight depression on the dorsal surface, just before frontal tube, which is thinner and slightly upturned (in relation to the dorsal surface of head) (Figs. 2D and 3D) *C. karpuna* sp. n.

Geographic distribution. Fig. 7 shows the sample records of all *Cyranotermes* species, based on the MZUSP Collection and in literature. Except for *C. timuassu*, there are few samples of the other species.

Cyranotermes timuassu Araujo, 1970

(First description of the imago)

Imago (Figs. 1A, C, and E). Head capsule rounded in dorsal view. Semi-spherical eyes, oval in profile, major diameter approximately equal to one third of the cephalic capsule length, close to the inferior margin of the head. Ocelli elliptical and projected, more visible in profile than in dorsal view, slightly distant from the eyes in profile, major diameter approximately equal to half of eye diameter. Fontanelle approximately elliptical, situated at the same line of the middle of the eyes. Postclypeus inflated, with the median line poorly marked. Antennae with 14 articles. Mandibles illustrated by Fontes (1987b) Left: apical tooth slender, twice the size of M1+2, M3 distinct, molar tooth conspicuous, partially hidden by molar prominence; molar prominence concave without ridges. Right: apical tooth three times the size of M1, M2 absent, molar plate concave and wide, without ridges. Pronotum subtrapezoidal, anterior margin slightly raised and posterior emarginated. Head covered with scattered bristles and microscopic hairs. Pronotum with scattered bristles along the margins, and microscopic hairs on the entire surface, denser on the middle. Abdominal tergites and sternites with a line of bristles on posterior margin, short hairs covering only the last two tergites and all sternites. Legs covered with a layer of short hairs and sparse bristles. Tibial spurs formula 2:2:2. Measurements of two males and one female from the same colony: males. LH: 0.73–0.79;

WH: 1.18–1.19; DE: 0.39–0.40; DO: 0.16–0.18; WP: 0.97–0.98; LT: 1.62–1.64; female. LH: 0.85; WH: 1.21; DE: 0.40; DO: 0.16; WP: 0.99; LT: 1.48.

Comparisons. The other known imago is from *C. karipuna* **n. sp.**, described in this paper. The imago of *C. timuassu* can be easily recognized by the eyes and ocelli proportionally smaller compared to the size of the cephalic capsule, the ocelli less salient and farther from the eyes; in *C. karipuna* **n. sp.** they are very salient and touching the eyes. The shape of the cephalic capsule is different, not rounded and much more elongate, approximately rectangular (without eyes) in the new species. The anterior margin of pronotum is very emarginated and more raised in *C. karipuna* **n. sp.** than in *C. timuassu*.

FIGURE 1. Imagos: *Cyranotermes timuassu* in profile (A) and dorsal view of the head and pronotum (C) and meta and mesonotum (E); *C. karipuna* **n. sp.** in profile (B) and dorsal view of the head and pronotum (D) and meta and mesonotum (F).

FIGURE 2. Soldier head, in dorsal view: *Cyranotermes timuassu* (A); *C. caete* (B); *C. glaber* (C); *C. karipuna* n. sp. (D).

FIGURE 3. Soldier head, in profile: *Cyranotermes timuassu* (A); *C. caete* (B); *C. glaber* (C); *C. karipuna* n. sp. (D).

Cyranotermes karipuna, new species

Holotype. Soldier, part of the lot 14452, labeled “BRA: RO, UHE STO, M. Rocha & J. Cabral col. 14.vi.2011 ATP: TPP1 Amostra: 2Ba”, collected at: 9° 27' 17.60"S, 64° 23' 32.40"W, district of Jaci Paraná, municipality of Porto Velho, state of Rondônia. Kept separately in the same vial with paratypes.

Paratypes. Soldiers and workers with same data as holotype plus: *Rondônia*: municipality of Porto Velho. Jaci Paraná district, coordinates 9° 27' 6.04" S, 64° 21' 28.97" W, 20.ix.2010, T. Carrijo & R. Santos coll. (14455), coordinates 9° 27' 3.76" S, 64° 20' 55.85" W (14454), coordinates 9° 17' 19.07" S, 64° 45' 0.64" W, 9.i.2011, R. Santos & C. Mandai coll. (14453); Teotônio district, coordinates 8° 49' 1.71" S, 64° 5' 43.54" W, 1.vi.2011, M.M. Rocha & J. Cabral coll. (14456).

Etymology. *Karipuna* is an Indian ethnic group of which only 14 individuals remain in the Rondônia state, they live near the Jaci River, close to the type locality of this species.

Imago (Figs. 1B, D and F). Head capsule approximately rectangular (without eyes) in dorsal view. Semi-spherical eyes, oval in profile, major diameter approximately equal to half of the cephalic capsule length, close to

the inferior margin of the head. Ocelli oval and projected, clearly visible in profile and dorsal view, almost reaching the eyes, major diameter approximately equal to half of eye diameter. Fontanelle approximately elliptical; in dorsal view aligned with the center of the eyes. Postclypeus inflated, with the median line well marked. Number of antennal articles uncertain (in all the specimens the antennae are incomplete). Mandibles as described for the worker, except for a narrower molar plate (Fig. 4). Pronotum sub trapezoidal, anterior margin slightly raised, and anterior and posterior margins emarginated. Head covered with scattered bristles and microscopic hairs. Pronotum with scattered bristles around the margins and microscopic hairs on the entire surface, denser on the middle. Abdominal tergites and sternites with a line of bristles on posterior margins, short hairs covering only the last two tergites and all sternites. Legs covered with a layer of short hairs and sparse bristles. Tibial spurs formula 2:2:2. Measurements of one male and one female from the same colony: male LH: 0.65; WH: 0.99; DE: 0.37; DO: 0.17; WP: 69; LT: 1.24; female. LH: 0.67; WH: 1.02; DE: 0.35; DO: 0.16; WP: 0.77; LT: 1.20.

FIGURE 4. Worker mandibles of *Cyranotermes karipuna* n. sp., dorsal view.

Comparisons. See the comparison with *C. timuassu*, above.

Comments. The pronotum of the female is wider than that of the male but, because of the low number of individuals available, we could not characterize it as a sexual dimorphism, as it could be a variation among individuals independent of sex.

Soldier (Figs. 2D and 3D). Head capsule pyriform in dorsal view, slightly strangled below the antennal sockets (Fig. 2D), frontal tube conical and very elongated, slightly upturned in profile (Fig. 3D). Antennae with 13 articles, second half size of first, third equal to first, fourth slightly shorter than second, fifth intermediate and sixth one-third longer than second, subsequent articles sub-equal and similar to sixth. Pronotum margins rounded. Head capsule glabrous, except for the tip of the frontal tube, with four bristles. Pronotum, mesonotum and metanotum glabrous. Abdominal tergites with four to six bristles on posterior margins plus microscopic hairs; terminal tergites also with short hairs; sternites with a line of perpendicular bristles on the posterior margin plus many short hairs. Femur covered with sparse long bristles on the inner and lateral surface, the same on the tibiae, along with many stiff, spine-like hairs in internal margin not organized in a row, first coxae with microscopic hairs and without bristles, other coxae with short hairs. Head capsule pale-yellow, frontal tube ferruginous orange or darker, body pale-yellow. Measurements of 15 individuals from five different colonies: LR: 1.58–1.85; LF: 0.81–0.98; WH: 0.63–0.73; HH: 0.43–0.53; LT: 0.99–1.18.

Comparisons. Soldiers of *C. timuassu* (Figs. 2A and 3A) and *C. caete* (Figs. 2B and 3B) have a rounder head capsule, and proportionally longer frontal tube than *C. karipuna* n. sp.; moreover, *C. timuassu* shows sparse bristles on the head, totally absent in *C. karipuna* n. sp. The closest species is *C. glaber* (Figs. 2C and 3C), but *C. karipuna* n. sp. (Figs. 2D and 3D) is smaller; the frontal tube is narrower, and slightly more upturned; and the head is proportionally slimmer in profile.

Worker. Head capsule close to a trapezoid in dorsal view, postclypeus very inflated and acuminate, Y-suture and fontanelle not visible. Antennae with 14 articles. Head with scattered bristles and some microscopic hairs. Postclypeus with a pair of bristles in the center, on the top, and a few on the front margin and in lateral region; labrum with two rows of three bristles near the center, the proximal erect and others forward oriented. Pronotum with bristles on the margins and scattered microscopic hairs. Tergites and sternites all covered with bristles, sternites also with a dense layer of short hairs and long erect long bristles. Legs covered with sparse bristles and short hairs. Measurements of 15 individuals from five different colonies: WH: 0.81–0.93; LT: 0.87–1.10.

FIGURE 5. Enteric valve armature of the worker of *Cyranotermes karipuna* n. sp.

FIGURE 6. Nest of *Cyranotermes karipuna* n. sp. from Rondônia, Brazil, internal view (A), external view (B).

Worker mandibles (Fig. 4). Left: apical tooth twice the size of M1+2, M3 indistinct, molar tooth conspicuous, partially hidden by molar prominence; molar prominence concave without ridges. Right: apical tooth three times the size of M1, M2 absent, molar plate concave, wide, without ridges.

Worker digestive tube. Morphology as described by Fontes (1987a), differing from *C. timuassu* only in size, smaller but keeping the proportions. Enteric valve (Fig. 5) similar to *C. caete* and *C. timuassu*, with more spines in three layers in the first order cushions, and more clearly distinct between the size of the first and second order cushions than in *C. glaber*.

Biology. Most of specimens were collected foraging in the soil, under rotten logs or abandoned nests. One of the samples (MZUSP 14452), probably an initial colony, was collected with the royal pair (Figs. 6A and 6B), buried in the soil, under a log partially rotten. The nest was a hollow spherical construction of approximately two centimeters in diameter with a unique entrance (Fig. 6A, arrow), and was internally occupied by meander projections from the walls. This nest is similar to those already described for *C. timuassu* and *C. glaber*, although in the last the chambers are larger (about 5 cm of diameter).

FIGURE 7. Known geographic range of the species of *Cyranotermes* based on records from the literature and specimens from the termite collection of the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Acknowledgments

We are grateful to “PROBIOTA Consultoria Ambiental” and “Santo Antônio Energia” for field support; to Dr. Carlos Lamas and Julia Calhau for assistance with the pictures and to Juarez Cabral for the photographs of the nest. This work was partially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, by a post doctoral scholarship to M. M. Rocha, a doctoral scholarship to T. F. Carrijo and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by a grant (Proc nr. 304765/2007-4), to E. M. Cancellato.

References

- Araujo, R.L. (1970) A new genus and species of Brazilian termite (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). *Studia Entomologica*, 13, 365–368.
- Cancello, E.M. (1987) Observation on *Cyranotermes* Araujo, with description of *C. caete*, new species (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 36, 251–255.
- Constantino, R. (1990) Notes on *Cyranotermes* Araujo, with description of a new species (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). *Goeldiana Zoologia*, 2, 1–11.
- Fontes, L.R. (1987a) Morphology of the worker digestive tube of the soil-feeding nasute termites (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) from the Neotropical region. *Revista Brasileira de Zoologia*, 3, 475–501.
- Fontes, L.R. (1987b) Morphology of the alate and worker mandibles of the soil-feeding nasute termites (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) from the Neotropical region. *Revista Brasileira de Zoologia*, 3, 503–531.
- Hadley, A. (2010) Combine ZP software. Available from: <http://www.hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk> (Date of access: July of 2011)
- Mathews, A.G.A. (1977) *Studies on termites from the Mato Grosso State, Brazil*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 267 pp.
- Noirot, C. (2001). The gut of termites (Isoptera) comparative anatomy, systematics, phylogeny. II. – Higher termites (Termitidae). *Annales de la Société Entomologique de France*, 37, 431–471.
- Roonwal, M.L. (1970) Measurement of termites (Isoptera) for taxonomic purposes. *Journal of the Zoological Society of India*, 21, 9–66.