

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA REGINA STRÖHER

**FILOGEOGRAFIA COMPARADA NA FLORESTA ATLÂNTICA USANDO
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

CURITIBA

2017



PATRÍCIA REGINA STRÖHER

**FILOGEOGRAFIA COMPARADA NA FLORESTA ATLÂNTICA USANDO
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

Tese apresentada à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração em Entomologia) da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcio R. Pie

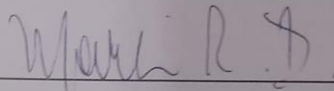
CURITIBA

2017

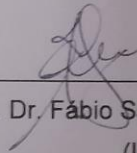
PATRICIA REGINA STRÖHER

"FILOGEOGRAFIA COMPARADA NA FLORESTA ATLÂNTICA USANDO
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO"

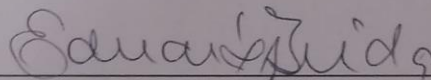
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em
Ciências Biológicas", no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná,
pela Comissão formada pelos professores:



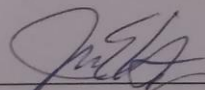
Prof. Dr. Márcio Roberto Pie (Orientador)
(UFPR)



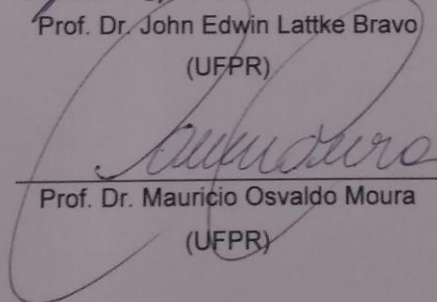
Prof. Dr. Fábio Sarubbi Raposo do Amaral
(UNIFESP)



Prof. Dr. Eduardo Andrade Botelho de Almeida
(FFCL/USP)



Prof. Dr. John Edwin Lattke Bravo
(UFPR)



Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura
(UFPR)

Curitiba, 24 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao meu orientador Prof. Dr. Marcio R. Pie pelo seu apoio dedicado durante meu doutorado, por sua motivação, paciência e notável conhecimento. Tive a sorte de contar com um grande mentor! Muito obrigada!

Meus agradecimentos também ao Prof. Dr. John McCormack, à Dr.^a Eugenia Zarza e à Whitney Tsai pela oportunidade em fazer parte do Moore Laboratory of Zoology durante um ano. Sem o apoio e aprendizado adquirido desta experiência a realização deste projeto não seria possível. Ao Dr. Rodrigo M. Feitosa agradeço pelo privilégio de poder contar com sua assessoria taxonômica e a amizade! Ao meu colega Andreas L.S. Meyer agradeço por toda a sua colaboração e conhecimento climático e ao Dr. Rogério R. Silva deixo meu agradecimento por fornecer os espécimes utilizados nesta tese, obrigada!

Deixo a todos os meus colegas de PieLab, amigos, demais colegas que passaram pela minha vida nestes últimos quatro anos o mesmo sentimento de gratidão. Não quero correr o risco de esquecer alguém, por isso não haverá nomes neste parágrafo. No entanto, foram incontáveis momentos que um comentário, uma palavra amiga, uma piada, um café, um chá e um abraço deixaram o meu dia melhor e renovaram a minha esperança em mim mesma. Obrigada!

Minha família, meu porto seguro. Primeiramente aos meus pais quero expressar mais do que minha gratidão, mas o meu reconhecimento e a minha alegria por ter tido a sorte de mesmo vinda de uma família sem nenhuma tradição acadêmica poder ter contado com toda a ajuda possível para que eu chegasse até esta etapa. E ao meu marido além do constante apoio, quero agradecer pela sua serenidade e tranquilidade sendo contraponto fundamental na minha vida, sua presença foi crucial para que este projeto se tornasse realidade. Muito obrigada! Amo vocês!

APRESENTAÇÃO

Conforme formato requerido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração em Entomologia) da Universidade Federal do Paraná, este documento apresenta todos os elementos obrigatórios exigidos de acordo com as normas para Apresentação de Documentos Científicos publicados pela Editora da UFPR. Após resumo em língua vernácula e em língua estrangeira, o documento é estruturado em capítulos que estão em formato de artigos científicos. No momento da defesa desta tese o capítulo I se encontra submetido em revista científica, o capítulo III publicado na Revista *Insectes Sociaux*, o capítulo IV possui previsão de submissão em breve. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Dinâmica Evolutiva e Sistemas Complexos da Universidade Federal do Paraná (cidade de Curitiba, estado do Paraná, Brasil) e no Moore Laboratory of Zoology (cidade de Los Angeles, estado da Califórnia, EUA). A estudante recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) -140262/2013-0 e bolsa sanduíche no exterior concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - 99999.002880/2014-08.

Sumário

CAPÍTULO I: Sequenciamento de nova geração e entomologia: novas perspectivas para antigos questionamentos	9
CAPÍTULO II: Redução de genomas: usando elementos ultraconservados	42
CAPÍTULO III: The mitochondrial genome of <i>Octostruma stenognatha</i> (Hymenoptera: Formicidae) and its phylogenetic implications	54
CAPÍTULO IV: Comparative phylogeography in the Brazilian Atlantic rainforest	69
REFERÊNCIAS GERAIS	98
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	122

RESUMO

Esta tese usa a filogeografia comparada como ferramenta para o melhor entendimento do passado evolutivo da Floresta Atlântica, um ambiente de rica biodiversidade e reconhecido mundialmente pelos seus altos índices de endemismo. Para cumprir tal tarefa foi realizado um estudo mirmecológico com várias espécies cujas distribuições geográficas contemplam quase a totalidade da distribuição Norte/Sul do bioma. Além de ser um estudo pioneiro com filogeografia comparada em invertebrados neste ambiente, destaca-se o uso do sequenciamento de nova geração para a obtenção de centenas de loci para cada indivíduo em busca de uma visão mais ampla de suas informações genéticas. Devido a estas características o primeiro capítulo desta tese apresenta uma revisão em sequenciamento de DNA e suas aplicações em entomologia a fim de familiarizar o leitor aos métodos utilizados no estudo. Com esta mesma finalidade o segundo capítulo é dedicado ao maior entendimento dos marcadores utilizados nas análises moleculares, os Elementos Ultraconservados. O terceiro capítulo é a primeira descrição de um genoma mitocondrial para o gênero *Octostruma*, resultado que só foi possível graças ao método de sequenciamento utilizado e que exemplifica o poder das novas tecnologias mesmo em organismos não-modelo. Finalmente, o quarto capítulo agrega aos resultados filogeográficos dados de modelagem de nicho para revelar como diferentes espécies responderam às mudanças climáticas durante o Quaternário. Em particular, mostramos que o padrão de distribuição da variabilidade genética na Floresta Atlântica é o produto complexo de fatores históricos (ex. mudanças na extensão das florestas úmidas, disponibilidade de refúgios) e as características biológicas de cada espécie (ex. hábito, capacidade de dispersão, nicho climático ancestral).

Palavras-chave: Filogeografia, Elementos Ultraconservados, Floresta Atlântica.

ABSTRACT

This dissertation uses comparative phylogeography as a tool to better understand the Brazilian Atlantic Rainforest evolutionary past, a place of enormous biodiversity and well known for its high endemism level. To perform this task a myrmecological study was carried out with several species whose geographical distributions span the North/South forest range. It is a pioneering study in this biome using invertebrate's comparative phylogeography and is also novel in the use of new sequencing technologies to obtain hundreds of loci for each individual to provide a broad view of its genetics. Because such singularity the first chapter introduces and reviews the history of DNA sequencing and its applications to entomology, the goal here is to provide to the reader a background about this dissertation's methods. With the same aim, the second chapter is dedicated to present the Ultraconserved Elements, that were used in the molecular analyses. Third chapter is the first description for the mitochondrial genome in the *Octostruma* genus, a result that was only possible because of the sequencing method applied to the study and exemplifies the power of new technologies even to non-model organisms. Finally, the fourth chapter integrates phylogeographical results with environmental niche modeling to reveal how different species responded to the climatic changes during the Quaternary. In particular, we show that the pattern of distribution of genetic variability in the Atlantic Forest is the complex outcome of historical factors (e.g. changes in the extent of humid forests, availability of refugia) and biological characteristics of each species (e.g. habit, dispersal capacity, ancestral climatic niche).

Key words: Phylogeography, Ultraconservative Elements, Atlantic Rainforest

Capítulo I

**Sequenciamento de nova geração e entomologia:
Novas perspectivas para antigos
questionamentos**

Resumo

Este capítulo inicial é uma revisão das novas tecnologias disponíveis para sequenciamento de DNA e sua aplicabilidade nos estudos entomológicos. O texto traz uma perspectiva histórica do assunto, as principais plataformas disponíveis na atualidade e também informações de como estes instrumentos funcionam, discutindo sua utilidade para resolver questões como biogeografia, taxonomia e evolução. No passado, importantes questões evolutivas ficavam com respostas limitadas em várias áreas (incluindo a entomologia), quando o cenário envolvia organismos não modelo. Os métodos anteriores muitas vezes não possuíam protocolos aplicáveis às peculiaridades de cada indivíduo ou espécie que permitissem recuperar a informação contida em seus genomas a fim de resolver indagações filogenéticas e biogeográficas. Outro ponto interessante do sequenciamento de nova geração e insetos diz respeito à possibilidade de recuperação de DNA antigo, como o contido em exemplares de coleções científicas e museus. Estas novas tecnologias tornam possível o acesso a um novo universo de informações que até então estava inacessível aos pesquisadores.

Palavras-chave: Sequenciamento de nova geração. Illumina. DNA antigo.

Abstract

This introductory chapter is a revision of the available new technologies to perform DNA sequencing and its application in entomology studies. A historical view is presented, as well as the currently available tools for studying biogeography, taxonomy and evolution. In the past, important evolutionary questions were limited when non-model organisms were involved. Previous methods commonly lacked protocols adapted to single individuals or species in order to recover the genomic information for addressing phylogenetic and biogeographic topics. Other point related with these new sequencing technologies and insects is the possibility of ancient DNA recovery, as the information in scientific collections and museums. These technologies made possible to address a new informational universe that was previously inaccessible.

Key words: New sequencing generation. Illumina. Ancient DNA.

Introdução

Um campo de estudo ainda jovem e em plena revolução: é assim que podemos falar da Biologia Molecular. Quando analisamos esta área aplicada aos estudos entomológicos (particularmente com a finalidade de resolver questões de sistemática, taxonomia e biogeografia), percebemos que este campo é ainda mais jovem, mas que também está em franco crescimento. E justamente neste momento em que a maioria dos pesquisadores começa a quebrar a barreira entre as duas áreas (entomologia e biologia molecular), seguindo uma tendência científica mundial, a interdisciplinaridade, surgem novas tecnologias que os fazem reaprender o conteúdo há tão pouco tempo assimilado (a autora desta tese inclusa). Faz parte da ciência e de ser um pesquisador, aliás, são as constantes novidades e curiosidade com o desconhecido que atraíram muitos destes pesquisadores para a carreira científica, a necessidade de contínua adaptação não é novidade. Os que mais recentemente aliaram dados moleculares nas suas pesquisas provavelmente já foram inseridos nas técnicas mais atuais e, portanto, não estão passando por esta fase de transição necessária para quem já trabalhava com tais dados. O “*Next-Generation Sequencing*” ou “*Massively Parallel Sequencing*” conhecidos pelas siglas NGS e MPS, respectivamente consistem no sequenciamento de DNA através de milhares de leituras em paralelo gerando milhões de sequências em uma única corrida de um equipamento automatizado. Assim, a intenção deste capítulo é fazer uma revisão do sequenciamento de nova geração e sua aplicação, particularmente nos estudos com insetos a fim de colaborar com entomólogos que queiram incorporar esta nova tecnologia em seus projetos.

Sequenciamento de DNA

Atualmente o sequenciamento de DNA (principalmente em humanos e em outros organismos modelo), permite-nos vislumbrar possibilidades como a medicina personalizada, sequenciamento completo de genomas e reconstrução

de genomas fósseis como plenamente plausíveis, mesmo que estes termos em um passado recente fossem considerados enredo de ficção científica.

O sequenciamento de DNA é resultado de esforços de biologia molecular que começaram a se tornar proeminentes na década de 1950. No entanto, as pesquisas com o intuito direto de sequenciamento do material genético só começaram no início da década de 1970 comandadas por Frederick Sanger. A equipe do Professor Sanger em 1977 publicou dois importantes trabalhos (SANGER et al. 1977a; SANGER et al. 1977b) descrevendo todos os procedimentos necessários para se chegar à leitura dos hoje populares quatro nucleotídeos A, C, G e T que compõem o material genético de todos os organismos, bem como, publicaram o primeiro genoma a ser desvendado, o fago phi X17. O princípio desta técnica perdurou por mais de três décadas como a única forma pela qual cientistas sequenciavam DNA em seus laboratórios, mesmo quando o processo manual passou a ser automatizado no fim da década de 1980 e início da década de 1990, o método era essencialmente o mesmo. Trata-se de um sequenciamento enzimático baseado na interrupção da cadeia pela adição de um dideoxynucleotídeo, que nada mais é do que um nucleotídeo com uma modificação química: não possui o grupo hidroxila (OH) 3', não permitindo a ligação do próximo nucleotídeo. Estes nucleotídeos modificados são marcados com P^{32} que podem ser visualizados através de raios-X. Assim, após a geração dos fragmentos estes eram submetidos a um gel de eletroforese e observados em filmes de raios-X onde tinham suas sequências determinadas (SANGER et al. 1977a). Era um processo manual, com múltiplas etapas, com as leituras realizadas a olho nu e que deixava os cientistas constantemente expostos aos raios-X (MARDIS, 2013), mas de tamanha importância para ciência que rendeu o segundo prêmio Nobel em química para Sanger no ano de 1980. O método Sanger começou a ganhar maior escala e popularização nos laboratórios quando em 1986 a empresa Applied Biosystems, Inc. (ABI) iniciou a comercialização de um sequenciador de DNA baseado em fluorescência que foi desenvolvido anteriormente por Smith et al. (1986). Neste aperfeiçoamento do método, a marcação com P^{32} foi eliminada, gerando uma grande economia de tempo extinguindo várias etapas manuais e com isso aumentando a acurácia ao

eliminar uma das fontes de erro. Outro avanço da mesma época que não pode deixar de ser citado foi o desenvolvimento da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) (MULLIS et al. 1986). Esta técnica permite a amplificação de sequências de DNA em milhões de cópias através de reações em ciclos catalisadas por uma enzima polimerase termoestável, assim a quantidade inicial de DNA usada pôde ser bem menor (MARDIS, 2013).

Após aproximadamente uma década sem grandes revoluções no sequenciamento de DNA, o lançamento de sequenciadores de capilar teve um grande impacto na área. Estes instrumentos resolveram o problema com relação ao gel eletroforético ao injetar as amostras diretamente em uma matriz de capilares, proporcionando uma resolução individual dos nucleotídeos. O equipamento de maior sucesso foi o ABI PRISM® 3700, que começou a ser comercializado em 1999. Este modelo, logo seguido de sua versão posterior ABI 3730, foram os principais instrumentos utilizados no sequenciamento do genoma humano e do rato (MARDIS, 2013). O projeto genoma humano foi oficialmente declarado finalizado em 2003, dois anos antes do previsto (CHIAL, 2008), mas teve seu início ainda no ano de 1990 (WATSON, 1990), portanto, levou mais de uma década para que as três bilhões de bases fossem decifradas com um orçamento inicial de também três bilhões de dólares (WATSON, 2001). Com este grande salto em conhecimento e entusiasmo dos pesquisadores ao redor do mundo em utilizar dados genômicos, logo empresas de biotecnologia perceberam que uma nova forma de sequenciamento mais rápida e menos laboral seria necessária para tornar a genômica trivial a todos os organismos. Era o início de uma nova era no sequenciamento de DNA, onde novas tecnologias passaram a ser desenvolvidas não mais por biólogos, mas também por engenheiros, não mais em universidades, mas em empresas. Isto individualmente, resultou em uma revolução que produziu equipamentos capazes de realizarem o mesmo trabalho de trinta mil sequenciadores dos modelos usados no início dos anos 2000, juntos (SCHNABLE, 2010).

Sequenciamento de Nova Geração

Em meados de 2005, após quase trinta anos de sequenciamento pelo mesmo método, surgiram os primeiros equipamentos com uma abordagem alternativa à Sanger (MARGULIES et al. 2009). Uma tecnologia onde o DNA a ser sequenciado é usado para construir uma biblioteca de fragmentos que possuem DNAs sintéticos (adaptadores) ligados covalentemente a eles. Esses adaptadores são sequências universais, específicos para cada plataforma, usados pela polimerase para amplificar os fragmentos das bibliotecas. Esse processo ocorre geralmente em uma superfície sólida, seja em vidro plano ou em volta de “*beads*” (microesferas magnéticas). Em essência os instrumentos de sequenciamento de nova geração conduzem à amplificação dos nucleotídeos e à detecção (o sequenciamento em si) em uma única etapa, enquanto o método Sanger realiza os dois processos separadamente (MARDIS, 2013). Além do baixo rendimento, o sequenciamento via método Sanger, para obter bons resultados, requer que o DNA amplificado esteja em alta concentração (POLZ & CAVANAUGH, 1998) e fornece um único padrão de sinal, ou eletroferograma, para cada sequência gerada. Ambas as características diferem da tecnologia de nova geração que pode ser conduzida com baixas concentrações de DNA e produz milhões de sinais em paralelo para a mesma sequência (SHOKRALLA et al. 2014).

Outro contraste entre os dois métodos que vale ser mencionado é o tamanho da sequência produzida. Enquanto o método Sanger (após décadas de refinamento) produz fragmentos com ≈ 1000 pares de base (pb) (SHENDURE & HANLEE, 2008), os primeiros sequenciadores de nova geração produziam fragmentos com apenas 150-200 pb (SCHUSTER, 2007). Atualmente, o sequenciamento de nova geração já capaz de produzir fragmentos com mais de 500 pb (GLENN, 2016). A taxa de erro no sequenciamento de nova geração que no início era mais elevada do que a do método Sanger, foi sendo diminuída juntamente com o aprimoramento das plataformas e atualmente não pode mais ser apontada como uma crítica às novas tecnologias (SHOKRALLA et al. 2014). Mas, uma das principais vantagens do sequenciamento de nova geração ainda

não foi mencionada: o custo. Após o investimento inicial com um novo equipamento o custo por megabase é inferior a \$ 0.10 com a possibilidade de sequenciamentos completos de genomas em um período inferior a uma semana (GLENN, 2016). Assim, os custos e prazos são apenas uma fração dos necessários para o sequenciamento via método Sanger.

O pequeno tamanho das sequências produzidas inicialmente aliada à necessidade de compra de novos equipamentos podem ser explicações para a maioria dos cientistas, a princípio, não adotarem o novo método. Mesmo as versões iniciais da plataforma **454** (considerado o primeiro sequenciador de nova geração) que facilmente geravam o equivalente à mesma informação de 50 sequenciadores modelo 3730XL da Applied Biosystems (método Sanger), com apenas um sexto do custo, tiveram reações surpreendentemente reservadas (SCHUSTER, 2007). Na verdade, houve certa resistência da comunidade científica em alterar a forma que há tanto tempo vinha sendo utilizada no sequenciamento de material genético. Este fato pode ser observado pelo reduzido número de artigos que utilizaram a nova tecnologia nos primeiros anos após o lançamento das primeiras plataformas. Ao invés de abraçar a nova tecnologia e rapidamente adaptar-se para aproveitar seu enorme potencial, muitos cientistas acostumados ao método Sanger, levantaram questionamentos com relação à acurácia, tamanho dos fragmentos gerados, custo de infraestrutura ou apenas a objeção de lidar com o grande volume de dados gerados pela nova tecnologia. Este ceticismo, que se iniciou nas agências de financiamento, pode ter sido impulsionado pelo medo de que investimentos substanciais no sequenciamento Sanger poderiam se tornar obsoletos (SCHUSTER, 2007).

Somente agora, praticamente uma década após o lançamento do sequenciamento de nova geração, é que essas tecnologias ganham maior popularidade no meio científico. O estranhamento inicial e as preocupações com relação à acurácia e eficiência já foram superados. Cada dia mais cientistas percebem que esta é uma tecnologia que está transformando “o que nós pesquisamos, como nós pesquisamos e quanto irá custar” (GLENN, 2011). Conseqüentemente, muitos centros de genômica têm reduzido gradualmente os

seus sequenciadores Sanger e passaram a incorporar a tecnologia NGS (SHOKRALLA et al. 2014). O desafio agora é treinar e formar profissionais para que o sequenciamento de nova geração que já é viável se torne realidade como ferramenta de estudos para outras áreas além da genética e biologia molecular.

Plataformas

Nesta revisão será usada a mesma nomenclatura proposta por GLENN 2011, em que são chamadas plataformas de 2ª geração as que necessitam da amplificação prévia de DNA para o sequenciamento, 3ª geração para as plataformas que sequenciam diretamente e individualmente as moléculas de DNA e simplesmente plataformas de sequenciamento de nova geração, indicadas com a sigla “NGS” para de forma genérica fazer referência aos instrumentos de 2ª e 3ª geração. As plataformas aqui discutidas serão as que estão disponíveis atualmente e/ou as mais largamente utilizadas, tendo em vista que algumas plataformas que surgiram já estão praticamente extintas ou simplesmente não possuem instrumentos disponíveis para venda, como o sequenciador **Helicos** (NIKOLAKI & TSIAMIS, 2013). A maioria das plataformas necessita que o DNA seja fragmentado em sequências curtas, entre 200-100 pb, e que a solução contenha primers ou adaptadores, ou seja, a construção de uma biblioteca se faz necessária (GLENN, 2011). Abaixo segue uma breve descrição destes equipamentos:

- **454-** A primeira plataforma NGS comercialmente disponível foi lançada no ano de 2005, atualmente faz parte dos equipamentos comercializados pela empresa Roche e seu princípio usa o pirosequenciamento. Esta técnica utiliza *beads* e inicia o processo com uma única molécula de DNA que é amplificada em uma PCR de emulsão e, em seguida, as milhões de *beads* são transferidas para uma placa. Nesta placa cada *bead* só encaixa em apenas uma nanofenda onde serão sequenciadas em paralelo. O processo utiliza uma enzima luciferase que produz luz detectável a cada vez que um nucleotídeo é incorporado e assim permite o sequenciamento (MARGULIES et al. 2005). Em outubro de 2013

foi realizado um anúncio pela empresa Roche comunicando que até meados de 2016 a empresa iria gradualmente descontinuar a venda de equipamentos baseados em pirosequenciamento. Atualmente o sequenciador continua anunciado no website da empresa, mas começam a surgir os primeiros relatos de pesquisadores comunicando que não há mais a possibilidade de adquirir os kits de reagentes para o correto funcionamento do sequenciador.

- **Illumina**- Inicialmente lançada com o nome de **Solexa** foi subsequentemente adquirida pela companhia Illumina de onde vem o nome atual. O princípio deste método usa *bridge* PCR, onde pontes de DNA são criadas e amplificadas em uma superfície sólida, criando agrupamentos chamados de *clusters*. Os milhões de *clusters* produzidos possuem, cada um, mais de mil cópias do DNA inicial que serão sequenciados com uma estratégia similar ao método Sanger. A diferença é que apenas terminadores marcados por fluorescência são utilizados e há a garantia de que a cada etapa somente um nucleotídeo será incorporado. A cada incorporação o nucleotídeo é detectado por um dispositivo de leitura que interpreta qual a identidade do mesmo, o sequenciamento ocorre em paralelo em todos os *clusters* ao mesmo tempo (MOROZOVA & MARRA, 2008). No início de 2014 a companhia anunciou um novo sistema, o **HiSeq X™ Ten Sequencing System**. Este produto quebrou a “barreira do som” da genômica ao se tornar capaz de sequenciar um genoma humano completo por apenas mil dólares gerando seis bilhões de bases por dia, podendo sequenciar mais de 18 mil genomas por ano. Atualmente o portfólio da plataforma Illumina é composto por seis equipamentos que se diferenciam entre si na escala e tamanho das sequências geradas: Illumina MiniSeq, Illumina MiSeq, Illumina NextSeq 500/550, Illumina HiSeq 1500/2500, Illumina HiSeq 3000/4000 e Illumina HiSeq X Ten.
- **SOLiD**- No presente esta plataforma é administrada pela Thermo Fisher Scientific, empresa resultante primeiramente pela fusão das

companhias Applied Biosystems e Invitrogen, formando a Life Technologies Corporation em 2009. Em 2014 a empresa foi adquirida pela Thermo Fisher Scientific, por este motivo ainda é comum encontrarmos nomes de diferentes empresas associadas a esta plataforma. A tecnologia SOLiD também faz uso das *beads*, mas aqui elas são inseridas diretamente em *chip* onde ocorre a leitura das sequências. Estes *chips* podem ser divididos em oito áreas, permitindo a análise de oito bibliotecas simultaneamente. Outra diferença é que as bases são determinadas por meio de ligação, ou seja, a enzima utilizada é uma DNA ligase ao invés da conhecida DNA polimerase (GLENN, 2011). Atualmente o alto custo para aquisição e a limitação de aplicações tornam esta plataforma praticamente inviável, sendo considerada um “potencial zumbi” (GLENN, 2016).

- **Ion Torrent-** É uma plataforma também administrada pela empresa Thermo Fisher Scientific. Sua estratégia de sequenciamento é similar à aplicada pela **454**, com o contraste de que esta tecnologia detecta íons de hidrogênio (H^+) ao invés de sinal luminoso. A utilização de H^+ implica na não necessidade de uso de lasers, câmeras ou marcadores fluorescentes. O lançamento dos primeiros equipamentos ocorreu no final no ano de 2010. No segundo semestre de 2012 foi lançado o sucessor deste equipamento, o **Ion Proton** que utiliza *chips* maiores sendo capaz de gerar 10 gigas de informação por corrida (NIKOLAKI & TSIAMIS, 2013). Em setembro de 2015 foi lançado o **Ion Torrent – S5** com a possibilidade de uso de três novos *chips*, permitindo ao pesquisador escolher qual o mais conveniente com a sua necessidade de escala de sequenciamento. Infelizmente os novos *chips* não são operáveis entre os equipamentos da plataforma “Ion”. Esta tecnologia, em especial o S5, pode ser vista como uma alternativa aos equipamentos Illumina MiniSeq, Illumina MiSeq e Illumina NextSeq 500/550, no entanto, sua baixa

representatividade nos laboratórios e a baixa disponibilidade de softwares ainda não o tornaram competitivo (GLENN, 2016).

- **PacBio-** Foi a plataforma de 3ª geração que alcançou maior notoriedade, a empresa Pacific Biosciences desenvolveu um equipamento capaz de sequenciar moléculas únicas de DNA em tempo real. Isto é possível pela observação imediata da enzima DNA polimerase, em que as bases são detectadas no exato momento em que ocorre a síntese, isto é praticável por uma marcação fluorescente (GLENN, 2011). Uma desvantagem dos sequenciadores de 3ª geração é a taxa de erro, superior aos índices das outras plataformas (QUAIL et al. 2012). No início de 2016 a empresa lançou um novo equipamento chamado **Sequel System**, um equipamento menor, mais leve que custa metade do valor e com capacidade de sequenciamento sete vezes maior do que o seu antecessor. No entanto, a tecnologia continua muito mais cara do que o Illumina e com maior taxa de erro, embora promessas de aperfeiçoamento na plataforma a torna muito promissora (GLENN, 2016).
- **MinION-** Plataforma apresentada pela empresa britânica Oxford Nanopore em 2012, mas sua tecnologia vem sendo desenvolvida desde a segunda metade da década de 1990 (KASIANOWICZ et al. 1996). Aqui o sequenciamento se faz por meio de sinais elétricos detectados no momento em que os nucleotídeos passam através de nanoporos (NINOMIYA et al. 2013). O equipamento todo possui o tamanho similar a um HD externo onde as amostras são inseridas e o sequenciador é acoplado diretamente aos computadores dos pesquisadores. Causou grande entusiasmo na comunidade científica, ao permitir, por exemplo, imaginar o sequenciamento de DNA tão acessível que este poderia ser realizado em campo. Infelizmente, após vários adiamentos, ainda não apresenta data para ser lançado no mercado. Em abril de 2014, alguns cientistas ao redor do globo foram selecionados para testar o equipamento em seus laboratórios e imediatamente surgiram fotos nas mídias

sociais da plataforma em uso no dia-a-dia (NEXTGENSEEK, 2014). Após dois anos de uso a plataforma apresenta grandes melhorias, embora sua alta taxa de erro ainda seja considerada como um fator limitante e que possivelmente está impedito sua ampla comercialização (GLENN, 2016). É um produto que gera muita expectativa, mas após quatro anos de espera continua considerado apenas como “uma promessa”.

- **GenapSys-** Faz parte do portfólio da empresa Sigma-Aldrich por ainda não ter sido lançado oficialmente não divulgou detalhes da sua tecnologia, mas promete ser uma nova alternativa de sequenciador portátil e atualmente está recrutando pesquisadores para testar a nova plataforma (GLENN, 2016).
 - **Genia-** Finalizando os sequenciadores de moléculas únicas, este equipamento é considerado uma combinação das tecnologias da Oxford Nanopore, Illumina e Pacbio (ROBISON, 2016). Detalhes do funcionamento da tecnologia foram surpreendentemente publicados em acesso aberto recentemente (FULLER et al. 2016). A empresa foi adquirida pela Roche em 2014 e afirma que em breve será possível sequenciar um genoma humano por apenas 100 dólares (GENIA TECHNOLOGIES, 2016).

As plataformas **454**, **Illumina** e **SOLiD** são as mais populares em laboratórios acadêmicos (GLENN, 2016), estes três equipamentos possuem estratégias distintas quanto ao tamanho de fragmentos produzidos. Enquanto o **454** produz um número de leituras menor em cada corrida com fragmentos maiores, o **Illumina** e **SOLiD** produzem um número maior de leituras e fragmentos com tamanhos menores. Aqui cabe uma consideração com relação ao número de pares de base necessários para se considerar uma leitura curta ou longa. Segundo Glenn (2011), são considerados fragmentos curtos aqueles ≤ 50 bases consecutivas, fragmentos médios aqueles que possuem ≥ 51 , mas < 400 bases consecutivas, fragmentos longos aqueles com ≥ 400 , mas < 1000 bases consecutivas e, finalmente fragmentos estendidos aqueles > 1000 bases.

Leituras longas são mais indicadas em casos onde o objetivo é a caracterização de todo o genoma ou transcriptoma, uma vez que fragmentos longos são mais fáceis de serem montados do que fragmentos curtos. No entanto, o baixo custo e o incremento no número de leituras associado os sequenciadores de fragmentos curtos os tornam mais adequados em casos de resequenciamento (quando um genoma completo já está disponível) ou em casos em que a frequência de leituras é importante como estudos de expressão gênica (GLENN, 2011). Mas, é importante lembrar que praticamente todas as plataformas estão aumentando progressivamente o tamanho dos fragmentos gerados, assim muitas das plataformas podem ser usadas para as mesmas aplicações. Então, entre tantas possibilidades, qual escolher? Levando em consideração o tempo, custos e tamanhos de fragmentos, um veredicto atual sobre qual é a plataforma mais apropriada para estudos em organismos não modelo, o título fica com a plataforma **Illumina**. Enquanto a tecnologia da Oxford Nanopore e similares não chegam a todos e ao mercado, Illumina aparece como a plataforma de escolha na maioria dos laboratórios e mesmo quando as mais recentes tecnologias se consolidarem e se tornarem confiáveis, o equipamento Illumina provavelmente continuará dominante, competitivo e estes deverão coexistir por um período (YODER, 2014).

Se o sequenciamento de nova geração é uma realidade que vem aumentando o tamanho dos fragmentos e baixando os custos criando a sensação de que só existem benefícios, precisamos mencionar que as novas tecnologias também possuem suas desvantagens. O Calcanhar de Aquiles do NGS é sem dúvida o recurso computacional necessário para as análises (EL-METWALLY et al. 2013). A montagem dos genomas surge como um problema, pois é impossível sequenciar diretamente um genoma inteiro em apenas uma leitura usando as tecnologias atuais. Os métodos de sequenciamento quebram as leituras randomicamente e as leem de forma individual, o processo de reconstrução total do genoma requer grande poder computacional para fazer a junção correta dos fragmentos até o nível cromossômico.

Devido a estas limitações em recursos computacionais, a construção dos genomas é a tarefa mais difícil enfrentada pelas novas tecnologias de

sequenciamento. Alguns equipamentos geraram um volume de dados tão grande que foram considerados impossíveis de serem totalmente examinados (EGAN et al. 2012). A necessidade de computadores tão potentes deve-se também aos milhões de fragmentos curtos produzidos, tendo em vista que estas sequências requerem análises mais intensas para serem agrupadas.

Não bastasse o desafio computacional dos extensos dados gerados, outra dificuldade é o fato destes não serem comunicáveis entre si. Cada plataforma gera seus arquivos em formatos únicos e possuem seus próprios protocolos para montagem e análise dos dados (METZKER, 2009). E quando o sequenciamento é feito de forma terceirizada, muitas vezes, é mais rápido enviar as sequências produzidas, gravadas em dispositivos físicos, via serviço postal tradicional ao invés de fazer o *download* das sequências via *web* (JONES et al. 2012). O *download* de sequências é comum no caso do sequenciamento tradicional Sanger, mas em NGS, mesmo quando os dispositivos precisam ser transportados entre continentes o serviço postal é vantajoso, pois o *download* pode levar meses! Em língua inglesa o termo *Sneakernet* é informalmente usado para definir esta transferência de arquivos usando um componente físico, estratégia que também é usada no caso da entrega dos resultados do NGS.

Ferramentas e conhecimento em bioinformática são essenciais para quem deseja lidar com os dados de forma crua, ou seja, assim que eles saem das plataformas de NGS. As ferramentas atuais ainda não possuem interfaces interativas aos usuários, de fácil configuração e independência do sistema operacional, tornando-se um desafio para os pesquisadores sem profundos conhecimentos em informática (EL-METWALLY et al. 2013). Embora promessas de novos programas que irão permitir avanços técnicos para que as tecnologias de NGS continuem evoluindo e ao mesmo tempo se tornem mais acessíveis e populares tenham sido feitas (EGAN et al. 2012), atualmente a grande maioria das análises continuam sendo executadas através de “linhas de comando”.

Como é possível usar a maioria das plataformas para a maior parte das aplicações, a economia de dinheiro, o tempo para aquisição dos dados e o tempo necessário para analisar a quantidade de informação gerada são itens

importantes para a escolha da plataforma (GLENN, 2011). Com o número de equipamentos disponíveis aumentando e os custos diminuindo, dependerá apenas do nosso conhecimento em relação aos sistemas e da nossa criatividade desenvolver e adaptar estas tecnologias para obtermos dados de nosso interesse de forma eficiente. Ao aplicar estas novas tecnologias aos nossos organismos de estudo, que até pouco tempo estavam fora do alcance deste campo, expandimos também toda uma área de conhecimento. Esta afirmação tem base na ideia de que plataformas de NGS estão ajudando a abrir áreas de investigação biológica inteiramente novas, incluindo a investigação de genomas antigos, a caracterização de diversidade ecológica e a identificação de agentes etiológicos desconhecidos (MARDIS, 2008).

Sequenciamento de nova geração e organismos não modelo: Entomologia

As plataformas de nova geração tornaram o sequenciamento mais acessível aos organismos não modelo, como boa parte dos insetos. É uma era em que praticamente qualquer organismo pode ser estudado de forma genômica (EKBLUM & GALINDO, 2010) e que faz surgir inclusive novas áreas de estudo, como a “ecologia genômica” (GILAD et al. 2009). Com a mudança do reino da genômica de endereço, saindo de estudos baseados em grandes laboratórios com espécies modelo para estudos de populações naturais, as pesquisas podem agora abordar importantes questões ecológicas e evolutivas em uma escala de precisão que soaria irrealista há apenas alguns anos atrás.

O método anterior requer o desenvolvimento de protocolos individualizados para a maioria das espécies, com *primers* específicos para a PCR (necessária na amplificação preliminar do DNA), além de ajustes finos em tempos e temperaturas. Pela imensa diversidade encontrada em insetos, na grande maioria das vezes não era possível aplicar o mesmo protocolo em diferentes organismos, em alguns casos até mesmo entre espécies muito próximas filogeneticamente. Isto limitava o número de marcadores moleculares que poderiam ser usados em insetos, ficando possível em boa parte dos estudos o uso apenas do DNA mitocondrial, pois este possui um genoma infinitamente

menor e mais conhecido do que o nuclear. Isto facilitou o desenvolvimento de alguns *primers* genéricos que permitem seu uso em diferentes espécies, além das mitocôndrias possuírem múltiplas cópias em cada célula, aumentando a taxa de sucesso na amplificação final. No entanto, o material genético mitocondrial muitas vezes não contém informação necessária para responder muitas perguntas filogenéticas. Assim, parece até “injusto” que após o sequenciamento de nova geração superar a inércia de praticamente três décadas na área (SCHUSTER, 2007), e que vivendo em plena era genômica alguns pesquisadores continuem a usar a mesma tecnologia que traz resultados semelhantes há tantos anos.

É preciso saber tirar proveito desta nova era de informação a fim de responder os principais questionamentos que envolvem estudos em organismos não modelo. Inicialmente a aplicação mais comum para o NGS nestes casos foi a caracterização de transcriptomas (EKBLÖM & GALINDO, 2010), ou seja, descrever como os genes são expressados em determinados tecidos, estágios de vida ou sob pressão de condições específicas. Um exemplo deste tipo de abordagem é o trabalho de Feldmeyer et al. (2013) utilizando insetos sociais. Este estudo com uma formiga do gênero *Temnothorax* utilizou sequenciamento de nova geração para tentar responder um questionamento que remota a época de Darwin: explicar a evolução das castas sociais, em especial das operárias (DARWIN, 1859). A tecnologia NGS permitiu a comparação dos genomas de uma rainha e de três operárias com funções distintas na colônia, com os resultados apontando para cerca de 2500 genes que são diferencialmente expressos entre os indivíduos estudados. A técnica empregada neste caso chama-se RNA-Seq e consiste na detecção e quantificação de RNA em uma amostra em um determinado momento usando uma plataforma NGS (WANG et al. 2009). Mas, um dado não relacionado com o transcriptoma (expressão dos genes) e sim com a bioinformática chamou a atenção neste estudo: menos de 50% das sequências produzidas foram anotadas, um resultado que não era esperado uma vez que já existem diversos genomas de formigas sequenciados e anotados.

Aqui chegamos a um ponto que pode ser frágil quanto ao uso de NGS e sequenciamento completo de genomas em organismos não modelo. Como apenas fragmentos curtos são gerados, para que o genoma possa ser montado e anotado é preciso que já exista um genoma previamente sequenciado de outro organismo filogeneticamente próximo. Este genoma de um parente do grupo que está em investigação, serve como referência para que as sequências curtas produzidas pelos equipamentos NGS sejam encaixadas, como em um quebra-cabeça. Assim, o sequenciamento completo de genomas, bem como o desenvolvimento de marcadores é facilitado para os organismos que já possuem parentes filogenéticos com genomas sequenciados. Em insetos, este é o caso principalmente de organismos pertencentes à Diptera (CELNIKER et al. 2002), Coleoptera (RICHARDS et al. 2008), Lepidoptera (THE INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM, 2008) e Hymenoptera (GADAU et al. 2012). Isto não significa que organismos sem espécies proximamente relacionadas com genomas sequenciados não possam se beneficiar da tecnologia NGS, a estes ainda estão disponíveis outras abordagens capazes de produzir milhares de sequências, com baixo custo em um curto espaço de tempo (Capítulo 2).

É importante ressaltar que já há alguns anos estas tecnologias modernas de sequenciamento estão sendo consideradas como o novo padrão para alguns pesquisadores na área filogenética (MCCORMACK & FAIRCLOTH, 2012), inclusive sendo aplicadas para elucidar questões de filogeografia (O'NEIL et al. 2013). O uso de NGS permite uma coleta de dados em escalas maiores viabilizando estudos mais robustos sobre a história demográfica de populações e suas variações de aptidão associadas aos ambientes (STEINER et al. 2013).

Outra aplicação do NGS aos estudos entomológicos em especial é a implementação do “*DNA barcoding*” ou código de barras. Nesta técnica uma pequena parte variável do genoma (usualmente mitocondrial) é sequenciada a partir de amostras não especificadas. A informação contida na sequência é então utilizada para identificar as espécies presentes na amostra (VALENTINI et al. 2009). O DNA código de barras pode ser usado para detectar espécies crípticas (JANZEN et al. 2012; CHACON et al. 2013), para investigar interações

ecológicas complexas (SMITH et al.2011) e até para determinar o conteúdo de produtos comerciais (WALLACE et al. 2012). Esta abordagem também está sendo empregada com insetos em pesquisas de monitoramento ambiental, como em BRODIN et al. (2012) que mostrou um incremento de 10% para mais de 90% no sucesso em identificação de espécies de Chironomidae (Diptera) em amostras bentônicas do Mar Báltico através do uso de NGS.

Uma vez que as tecnologias de NGS estão se tornando acessíveis para vários cientistas, tornam-se possíveis também trabalhos que possibilitem inferências puramente ecológicas e/ou evolutivas através destes tipos de dados (FUKATSU, 2012). Como referência a estas aplicações pode-se citar a pesquisa com uma espécie de Pyrrhocoridae (Hemiptera) e a caracterização de sua microbiota intestinal. A conclusão principal foi que a maioria das bactérias está localizada na região anóxica do sistema digestivo, levando a considerações importantes com relação ao mutualismo e à coevolução destes organismos (SUDAKARAN et al. 2012). O estudo conseguiu avaliar diferentes regiões do trato digestivo dos insetos, em diferentes fases de desenvolvimento, de diferentes regiões geográficas e que se alimentaram de distintas dietas. Esta enorme quantidade de sequências que revelou em detalhes a microbiota destes insetos seria praticamente impossível de ser produzida utilizando apenas técnicas tradicionais.

É importante também ressaltar a importância da tecnologia em estudos médico-veterinários relacionados aos insetos, como sequenciamento do genoma da mosca tsé-tsé (ATTARDO et al. 2014). A *Glossina morsitans* é o vetor para a famosa doença do sono e que constitui um flagelo para as populações da África Subsaariana, o tratamento é longo e complicado e sem ele a doença é geralmente fatal (WELBURN et al. 2009). A decodificação deste material genético permitirá o reconhecimento de genes responsáveis pelo desenvolvimento inseto, contribuindo para elaborar novas estratégias de controle. O genoma levou uma década para ser concluído e custou \$10 milhões, o projeto teve início em um período pré-NGS, mas mesmo assim chegou a usar as novas tecnologias em fases subsequentes (ATTARDO et al. 2014). Como o sequenciamento do genoma ficou mais rápido e barato o Instituto Nacional de

Saúde dos Estados Unidos fomentou o sequenciamento de outras cinco espécies de *Glossina* que foi realizado em menos de dois anos, permitindo inclusive estudos de caracterização de potenciais genes alvo no controle da mosca (MACHARIA et al. 2016).

Em termos de conservação, análises genômicas que antes eram limitadas aos organismos modelo agora podem ser aplicadas a espécies ameaçadas a fim de estimar recentes acontecimentos demográficos, variação genética e a estrutura das populações (STEINER et al. 2013). Tendo em vista que o fluxo gênico entre unidades de conservação é um fator muito importante em termos de manutenção destas populações, uma técnica como NGS que traz uma grande quantidade de informações, em um curto período de tempo e com baixo custo é uma ferramenta importante para mensurar estas conexões.

DNA Histórico e Coleções Científicas

O campo de estudos com DNA antigo começou a ganhar ânimo na metade da década de 1980 quando ocorreu a extração e sequenciamento do DNA do Quagga, um equídeo da África do Sul que foi extinto no século XIX (HIGUCHI et al. 1984), seguido do anúncio do sequenciamento do material genético de uma múmia egípcia (PÄÄBO, 1985). Estes trabalhos utilizaram clonagem bacteriana para amplificar pequenas sequências de DNA (as amostras foram retiradas da pele destes espécimes) e mostraram que a origem da maioria do material genético extraído era de micróbios ou fungos. Apenas uma pequena porcentagem do DNA pertencia aos organismos em estudo e eram compostos principalmente de DNA mitocondrial (RIZZI et al. 2012). Alguns anos mais tarde o desenvolvimento da PCR deixou mais acessível à amplificação de DNA antigo, resultando em uma rápida diversificação e crescimento da área (PÄÄBO et al. 1989) e (THOMAS et al. 1989). No entanto, devido à enorme capacidade da PCR em amplificar mesmo poucas cópias de material genético que estejam na amostra, a contaminação com DNA moderno acabou se tornando um problema importante (RIZZI et al. 2012).

Até recentemente, análises com DNA antigo eram na maioria das vezes restritas a fragmentos curtos, geralmente provenientes do genoma mitocondrial. Alguns avanços foram realizados em termos técnicos para aumentar o tamanho dos fragmentos, mas nenhuma inovação havia revolucionado o estudo com material genético antigo como o surgimento do NGS fez (KNAPP & HOFREITER, 2010). Assim que a primeira plataforma foi lançada em 2005, já foi quase imediatamente implementada na pesquisa com DNA fóssil. Apenas alguns meses após a introdução do NGS, Poinar et al. (2006) publicaram um artigo com 13 milhões de pares de base de DNA provenientes do genoma nuclear do extinto mamute. Isto representou um incremento de 480X no número de bases produzidas a partir de um exemplar antigo em relação ao estudo que havia conseguido maior quantidade de informação genética até então (KNAPP & HOFREITER, 2010).

O acesso a grande diversidade genômica armazenada em coleções científicas criaria oportunidades sem precedentes para estudos evolutivos, filogenéticos e de genética de populações (STAATS et al. 2013). Porém, várias complicações surgem ao se manipular material antigo, e existem problemas técnicos que são específicos deste campo de estudo. Estes empecilhos muitas vezes são acentuados em espécimes de museus, onde a qualidade do DNA varia muito entre as amostras e os níveis de contaminação são geralmente altos (MILLAR et al. 2008). Mas, a principal dificuldade consiste na produção de quantidades suficientes de sequências de DNA autênticas para que se possa chegar a resultados conclusivos. Este obstáculo é consequência de processos de degradação do DNA *post mortem*, que podem levar a erros na leitura ou na destruição física da molécula, aumentando as chances de sequências contaminantes exógenas serem amplificadas (RIZZI et al. 2012). Porém, a qualidade do DNA recuperado parece ser mais influenciada pelo modo como os espécimes são tratados e armazenados nas coleções do que simplesmente pelo tempo que se passou desde a coleta (MASON et al. 2011). Especificamente com relação às coleções entomológicas é sabido que métodos tradicionais usados para sacrificar os organismos, como o acetado de etila e substâncias similares, são responsáveis por danos ao material genético (DILLON et al. 1996). Estas

adversidades já estavam presentes nas tentativas de sequenciamento de material antigo via método Sanger, mas agora podem ser mais facilmente contornadas via NGS. Trabalhos que utilizaram sequenciamento de nova geração em exemplares provenientes de museus mostraram que a quantidade e a qualidade das sequências geradas de espécimes antigos não foram inferiores às sequências produzidas de tecidos frescos das mesmas espécies (STAATS et al. 2013).

Uma característica comum a todas as plataformas de NGS faz com que organismos coletados no passado, inclusive os insetos pertencentes às coleções entomológicas, se tornem propícios a este método de sequenciamento: a fragmentação do material genético. Com relação aos espécimes de museus a variação no tamanho dos fragmentos é gigantesca, mas em material genético fóssil geralmente são menores do que 150 pares de base, com alguns chegando a apenas 50 pares de base (KNAPP & HOFREITER, 2010). A conexão entre este tipo de amostra e o NGS acontece porque as principais plataformas de NGS requerem como etapa inicial a fragmentação do DNA após a extração, seja de forma mecânica ou química (MARDIS, 2013). Justamente a degradação do passar do tempo, que fragmentava o DNA de espécimes fósseis ou dos depositados em coleções, e que na maioria das vezes impossibilitava o sequenciamento via o método tradicional, agora é uma característica que não os inviabilizam mais. Aliás, este passo de fragmentação é inclusive descartado no NGS quando as amostras são de espécimes antigos (KNAPP & HOFREITER, 2010). Assim, o NGS é considerado ideal para este tipo de pesquisa, uma vez que fornecem sequências para todas as moléculas de DNA no extrato, independentemente do seu tamanho, e a probabilidade de preferência por moléculas contaminantes atuais é menor (KNAPP & HOFREITER, 2010).

O advento das plataformas de NGS tornou possível pela primeira vez amostrar o DNA nuclear antigo do mamute (POINAR et al. 2006) e do Homem de Neandertal (GREEN et al. 2006), ambos com milhares de anos. Se estes trabalhos com resultados favoráveis fazem muitos imaginar um mundo cinematográfico de possibilidades, um trabalho mais recente, que tentou acessar o DNA fóssil de insetos impregnados em resina, nos mostrou que em alguns

casos, nem mesmo a tecnologia NGS pode ser suficiente para trazer o passado à tona (PENNEY et al. 2013). O trabalho da equipe de pesquisadores ingleses comprovou que a existência de DNA em amostras fossilizadas em resina é altamente improvável. Os resultados do início da década de 1990 que haviam conseguido extrair DNA de âmbar de milhões de anos e que não puderam ser replicados (AUSTIN et al. 1997), hoje são tratados como exemplos clássicos de contaminação das amostras por DNA moderno (HEBSGAARD et al. 2005). Como citado anteriormente, nos protocolos tradicionais o DNA era amplificado via PCR, que preferencialmente irá amplificar qualquer molécula de DNA moderna, não danificada e que esteja como contaminante no extrato antigo, gerando falsos positivos ao serem confundidos com DNA fóssil genuíno (BROWN & BROWN, 2011). A degradação do DNA é influenciada por vários fatores como o conteúdo de água e oxigênio, temperatura ambiente e tempo decorrido desde a morte do organismo (LINDAHL, 1993). Assim, intuitivamente, poderíamos imaginar que o rápido envolvimento em resina, resultando em uma morte quase instantânea e gerando um ambiente anóxico, promoveria uma preservação do material genético do inseto, mas por razões físico-químicas ainda desconhecidas isto não ocorre (PENNEY, et al. 2013). Certamente os processos de preservação e fossilização não são uniformes (nem mesmo na fossilização em resina) e o resultado negativo em uma fonte de material fóssil não pode ser vista como uma negativa para todas as outras formas fósseis ou desencorajar futuras pesquisas. Dados teóricos e empíricos indicam que fragmentos de DNA podem estar presentes em material geológico bem preservado com até 100 mil anos de idade e sugerem que alguns materiais com até um milhão de anos poderiam fornecer sequências (HEBSGAARD et al. 2005), nestes cenários novas tecnologias de NGS são essenciais para acessarmos tais dados.

Se no presente as novidades para o DNA fossilizado em âmbar não são tão animadoras, o mesmo não se pode dizer para amostras de coleções científicas e em especial para coleções entomológicas que possuem resultados estimulantes, ainda mais por possuírem uma riqueza incomparável de biodiversidade e de dados de distribuição geográfica protegidos em seu interior.

A informação contida nestas coleções está se tornando cada vez mais acessível à medida que mais museus dispõem seus catálogos na *web* e os curadores destas coleções permitem estudos moleculares com amostras mais raras. No entanto, como a maioria dos exemplares em coleções científicas são insubstituíveis, tentativas de extração de DNA destrutivas geralmente são desencorajadas. Neste sentido existem grandes progressos já realizados com o desenvolvimento de métodos não destrutivos de recuperação de DNA proveniente de insetos em museus (GILBERT et al. 2007) e (THOMSEN et al. 2009), incluindo amostras do século XIX que foram fixadas de forma tradicional (CHAPCO & LITZENBERGER, 2004). Quanto à contaminação existem também algumas recomendações técnicas que são importantes e que podem ser aplicadas de forma simples. São lavagens prévias dos exemplares a fim de eliminar fungos e outros microrganismos que possam ter se desenvolvido na superfície dos espécimes, além do uso de pipetas com filtro exclusivas e laboratórios distintos para extração e o processamento do material genético (STAATS et al. 2013).

Resultados promissores com DNA antigo de outros grupos ou com material genético fóssil nos permitem presumir toda sua aplicabilidade latente às coleções entomológicas, como a possibilidade de voltar no tempo e estudar as relações genéticas entre organismos extintos e seus familiares contemporâneos. A preservação de muitos indivíduos, todos provenientes de uma única localidade, coletados anteriormente por naturalistas, oferece uma oportunidade única para acompanhar as mudanças em uma população ao longo do tempo (RIZZI et al. 2012). Além disso, o NGS de DNA histórico permite recuperar informações genéticas essenciais de antigos espécimes tipo e, portanto, abre também uma nova fronteira para a pesquisa taxonômica (STAATS et al. 2013). Com relação às espécies extintas, espécimes de museus podem representar “fósseis em alfinetes” (LARSEN, 2005), e sequências recuperadas destes exemplares podem ajudar no posicionamento destes táxons nas filogenias (PENNEY et al. 2013). Esta abordagem também seria útil para o estudo de faunas extintas e endêmicas de ilhas, não apenas para entender suas relações evolutivas, mas também para elucidar sua história biogeográfica.

Um ponto adicional a favor da utilização de insetos depositados em coleções científicas é a dificuldade na coleta de insetos em determinadas regiões do planeta, seja por limitações orçamentárias, conflitos armados ou até por leis restritivas de conservação da vida selvagem em determinados ambientes (KOTHAMASI, 2009). Algumas espécies são tão raras que não há garantia alguma de que serão coletadas novamente durante uma nova expedição de campo. Outra vantagem potencial de dados provenientes de material genético de insetos em museus seria a geração de um conjunto de dados para examinar os efeitos moleculares de eventos de poluição que ocorreram no passado, tal como testes com bombas atômicas e de outras formas de radiação ou exposição a substâncias químicas (PENNEY et al. 2013), como foi explorado mais recentemente em um estudo com borboletas após o acidente nuclear de Fukushima (HIYAMA et al. 2012).

Até recentemente, quase todos os estudos genéticos realizados em espécimes antigos tinham como alvo regiões do genoma mitocondrial. As expectativas futuras são de que por meio da tecnologia NGS o sequenciamento completo de genomas antigos, tanto mitocondriais como nucleares, sejam possíveis, inclusive com exemplos de sucesso em insetos (STAATS et al 2013). A identificação, estimativa e eliminação de sequências contaminantes em amostras antigas são questões que ainda precisam ser discutidas e melhor resolvidas (RIZZI et al. 2012), mas é inegável que as novas tecnologias abriram uma janela de acesso a faunas antigas de formas que não podiam ser consideradas possíveis em um passado não tão distante. O sequenciamento de nova geração pode trazer a pesquisa com DNA antigo para o centro da biologia evolutiva e torna-la uma parte crucial da genética moderna. Afinal de contas, o que melhor poderia ajudar a compreender a evolução do que visualizar seu andamento em tempo real? (KNAPP & HOFREITER, 2010).

Perspectivas

Com os contínuos avanços tecnológicos desta área, é arriscado especular muito adiante no futuro. No entanto, pode ser assegurado que uma

das grandes vantagens das tecnologias de NGS para entomologia e campos afins, é a pequena quantidade de material genético necessário para se iniciar o sequenciamento. Isto torna estas tecnologias adequadas para estudos com espécies ameaçadas de extinção, onde é necessária uma amostragem não invasiva, bem como para exemplares de coleções científicas que requerem métodos não destrutivos de extração do DNA. Há inclusive esforços que visam ir ainda mais longe e abrem a possibilidade de análises baseadas em sequências de células individuais (YAN et al. 2013). Além disso, podemos esperar que tecnologias disponíveis no momento continuem melhorando sua capacidade de produção de sequências juntamente com a diminuição da taxa de erro, dando maior qualidade a montagem dos genomas.

O incremento da velocidade e decréscimo dos custos na geração de dados moleculares está transformando vários campos da biologia. As tecnologias de NGS estão revolucionando a ecologia ao derrubar as barreiras entre ecologia, biologia molecular, genética e genômica (TAUTZ et al. 2010). O futuro parece muito promissor e é muito interessante que cada vez mais pesquisas adicionem dados moleculares aos seus resultados. Certamente estas novas tecnologias de sequenciamento irão contribuir para que a informação contida no material genético dos organismos se difunda como ferramenta aos cientistas.

Cientistas que se entusiasmarem com as possibilidades apresentadas neste texto e que não se intimidarem com os desafios ainda existentes, podem decidir por utilizar estas novas tecnologias de sequenciamento. No entanto, precisarão de cautela para não desperdiçar recursos. Raramente laboratórios isolados de zoologia ou ecologia terão uma demanda tão grande de sequências genéticas conforme a capacidade destes novos equipamentos. Assim, o ideal é realizar parcerias com laboratórios que já disponham destes sequenciadores, a fim de otimizar o uso e não obter um patrimônio que em poucos anos estará ultrapassado em termos de tecnologia. Uma alternativa é a terceirização do sequenciamento, atualmente existem muitas empresas no mercado que realizam o sequenciamento de forma comercial. Aos que pretendem adquirir os novos sequenciadores vale lembrar que é preciso considerar os custos com mão

de obra altamente especializada para a operação e manuseio que são específicas de cada plataforma. É preciso também considerar os custos com a manutenção dos instrumentos, gasto que muitas vezes não é levado em consideração quando da aquisição deste tipo de equipamento e que geralmente possui um suporte técnico oneroso.

Referências

- ATTARDO, G. M.; ABILA, P. P.; AUMA, J. E.; et al. Genome sequence of the Tsetse fly (*Glossina morsitans*): Vector of African Trypanosomiasis. **Science**, v. 344, n. 6182, p. 380–386, 2014. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
- AUSTIN, J. J.; ROSS, A. J.; SMITH, A. B.; FORTEY, R. A.; THOMAS, R. H. Problems of reproducibility - does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 264, n. 1381, p. 467–474, 1997. The Royal Society.
- BRODIN, Y.; EJDUNG, G.; STRANDBERG, J.; LYRHOLM, T. Improving environmental and biodiversity monitoring in the Baltic sea using DNA barcoding of Chironomidae (Diptera). **Molecular Ecology Resources**, p. n/a–n/a, 2012. Wiley-Blackwell.
- BROWN, K. A.; BROWN, T. A. **Biomolecular archaeology: An introduction**. Malden, MA: Wiley-Blackwell (an imprint of John Wiley & Sons Ltd), 2011.
- CELNIKER, S. E.; WHEELER, D. A.; KRONMILLER, B.; et al. Finishing a whole-genome shotgun: release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. **Genome Biology**, v. 3, n. 12, p. research0079.1, 2002. Springer Nature.
- CHACÓN, I.; JANZEN, D.; HALLWACHS, W.; SULLIVAN, J.; HAJIBABAEI, M. Cryptic species within cryptic moths: New species of *Dunama* Schaus (Notodontidae, Nystaleinae) in Costa Rica. **ZooKeys**, v. 264, p. 11–45, 2013. Pensoft Publishers.
- CHAPCO, W.; LITZENBERGER, G. A DNA investigation into the mysterious disappearance of the Rocky Mountain grasshopper, mega-pest of the 1800s. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, n. 3, p. 810–814, 2004. Elsevier BV.
- CHIAL, H. Human genome project: Sequencing the human genome. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 219, 2008. Nature Education. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-sequencing-technologies-key-to-the-human-828>>. Acesso em: 3/8/2016.

- DARWIN, C. **On the Origin of Species**. United Kingdom, 1859.
- DILLON, N.; AUSTIN, A. D.; BARTOWSKY, E. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. **Insect Molecular Biology**, v. 5, n. 1, p. 21–24, 1996. Wiley-Blackwell.
- EGAN, A. N.; SCHLUETER, J.; SPOONER, D. M. Applications of next-generation sequencing in plant biology. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. 175–185, 2012. Botanical Society of America.
- EKBLUM, R.; GALINDO, J. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. **Heredity**, v. 107, n. 1, p. 1–15, 2010. Nature Publishing Group.
- EL-METWALLY, S.; HAMZA, T.; ZAKARIA, M.; HELMY, M. Next-generation sequence assembly: Four stages of data processing and computational challenges. (S. Markel, Org.) **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 12, p. e1003345, 2013. Public Library of Science (PLoS).
- FELDMEYER, B.; ELSNER, D.; FOITZIK, S. Gene expression patterns associated with caste and reproductive status in ants: Worker-specific genes are more derived than queen-specific ones. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 1, p. 151–161, 2013. Wiley-Blackwell.
- FUKATSU, T. Next-generation sequencing sheds light on intricate regulation of insect gut microbiota. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 24, p. 5908–5910, 2012. Wiley-Blackwell.
- FULLER, C. W.; KUMAR, S.; POREL, M.; et al. Real-time single-molecule electronic DNA sequencing by synthesis using polymer-tagged nucleotides on a nanopore array. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 19, p. 5233–5238, 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- GADAU, J.; HELMKAMPF, M.; NYGAARD, S.; et al. The genomic impact of 100 million years of social evolution in seven ant species. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 1, p. 14–21, 2012. Elsevier BV.
- GENIA TECHNOLOGIES. Genia Technologies - technology. Disponível em: <<http://www.geniachip.com/technology/>>. Acesso em: 3/8/2016.
- GILAD, Y.; PRITCHARD, J. K.; THORNTON, K. Characterizing natural variation using next-generation sequencing technologies. **Trends in Genetics**, v. 25, n. 10, p. 463–471, 2009. Elsevier BV.
- GILBERT, M. T. P.; MOORE, W.; MELCHIOR, L.; WOROBEY, M. DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. (M. Hofreiter, Org.) **PLoS ONE**, v. 2, n. 3, p. e272, 2007. Public Library of Science (PLoS).

- GLENN, T. 2016 NGS field guide: Overview. Disponível em: <<http://www.molecularecologist.com/next-gen-fieldguide-2016>>. Acesso em: 3/8/2016.
- GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 5, p. 759–769, 2011. Wiley-Blackwell.
- GREEN, R. E.; KRAUSE, J.; PTAK, S. E.; et al. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 330–336, 2006. Nature Publishing Group.
- HEBSGAARD, M. B.; PHILLIPS, M. J.; WILLERSLEV, E. Geologically ancient DNA: Fact or artefact? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 212–220, 2005. Elsevier BV.
- HIGUCHI, R.; BOWMAN, B.; FREIBERGER, M.; RYDER, O. A.; WILSON, A. C. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. **Nature**, v. 312, n. 5991, p. 282–284, 1984. Nature Publishing Group.
- HIYAMA, A.; NOHARA, C.; KINJO, S.; et al. The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. **Scientific Reports**, v. 2, 2012. Nature Publishing Group.
- JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HARVEY, D. J.; et al. What happens to the traditional taxonomy when a well-known tropical saturniid moth fauna is DNA barcoded? **Invertebrate Systematics**, v. 26, n. 6, p. 478, 2012. CSIRO Publishing.
- JONES, D. C.; RUZZO, W. L.; PENG, X.; KATZE, M. G. Compression of next-generation sequencing reads aided by highly efficient de novo assembly. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 22, p. e171–e171, 2012. Oxford University Press (OUP).
- KASIANOWICZ, J. J.; BRANDIN, E.; BRANTON, D.; DEAMER, D. W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13770–13773, 1996. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- KNAPP, M.; HOFREITER, M. Next generation Sequencing of ancient DNA: Requirements, strategies and perspectives. **Genes**, v. 1, n. 2, p. 227–243, 2010. MDPI AG.
- KOTHAMASI, D.; KIERS, E. T. Emerging conflicts between Biodiversity conservation laws and scientific research: The case of the Czech Entomologists in India. **Conservation Biology**, v. 23, n. 5, p. 1328–1330, 2009. Wiley-Blackwell.
- LARSEN, T. B. Hazards of butterfly collecting – fossil on a pin. **The entomologist's record and journal of variation**, v. 117, p. 109–111, 2005.

- LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709–715, 1993. Nature Publishing Group.
- MACHARIA, R.; MIREJI, P.; MURUNGI, E.; et al. Genome-wide comparative analysis of Chemosensory gene families in Five Tsetse fly species. (A. Acosta-Serrano, Org.) **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004421, 2016. Public Library of Science (PLoS).
- MARDIS, E. R. Next-generation DNA Sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, n. 1, p. 387–402, 2008. Annual Reviews.
- MARDIS, E. R. Next-generation Sequencing platforms. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 287–303, 2013. Annual Reviews.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, 2005. Nature Publishing Group.
- MASON, V. C.; LI, G.; HELGEN, K. M.; MURPHY, W. J. Efficient cross-species capture hybridization and next-generation sequencing of mitochondrial genomes from noninvasively sampled museum specimens. **Genome Research**, v. 21, n. 10, p. 1695–1704, 2011. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MCCORMACK, J. E.; FAIRCLOTH, B. C. Next-generation phylogenetics takes root. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 1, p. 19–21, 2012. Wiley-Blackwell.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2009. Nature Publishing Group.
- MILLAR, C. D.; HUYNEN, L.; SUBRAMANIAN, S.; MOHANDASAN, E.; LAMBERT, D. M. New developments in ancient genomics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 7, p. 386–393, 2008. Elsevier BV.
- MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 255–264, 2008. Elsevier BV.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, n. 0, p. 263–273, 1986. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- NIKOLAKI, S.; TSIAMIS, G. Microbial diversity in the era of Omic technologies. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–15, 2013. Hindawi Publishing.
- NINOMIYA, M.; UENO, Y.; SHIMOSEGAWA, T. Application of deep sequence technology in hepatology. **Hepatology Research**, v. 44, n. 2, p. 141–148, 2013. Wiley-Blackwell.

- PÄÄBO, S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. **Nature**, v. 314, n. 6012, p. 644–645, 1985. Nature Publishing Group.
- PÄÄBO, S.; HIGUCHI, R.; WILSON, A. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 17, p. 9709–12, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2656708>>. Acesso em: 3/8/2016.
- PENNEY, D.; WADSWORTH, C.; FOX, G.; et al. Absence of ancient DNA in sub-fossil insect inclusions preserved in “Anthropocene” Colombian Copal. (L. Orlando, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73150, 2013. Public Library of Science (PLoS).
- POINAR, H. N. Metagenomics to Paleogenomics: Large-scale Sequencing of mammoth DNA. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 392–394, 2006. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
- QUAIL, M.; SMITH, M. E.; COUPLAND, P.; et al. A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of ion torrent, pacific biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 341, 2012. Springer Science + Business Media.
- RICHARDS, S.; GIBBS, R.; WEINSTOCK, G.; et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 949–55, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362917>>. Acesso em: 3/8/2016.
- RIZZI, E.; LARI, M.; GIGLI, E.; DE BELLIS, G.; CARAMELLI, D. Ancient DNA studies: New perspectives on old samples. **Genetics Selection Evolution**, v. 44, n. 1, p. 21, 2012. Springer Science + Business Media.
- ROBISON, K. Omics! Omics! Disponível em: <<http://omicsomics.blogspot.com.br/2016/04/genia-publishes-platform-progress.html>>. Acesso em: 3/8/2016.
- SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687–695, 1977. Nature Publishing Group.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- SCHNABLE, J. Even faster Sequencing. Disponível em: <<http://www.jamesandthegiantcorn.com/2010/01/13/even-faster-sequencing/>>. Acesso em: 3/8/2016.
- SCHUSTER, S. C. Next-generation sequencing transforms today’s biology. **Nature Methods**, v. 5, n. 1, p. 16–18, 2007. Nature Publishing Group.

- SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, 2008. Nature Publishing Group.
- SHOKRALLA, S.; GIBSON, J. F.; NIKBAKHT, H.; et al. Next-generation DNA barcoding: Using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. **Molecular Ecology Resources**, p. n/a–n/a, 2014. Wiley-Blackwell.
- SMITH, L. M.; SANDERS, J. Z.; KAISER, R. J.; et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, v. 321, n. 6071, p. 674–679, 1986. Nature Publishing Group.
- SMITH, M. A.; EVELEIGH, E. S.; MCCANN, K. S.; et al. Barcoding a quantified food web: Crypsis, concepts, ecology and hypotheses. (T. N. Romanuk, Org.) **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e14424, 2011. Public Library of Science (PLoS).
- STAATS, M.; ERKENS, R. H. J.; VAN DE VOSSENBERG, B.; et al. Genomic treasure Troves: Complete genome Sequencing of Herbarium and insect museum specimens. (D. Caramelli, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69189, 2013. Public Library of Science (PLoS).
- SUDAKARAN, S.; SALEM, H.; KOST, C.; KALTENPOTH, M. Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). **Molecular Ecology**, v. 21, n. 24, p. 6134–6151, 2012. Wiley-Blackwell.
- TAUTZ, D.; ELLEGREN, H.; WEIGEL, D. Next generation molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 1–3, 2010. Wiley-Blackwell.
- THE INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 12, p. 1036–45, 2009.
- THOMAS, R. H.; SCHAFFNER, W.; WILSON, A. C.; PÄÄBO, S. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. **Nature**, v. 340, n. 6233, p. 465–467, 1989. Nature Publishing Group.
- THOMSEN, P. F.; ELIAS, S.; GILBERT, M. T. P.; et al. Non-destructive sampling of ancient insect DNA. (R. DeSalle, Org.). **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. e5048, 2009. Public Library of Science (PLoS).
- VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 2, p. 110–117, 2009. Elsevier BV.
- WALLACE, L. J.; BOILARD, S. M. A. L.; EAGLE, S. H. C.; et al. DNA barcodes for everyday life: Routine authentication of natural health products. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 446–452, 2012. Elsevier BV.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

- WATSON, J. The human genome project: Past, present, and future. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 44–49, 1990. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
- WELBURN, S. C.; MAUDLIN, I.; SIMARRO, P. P. Controlling sleeping sickness – a review. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1943, 2009. Cambridge University Press (CUP).
- YAN, L.; YANG, M.; GUO, H.; et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 9, p. 1131–1139, 2013. Nature Publishing Group.
- YODER, J. 2014 NGS field guide: Resistance is futile (mostly, at least for a while). Disponível em: <<http://www.molecularecologist.com/2014/03/2014-ngs-field-guide-resistance-is-futile-mostly-at-least-for-a-while/>>. Acesso em: 3/8/2016.

Capítulo II

Redução de Genomas: Usando Elementos Ultraconservados

Resumo

Este capítulo é uma introdução e discussão sobre os marcadores moleculares utilizados na metodologia desta tese, os Elementos Ultraconservados. O histórico, uso e utilidade dos marcadores são abordados a fim de justificar seu emprego neste estudo. Também é discutida uma das principais técnicas de redução de genomas, a *Sequence capture*. E como este método pode ser aliado ao sequenciamento de nova geração para produzir uma quantidade de dados satisfatória aos estudos moleculares, além de ser uma alternativa mais viável economicamente.

Palavras-chave: Elementos ultraconservados. *Sequence capture*.

Abstract

This chapter is an introduction to the molecular markers used in this dissertation, the Ultraconserved Elements. The history, application and use of these markers are explored to explain their adoption in this study. Another point addressed in this chapter is a genome reduction technique called Sequence Capture and how this strategy can be combined with massive parallel sequencing to generate enough data for molecular studies and at the same time be economically viable.

Key-words: Ultraconserved elements. Sequence capture.

Introdução

Estudos evolutivos, genética de populações, filogeografia e outras áreas da Biologia estruturam-se em um mesmo fenômeno: mutação. São mudanças acumuladas no DNA de indivíduos, populações e espécies que permitem comparações entre si e que através de variadas metodologias fornecem conclusões a respeito de seus passados evolutivos. Deste modo, em um primeiro momento pode parecer contraditório o uso de partes do genoma que misteriosamente não apresentam muitas mutações como ferramenta para uma tese em filogeografia, mas como será demonstrado a seguir, particularidades destes segmentos, aliadas a novas tecnologias, tornam esta proposta possível.

Por definição Elementos Ultraconservados (UCEs da sigla inglesa *ultraconserved elements*) são porções do genoma que estão praticamente inalteradas ao longo da evolução (SABARINADH et al. 2004). Um fenômeno que foi primeiramente detectado em humanos (BEJERANO et al. 2004), mas que também já está muito bem documentado em outros organismos como aves (FAIRCLOTH et al. 2012), répteis (CRAWFORD et al. 2012) e insetos (FAIRCLOTH et al. 2014). São táxons que possuem ancestrais comuns distantes e que, 300 milhões de anos depois de divergirem, ainda compartilham significativas partes do seu genoma muito similares. Por convenção, sequencias de DNA com mais de 80% de correspondência idêntica através de táxons divergentes e com pelos menos 100 pb são considerados UCEs (FAIRCLOTH et al. 2012).

Os UCEs fazem parte de uma intrigante e gigantesca parte dos genomas animais que não codificam proteínas: 98.8% (ZIMMER & EMLEN, 2012). A codificação é considerada a atribuição principal do código genético (HARROW et al. 2009), portanto, são regiões que não possuem uma função óbvia. Esta é uma questão que tem despertado grande interesse no meio científico, gerando inclusive grandes debates (GRAUR et al. 2013) e até críticas ao apelido de “DNA-lixo” que estas regiões não-codificantes do genoma recebem por parte de alguns pesquisadores (ENCODE, 2012). No entanto, cada vez mais estudos mostram que na verdade há apenas um desconhecimento a respeito desta parte

do código genético. Atualmente há um consenso de que esta é uma área de grande potencial e que precisa ser melhor esclarecida (CARTWRIGHT et al. 2016). Obviamente os UCEs mais estudados e conhecidos são os presentes em humanos, especialmente regiões que são conservadas em outros vertebrados, mas que se modificaram através de rápido acúmulo de mutações apenas na nossa espécie para tornarem-se, por exemplo, regiões expressas no cérebro apenas durante o desenvolvimento embrionário (Pollard et al. 2006b) ou que aparentam ter funções reguladoras (SANDELIN et al. 2004).

UCEs possuem extremidades que fornecem variação suficiente tanto para pesquisas com foco em divergências filogenéticas antigas (CRAWFORD et al. 2012) como em contextos mais recentes (SMITH et al. 2013), embora este último ainda seja menos explorado. Um aumento de variabilidade nas margens dos UCEs sugere que eles podem reter sinal evolutivo de diferentes épocas dependendo de que distância da região central está o trecho sendo analisado, como se fosse um “fóssil molecular” (FAIRCLOTH et al. 2012). Os índices de variação dentro de uma mesma espécie nas extremidades dos UCEs podem ser comparados com aqueles encontrados em sequências de íntrons de DNA de origem nuclear (SMITH et al. 2013). UCEs ao fornecerem um grande número de loci não ligados também ajudam a resolver um problema metodológico filogenético, uma vez que diferentes genes frequentemente mostram histórias conflitantes (POLLARD et al. 2006a). A identificação de loci ortólogos através de táxons distantes filogeneticamente não é uma tarefa fácil, mas como estes marcadores ultraconservados estão muito dispersos no genoma, o mais provável é uma segregação independente, além de ser uma abordagem praticamente imune ao artefato da saturação na substituição de nucleotídeos (MCCORMACK et al. 2011) e raramente apresentar duplicatas (DERTI et al. 2006). Ao aumentar o número de genes a resolução do verdadeiro passado evolutivo fica mais evidente, desde que métodos corretos capazes de lidar com este tipo de incerteza sejam empregados (KNOWLES, 2009). Outra vantagem importante deste tipo de marcador é sua aplicação em organismos não-modelo e a possibilidade da detecção de homologia entre organismos filogeneticamente distantes.

Atualmente os UCEs começam a ser utilizados em grande escala para estudos filogenéticos em animais (DO AMARAL et al. 2015). O acesso a esta informação contida nos UCEs só se fez possível através da combinação de duas recentes tecnologias, o sequenciamento massivo paralelo (já discutido no capítulo 1) e o *Sequence Capture* (sequenciamento de captura). *Sequence capture* é um dos métodos utilizados na chamada “redução de genomas”. Esta redução torna possível sequenciar uma grande quantidade de indivíduos em uma única reação através de uma sequência identificadora, que funciona como um código de barras para cada amostra. UCEs são ótimos candidatos ao *Sequence Capture* justamente por possuírem sequências alvo muito conservadas e que por isso podem ser usadas com uma grande quantidade de espécies mesmo que distantes filogeneticamente. O alinhamento é facilitado pela presença da região conservada enquanto a variação nas extremidades é informativa para estudos evolutivos (FAIRCLOTH et al. 2012).

Sequence Capture

Sequence capture (também conhecida como *Target Enrichment* ou *Target Resequencing*) é uma recente estratégia de sequenciamento que permite associar o poder de sequenciamento em larga escala, como o da plataforma Illumina, com um controle sobre qual parte do genoma será caracterizada: o *target* ou alvo. A captura em si de fragmentos específicos do DNA é uma técnica já antiga em biologia molecular, mas possuía baixa eficiência (BRENIG & BREM, 1991) ou era muito trabalhosa dependendo do uso de microrganismos (OSTRANDER et al. 1992). A utilização desta técnica em solução e depois usando partículas magnéticas foi primeiramente descrita por Kandpal et al. (1994) e Kijas et al. (1994), respectivamente. Mas foi após o surgimento do NGS que a técnica ganhou novo fôlego com pesquisas mostrando que a captura poderia ser realizada com centenas de oligonucleotídeos em uma única reação (ALBERT et al. 2007; GNIRKE et al. 2009).

O protocolo desta técnica em associação com o NGS tem a sua primeira etapa semelhante ao processo usual deste tipo de sequenciamento onde o DNA

passa por um procedimento chamado “preparo de biblioteca”. Neste passo é realizada a fragmentação, seleção de tamanho e incorporação de *tags* identificadoras de cada amostra aos fragmentos dupla-fita. A fase de captura acontece quando as bibliotecas são hibridizadas com sondas customizadas de DNA ou RNA que são específicas para determinados alvos. Após isto, todo o material não alvo presente na biblioteca é removido por lavagem e apenas o DNA alvo enriquecido segue para ser sequenciado. É importante ressaltar que a quantidade de DNA de diferentes amostras precisa ser precisamente balanceada antes das amostras serem misturadas. Este cuidado é necessário para evitar a perda de loci de alguns indivíduos que ficarão com a cobertura de sequenciamento comprometida caso estejam sub-representadas (DAVEY et al. 2011). Após o sequenciamento, métodos de bioinformática que utilizam as *tags* identificadoras irão separar as sequências geradas umas das outras, processo conhecido como “*demultiplexing*”. Este protocolo completo foi primeiramente descrito por Mamanova et al. (2010).

As sondas utilizadas para a captura das sequências alvo podem ser customizadas e adquiridas através de kits comerciais. A elevada conservação na parte central dos UCEs permite que as mesmas iscas desenvolvidas para uma espécie possam ser usadas em outras com grande confiança, como por exemplo, os UCEs que foram descritos para toda a Ordem Hymenoptera (FAIRCLOTH et al. 2014) e que foram os escolhidos nesta tese. A extensão média dos UCEs é bem variável indo de 60 pb até 750 pb, no entanto loci entre 400pb a 750pb são geralmente os selecionados a fim de contribuir para a eficiência das capturas (MCCORMACK et al. 2011). A captura realizada nesta tese foi do tipo “*in solution capture*”, mas é válido mencionar que a mesma também pode acontecer sobre uma superfície sólida, “*on-array capture*” (MAMANOVA et al. 2010). A descrição completa do protocolo laboratorial está na sessão “matérias e métodos” dos capítulos seguintes.

Focar apenas em partes informativas do genoma ao invés de sequenciar o genoma todo (mesmo isto já sendo possível) em estudos comparativos é vantajoso (FAIRCLOTH et al. 2012). A quantidade de dados gerada e o limitado poder computacional, além da construção de múltiplas bibliotecas são alguns

dos problemas que não tornam prático o trabalho com genomas inteiros. Além disso, uma vez que este grande conjunto de dados é alinhado fica evidente que apenas uma pequena parte do genoma é útil para análises filogenéticas (FAIRCLOTH et al. 2012). Assim, a técnica de *Sequence Capture* de UCEs concentra-se em porções do genoma que são facilmente alinhadas entre diferentes espécies mesmo que distantes filogeneticamente e que podem ser sequenciadas combinando muitos indivíduos em uma única biblioteca tornando a abordagem também mais interessante economicamente.

Apesar da eficácia do método *Sequence Capture*, a captura não é totalmente específica e regiões não-alvo também podem ser sequenciadas, algumas vezes chegando a representar 60% do total de sequências produzidas (CHILAMAKURI et al. 2014), geralmente tratam-se de sequências mitocondriais e que frequentemente recuperam o genoma inteiro da molécula (PICARDI et al. 2012; SAMUELS et al. 2013).

Mesmo com este grande potencial, inicialmente apenas áreas como a genética médica utilizaram de forma mais abrangente as metodologias que utilizam sequenciamento em massa em conjunto com o método de captura, como para detectar especificadamente regiões associadas com alguma doença ou característica (DAVEY et al. 2011). A filogeografia e filogenética apenas mais recentemente começaram a explorar esta área (MCCORMACK et al. 2013). Vários motivos atrasaram a chegada destes avanços a estes campos da biologia, como o uso de organismos não-modelo e a falta de protocolos ou discordância inicial de metodologias no preparo das bibliotecas, questões comuns quando a ciência se encontra em um estado de transição entre tecnologias.

Finalmente é válido mencionar que *Sequence Capture* não é a única metodologia existente capaz de gerar dados através das novas plataformas de sequenciamento para estudos de filogeografia e filogenias sem que seja necessário sequenciar o genoma todo, ou como uma alternativa ao método Sanger para aumentar substancialmente o número de loci. Outras abordagens como *Multiplex PCR*, *Restriction-digest (Radseq)* e *RNA-seq* também apresentam resultados promissores, capazes de descobrir, sequenciar e

genotipar milhares de marcadores de qualquer genoma de interesse até mesmo para populações onde pouca ou nenhuma informação genética está disponível (DAVEY et al. 2011). No entanto, estas técnicas não serão tratadas neste texto por não fazem parte da metodologia desta tese, e por não serem as mais adequadas quando a quantidade de DNA é baixa ou este se encontra degradado (condições das amostras neste estudo), onde a *Sequence Capture* é a mais recomendada (JONES & GOOD, 2015).

Conclusão

UCEs possuem um grande potencial para elucidar questões dentro da biologia evolutiva. Todas as evidências deste potencial que foram discutidas nos parágrafos anteriores fizeram com que os UCEs fossem escolhidos como ferramenta para a geração de dados desta tese, mesmo que no momento da escolha dos marcadores (ano de 2013) pouquíssimos estudos descritos na literatura haviam usado esta estratégia em uma análise filogeográfica. O uso dos UCEs aliados a *Sequence Capture* utilizando novas plataformas de sequenciamento foi a “fórmula” escolhida para o desenvolvimento desta tese. A expectativa da geração de uma grande quantidade de dados aliada com a oportunidade de aprendizado de novas tecnologias, facilmente superou o desafio de explorar uma metodologia e abordagem até então totalmente desconhecida pela autora e que pode ser considerada pioneira no país.

Referências

- ALBERT, T. J.; MOLLA, M. N.; MUZNY, D. M.; et al. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. **Nature Methods**, v. 4, n. 11, p. 903–905, 2007. Nature Publishing Group.
- BEJERANO, G. Ultraconserved elements in the human genome. *Science*, v. 304, n. 5675, p. 1321–1325, 2004. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**.
- BRENIG, B.; BREM, G. Direct cloning of sequence tagged microsatellite sites by DNA affinity chromatography. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5441–5441, 1991. Oxford University Press (OUP).

- CARTWRIGHT, J. H. E.; GIANNERINI, S.; GONZÁLEZ, D. L. DNA as information: At the crossroads between biology, mathematics, physics and chemistry. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2063, p. 20150071, 2016. The Royal Society.
- CHILAMAKURI, C. S.; LORENZ, S.; MADOU, M.-A.; et al. Performance comparison of four exome capture systems for deep sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 449, 2014. Springer Science + Business Media.
- CRAWFORD, N. G.; FAIRCLOTH, B. C.; MCCORMACK, J. E.; et al. More than 1000 ultraconserved elements provide evidence that turtles are the sister group of archosaurs. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 783–786, 2012. The Royal Society.
- DAVEY, J. W.; HOHENLOHE, P. A.; ETTER, P. D.; et al. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 7, p. 499–510, 2011. Nature Publishing Group.
- DETI, A.; ROTH, F. P.; CHURCH, G. M.; WU, C. Mammalian ultraconserved elements are strongly depleted among segmental duplications and copy number variants. **Nature Genetics**, v. 38, n. 10, p. 1216–1220, 2006. Nature Publishing Group.
- DO AMARAL, F. R.; NEVES, L. G.; RESENDE, M. F. R.; et al. Ultraconserved elements Sequencing as a low-cost source of complete Mitochondrial Genomes and Microsatellite markers in non-model Amniotes. (G. H. Yue, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138446, 2015. Public Library of Science (PLoS).
- ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, 489:57–74, 2012.
- FAIRCLOTH, B. C.; MCCORMACK, J. E.; CRAWFORD, N. G.; et al. Ultraconserved elements anchor Thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary Timescales. **Systematic Biology**, v. 61, n. 5, p. 717–726, 2012. Oxford University Press (OUP).
- FAIRCLOTH, B. C.; BRANSTETTER, M. G.; WHITE, N. D.; BRADY, S. G. Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among Hymenoptera. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 3, p. 489–501, 2014.
- GNIRKE, A.; MELNIKOV, A.; MAGUIRE, J.; et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 182–189, 2009. Nature Publishing Group.

- GRAUR, D.; ZHENG, Y.; PRICE, N.; et al. On the immortality of television sets: 'Function' in the human genome according to the evolution-free gospel of ENCODE. **Genome Biology and Evolution**, v. 5, n. 3, p. 578–590, 2013. Oxford University Press (OUP).
- HARROW, J.; NAGY, A.; REYMOND, A.; et al. Identifying protein-coding genes in genomic sequences. **Genome Biology**, v. 10, n. 1, p. 201, 2009. Springer Science + Business Media.
- JONES, M. R.; GOOD, J. M. Targeted capture in evolutionary and ecological genomics. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 1, p. 185–202, 2015. Wiley-Blackwell.
- KANDPAL, R. P.; KANDPAL, G.; WEISSMAN, S. M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 1, p. 88–92, 1994.
- KIJAS, J.; FOWLER, J.; GARBETT, C.; THOMAS. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **Bio Techniques**, v. 16, n. 4, p. 656–60, 1994.
- KNOWLES, L. L. Estimating species trees: Methods of Phylogenetic analysis when there is Incongruence across genes. **Systematic Biology**, v. 58, n. 5, p. 463–467, 2009. Oxford University Press (OUP).
- MCCORMACK, J. E.; FAIRCLOTH, B. C.; CRAWFORD, N. G.; et al. Ultraconserved elements are novel phylogenomic markers that resolve placental mammal phylogeny when combined with species-tree analysis. **Genome Research**, v. 22, n. 4, p. 746–754, 2011. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MCCORMACK, J. E.; HIRD, S. M.; ZELLMER, A. J.; CARSTENS, B. C.; BRUMFIELD, R. T. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 66, n. 2, p. 526–538, 2013. Elsevier BV.
- OSTRANDER, E. A.; JONG, P. M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 8, p. 3419–3423, 1992. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- PICARDI, E.; PESOLE, G. Mitochondrial genomes gleaned from human whole-exome sequencing. **Nature Methods**, v. 9, n. 6, p. 523–524, 2012. Nature Publishing Group.
- POLLARD, K. S.; SALAMA, S. R.; LAMBERT, N.; et al. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 167–172, 2006. Nature Publishing Group.

- SABARINADH, C.; SUBRAMANIAN, S.; TRIPATHI, A.; MISHRA, R. K. **BMC Genomics**, v. 5, n. 1, p. 75, 2004. Springer Science + Business Media.
- SAMUELS, D. C.; HAN, L.; LI, J.; et al. Finding the lost treasures in exome sequencing data. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 10, p. 593–599, 2013. Elsevier BV.
- SANDELIN, A.; BAILEY, P.; BRUCE, S.; et al. Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes. **BMC Genomics**, v. 5, n. 1, p. 99, 2004. Springer Science + Business Media.
- SMITH, B. T.; HARVEY, M. G.; FAIRCLOTH, B. C.; GLENN, T. C.; BRUMFIELD, R. T. Target capture and massively parallel Sequencing of Ultraconserved elements for comparative studies at shallow evolutionary time scales. **Systematic Biology**, v. 63, n. 1, p. 83–95, 2013. Oxford University Press (OUP)
- ZIMMER, C.; EMLEN, D. J. **Evolution: Making sense of life**. United States: Roberts and Company Publishers, 2012.

Capítulo III

**The mitochondrial genome of
Octostruma stenognatha (Hymenoptera:
Formicidae) and its phylogenetic implications**

Resumo

Novas tecnologias de sequenciamento estão permitindo uma proliferação de dados genéticos em larga escala, incluindo genomas mitocondriais que são gerados colateralmente aos métodos de sequenciamento por captura. Neste estudo utilizamos sequenciamento de nova geração para fornecer o genoma mitocondrial da espécie *Octostruma stenognatha*. A anotação do genoma revelou um interessante padrão que concorda com uma recente grande reorganização sistemática na família Formicidae. Este é o primeiro mitogenoma para o gênero, em uma linhagem em que a carência deste tipo de informação tem restringido nosso entendimento com relação a história evolutiva no grupo. Este é um relevante exemplo do poder e velocidade com que os produtos das novas tecnologias de sequenciamento aumentam nossa capacidade em compreender a biologia evolutiva, especialmente em organismos não modelo.

Palavras-chave: Mitogenoma, Elementos Ultraconservados, Formicidae.

Abstract

New sequencing technologies are providing a large-scale proliferation of sequence data, including complete mitochondrial genomes as a side-effect of target capture methods. In this study, we use massive parallel sequencing to provide the nearly complete mitochondrial genome of the ant *Octostruma stenognatha*. The annotation of the genome revealed an interesting pattern that agrees with a recent deep reorganization in the systematics within the Formicidae family. This is the first mitogenome for the genus, in a lineage where the scarcity of mitochondrial information has restricted our understanding of its evolutionary history. This is a valuable example of the power and velocity with which products from new sequencing technologies can increase our capacity to understand evolutionary biology, especially in non-model species.

Keywords: Mitogenome, Ultraconserved Elements, Formicidae.

Introduction

The advent of massively parallel sequencing has provided unprecedented opportunities to investigate many aspects of the tree of life (Dunn et al. 2014). Interestingly, in addition to the availability of information on nuclear genomes, the nature of many new sequencing methods has also improved our understanding of traditional sources of molecular information, such as mitogenomes (Tan et al. 2015). Mitogenomic sequences have been applied to infer relationships between organisms as soon they became most commonly available (e. g., Smith et al. 1993; Boore et al. 1998). The small size of the mitochondrial genome when compared with the nuclear allows studies involving phylogenetics, evolutionary biology and phylogeography in a computationally feasible way (e.g., Perseke et al. 2013; Havird et al. 2014; Shen et al. 2015). In general, modifications in mitochondrial gene order are uncommon in Metazoa (Boore 1999) and rarely display homoplasy (Le et al. 2000). These observations indicate the possibility of phylogenetic inferences based in gene order of the mitochondrial genome, which have been broadly applied in the field (e.g., Sankoff et al. 2000; Yuan et al. 2012; Liu et al. 2013). Mitochondrial genomes have also been shown as a powerful tool for the reconstruction of high-level phylogenetic relationship in Hymenoptera (Mao et al. 2015) and as well on the basal relationships within the clade (Song et al. 2016).

The order Hymenoptera includes several clades with enormous evolutionary success, such as wasps, bees, and ants, with the latter being a dominant terrestrial taxon since Cretaceous (Dlussky et al. 2003). Despite their ecological importance (Hölldobler and Wilson 1990) and economic impacts (Way and Khoo 1992; Gutrich et al. 2007; Pérez et al. 2011), only few nuclear and mitochondrial genomes have been described for the family Formicidae to date (e.g. Gotzek et al. 2010; Hasegawa et al. 2011; Rodovalho et al. 2014; Duan et al. 2016; Liu et al. 2016). In this article we take advantage of advances in massively parallel sequencing to provide the first mitogenome of the ant genus *Octostruma* using the strategy of assembling the genome from captured off-target data. This procedure is well known for provide accurate information widely in the field from humans (Picardi and Pesole 2012) to non-model amniotes (do Amaral

et al. 2015). Finally, we interpret the obtained results in light of recent taxonomic changes in Myrmicinae.

Material and Methods

Total DNA was extracted from a single specimen of *Octostruma stenognatha* from Horto Dois Irmãos, Recife, state of Pernambuco, Brazil (08°00'32"S, 34°56'40"W). Voucher specimens from the same nest series are deposited in the myrmecological collection of the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brazil. DNA was extracted using the kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen, USA) and double strand DNA concentration was measured on a Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Inc.) using dsDNA High Sensitivity Assay Kit. The initial DNA concentration for this sample was 0.56 ng/μl. Because of this low concentration, instead of running a traditional electrophoresis gel, we checked DNA integrity using a Bioanalyzer (Agilent Technologies), which showed highly fragmented DNA (possibly because of the age, size and preservation of the specimen, which was collected almost 15 years ago). Therefore, the sample was not sheared prior to library preparation for Illumina sequencing.

The KAPA Hyper prep kit (Kapa Biosystems) and protocol was chosen to process the Illumina libraries. A bead technique (Fisher et al. 2011) was used with an alternative for SPRI beads (Rohland and Reich 2012) in the library preparation. We used approximately 30ng of total starting DNA and all reactions, except PCR, were carried out using ¼ of volume indicated by the manufacturer (M. Branstetter pers. com.). The sample was individually labeled using the iTru dual-indexing adapter system (B. Faircloth and T. Glenn, pers. com.), which are similar to the TruSeq layout barcodes (Faircloth and Glenn 2012), and we obtained 4.96 ng/μl of adapter ligated DNA from 16 PCR cycles. A target enrichment system (Gnirke et al. 2009) was performed to obtain ultraconserved elements (UCEs) specifically designed for Hymenoptera (Faircloth et al. 2014) using a modified protocol from Faircloth et al. (2012). We pooled our sample with seven other samples as part of another study for target enrichment (Ströher et al. unpublished results). The pool was concentrated to 147 ng/μl in a vacuum

centrifuge and later enriched for 1510 UCEs using manufactured RNA capture probes (MyBaits, Mycroarray, Inc.) and followed the manufacturer's indications except for the on-bead (biotinized) PCR. Two washes were performed to remove off-target sequences, however this is not totally efficient, leaving copies of mitochondrial DNA in the library. Bioanalyzer (Agilent Technologies) was also used to measure the size of the enriched material, followed by a real-time PCR to access the library concentration adopting the Kapa Library Quantification kit (Kapa Biosystems, Inc.). The pool was combined with five other pools at equimolar ratios and sequenced on Illumina HiSeq2000 sequencer, using 100-bp paired-end reads at the University of California Santa Cruz, Genome Technology Center.

After sequencing, we used the Illumina bcl2fastq Conversion Software v1.8.4 to convert BCL files into FASTQ and to separate multiplexed samples. Sequence quality control was evaluated using FastQC 0.11.3 (Andrews 2010). This sample produced a total of 2823754 sequences. The Trimmomatic tool (Lohse et al., 2012), implemented through Illumiprocessor (Faircloth 2013), was used to remove low quality regions, barcodes and adapters. PHYLUCE (Faircloth 2016) was used to perform the assembly using the default Trinity tool (Grabherr et al. 2011) generating 25820 contigs with mean length of 358 bp. The resulted contigs were processed with the phyluce workflow for UCEs analysis using a minimum of 80X coverage and 80 % identity. A total of 651 unique UCEs were recovered for this sample. As predicted in this kind of large-scale sequencing (Hung et al., 2013), off-target regions are also captured and sequenced in a sufficient way to produce the mitochondrial genome in one contig, usually identified as the longest one. With this result, we performed the mtDNA genome annotation using MITOS (Bernt et al., 2013) with the Invertebrate genetic code, the base composition was calculated using Geneious 8.1.5 (Kearse et al., 2012). The DNA sequence is available in GenBank with the accession number KX758608.

Results and Discussion

The mitogenome of *Octostruma stenognatha* presented here for the first time is composed of 37 genes (22 tRNAs, 2 rRNAs and 13 protein-coding genes), for a total of 14,183 bp without the control region (Figure 1a). As observed in other hymenopterans (Wei et al. 2010; Xiao et al. 2011), the base composition in the mtDNA genome of *O. stenognatha* is highly A+T-rich, with only 19.4% being G+C. This is very similar to the base pair composition found in another member of Attini, *Atta laevigata*, where base composition is 80.8% A+T (Rodvalho et al. 2014). In *Octostruma stenognatha*, 14 genes are encoded by the minus strand and 23 by the plus strand. Regarding the absence of the control region: the challenges in sequencing and assemble this particular part of the mitogenome in insects is recognized for a long time and appears to be related with the high A+T composition allied with repeats sections (Saito et al., 2005; Cameron et al., 2008). So, our result is not unpredicted, since other studies that were specific designed for the sequencing of insects mitogenomes also had no success in recovering the control region (Mao et al., 2012; Ramakodi et al., 2015).

Although some mitochondrial gene order rearrangement, especially in tRNAs, can be observed in Hymenoptera (Dowton and Austin 1999), only a few changes could be observed in *Octostruma stenognatha* when compared with the hypothetical pancrustacean ancestral (Boore et al. 1998) (Figure 1b). That is not true in other hymenopterans such as wasps, in which the gene order rearrangement is widespread, not only for tRNAs, but also for protein-coding genes (Xiao et al. 2011). Several models have been suggested to explain how mitochondrial genes are rearranged, but this issue is still poorly understood (Cameron 2014). Therefore, when comparing the available ant mitogenomes with other hymenopterans, gene arrangements are relatively stable (e.g. Gotzek et al. 2010; Hasegawa et al. 2011; Berman et al. 2014; Rodvalho et al. 2014; Yang et al. 2016) indicating that this can be a characteristic in the Formicidae family. The position of the trnV gene, after and not between the ribosomal genes, is unusual when compared with other ants (Berman et al. 2014; Yang et al. 2016) and the

hypothetical ancestral gene order (Gotzek et al. 2010). Although, this feature can be found in some Myrmicine ants (e.g. Hasegawa et al. 2011; Babbucci et al. 2014) and is not exclusive to Hymenoptera (Mao et al. 2015). The higher mobility of tRNAs in relation to other genes is expected, given that shifts in gene order are not equally frequent across mitogenomes (Moritz et al. 1987). Although phylogenetic inference using gene order can be problematic when homoplasy can occur in the group, this feature can still be accounted for (Babbucci et al. 2014). An example in Hymenoptera is the paraphyly and basal position of Symphyta that was recently supported by the use of new mitochondrial genomes (Song et al. 2016).

Cox 1	L 2	Cox 2	K	D	ATP 8	ATP 6	Cox 3	G	Nd3	A	R	N	S 1	E	F	Nd5	H	Nd4	Nd4L	T	P	Nd6	Cob	S 2	Nd1	L 1	rrnL	rrnS	V	M	I	Q	Nd2	W	C	Y	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-

(a) *Octostruma stenognatha*

Cox 1	L 2	Cox 2	K	D	ATP 8	ATP 6	Cox 3	G	Nd3	A	R	N	S 1	E	F	Nd5	H	Nd4	Nd4L	T	P	Nd6	Cob	S 2	Nd1	L 1	rrnL	V	rrnS	I	Q	M	Nd2	W	C	Y
-------	-----	-------	---	---	-------	-------	-------	---	-----	---	---	---	-----	---	---	-----	---	-----	------	---	---	-----	-----	-----	-----	-----	------	---	------	---	---	---	-----	---	---	---

(b) Hypothesized ancestor

Cox 1	L 2	Cox 2	K	D	ATP 8	ATP 6	Cox 3	G	Nd3	A	R	N	S 1	E	F	Nd5	H	Nd4	Nd4L	T	P	Nd6	Cob	S 2	Nd1	L 1	rrnL	V	rrnS	M	I	Q	Nd2	W	C	Y
-------	-----	-------	---	---	-------	-------	-------	---	-----	---	---	---	-----	---	---	-----	---	-----	------	---	---	-----	-----	-----	-----	-----	------	---	------	---	---	---	-----	---	---	---

(c) *Formica* sp. and *Linepithema humile*

Cox 1	L 2	Cox 2	K	D	ATP 8	ATP 6	Cox 3	G	Nd3	A	R	S 1	E	F	Nd5	H	Nd4	Nd4L	T	P	Nd6	Cob	S 2	Nd1	L 1	rrnL	V	rrnS	N	M	I	Q	Nd2	W	C	Y
-------	-----	-------	---	---	-------	-------	-------	---	-----	---	---	-----	---	---	-----	---	-----	------	---	---	-----	-----	-----	-----	-----	------	---	------	---	---	---	---	-----	---	---	---

(d) *Leptomyrmex pallens*

Cox 1	L 2	Cox 2	K	D	ATP 8	ATP 6	Cox 3	G	Nd3	A	R	S 1	E	F	Nd5	H	Nd4	Nd4L	T	P	Nd6	Cob	S 2	Nd1	L 1	rrnL	rrnS	N	V	M	I	Q	Nd2	W	C	Y
-------	-----	-------	---	---	-------	-------	-------	---	-----	---	---	-----	---	---	-----	---	-----	------	---	---	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	---	---	---	---	---	-----	---	---	---

(e) *Solenopsis* sp.

Cox 1	L 2	Cox 2	D	K	ATP 8	ATP 6	Cox 3	G	Nd3	A	R	N	S 1	E	F	Nd5	H	Nd4	Nd4L	T	P	Nd6	Cob	S 2	Nd1	L 1	rrnL	rrnS	V	M	I	Q	Nd2	W	C	Y
-------	-----	-------	---	---	-------	-------	-------	---	-----	---	---	---	-----	---	---	-----	---	-----	------	---	---	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	---	---	---	---	-----	---	---	---

(f) *Pristomyrmex punctatus*

Cox 1	L 2	Cox 2	K	D	ATP 8	ATP 6	Cox 3	G	Nd3	A	R	N	S 1	E	F	Nd5	H	Nd4	Nd4L	T	P	Nd6	Cob	S 2	Nd1	L 1	rrnL	rrnS	V	M	I	Q	Nd2	W	C	Y
-------	-----	-------	---	---	-------	-------	-------	---	-----	---	---	---	-----	---	---	-----	---	-----	------	---	---	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	---	---	---	---	-----	---	---	---

(g) *Atta laevigata*, *Octostruma stenognatha*, *Myrmica scabrinodis* and *Vollenhovia emeryi*

Figure 1 (a) The mitogenome gene order of *Octostruma stenognatha* and corresponding strand. (b) Hypothetical ancestor (Boore et al. 1998). (c), (d), (e) and (f) Colored boxes indicate differences in gene order in relation to the hypothetical ancestor in the indicated species. Single letters refer to tRNAs.

A recently proposed new hypothesis for the phylogenetic relationships within the ant group Myrmicinae (Ward et al. 2015) has challenged some earlier ideas about the evolutionary relationships within the subfamily - the largest among ants. Based on eleven nuclear genes, Ward et al. (2015) reduced

drastically the number of tribes from twenty-five to six. In one of the most noteworthy changes, the tribe Attini is not restricted to fungus-growing species, but rather includes other genera such as *Octostruma*. This genus has a long history of instability in its taxonomy, with its systematic position being first described as a subgenus of *Rhopalothrix* (Forel 1917). Only thirty years later *Octostruma* was elevated to genus (Brown 1948), being subsequently allocated into the tribe Basicerotini (Brown 1949). The genus remained stable in that position for more than fifty years, until being transferred to the tribe Dacetini (Baroni Urbani and De Andrade 1994). However, Bolton (1994) almost immediately restored the position of *Octostruma* within Basicerotini. In 2007, Baroni Urbani and De Andrade not only returned *Octostruma* to Dacetini, but also considered this genus to be a junior synonym of *Basiceros*. This classification was not followed by most of the subsequent authors, so that *Octostruma* appears as a valid genus in the paper by Ward et al. (2015), as it was finally transferred to the tribe Attini. The fact that *Octostruma stenognatha* has an identical mitochondrial gene order as *Atta laevigata* (Rodvalho et al. 2014) corroborates the recent change of the genus inside the Attini tribe (Ward et al. 2015). In addition, as a final corroboration that the annotation of the mitogenome was correct, we recovered the place of the trnN gene as the same as the ancestral, position that is being claimed to be the “authentic” one for ants with mitogenomes already sequenced (Babbucci et al. 2014), as opposed to other findings (Gotzek et al. 2010; Berman et al. 2014). The *Octostruma* mitogenome has also high similarity with another member of the tribe Attini: *Wasmannia auropunctata* (Duan et al. 2016), the only possible divergence it is an inversion between the control region and the trnV gene that cannot be verified in this study.

Conclusions

The recent technological advances are accelerating the number of mitogenomes available. Using massively parallel sequencing, we provide here the first mitochondrial genome for *Octostruma*. The characteristics of this mitogenome are very similar to other hymenopterans and comparing this genome with those of other ants is consistent with recent taxonomic changes in the Myrmicinae clade. We expect that soon we will be able to compare genomes

widely in Formicidae, making possible a better understanding of the evolutionary history in this family.

References

- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Babbucci M, Basso A, Scupola A, Patarnello T, Negrisol E (2014) Is it an ant or a butterfly? Convergent evolution in the Mitochondrial Gene Order of Hymenoptera and Lepidoptera. *Genome Biology and Evolution* 6:3326–3343. doi: 10.1093/gbe/evu265
- Baroni Urbani C, de Andrade ML (1994) First description of fossil Dacetini ants with a critical analysis of the current classification of the tribe (amber collection Stuttgart: Hymenoptera, Formicidae. VI: Dacetini). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Serie B* 198:1–65
- Berman M, Austin CM, Miller AD (2014) Characterisation of the complete mitochondrial genome and 13 microsatellite loci through next-generation sequencing for the new Caledonian spider-ant *Leptomymex pallens*. *Molecular Biology Reports* 41:1179–1187. doi: 10.1007/s11033-013-2657-5
- Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritzsche G, Pütz J, Middendorf M, Stadler PF (2013) MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69:313–319. doi: 10.1016/j.ympev.2012.08.023
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27:1767–1780. doi: 10.1093/nar/27.8.1767
- Boore JL, Lavrov DV, Brown WM (1998) Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392:667–668. doi: 10.1038/33577
- Brown Jr. WL (1948) A preliminary generic revision of the higher Dacetini (Hymenoptera: Formicidae). *Transactions of the American Entomological Society* 74:101–129.
- Brown WLJ (1949) Revision of the ant tribe Dacetini. I. Fauna of Japan, China and Taiwan. *Muschi* 20:1:25.
- Cameron SL, Downton M, Castro LR, Ruberu K, Whiting MF, Austin AD, Diement K, Stevens J (2008) Mitochondrial genome organization and phylogeny of two vespid wasps. *Genome* 51:800–808. doi: 10.1139/g08-066
- Cameron SL (2014) Insect Mitochondrial Genomics: Implications for evolution and Phylogeny. *Annual Review of Entomology* 59:95–117. doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162007

- Dlussky GM, Brothers DJ, Rasnitsyn AP (2003) The first late Cretaceous ants (Hymenoptera: Formicidae) from southern Africa, with comments on the origin of the Myrmicinae. *Insect Systematics & Evolution* 35:1–13. doi: 10.1163/187631204788964727
- do Amaral R F, Neves LG, Resende MFR, Mobili F, Miyaki CY, Pellegrino KCM, Biondo C (2015) Ultraconserved elements Sequencing as a low-cost source of complete Mitochondrial Genomes and Microsatellite markers in non-model Amniotes. *PLOS ONE* 10: e0138446. doi: 10.1371/journal.pone.0138446
- Dowton M, Austin AD (1999) Evolutionary dynamics of a mitochondrial rearrangement 'hot spot' in the Hymenoptera. *Molecular Biology and Evolution* 16:298–309. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026111
- Dowton M, Cameron SL, Dowavic JI, Austin AD, Whiting MF (2009) Characterization of 67 Mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that Mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. *Molecular Biology and Evolution* 26:1607–1617. doi: 10.1093/molbev/msp072
- Duan X-Y, Peng X-Y, Qian Z-Q (2016) The complete mitochondrial genomes of two globally invasive ants, the Argentine ant *Linepithema humile* and the little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *Conservation Genetics Resources*. doi: 10.1007/s12686-016-0555-6
- Dunn CW, Giribet G, Edgecombe GD, Hejnol A (2014) Animal Phylogeny and its evolutionary Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45:371–395. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-120213-091627
- Faircloth BC, Glenn TC (2012) Not all sequence tags are created equal: Designing and validating sequence identification tags robust to Indels. *PLoS ONE* 7: e42543. doi: 10.1371/journal.pone.0042543
- Faircloth BC (2013) Illumiprocessor: A Trimmomatic wrapper for parallel adapter and quality trimming. <http://dx.doi.org/10.6079/J9ILL>
- Faircloth BC (2016) PHYLUCE is a software package for the analysis of conserved genomic loci. *Bioinformatics* 32:786–788. doi: 10.1093/bioinformatics/btv646
- Faircloth BC, Branstetter MG, White ND, Brady SG (2014) Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among Hymenoptera. *Molecular Ecology Resources* 15:489–501. doi: 10.1111/1755-0998.12328
- Faircloth BC, McCormack JE, Crawford NG, Harvey MG, Brumfield RT, Glenn TC (2012) Ultraconserved elements anchor Thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary Timescales. *Systematic Biology* 61:717–726. doi: 10.1093/sysbio/sys004

- Fisher S, Barry A, Abreu J, Minie B, Nolan J, Delorey TM, Young G, Fennell TJ, Allen A, Ambrogio L, Berlin AM, Blumenstiel B, Cibulskis K, Friedrich D, Johnson R, Juhn F, Reilly B, Shammas R, Stalker J, Sykes SM, Thompson J, Walsh J, Zimmer A, Zwirko Z, Gabriel S, Nicol R, Nusbaum C (2011) A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biology* 12: R1. Doi: 10.1186/gb-2011-12-1-r1
- Forel A (1917) Cadre synoptique actuel de la faune universelle des fourmis. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 51:229–253.
- Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, Fennell T, Giannoukos G, Fisher S, Russ C, Gabriel S, Jaffe DB, Lander ES, Nusbaum C (2009) Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature Biotechnology* 27:182–189. doi: 10.1038/nbt.1523
- Gotzek D, Clarke J, Shoemaker D (2010) Mitochondrial genome evolution in fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *BMC Evolutionary Biology* 10:300. doi: 10.1186/1471-2148-10-300
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29:644–652. doi: 10.1038/nbt.1883
- Gutrich JJ, VanGelder E, Loope L (2007) Potential economic impact of introduction and spread of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, in Hawaii. *Environmental Science & Policy* 10:685–696. doi: 10.1016/j.envsci.2007.03.007
- Hasegawa E, Kobayashi K, Yagi N, Tsuji K (2011) Complete mitochondrial genomes of normal and cheater morphs in the parthenogenetic ant *Pristomyrmex punctatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News* 15:85:90.
- Havird JC, Santos SR (2014) Performance of single and Concatenated sets of Mitochondrial genes at Inferring Metazoan relationships relative to full Mitogenome data. *PLoS ONE* 9: e84080. doi: 10.1371/journal.pone.0084080
- Hölldobler B, Wilson EO (1990) *The ants*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA
- Hung C-M, Lin R-C, Chu J-H, Yeh C-F, Yao C-J, Li S-H (2013) The de novo assembly of Mitochondrial Genomes of the extinct passenger pigeon (*Ectopistes migratorius*) with next generation Sequencing. *PLoS ONE* 8: e56301. doi: 10.1371/journal.pone.0056301

- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Le TH, Blair D, Agatsuma T, Humair P-F, Campbell NJH, Iwagami M, Littlewood DTJ, Peacock B, Johnston DA, Bartley J, Rollinson D, Herniou EA, Zarlenga DS, McManus DP (2000) Phylogenies inferred from Mitochondrial gene orders--a cautionary tale from the parasitic Flatworms. *Molecular Biology and Evolution* 17:1123–1125. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026393
- Liu G-H, Shao R, Li J-Y, Zhou D-H, Li H, Zhu X-Q (2013) The complete mitochondrial genomes of three parasitic nematodes of birds: A unique gene order and insights into nematode phylogeny. *BMC Genomics* 14:414. doi: 10.1186/1471-2164-14-414
- Liu N, Duan X-Y, Qian Z-Q, Wang X-Y, Li X-L, Ding M-Y (2016) Characterization of the complete mitochondrial genome of the Myrmicine ant *Vollenhovia emeryi* (Insecta: Hymenoptera: Formicidae). *Conservation Genetics Resources*. doi: 10.1007/s12686-016-0535-x
- Lohse M, Bolger AM, Nagel A, Ferine AR, Lunn JE, Stitt M, Usadel B (2012) RobiNA: A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Research* 40: W622–W627. doi: 10.1093/nar/gks540
- Mao M, Valerio A, Austin AD, Dowton M, Johnson NF (2012) The first mitochondrial genome for the wasp superfamily Platygastroidea: The egg parasitoid *Trissolcus basalis*. *Genome* 55:194–204. doi: 10.1139/g2012-005
- Mao M, Gibson T, Dowton M (2015) Higher-level phylogeny of the Hymenoptera inferred from mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 84:34–43. doi: 10.1016/j.ympev.2014.12.009
- Moritz C (1987) Evolution of animal Mitochondrial Dna: Relevance for population biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:269–292. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.18.1.269
- Pérez SP, Corley JC, Farji-Brener AG (2010) Potential impact of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* on conifer plantations in northern Patagonia, Argentina. *Agricultural and Forest Entomology* 13:191–196. doi: 10.1111/j.1461-9563.2010.00515.x
- Perseke M, Golombek A, Schlegel M, Struck TH (2013) The impact of mitochondrial genome analyses on the understanding of deuterostome phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66:898–905. doi: 10.1016/j.ympev.2012.11.019

- Picardi E, Pesole G (2012) Mitochondrial genomes gleaned from human whole-exome sequencing. *Nature Methods* 9:523–524. doi: 10.1038/nmeth.2029
- Ramakodi MP, Singh B, Wells JD, Guerrero F, Ray DA (2015) A 454 sequencing approach to dipteran mitochondrial genome research. *Genomics* 105:53–60. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.10.014
- Rodvalho C de M, Lyra ML, Ferro M, Bacci M (2014) The Mitochondrial genome of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*: A Mitogenome with a large number of Intergenic spacers. *PLoS ONE* 9: e97117. doi: 10.1371/journal.pone.0097117
- Rohland N, Reich D (2012) Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Research* 22:939–946. doi: 10.1101/gr.128124.111
- Saito S, Tamura K, Aotsuka T (2005) Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics* 171:1695–705.
- Sankoff D, Bryant D, Deneault M, Lang BF, Burger G (2000) Early Eukaryote evolution based on Mitochondrial Gene Order Breakpoints. *Journal of Computational Biology* 7:521–535. doi: 10.1089/10665270075005092
- Shen H, Braband A, Scholtz G (2015) The complete mitogenomes of lobsters and crayfish (Crustacea: Decapoda: Astacidea) reveal surprising differences in closely related taxa and convergences to Priapulida. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53:273–281. doi: 10.1111/jzs.12106
- Smith MJ, Arndt A, Gorski S, Fajber E (1993) The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *Journal of Molecular Evolution* 36:545–554. doi: 10.1007/bf00556359
- Song S-N, Tang P, Wei S-J, Chen X-X (2016) Comparative and phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes in basal hymenopterans. *Scientific Reports* 6:20972. doi: 10.1038/srep20972
- Tan MH, Gan HM, Schultz MB, Austin CM (2015) Corrigendum to 'MitoPhAST, a new automated mitogenomic phylogeny tool in the post-genomic era with a case study of 89 decapod mitogenomes including eight new freshwater crayfish mitogenomes' [*Mol. Phylogenet. Evol.* 85 (2015) 180–188]. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 87:118. doi: 10.1016/j.ympev.2015.03.017
- Ward PS, Brady SG, Fisher BL, Schultz TR (2014) The evolution of Myrmicine ants: Phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomology* 40:61–81. doi: 10.1111/syen.12090
- Way M (1992) Role of ants in pest-management. *Annual Review of Entomology* 37:479–503. doi: 10.1146/annurev.ento.37.1.479
- Wei S, Shi M, Sharkey MJ, van Achterberg C, Chen X (2010) Comparative mitogenomics of Braconidae (Insecta: Hymenoptera) and the phylogenetic

utility of mitochondrial genomes with special reference to Holometabolous insects. *BMC Genomics* 11:371. doi: 10.1186/1471-2164-11-371

Xiao J-H, Jia J-G, Murphy RW, Huang D-W (2011) Rapid evolution of the Mitochondrial genome in Chalcidoid Wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea) driven by parasitic lifestyles. *PLoS ONE* 6: e26645. doi: 10.1371/journal.pone.0026645

Yang, S., Li, X., Cai, L.-G., and Qian, Z.-Q. 2016. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Formica selysi* (Insecta: Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *Mitochondrial DNA* 27(5): 3378–3380

Yuan Y, Li Q, Yu H, Kong L (2012) The complete Mitochondrial Genomes of Six Heterodont Bivalves (Tellinoidea and Solenoidea): Variable gene arrangements and Phylogenetic implications. *PLoS ONE* 7: e32353. doi: 10.1371/journal.pone.0032353

Capítulo IV

**Comparative phylogeography in the Brazilian
Atlantic Rainforest**

Resumo

Conhecida por sua biodiversidade e altos níveis de endemismo, a Floresta Atlântica Brasileira (BAF) tem sido caracterizada como um dos ambientes mais ameaçados do planeta. Mesmo com o crescente interesse científico, ainda nos falta um cenário coeso para a compreensão da origem e manutenção da biodiversidade na BAF, particularmente pelo fraco poder de análises com poucos loci independentes. Neste estudo usamos um conjunto de dados de larga escala de várias espécies de formigas para investigar padrões filogeográficos na BAF. Em particular, sequenciamos elementos ultraconservados para gerar um banco de dados com centenas de loci usando um método de captura com iscas desenvolvidas especialmente para Hymenoptera. Estes resultados foram integrados com modelagem de nicho climático do presente e de clima passados (último máximo glacial-LGM - e períodos interglaciais - LIG). Encontramos diferenças substanciais entre as espécies em níveis de variabilidade genética, diferenciação norte-sul e níveis de estruturação geográfica. Espécies com divergências intraespecíficas mais profundas foram associadas com áreas maiores de adequabilidade no sul da BAF, particularmente durante o LIG, enquanto divergências mais recentes foram encontradas em espécies com áreas de adequabilidade no norte da BAF. Finalmente, uma espécie com divergências rasas também mostrou baixa estruturação geográfica, um padrão consistente com altos níveis de capacidade de dispersão (fluxo gênico) e/ou expansão recente. Estas respostas sugerem que o padrão atual de distribuição geográfica é um resultado complexo de fatores históricos (ex. climas passados, refúgios) e de características biológicas (ex. habitat, capacidade de dispersão, nicho climático), levando a padrões idiossincráticos para diferentes espécies.

Palavras-chave: Quaternário, refúgios, marcadores nucleares, elementos ultraconservados.

Abstract

Known for its remarkable biodiversity and high levels of endemism, the Brazilian Atlantic Rainforest (BAF) has been characterized as one of the most threatened biomes on the planet. Despite strong interest in recent years, we still lack a comprehensive scenario to explain the origin and maintenance of diversity in the BAF, particularly given the relatively poor power of analyses involving few independent genetic loci. Here we used a phylogenomic-scale dataset of several ant species to investigate phylogeographical patterns across the BAF. In particular, we sequenced capture of ultraconserved elements to generate hundreds of loci for several ant species using a bait set developed specifically for hymenopterans. These results were then integrated with environmental niche modeling of current and past climates (last glacial maximum - LGM - and last interglacial periods - LIG). We found substantial differences among species in the level of genetic variability, north-south differentiation and level of geographical structure. Interestingly, species with deeper intraspecific divergences were associated with relatively large suitable areas in the southern BAF, particularly during the LIG, whereas shallower divergences were found in species with more suitable regions in the northern BAF. Finally, a species with very shallow divergences also showed little geographical structure in its genetic variability, a pattern consistent with high dispersal capacity (gene flow) and/or recent expansion. These results suggest that the current pattern of geographical distribution is the complex outcome of historical (e.g. past climates, refugia) and biological characteristics (e.g. habit, dispersal capacity, climatic niche), leading to idiosyncratic patterns for different species.

Keywords: Quaternary, refugia, nuclear markers, ultraconserved elements.

Introduction

The Brazilian Atlantic Rainforest (BAF) is a unique biome and a noteworthy example of a hotspot of biodiversity (MYERS et al. 2000). It is part of a world's narrow list of biogeographical regions that are biologically rich and severely threatened (CI 2016). Any effort to protect and to better understand the biogeographical history of this environment should be welcomed and supported. In particular, there is evidence showing that the threat of climate change can be particularly hurtful to tropical forests (ŞEKERCIOĞLU et al. 2012) and estimates that 92% of present conservation areas will be unsuitable within a century (LOARIE et al. 2009), a scenario that is also becoming more accepted for the BAF (NEMÉSIO et al. 2016). Therefore, the understanding of the distribution of biological diversity in the BAF it is not only essential, but critical and urgent.

The appeal to climatic changes to interpret species and population distribution is broadly known, especially in coastal areas where the fluctuations in sea level is a recurrent evidence used explaining for population distributions as well as to future predictions (e.g. BARKET et al. 2012). One of the most widely discussed phenomenon is the refugia theory. This elegant idea was first proposed for the Amazon (HAFFER 1969), but later was applied in diverse regions of the world (HEWITT 2000). Essentially, it supports that when the climate changed, some regions became drier and the forests shrunk their areas and persisted only in the humid and stable sites, the refugia. Once the climate changed again and the forests returned to their original ranges, the vicariant process produced speciation and/or genetic differentiation between populations isolated in different refugia. And, as a result, now we see endemism and higher genetic diversity in areas that served as refugia than in the areas that were not climatically stable.

The refugium theory began to be more tested, accepted and earned notoriety in BAF after the Carnaval and Moritz (2008) study. They inferred that, during the Last Glacial Maximum (LGM), only the northern portion and a small area in the central BAF were climatically stable to be suitable as a refugium, in this way, the southern BAF should expect signals of demographic expansion after the postglacial diffusion of the forest back to this region. Subsequently, other

studies also demonstrated that climate changes, especially in the Pleistocene, affected species distribution in the BAF (e.g. CARNAVAL et al. 2009; THOMÉ et al. 2010; TONINI et al. 2013; TAVARES et al. 2015; CABANNE et al. 2016). Another event well explored in the BAF is the fluvial vicariance, specially documented for the Doce River. This river recently received internationally attention when a dam with waste from iron mines collapsed bringing a “mud tsunami” with potentially two dozen heavy metals into the river, causing one of the biggest environmental disasters in Brazilian history (ESCOBAR 2015), the consequences of this tragedy are not yet fully known, but the first studies are alarming (MARTA-ALMEIDA et al. 2016; SEGURA et al. 2016). Doce river has the largest wave-dominated delta of the Brazilian coast (ROSSETTI et al. 2015) and appears to play a role as a barrier to plants (RIBEIRO et al. 2010) and to many vertebrate taxa (e. g. PELLEGRINO et al. 2005; CABANNE et al. 2008; THOMÉ et al. 2010), besides its formation being dated to before the Pleistocene (LUNDBERG et al. 1998).

Amazonian biogeographic connections are also being proposed with respect to BAF, creating a scenario that contrasts with its currently isolation in the South America continent. Although the subject has been known for some time (OLIVEIRA-FILHO AND RATTER 1995), only more recently it is starting to be more explored. The evidence mostly fall into species or groups that co-occur in the two regions (GALDINO-LEAL AND CÂMARA 2005). Pioneer studies are starting to explicitly test the proposal (e.g. BATALHA-FILHO et al. 2013), with corridors of suitable habitat between the two regions being possible taking into account climate change over time (PRATES et al. 2016).

Overall riverine influence and the refugia theory were repeatedly addressed in the first large phylogeography BAF studies as explanations for the high indices of biodiversity and endemism (e.g. GRAZZIOTIN et al. 2006; RESENDE et al. 2010; D'HORTA et al. 2011; MARTINS 2011), however in the following years the assumptions have become controversial with studies showing discordant results as different taxonomic groups started to be sampled (e.g. COLOMBI et al. 2010; PINHEIRO et al. 2011; BATALHA-FILHO et al. 2012; CARDOSO et al. 2015; PERES et al. 2015) and not only North to South

distributions began to be considered (GOETZE et al. 2016), showing that a more complex scenario for BAF is probably in the frame. So, despite this growing interest and increase of the number of researches working with phylogeography in BAF, its past genetic distribution stands blurry, perhaps because the majority of the phylogeographical investigations being concentrate in vertebrates, a tendency that actually is not exclusively to BAF, since “a single-species study with a vertebrate remains the gold standard of phylogeographic data collection” (GARRICK et al. 2015).

A larger view of BAF should include comparative phylogeography and especially with taxonomic groups poorly represented in these studies, as the invertebrates. To perform this task, Formicidae is a particularly versatile group that has been used as a model system to investigate phylogeographical patterns in a wide range of terrestrial ecosystems (e.g. QUEK et al. 2007; SOLOMON et al. 2008; LEPPÄNEN et al. 2011). With currently more than 15,000 species described (www.AntWeb.org), ants are eusocial organisms that display a variety of habitats being distributed along all continents (with the exception of the poles), and also have a wide range of relationships with other living beings (HÖLLDOBLER & WILSON 1990).

An important drawback in the phylogeographical studies, not only in ants, but in all animals, was that until recently the only source of information was relied to the mitochondrial DNA, which substantially corresponds to a single genealogical locus. Biases, like selective sweeps and introgression, can more easily be introduced when only the mitochondrial information is considered and therefore was heavily criticized (WIENS et al. 2010). Fortunately, recent new sequence technologies made the nuclear genomic data widely available and are impressively increasing the total number of alleles sampled and the number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) per data set in phylogeographical studies (GARRICK et al. 2015). Tools like the sequence capture of ultraconserved elements (UCEs) brings the possibility of the use of hundreds to thousands of unlinked nuclear loci at once (MCCORMACK et al. 2013), including in the Hymenopteran clade (FAIRCLOTH et al. 2014) and are being able to solve remote and recent relationships (SMITH et al. 2014). But, unfortunately, these

technologies are not yet spread in the field with recently BAF studies still relying on in a few genes (e.g. BATALHA-FILHO and MIYAK 2016; CABANNE et al. 2016), including in the scarcest ones with invertebrates (BRAGAGNOLO et al. 2015).

The goal of the present study is a comparative phylogeography research with several ant species from BAF. We are using an extensive data set from an unrepresented group in BAF past studies. This was possible with the alliance of the new technologies to produce a pioneer approach applied to BAF. Since genetics conservation can be strongly benefited by scaling up to genome-wide data (SHAFFER et al. 2015), this study aims to improve our understandings about the biogeographical history of this relevant hotspot of biodiversity.

Material and Methods

Genomic DNA was extracted from 142 specimens of the following ant species: *Fulakora elongata* (Amblyoponinae), *Heteroponera dentinodis* (Heteroponerinae), *Hylomyrma reitteri* (Myrmicinae), *Megalomyrmex drifti* (Myrmicinae), *Octostruma rugifera* (Myrmicinae), *Octostruma stenognatha* (Myrmicinae), *Odontomachus meinerti* (Ponerinae), *Strumigenys crassicornis* (Myrmicinae), and *Strumigenys denticulata* (Myrmicinae) from twenty-one localities covering most of the Brazilian coast and the original distribution of the BAF (Figure 1), although not all species were obtained from all locations (Table S1). These species were selected based on their considerable variation in ecological properties, particularly at the genus level. For instance, *Fulakora* species live in small colonies and are specialized centipede predators; *Heteroponera* species are diurnal, with workers preferentially foraging on the forest floor; *Hylomyrma* are generalist epigeic predator that nests in the leaf litter, fallen logs and in the superficial layers of the soil; *Octostruma* move slowly and are predators of small, soft-bodied arthropods; *Odontomachus* are large-bodied predators with their typical specialized trap-jaws; *Strumigenys* are highly abundant, minute ants that prey on small arthropods, especially mites and springtails, and tend to become immobile when threatened (see Baccaro et al. 2015).

The studied specimens were obtained as part of a larger effort to survey the ant fauna of the Atlantic Rainforest between 1999 and 2001 as part of a BIOTA-FAPESP initiative. Voucher specimens of ants from the same nest series of all species were deposited in the myrmecological collection of the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brazil. DNA extraction was carried out using the PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen, USA) and double strand DNA concentration was measured on a Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Inc.) using dsDNA High Sensitivity Assay Kit. The initial DNA concentration for these samples were high variable ranging from “too low” (> 0.2 ng total DNA) to 14.2 ng/μl. Depending on the amount of the DNA, integrity was checked either through agarose gel electrophoresis or using Bioanalyzer (Agilent Technologies). Highly fragmented samples were not sheared and followed directly to the library preparation for Illumina sequencing. We named these samples “preserved in ancient conditions” because of the of their age (they were collected more than 15 years ago), size and state of preservation that are very similar to the situation on ancient samples (HÖSS et al. 1996) (Figure S1). Samples with high integrity were sheared by sonication with the Q800 equipment (Qsonica Inc.) in 15 s on–15 s off cycles for 50 s with 20 % amplitude.

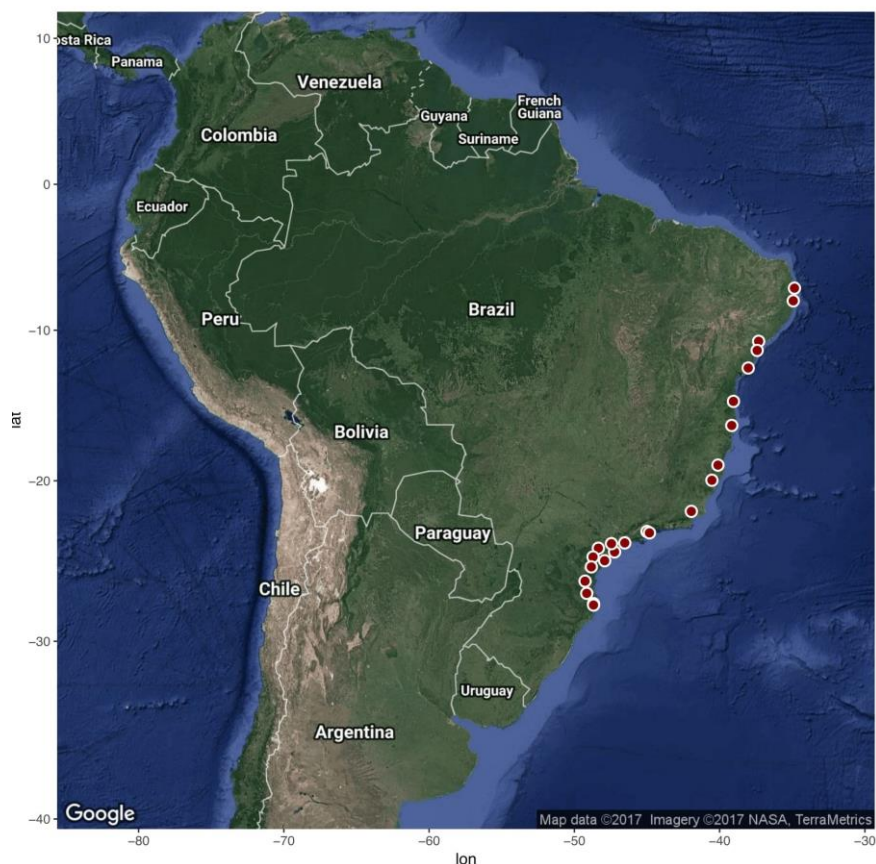


Figure 1. Location of the sampling sites from which the studied specimens were obtained.

The chosen protocol to prepare the Illumina libraries was the KAPA Hyper prep kit (Kapa Biosystems) adjuvant with a bead technique (FISHER et al. 2011), which was employed with an alternative for SPRI beads (ROHLAND AND REICH 2012). We used approximately 30 ng of total starting DNA with the samples that reached this amount, or simply used all the DNA available when the amount was less than this value. All reactions, except PCR, were carried out using $\frac{1}{4}$ of volume indicated by the manufacturer. Each sample was individually labeled using the iTru dual-indexing adapter system (GLENN et al. 2016), which is similar to the TruSeq layout barcodes (FAIRCLOTH AND GLENN 2012), and we obtained our adapter ligated DNA for all samples with 12-16 PCR cycles (more cycles were performed with low concentration samples). If necessary, the samples were “cleaned up and/or bottom” using different ratios of SPRI beads to remove fragments that were too long or too short to continue the process.

Samples that did not reach at least a total DNA of 20 ng were discarded because they would compromise the better-quality samples with the needed randomization in the next step.

A target enrichment process (GNIRKE et al. 2009) was then used to obtain ultraconserved elements (UCEs) that were specifically designed for Hymenoptera (FAIRCLOTH et al. 2014) with a modified protocol from Faircloth et al. (2012). We created pools with eight samples and each pool was concentrated to 147 ng/ μ l in a vacuum centrifuge and later enriched for 1510 UCEs using manufactured RNA capture probes (MyBaits, Mycroarray, Inc.). We followed all the manufacturer's protocol except for the on-bead (biotinized) PCR. Although off-target sequences were aimed to be removed with two following washes, there were still remains of mitochondrial DNA in the library (STRÖHER et al. 2016). Bioanalyzer (Agilent Technologies) was used again to dimension the size of the enriched material, succeeded for a real-time PCR to measure the library concentration adopting the Kapa Library Quantification kit (Kapa Biosystems, Inc.). Once more, we had to eliminate some samples (four out of 12 pools), given that some of the pools did not achieve the minimum amount required from the sequence facility causing the removal of all samples of *Fulakora elongata*. The remaining pools containing sixty-four samples were combined together at equimolar ratios and sequenced on Illumina HiSeq2000 sequencer, using 100-bp paired-end reads at the University of California Santa Cruz, Genome Technology Center.

After sequencing, we converted the BCL files into FASTQ and demultiplexed samples using the Illumina bcl2fastq Conversion Software v1.8.4. FastQC 0.11.3 (ANDREWS 2010) was used to assess the sequencing quality. Performed through Illumiprocessor (FAIRCLOTH 2013), the Trimmomatic tool (LOHSE et al., 2012), was applied to pull out low quality regions, barcodes and adapters. The assembly was carried out with PHYLUCE (FAIRCLOTH 2016) implemented with the default Trinity tool (GRABHERR et al. 2011). The resulting contigs were processed with the PHYLUCE workflow analysis where the UCEs were recovered and the obtained matrices were generated following the extraction of the fasta format data. The sequences were aligned using MAFFT

(KATOH and STANDLEY 2013) and irregular edges were automatically cleaned. The additional refined adjustments like the locus name removal, addition of missing data designators and format conversions were also performed through PHYLUCE (FAIRCLOTH 2016). The following analyses were realized removing three species, *Heteroponera dentinodis*, *Hylomyrma reitteri* and *Megalomyrmex drifti*, because sequences from fewer than three individuals were obtained for these species (see below).

We pruned the obtained data to generate complete, concatenated matrices (without any missing locus for any specimen), and their relationships were inferred using maximum likelihood through RAxML version 8.0.0 (STAMATAKIS 2014) using an unpartitioned, GTRGAMMA nucleotide substitution model. Given that the obtained trees are unrooted, we used the following approach to obtain proper rooting. First, we searched for the phylogenetically closest species for which a reasonably large number of loci was available (Table S2). Thus, the outgroups for *Octostruma rugifera*, *Octostruma stenognatha*, *Odontomachus meinerti*, and *Strumigenys crassicornis* were *Strumigenys crassicornis*, *Hylomyrma reitteri*, *Heteroponera dentinodis*, and *Megalomyrmex drifti*, respectively. We then built a concatenated alignment using only the shared loci by selecting the longest sequence in the corresponding outgroup species and locus, and analyzed the resulting alignment using RAxML. The obtained placement of the outgroup was then used to root the original trees. We also assessed the relative timing of the obtained divergences using BEAST version 1.8.4 (DRUMMOND et al. 2012), with MCMC runs of 10 million generations, trees were sampled every 1000 generations with GTR+ Γ nucleotide substitution model and a burn-in of 10%. Uncertainty in the obtained topologies was visualized using DensiTree (BOUCKAERT 2010).

We inferred how the geographical distribution of the studied species might have been influenced by the climatic changes during their recent evolutionary past using ecological niche models (ENMs) using Maxent 3.3.3.k (PHILLIPS et al. 2006). Occurrence records of each species were obtained from the literature (Table S3). We selected a preliminary set of 19 variables from the WorldClim database (www.worldclim.org; HIJMANS et al. 2005) and then performed a

Pearson correlation test and retained only the variables with correlation values <0.85 . We used these variables to generate present-day model for each species. To estimate the past potential distribution, present-day models were projected into two periods: the Last Inter-Glacial and the Last Glacial Maximum.

Results

Basic descriptive statistics of UCE loci recovered for each species are shown in Table 1. We were unable to obtain any UCE locus from three out of the original sixty-four samples, which we believe is a highly satisfactory result, given the highly-degraded state of the DNA extracts and that the UCE baits were developed for Hymenoptera rather than specifically for ants. Interesting, we did not find a significant relationship between the initial DNA concentration and the number of obtained loci ($R=0.016$, $P=0.33$), suggesting that the level of DNA fragmentation might be more important than the concentration itself in the success of UCE capture.

Table 1. Descriptive statistics of ultraconserved elements obtained in the present study. Values are indicated as mean SD (range). It was not possible to calculate the number of parsimony-informative sites for *H. dentinodis* and *H. reitteri* due to the small number of sequenced specimens.

Species	Number of individuals	Number of loci	Fragment size (bp)	Number of parsimony-informative sites
<i>Odontomachus meinerti</i>	9	538±156 (136-638)	442±155.5 (224-3137)	139.3±87.7 (42-424)
<i>Octostruma stenognatha</i>	13	594±101 (289-663)	619±241.3 (224-2051)	248±54 (124-316)
<i>Strumigenys crassicornis</i>	7	613±29.9 (575-655)	503±174.6 (224-1625)	81.5±55.6 (4-231)
<i>Strumigenys denticulata</i>	19	577±98.4 (240-670)	535±209.3 (224-2311)	159±7.07 (154-164)
<i>Octostruma rugifera</i>	5	598±55.4 (509-638)	537±197.1 (224-1414)	137.5±92.5 (7-470)
<i>Heteroponera dentinodis</i>	3	678±16.5 (665-697)	719±309.8 (224-2586)	-
<i>Hylomyrma reitteri</i>	2	579±30.4 (558-601)	460±129.9 (225-1103)	-

The trees from concatenated UCE loci for each species are shown in figure 2. The topologies from ML (RAxML) and BI (BEAST) are almost congruent, so that only BI trees will be shown. There were intriguing differences among the studied species. The oldest divergences within *Octostruma rugifera* correspond to sites in the southern BAF (Morretes, state of Paraná, Palhoça, state of Santa Catarina (Figure 2). A similar pattern was detected in *S. crassicornis*, but the fact that only one sample was obtained from Northeastern Brazil suggests that this result should be interpreted with caution. On the other hand, *Octostruma stenognatha* the oldest divergences were found in samples from the northeastern BAF (states of Bahia and Pernambuco, Figure 2). Finally, there was little geographical structure in the relationships among samples of *Odontomachus meinerti*, with samples from distant locations often being found to be genetically similar. These results in *Odontomachus meinerti* were robust to uncertainty in phylogenetic inference, as indicated by DensiTree plots (Figure 2).

Although it is not possible at the moment to estimate absolute dates for the divergence times in our study, if we assume that UCE loci share similar mutation rates, one could directly compare their divergence times (Figure 3). Interestingly, *Odontomachus meinerti* was associated with the shallowest divergences (Figure 2). On the other hand, relatively shallow divergences were found in *Octostruma stenognatha*, despite strong differentiation between samples from northern and southern BAF. Finally, *Octostruma rugifera* and *Strumigenys crassicornis* showed the deepest divergences (Figure 3). These results are particularly intriguing given the inferred geographical distribution of habitat suitability according to current and past ENMs (Figure 4). In particular, the deepest divergences were associated with species with extensive suitability in the southern BAF, particularly during the LIG (i.e. *Octostruma rugifera* and *Strumigenys crassicornis*), whereas *Octostruma stenognatha*, a species with relatively shallow intraspecific divergences, showed considerably less habitat suitability in the southern BAF in relation to the north. Finally, *Odontomachus meinerti* showed both high instability in regions of climatic suitability across the LIG, LGM and the present and low relative genetic divergences. This combination of results suggests a scenario of population expansion and/or high dispersal

capacity, which could erase any geographical structure in the observed genetic variability of the species (Figure 2).

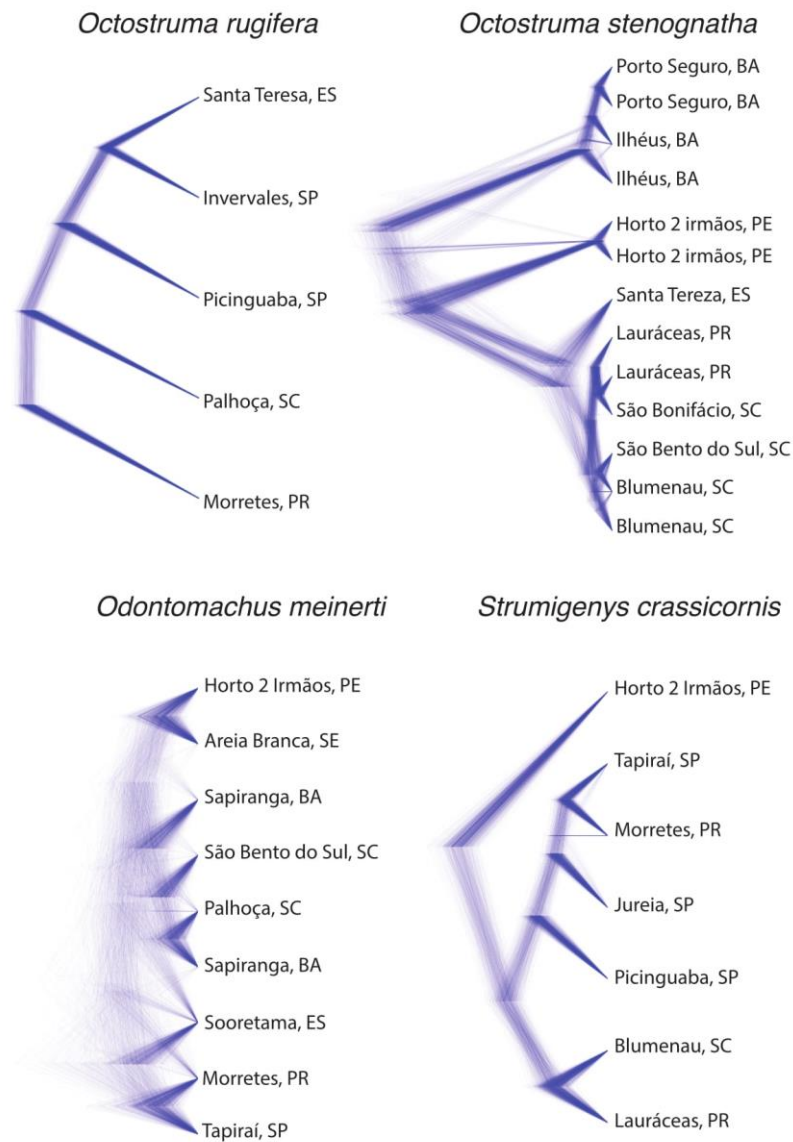


Figure 2 Relationships among specimens from different sites inferred from a Bayesian evolutionary analysis using BEAST, with topological uncertainty visualized based on 1000 post-burn-in trees using DensiTree.

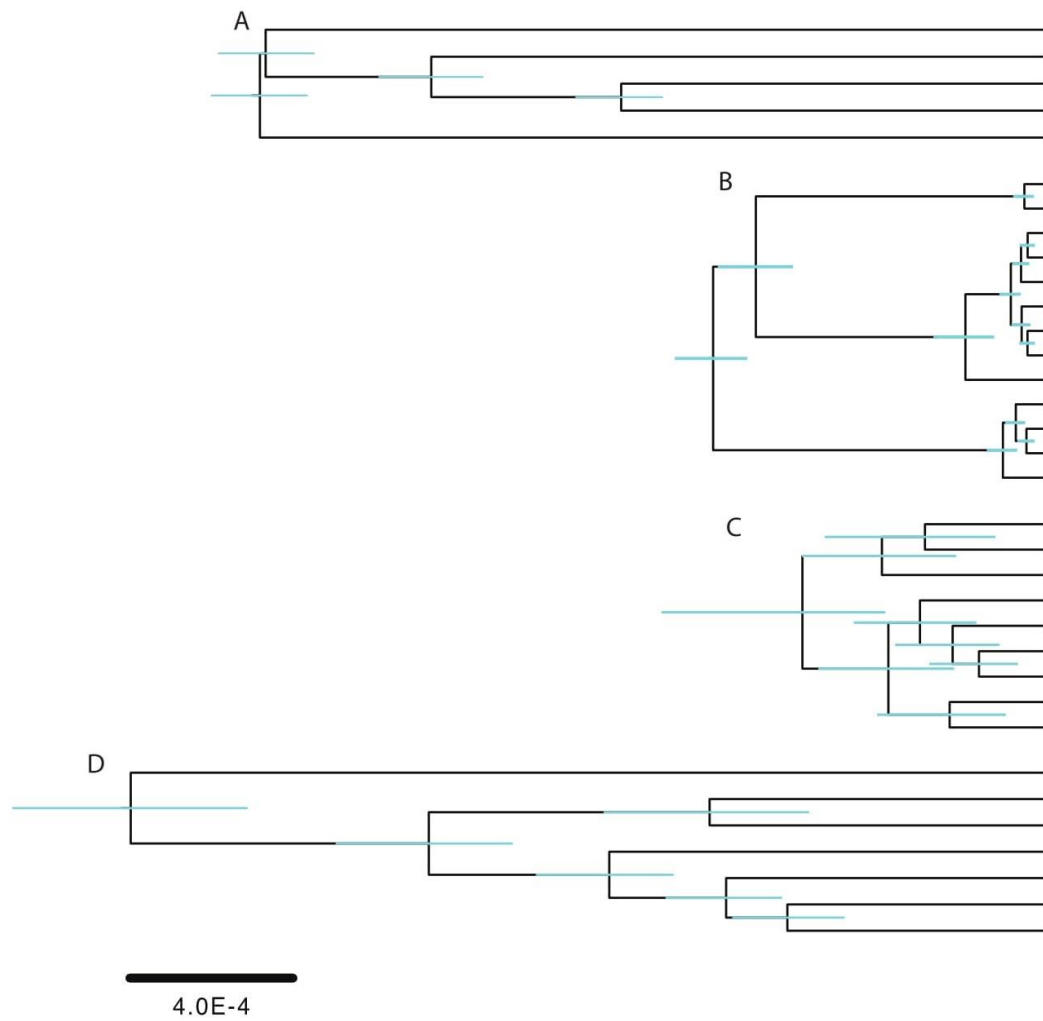


Figure 3. Chronogram indicating relative timing of divergence times of sequences from the studied species. Blue lines indicate 95% credibility intervals. A = *Octostruma rugifera* B = *Octostruma stenognatha*. C = *Odontomachus meinerti*, D = *Strumigenys crassicornis*.

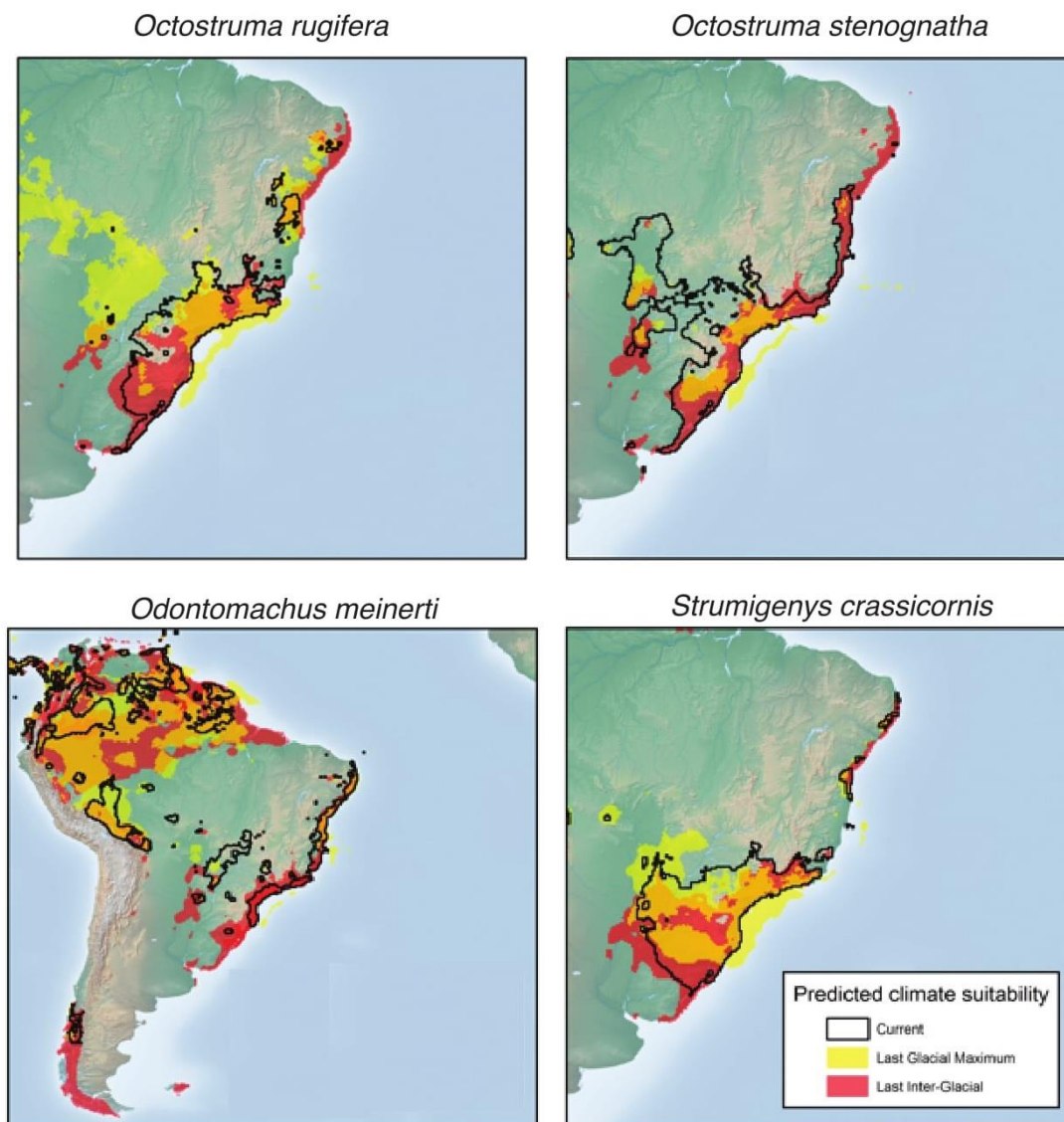


Figure 4. Environmental niche modeling of climatic suitability in the present time, last glacial maximum (LGM), and last inter-glacial period (LIG) for the studied species.

Discussion

Here we contribute to the debate about BAF diversification history by exploring the comparative phylogeography of an ecologically-diverse sample of ant species, particularly given that invertebrates are an underrepresented group in BAF studies. In general, our results tended to recover some north/south division in the BAF in the studied species. On the other hand, there were substantial differences among species, both in the location of the divisions, as

well as in the pattern of variation within these areas. This suggests that different species responded idiosyncratically to the climatic changes that took place in the BAF, and that a single scenario might not be sufficient to encompass the dynamics underlying the diversification of the biome (BATALHA-FILHO et al. 2012; RAPOSO DO AMARAL et al. 2016). Moreover, this phylogeographical finding of discordant evolutionary histories in co-distributed taxa was also recently reported for the Amazon (SMITH et al. 2014). Our study is consistent with these findings in the case of BAF, thus highlighting that our early assumptions of a single explanation for diversification in the Neotropic were premature.

To help us explain how species are influenced by extant and previous climatic conditions, we applied the niche modeling approach that has been successfully used in this and others biomes (e.g. PIE et al. 2013; MORALES et al. 2015; NICOLAS et al. 2016), and that has been confirmed as accurate even with small number of samples (PEARSON et al. 2007). For all studied ant species, we noticed shifts in areas of adequability between the present and the Last Inter-Glacial (LIG) period, with most discrepancy occurred between present +LIG and the Last Glacial Maximum (LGM). A substantial fraction of suitable areas was located where today is the Atlantic Ocean, similar to what was hypothesized by Cabanne et al. (2016). In the case of *O. rugifera*, where the ancient divergences are found in the southern BAF, this is also the region with broad adequability during the LIG. The opposite happens in *O. stenognatha*, where the oldest lineages are found in the north and this was the region of major adequability in the LIG. This is a very interesting result given that both species are from the same genus (*Octostruma*), showing how species-specific is their response to climatic changes.

Our environmental niche models of climatic suitability and genetic results agree with a previously proposed northern refugium (CARNAVAL et al. 2009; THOMÉ et al. 2010), and also recognizes patterns found in another ant study that was carried out only with mitochondrial genes (RESENDE et al. 2010). The finding of a northern distinct clade in our comparative phylogeographical analyses shows that the Bahia area is indeed a consistent candidate to a refugium, as was proposed (CARNAVAL AND MORITZ 2008; CARNAVAL et al. 2009) and

restated later (CARNAVAL et al. 2014). However, the high divergences found in lineages of the southern BAF are consistent with the existence of a southern refugium (THOMÉ et al. 2010). Interestingly, the difference in the relative time of different lineages also suggests that this southern refugium might have taken place at an earlier period than its northern counterpart. Still about climatic influences, in recent assertions, some authors proposed that the glaciation and refugia had minor effects in BAF, including the preposition of a new “Atlantis Forest hypothesis” (LEITE et al. 2016a), and that the fragmentation has small influence in the forest elasticity (THOMÉ et al. 2014). Although, the first idea was heavily criticized (RAPOSO DO AMARAL et al. 2016, see also LEITE et al. 2016b), both articles agree in the point that different taxonomic groups with a widely genome sample, instead of few genes, needs to be addressed in order to lead to a solid understanding about BAF history, a lack that the present study helps to fill.

The absence of a strong genetic structure in nuclear DNA from samples in the southern BAF area was also reported by Batalha-Filho and Miyaki (2016) in birds. Although these results could be explained by a delay in the coalescence from nuclear DNA comparing to the mitochondrial (HARE 2001) or by a recent divergence leading to an incomplete lineage sorting (MADDISON and KNOWLES 2006), these scenarios are starting to become less possible as a weaker genetic structure in the southern BAF comparing to the northern is starting to consistently be found among different taxa. In our case, we can also hypothesize that gene flow was possible because of the ant mating biology, where in general winged male and female fly to a nuptial encounter and after the mating the juvenile queen can be carried away by the winds before the landing to settle a new colony (BAER et al. 2011).

A characteristic that is not usually addressed in BAF studies involves very recent climatic changes. Many studies discuss climatic variation during Quaternary, but little is explored in terms of historical data. Although scarce, we have records for the BAF climate in the past few hundreds of years. According to historical notes, we know that Brazil was also affected by the “Little Ice Ages”- colder periods that were well documented in the Old World between the sixteenth

and nineteenth centuries (LOCKWOOD 2001; NESJE AND DAHL 2003). There are reports made by Europeans in their excursions to explore and/or colonize more remote areas of Brazil. Evidence for cooler temperatures and unusual climatic conditions in north BAF were reported independently by Georg Margrave and Johannes de Laet in seventeenth century with the penetration of an Atlantic polar anticyclone in the Pernambuco area (SANT'ANNA NETO et al. 2015). In the southern BAF, the descriptions made by the French naturalist Auguste Saint-Hilaire through the 1816 to 1822 years are noteworthy. He described intense cold conditions with frost, below 0°C temperatures and snow covering the mountains between Rio de Janeiro and São Paulo (SAINT-HILAIRE 1822). In fact, allusions to austere icy/snowy conditions are frequent in all available weather reports to this region for the nineteenth century (ARAKI 2012). Few hundred years ago, the BAF populations were able to go through weather conditions similar to the modelling ones for the LGM. This observation should be viewed as a support for modern research results that show the maintenance of the south BAF populations in the past.

Finally, our results underscore the potential of using UCEs as a valuable source of genetic data for shallow time-scales (SMITH et al. 2014), as has been demonstrated in ants for deeper time-scales (BLAIMER et al. 2015). Interestingly, a recent phylogeographical study failed to find nuclear divergences among populations of the sand dune ant *Mycetophylax simplex*, such that nuclear loci had to be discarded from the analyses (CARDOSO et al. 2015). In other cases, UCEs variation is comparable with that found in introns obtained from Sanger sequencing of nuclear DNA (SMITH et al. 2014).

Conclusion

As we reach almost a decade since the first large-scale phylogeography studies for this area, it is becoming evident that the natural history of the Brazilian Atlantic Rainforest is a complex mosaic structured by several factors. Hypotheses containing refugia and geographical barriers gives prominence in this scenario

but are probably, only part of the story. Nevertheless, our results suggest the preservation of southern populations during the Quaternary climatic fluctuations, similar to other recent findings and unlike the initial predictions to BAF. Our results also display the potential and utility of UCEs to address a more complete history in phylogeography studies and supports the idea of a complex net of characters for the explanation of BAF history and biodiversity. It was the first time that a genomic view from invertebrates was used for inferences in this biome. We considered our results as solid as they were generated by a wide dataset of loci that can infer evolutionary histories more accurately than individual locus (BRAGG et al. 2015). And, as the phylogeography itself is in a turning point (GARRICK et al. 2015), it is good to see that BAF is not behind in studies using the technology that we predict in a soon future is going to be the standard to address genetic inferences.

The idea that biodiversity is only the species number in an area and that the better conservation strategy should be simply preserve the place with the higher richness is not acceptable anymore. The rising concept is the demand for a revision in our conservation priorities giving space to an interdisciplinary approach making science-policy partnerships possible (MARCHESE 2015). But, in the other hand, is notable the gap between basic research and applicable solutions for conservation (SHAFER et al. 2015), strategies to spread the knowledge generated in our labs into the real world should be considered to turn our scientific findings more applicable. The high level of fragmentation in the BAF domain caused by humans affects many species causing extinctions, impact the life of millions of people who live at original distribution of forest and also significantly reduces the genetic diversity in the area. In this context, any effort for understanding its evolutionary past and biodiversity is important to maintain this ecosystem viable.

Reference

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>.

ARAKI, R. **A história do clima de São Paulo**, 2012. Campinas: UNICAMP/IG.

BACCARO, F. B.; FEITOSA, R. M.; FERNANDEZ, F.; et al. **Guia para os gêneros de Formigas do Brasil**. Manaus: INPA, 2015.

BAER, B. The copulation biology of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, v. 14, p. 55–68, 2011.

BARKER, B. S.; RODRÍGUEZ-ROBLES, J. A.; ARAN, V. S.; et al. Sea level, topography and island diversity: Phylogeography of the Puerto Rican red-eyed Coquí, *Eleutherodactylus antillensis*. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 24, p. 6033–6052, 2012. Wiley-Blackwell.

BATALHA-FILHO, H.; CABANNE, G.; MIYAKI, C. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 65, n. 3, p. 892–902, 2012.

BATALHA-FILHO, H.; FJELDSA, J.; FABRE, P.-H.; MIYAKI, C. Y. Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. **Journal of Ornithology**, v. 154, n. 1, p. 41, 2013.

BATALHA-FILHO, H.; MIYAKI, C. Y. Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic forest: Multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 54, n. 2, p. 137–147, 2016. Wiley-Blackwell.

BLAIMER, B. B.; BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R.; et al. Phylogenomic methods outperform traditional multi-locus approaches in resolving deep evolutionary history: A case study of formicine ants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, 2015.

BOUCKAERT, R. R. DensiTree: Making sense of sets of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 26, n. 10, p. 1372–1373, 2010. Oxford University Press (OUP).

BRAGAGNOLO, C.; PINTO-DA-ROCHA, R.; ANTUNES; CLOUSE, R. M. Phylogenetics and phylogeography of a long-legged harvestman (Arachnida: Opiliones) in the Brazilian Atlantic rain forest reveals poor dispersal, low diversity and extensive mitochondrial introgression. **INVERTEBRATE SYSTEMATICS**, v. 29, n. 4, p. 386, 2015.

BRAGG, J. G.; POTTER, S.; BI, K.; MORITZ, C. Exon capture phylogenomics: Efficacy across scales of divergence. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 5, p. 1059–1068, 2015. Wiley-Blackwell.

BRYANT, D.; BOUCKAERT, R.; FELSENSTEIN, J.; ROSENBERG, N. A.; ROYCHOUDHURY, A. Inferring species trees directly from Biallelic genetic markers: Bypassing Gene Trees in a full Coalescent analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1917–1932, 2012. Oxford University Press (OUP).

CABANNE, G. S.; CALDERÓN, L.; TRUJILLO ARIAS, N.; et al. Effects of Pleistocene climate changes on species ranges and evolutionary processes in the Neotropical Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, 2016. Wiley-Blackwell.

CABANNE, G. S.; D'HORTA, F. M.; SARI, E. H. R.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 3, p. 760–773, 2008.

CARDOSO, D. C.; CRISTIANO, M. P.; TAVARES, M. G.; SCHUBART, C. D.; HEINZE, J. Phylogeography of the sand dune ant *Mycetophylax simplex* along the Brazilian Atlantic forest coast: Remarkably low mtDNA diversity and shallow population structure. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, 2015. Springer Nature.

CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785–789, 2009.

CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 7, p. 1187–1201, 2008. Wiley-Blackwell.

CARNAVAL, A. C.; WALTARI, E.; RODRIGUES, M. T.; et al. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, v. 281, n. 1792, 2014.

CI- CONSERVATION INTERNACIONAL. Hotspots. Disponível em: <<http://www.conservation.org/How/Pages/Hotspots.aspx>>. Acesso em: 15/8/2016.

COLOMBI, V. H.; LOPES, S. R.; FAGUNDES, V. Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 785, 2011.

D'HORTA, F. M.; CABANNE, G. S.; MEYER, D.; MIYAKI, C. Y. The genetic effects of late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: Diversification of an Atlantic forest passerine. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 9, p. 1923–1935, 2011. Wiley-Blackwell.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012. Oxford University Press (OUP).

ESCOBAR, H. Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1138–1139, 2015.

FAIRCLOTH, B. Illumiprocessor: a trimmomatic wrapper for parallel adapter and quality trimming. Disponível em: <illumiprocessor: a trimmomatic wrapper for parallel adapter and quality trimming>. Acesso em: 2013.

FAIRCLOTH, B. C. PHYLUCE is a software package for the analysis of conserved genomic loci. **Bioinformatics**, v. 32, n. 5, p. 786–788, 2016.

FAIRCLOTH, B. C.; BRANSTETTER, M. G.; WHITE, N. D.; BRADY, S. G. Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among Hymenoptera. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 3, p. 489–501, 2014. Wiley-Blackwell.

FAIRCLOTH, B. C.; GLENN, T. C. Not all sequence tags are created equal: Designing and validating sequence identification tags robust to Indels. (S.-H. Shiu, Org.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42543, 2012. Public Library of Science (PLoS).

FAIRCLOTH, B. C.; MCCORMACK, J. E.; CRAWFORD, N. G.; et al. Ultraconserved elements anchor Thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary Timescales. **Systematic Biology**, v. 61, n. 5, p. 717–726, 2012. Oxford University Press (OUP).

FISHER, S.; BARRY, A.; ABREU, J.; et al. A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. **Genome Biology**, v. 12, n. 1, p. R1, 2011. Springer Science + Business Media.

GALINDO-LEAL, C.; DE GUSMÃO CÂMARA, E. **Mata Atlântica - Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas - Ame Livros**. S. O. S Mata Atlântica, 2005.

GARRICK, R. C.; BONATELLI, I. A. S.; HYSENI, C.; et al. The evolution of phylogeographic data sets. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 6, p. 1164–1171, 2015. Wiley-Blackwell.

GLENN, T. C.; NILSEN, R.; KIERAN, T. J.; et al. Adapterama I: Universal stubs and primers for thousands of dual-indexed Illumina libraries (iTru & iNext). **bioRxiv**, 2016. doi: <https://doi.org/10.1101/049114>.

GNIRKE, A.; MELNIKOV, A.; MAGUIRE, J.; et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 182–189, 2009. Nature Publishing Group.

GOETZE, M.; PALMA-SILVA, C.; ZANELLA, C. M.; BERED, F. East-to-west genetic structure in populations of *Aechmea calyculata* (Bromeliaceae) from the southern Atlantic rainforest of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 477–490, 2016. Wiley-Blackwell.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 2011. Nature Publishing Group.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): Past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic forest. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 13, p. 3969–3982, 2006. Wiley-Blackwell.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, n. 3889, p. 131–7, 1969.

HARE, M. P. Prospects for nuclear gene phylogeography. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 12, p. 700–706, 2001. Elsevier.

HARVEY, M. G.; SMITH, B. T.; GLENN, T. C.; FAIRCLOTH, B. C.; BRUMFIELD, R. T. Sequence capture versus restriction site associated DNA Sequencing for shallow Systematics. **Systematic Biology**, 2016. Oxford University Press doi: 10.1093/sysbio/syw036.

HEWITT, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages: Abstract: Nature. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 907–913, 2000.

HIJMANS, R. J.; CAMERON, S. E.; PARRA, J. L.; JONES, P. G.; JARVIS, A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, v. 25, n. 15, p. 1965–1978, 2005. Wiley-Blackwell.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press, 1990.

HÖSS, M.; JARUGA, P.; ZASTAWNY, T. H.; DIZDAROGLU, M.; PAABO, S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 7, p. 1304–1307, 1996.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013. Oxford University Press (OUP).

LEDRU, M.-P.; MONTADE, V.; BLANCHARD, G.; HÉLY, C. Long-term spatial changes in the distribution of the Brazilian Atlantic forest. **Biotropica**, v. 48, n. 2, p. 159–169, 2015. Wiley-Blackwell.

LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; LOSS, A. C.; et al. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 113, n. 4, 2016a.

LEITE, Y.; COSTA, L.; LOSS, A.; et al. Reply to Raposo do Amaral et al.: The “Atlantis forest hypothesis” adds a new dimension to Atlantic forest biogeography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 15, 2016b.

LEPPÄNEN, J.; VEPSÄLÄINEN, K.; SAVOLAINEN, R. Phylogeography of the ant *Myrmica rubra* and its inquiline social parasite. **Ecology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 46–62, 2011. Wiley-Blackwell.

LOARIE, S. R.; DUFFY, P. B.; HAMILTON, H.; et al. The velocity of climate change. **Nature**, v. 462, n. 7276, p. 1052–1055, 2009. Nature Publishing Group.

LOCKWOOD, J. G. Abrupt and sudden climatic transitions and fluctuations: A review. **International Journal of Climatology**, v. 21, n. 9, p. 1153–1179, 2001. Wiley-Blackwell.

LOHSE, M.; BOLGER, A. M.; NAGEL, A.; et al. RobiNA: A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W622–W627, 2012. Oxford University Press (OUP).

LUNDBERG, J. G.; MARSHALL, L. G.; GUERRERO, J.; et al. The stage for neotropical fish diversification: A history of tropical south American rivers. In: L. Malabarba; R. Reis; R. Vari; Z. Lucena; C. Lucena (Orgs.); **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. p.13–48, 1998. Porto Alegre: EDIPUCRS.

MADDISON, W. P.; KNOWLES, L. L. Inferring Phylogeny despite incomplete lineage sorting. **Systematic Biology**, v. 55, n. 1, p. 21–30, 2006.

MARCHESE, C. Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. **Global Ecology and Conservation**, v. 3, p. 297–309, 2015.

MARTA-ALMEIDA, M.; MENDES, R.; AMORIM, F. N.; CIRANO, M.; DIAS, J. M. Fundão dam collapse: Oceanic dispersion of river Doce after the greatest Brazilian environmental accident. **Marine Pollution Bulletin**, 2016.

MARTINS, F. D. M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: What do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 104, n. 3, p. 499–509, 2011. Wiley-Blackwell.

MCCORMACK, J. E.; HIRD, S. M.; ZELLMER, A. J.; CARSTENS, B. C.; BRUMFIELD, R. T. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 66, n. 2, p. 526–538, 2013.

MEROW, C.; SMITH, M. J.; SILANDER, J. A. A practical guide to Maxent for modeling species' distributions: What it does, and why inputs and settings matter. **Ecography**, v. 36, n. 10, p. 1058–1069, 2013. Wiley-Blackwell.

MORALES, N. S.; FERNÁNDEZ, I. C.; CARRASCO, B.; ORCHARD, C. Combining niche Modelling, land-use change, and genetic information to assess the conservation status of *Pouteria splendens* populations in central Chile. **International Journal of Ecology**, v. 2015, 2015.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities: Abstract: Nature. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v403/n6772/full/403853a0.html>>. Acesso em: 15/8/2016.

NEMÉSIO, A.; SILVA, D. P.; NABOUT, J. C.; VARELA, S. Effects of climate change and habitat loss on a forest-dependent bee species in a tropical fragmented landscape. (R. Didham & C. Hassall, Orgs.) **Insect Conservation and Diversity**, v. 9, n. 2, p. 149–160, 2016. Wiley-Blackwell.

NESJE, A.; DAHL, S. O. The “little ice age” – only temperature? **The Holocene**, v. 13, n. 1, p. 139–145, 2003.

NICOLAS, V.; MARTÍNEZ-VARGAS, J.; HUGOT, J.-P. Molecular data and ecological niche modelling reveal the evolutionary history of the common and Iberian moles (Talpidae) in Europe. **Zoologica Scripta**, 2016. Wiley-Blackwell.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. A study of the origin of central Brazilian Forests by the analysis of plant species distribution patterns. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 52, p. 141–194, 1995.

PEARSON, R. G.; RAXWORTHY, C. J.; NAKAMURA, M.; TOWNSEND PETERSON, A. ORIGINAL ARTICLE: Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. **Journal of Biogeography**, v. 34, n. 1, p. 102–117, 2006. Wiley-Blackwell.

PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; WAITE, A. N.; et al. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): Genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 1, p. 13–26, 2005. Wiley-Blackwell.

PERES, E. A.; SOBRAL-SOUZA, T.; PEREZ, M. F.; et al. Pleistocene niche stability and lineage diversification in the subtropical spider *Araneus omnicolor* (Araneidae). (W. Arthofer, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0121543, 2015. Public Library of Science (PLoS).

PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, v. 190, n. 3-4, p. 231–259, 2006. Elsevier BV.

PIE, M. R.; MEYER, A. L. S.; FIRKOWSKI, C. R.; RIBEIRO, L. F.; BORNSCHEIN, M. R. Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. **Ecological Modelling**, v. 250, p. 165–176, 2013.

PINHEIRO, F.; DE BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; et al. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: A Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 10, p. 1923–1935, 2011. Wiley-Blackwell.

PRATES, I.; RIVERA, D.; RODRIGUES, M. T.; CARNAVAL, A. C. A mid-Pleistocene rainforest corridor enabled synchronous invasions of the Atlantic forest by Amazonian anole lizards. **Molecular Ecology**, 2016. Wiley-Blackwell.

QUEK, S.-P.; DAVIES, S. J.; ASHTON, P. S.; ITINO, T.; PIERCE, N. E. The geography of diversification in mutualistic ants: A gene's-eye view into the Neogene history of Sundaland rain forests. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2045–2062, 2007. Wiley-Blackwell.

RAPOSO, F.; AMARAL; EDWARDS, S. V.; et al. The “Atlantis forest hypothesis” does not explain Atlantic forest phylogeography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 15, p. 2097–2098, 2016.

RESENDE, H. C.; YOTOKO, K. S. C.; DELABIE, J. H. C.; et al. Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 101, n. 4, p. 949–960, 2010. Wiley-Blackwell.

RIBEIRO, R. A.; LEMOS-FILHO, J. P.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Heredity - abstract of article: Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): Insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic forest. **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 46–57, 2010.

ROHLAND, N.; REICH, D. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. **Genome Research**, v. 22, n. 5, p. 939–946, 2012. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ROSSETTI, D. DE F.; POLIZEL, S. P.; COHEN, M. C. L.; PESSENDA, L. C. R. Late Pleistocene–Holocene evolution of the Doce river delta, southeastern Brazil: Implications for the understanding of wave-influenced deltas. **Marine Geology**, v. 367, p. 171–190, 2015.

SAINT-HILAIRE, A. DE. **Segunda viagem do Rio de Janeiro a Minas Gerais e a São Paulo, 1822: [diário]**. 1932.

SANT'ANNA NETO, J. L.; GALVANI, E.; VIEIRA, B. C. Climates of Brazil: Past and present. **Landscapes and Landforms of Brazil**. p.33–41, 2015. Springer Science + Business Media.

SEGURA, F. R.; NUNES, E. A.; PANIZ, F. P.; et al. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, 2016.

ŞEKERCIOĞLU, Ç. H.; PRIMACK, R. B.; WORMWORTH, J. The effects of climate change on tropical birds. **Biological Conservation**, v. 148, n. 1, p. 1–18, 2012. Elsevier BV.

SHAFER, A. B. A.; WOLF, J. B. W.; ALVES, P. C.; et al. Genomics and the challenging translation into conservation practice. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 30, n. 2, p. 78–87, 2015.

SMITH, B. T.; HARVEY, M. G.; FAIRCLOTH, B. C.; et al. Target capture and massively parallel Sequencing of Ultraconserved elements for comparative studies at shallow evolutionary time scales. **Systematic Biology**, v. 63, n. 1, p. 83–95, 2014. Oxford University Press.

SOLOMON, S. E.; BACCI, M.; MARTINS, J.; VINHA, G. G.; MUELLER, U. G. Paleodistributions and comparative molecular Phylogeography of Leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. (P. M. Bennett, Org.) **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. e2738, 2008. Public Library of Science (PLoS).

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014. Oxford University Press.

STRÖHER, P. R.; ZARZA, E.; TSAI, W. L. E.; et al. The mitochondrial genome of *Octostruma stenognatha* and its phylogenetic implications. **Insectes Sociaux**, 2016. Springer Nature.

TAVARES, W. C.; PESSÔA, L. M.; SEUÁNEZ, H. N. Plio-Pleistocene history of the endangered spiny rat *Trinomys eliasi* (Echimyidae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 96, n. 1, p. 94–106, 2015. Oxford University Press (OUP).

THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; GIOVANELLI, J. G. R.; et al. Phylogeography of endemic toads and post-pleistocene persistence of the Brazilian Atlantic forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 1018–1031, 2010. Elsevier BV.

THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. Barriers, rather than refugia, underlie the origin of diversity in toads endemic to the Brazilian Atlantic forest. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 24, p. 6152–6164, 2014. Wiley-Blackwell.

TONINI, J. F. R.; COSTA, L. P.; CARNAVAL, A. C. Phylogeographic structure is strong in the Atlantic forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 51, n. 2, p. 114–121, 2013. Wiley-Blackwell.

WIENS, J. J.; KUCZYNSKI, C. A.; STEPHENS, P. R. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: Implications for speciation and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, n. 2, p. 445–461, 2010. Wiley-Blackwell.

Referências Gerais

Capítulo I

- ATTARDO, G. M.; ABILA, P. P.; AUMA, J. E.; et al. Genome sequence of the Tsetse fly (*Glossina morsitans*): Vector of African Trypanosomiasis. **Science**, v. 344, n. 6182, p. 380–386, 2014. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
- AUSTIN, J. J.; ROSS, A. J.; SMITH, A. B.; FORTEY, R. A.; THOMAS, R. H. Problems of reproducibility - does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 264, n. 1381, p. 467–474, 1997. The Royal Society.
- BRODIN, Y.; EJDUNG, G.; STRANDBERG, J.; LYRHOLM, T. Improving environmental and biodiversity monitoring in the Baltic sea using DNA barcoding of Chironomidae (Diptera). **Molecular Ecology Resources**, p. n/a–n/a, 2012. Wiley-Blackwell.
- BROWN, K. A.; BROWN, T. A. **Biomolecular archaeology: An introduction**. Malden, MA: Wiley-Blackwell (an imprint of John Wiley & Sons Ltd), 2011.
- CELNIKER, S. E.; WHEELER, D. A.; KRONMILLER, B.; et al. Finishing a whole-genome shotgun: release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. **Genome Biology**, v. 3, n. 12, p. research0079.1, 2002. Springer Nature.
- CHACÓN, I.; JANZEN, D.; HALLWACHS, W.; SULLIVAN, J.; HAJIBABAEI, M. Cryptic species within cryptic moths: New species of *Dunama Schaus* (Notodontidae, Nystaleinae) in Costa Rica. **ZooKeys**, v. 264, p. 11–45, 2013. Pensoft Publishers.
- CHAPCO, W.; LITZENBERGER, G. A DNA investigation into the mysterious disappearance of the Rocky Mountain grasshopper, mega-pest of the 1800s. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, n. 3, p. 810–814, 2004. Elsevier BV.
- CHIAL, H. Human genome project: Sequencing the human genome. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 219, 2008. Nature Education. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-sequencing-technologies-key-to-the-human-828>>. Acesso em: 3/8/2016.
- DARWIN, C. **On the Origin of Species**. United Kingdom, 1859.
- DILLON, N.; AUSTIN, A. D.; BARTOWSKY, E. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. **Insect Molecular Biology**, v. 5, n. 1, p. 21–24, 1996. Wiley-Blackwell.
- EGAN, A. N.; SCHLUETER, J.; SPOONER, D. M. Applications of next-generation sequencing in plant biology. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. 175–185, 2012. Botanical Society of America.

- EKBLOM, R.; GALINDO, J. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. **Heredity**, v. 107, n. 1, p. 1–15, 2010. Nature Publishing Group.
- EL-METWALLY, S.; HAMZA, T.; ZAKARIA, M.; HELMY, M. Next-generation sequence assembly: Four stages of data processing and computational challenges. (S. Markel, Org.) **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 12, p. e1003345, 2013. Public Library of Science (PLoS).
- FELDMEYER, B.; ELSNER, D.; FOITZIK, S. Gene expression patterns associated with caste and reproductive status in ants: Worker-specific genes are more derived than queen-specific ones. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 1, p. 151–161, 2013. Wiley-Blackwell.
- FUKATSU, T. Next-generation sequencing sheds light on intricate regulation of insect gut microbiota. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 24, p. 5908–5910, 2012. Wiley-Blackwell.
- FULLER, C. W.; KUMAR, S.; POREL, M.; et al. Real-time single-molecule electronic DNA sequencing by synthesis using polymer-tagged nucleotides on a nanopore array. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 19, p. 5233–5238, 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- GADAU, J.; HELMKAMPF, M.; NYGAARD, S.; et al. The genomic impact of 100 million years of social evolution in seven ant species. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 1, p. 14–21, 2012. Elsevier BV.
- GENIA TECHNOLOGIES. Genia Technologies - technology. Disponível em: <<http://www.geniachip.com/technology/>>. Acesso em: 3/8/2016.
- GILAD, Y.; PRITCHARD, J. K.; THORNTON, K. Characterizing natural variation using next-generation sequencing technologies. **Trends in Genetics**, v. 25, n. 10, p. 463–471, 2009. Elsevier BV.
- GILBERT, M. T. P.; MOORE, W.; MELCHIOR, L.; WOROBEY, M. DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. (M. Hofreiter, Org.) **PLoS ONE**, v. 2, n. 3, p. e272, 2007. Public Library of Science (PLoS).
- GLENN, T. 2016 NGS field guide: Overview. Disponível em: <<http://www.molecularecologist.com/next-gen-fieldguide-2016>>. Acesso em: 3/8/2016.
- GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 5, p. 759–769, 2011. Wiley-Blackwell.
- GREEN, R. E.; KRAUSE, J.; PTAK, S. E.; et al. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 330–336, 2006. Nature Publishing Group.

- HEBSGAARD, M. B.; PHILLIPS, M. J.; WILLERSLEV, E. Geologically ancient DNA: Fact or artefact? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 212–220, 2005. Elsevier BV.
- HIGUCHI, R.; BOWMAN, B.; FREIBERGER, M.; RYDER, O. A.; WILSON, A. C. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. **Nature**, v. 312, n. 5991, p. 282–284, 1984. Nature Publishing Group.
- HIYAMA, A.; NOHARA, C.; KINJO, S.; et al. The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. **Scientific Reports**, v. 2, 2012. Nature Publishing Group.
- JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HARVEY, D. J.; et al. What happens to the traditional taxonomy when a well-known tropical saturniid moth fauna is DNA barcoded? **Invertebrate Systematics**, v. 26, n. 6, p. 478, 2012. CSIRO Publishing.
- JONES, D. C.; RUZZO, W. L.; PENG, X.; KATZE, M. G. Compression of next-generation sequencing reads aided by highly efficient de novo assembly. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 22, p. e171–e171, 2012. Oxford University Press (OUP).
- KASIANOWICZ, J. J.; BRANDIN, E.; BRANTON, D.; DEAMER, D. W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13770–13773, 1996. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- KNAPP, M.; HOFREITER, M. Next generation Sequencing of ancient DNA: Requirements, strategies and perspectives. **Genes**, v. 1, n. 2, p. 227–243, 2010. MDPI AG.
- KOTHAMASI, D.; KIERS, E. T. Emerging conflicts between Biodiversity conservation laws and scientific research: The case of the Czech Entomologists in India. **Conservation Biology**, v. 23, n. 5, p. 1328–1330, 2009. Wiley-Blackwell.
- LARSEN, T. B. Hazards of butterfly collecting – fossil on a pin. **The entomologist's record and journal of variation**, v. 117, p. 109–111, 2005.
- LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709–715, 1993. Nature Publishing Group.
- MACHARIA, R.; MIREJI, P.; MURUNGI, E.; et al. Genome-wide comparative analysis of Chemosensory gene families in Five Tsetse fly species. (A. Acosta-Serrano, Org.) **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004421, 2016. Public Library of Science (PLoS).
- MARDIS, E. R. Next-generation DNA Sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, n. 1, p. 387–402, 2008. Annual Reviews.

- MARDIS, E. R. Next-generation Sequencing platforms. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 287–303, 2013. Annual Reviews.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, 2005. Nature Publishing Group.
- MASON, V. C.; LI, G.; HELGEN, K. M.; MURPHY, W. J. Efficient cross-species capture hybridization and next-generation sequencing of mitochondrial genomes from noninvasively sampled museum specimens. **Genome Research**, v. 21, n. 10, p. 1695–1704, 2011. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MCCORMACK, J. E.; FAIRCLOTH, B. C. Next-generation phylogenetics takes root. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 1, p. 19–21, 2012. Wiley-Blackwell.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2009. Nature Publishing Group.
- MILLAR, C. D.; HUYNEN, L.; SUBRAMANIAN, S.; MOHANDASAN, E.; LAMBERT, D. M. New developments in ancient genomics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 7, p. 386–393, 2008. Elsevier BV.
- MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 255–264, 2008. Elsevier BV.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, n. 0, p. 263–273, 1986. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- NIKOLAKI, S.; TSIAMIS, G. Microbial diversity in the era of Omic technologies. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–15, 2013. Hindawi Publishing.
- NINOMIYA, M.; UENO, Y.; SHIMOSEGAWA, T. Application of deep sequence technology in hepatology. **Hepatology Research**, v. 44, n. 2, p. 141–148, 2013. Wiley-Blackwell.
- PÄÄBO, S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. **Nature**, v. 314, n. 6012, p. 644–645, 1985. Nature Publishing Group.
- PÄÄBO, S.; HIGUCHI, R.; WILSON, A. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 17, p. 9709–12, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2656708>>. Acesso em: 3/8/2016.
- PENNEY, D.; WADSWORTH, C.; FOX, G.; et al. Absence of ancient DNA in sub-fossil insect inclusions preserved in “Anthropocene” Colombian Copal. (L.

- Orlando, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73150, 2013. Public Library of Science (PLoS).
- POINAR, H. N. Metagenomics to Paleogenomics: Large-scale Sequencing of mammoth DNA. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 392–394, 2006. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
- QUAIL, M.; SMITH, M. E.; COUPLAND, P.; et al. A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of ion torrent, pacific biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 341, 2012. Springer Science + Business Media.
- RICHARDS, S.; GIBBS, R.; WEINSTOCK, G.; et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, n. 7190, p. 949–55, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362917>>. Acesso em: 3/8/2016.
- RIZZI, E.; LARI, M.; GIGLI, E.; DE BELLIS, G.; CARAMELLI, D. Ancient DNA studies: New perspectives on old samples. **Genetics Selection Evolution**, v. 44, n. 1, p. 21, 2012. Springer Science + Business Media.
- ROBISON, K. Omics! Omics! Disponível em: <<http://omicsomics.blogspot.com.br/2016/04/genia-publishes-platform-progress.html>>. Acesso em: 3/8/2016.
- SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687–695, 1977. Nature Publishing Group.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- SCHNABLE, J. Even faster Sequencing. Disponível em: <<http://www.jamesandthegiantcorn.com/2010/01/13/even-faster-sequencing/>>. Acesso em: 3/8/2016.
- SCHUSTER, S. C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, v. 5, n. 1, p. 16–18, 2007. Nature Publishing Group.
- SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, 2008. Nature Publishing Group.
- SHOKRALLA, S.; GIBSON, J. F.; NIKBAKHT, H.; et al. Next-generation DNA barcoding: Using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. **Molecular Ecology Resources**, p. n/a–n/a, 2014. Wiley-Blackwell.

- SMITH, L. M.; SANDERS, J. Z.; KAISER, R. J.; et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, v. 321, n. 6071, p. 674–679, 1986. Nature Publishing Group.
- SMITH, M. A.; EVELEIGH, E. S.; MCCANN, K. S.; et al. Barcoding a quantified food web: Crypsis, concepts, ecology and hypotheses. (T. N. Romanuk, Org.) **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e14424, 2011. Public Library of Science (PLoS).
- STAATS, M.; ERKENS, R. H. J.; VAN DE VOSSENBERG, B.; et al. Genomic treasure Troves: Complete genome Sequencing of Herbarium and insect museum specimens. (D. Caramelli, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69189, 2013. Public Library of Science (PLoS).
- SUDAKARAN, S.; SALEM, H.; KOST, C.; KALTENPOTH, M. Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). **Molecular Ecology**, v. 21, n. 24, p. 6134–6151, 2012. Wiley-Blackwell.
- TAUTZ, D.; ELLEGREN, H.; WEIGEL, D. Next generation molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 1–3, 2010. Wiley-Blackwell.
- THE INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 12, p. 1036–45, 2009.
- THOMAS, R. H.; SCHAFFNER, W.; WILSON, A. C.; PÄÄBO, S. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. **Nature**, v. 340, n. 6233, p. 465–467, 1989. Nature Publishing Group.
- THOMSEN, P. F.; ELIAS, S.; GILBERT, M. T. P.; et al. Non-destructive sampling of ancient insect DNA. (R. DeSalle, Org.) **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. e5048, 2009. Public Library of Science (PLoS).
- VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 2, p. 110–117, 2009. Elsevier BV.
- WALLACE, L. J.; BOILARD, S. M. A. L.; EAGLE, S. H. C.; et al. DNA barcodes for everyday life: Routine authentication of natural health products. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 446–452, 2012. Elsevier BV.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.
- WATSON, J. The human genome project: Past, present, and future. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 44–49, 1990. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
- WELBURN, S. C.; MAUDLIN, I.; SIMARRO, P. P. Controlling sleeping sickness – a review. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1943, 2009. Cambridge University Press (CUP).

YAN, L.; YANG, M.; GUO, H.; et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 9, p. 1131–1139, 2013. Nature Publishing Group.

YODER, J. 2014 NGS field guide: Resistance is futile (mostly, at least for a while). Disponível em: <<http://www.molecularecologist.com/2014/03/2014-ngs-field-guide-resistance-is-futile-mostly-at-least-for-a-while/>>. Acesso em: 3/8/2016.

Capítulo II

ALBERT, T. J.; MOLLA, M. N.; MUZNY, D. M.; et al. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. **Nature Methods**, v. 4, n. 11, p. 903–905, 2007. Nature Publishing Group.

BEJERANO, G. Ultraconserved elements in the human genome. *Science*, v. 304, n. 5675, p. 1321–1325, 2004. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**.

BRENIG, B.; BREM, G. Direct cloning of sequence tagged microsatellite sites by DNA affinity chromatography. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5441–5441, 1991. Oxford University Press (OUP).

CARTWRIGHT, J. H. E.; GIANNERINI, S.; GONZÁLEZ, D. L. DNA as information: At the crossroads between biology, mathematics, physics and chemistry. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2063, p. 20150071, 2016. The Royal Society.

CHILAMAKURI, C. S.; LORENZ, S.; MADOU, M.-A.; et al. Performance comparison of four exome capture systems for deep sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 449, 2014. Springer Science + Business Media.

CRAWFORD, N. G.; FAIRCLOTH, B. C.; MCCORMACK, J. E.; et al. More than 1000 ultraconserved elements provide evidence that turtles are the sister group of archosaurs. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 783–786, 2012. The Royal Society.

DAVEY, J. W.; HOHENLOHE, P. A.; ETTER, P. D.; et al. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 7, p. 499–510, 2011. Nature Publishing Group.

DETI, A.; ROTH, F. P.; CHURCH, G. M.; WU, C. Mammalian ultraconserved elements are strongly depleted among segmental duplications and copy number variants. **Nature Genetics**, v. 38, n. 10, p. 1216–1220, 2006. Nature Publishing Group.

- DO AMARAL, F. R.; NEVES, L. G.; RESENDE, M. F. R.; et al. Ultraconserved elements Sequencing as a low-cost source of complete Mitochondrial Genomes and Microsatellite markers in non-model Amniotes. (G. H. Yue, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138446, 2015. Public Library of Science (PLoS).
- ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, 489:57–74, 2012.
- FAIRCLOTH, B. C.; MCCORMACK, J. E.; CRAWFORD, N. G.; et al. Ultraconserved elements anchor Thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary Timescales. **Systematic Biology**, v. 61, n. 5, p. 717–726, 2012. Oxford University Press (OUP).
- FAIRCLOTH, B. C.; BRANSTETTER, M. G.; WHITE, N. D.; BRADY, S. G. Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among Hymenoptera. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 3, p. 489–501, 2014.
- GNIRKE, A.; MELNIKOV, A.; MAGUIRE, J.; et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 182–189, 2009. Nature Publishing Group.
- GRAUR, D.; ZHENG, Y.; PRICE, N.; et al. On the immortality of television sets: ‘Function’ in the human genome according to the evolution-free gospel of ENCODE. **Genome Biology and Evolution**, v. 5, n. 3, p. 578–590, 2013. Oxford University Press (OUP).
- HARROW, J.; NAGY, A.; REYMOND, A.; et al. Identifying protein-coding genes in genomic sequences. **Genome Biology**, v. 10, n. 1, p. 201, 2009. Springer Science + Business Media.
- JONES, M. R.; GOOD, J. M. Targeted capture in evolutionary and ecological genomics. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 1, p. 185–202, 2015. Wiley-Blackwell.
- KANDPAL, R. P.; KANDPAL, G.; WEISSMAN, S. M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 1, p. 88–92, 1994.
- KIJAS, J.; FOWLER, J.; GARBETT, C.; THOMAS. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **Bio Techniques**, v. 16, n. 4, p. 656–60, 1994.
- KNOWLES, L. L. Estimating species trees: Methods of Phylogenetic analysis when there is Incongruence across genes. **Systematic Biology**, v. 58, n. 5, p. 463–467, 2009. Oxford University Press (OUP).

- MCCORMACK, J. E.; FAIRCLOTH, B. C.; CRAWFORD, N. G.; et al. Ultraconserved elements are novel phylogenomic markers that resolve placental mammal phylogeny when combined with species-tree analysis. **Genome Research**, v. 22, n. 4, p. 746–754, 2011. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MCCORMACK, J. E.; HIRD, S. M.; ZELLMER, A. J.; CARSTENS, B. C.; BRUMFIELD, R. T. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 66, n. 2, p. 526–538, 2013. Elsevier BV.
- OSTRANDER, E. A.; JONG, P. M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 8, p. 3419–3423, 1992. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- PICARDI, E.; PESOLE, G. Mitochondrial genomes gleaned from human whole-exome sequencing. **Nature Methods**, v. 9, n. 6, p. 523–524, 2012. Nature Publishing Group.
- POLLARD, K. S.; SALAMA, S. R.; LAMBERT, N.; et al. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 167–172, 2006. Nature Publishing Group.
- SABARINADH, C.; SUBRAMANIAN, S.; TRIPATHI, A.; MISHRA, R. K. **BMC Genomics**, v. 5, n. 1, p. 75, 2004. Springer Science + Business Media.
- SAMUELS, D. C.; HAN, L.; LI, J.; et al. Finding the lost treasures in exome sequencing data. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 10, p. 593–599, 2013. Elsevier BV.
- SANDELIN, A.; BAILEY, P.; BRUCE, S.; et al. Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes. **BMC Genomics**, v. 5, n. 1, p. 99, 2004. Springer Science + Business Media.
- SMITH, B. T.; HARVEY, M. G.; FAIRCLOTH, B. C.; GLENN, T. C.; BRUMFIELD, R. T. Target capture and massively parallel Sequencing of Ultraconserved elements for comparative studies at shallow evolutionary time scales. **Systematic Biology**, v. 63, n. 1, p. 83–95, 2013. Oxford University Press (OUP)
- ZIMMER, C.; EMLEN, D. J. **Evolution: Making sense of life**. United States: Roberts and Company Publishers, 2012.

Capítulo III

- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Babbucci M, Basso A, Scupola A, Patarnello T, Negrisoló E (2014) Is it an ant or a butterfly? Convergent evolution in the Mitochondrial Gene Order of Hymenoptera and Lepidoptera. *Genome Biology and Evolution* 6:3326–3343. doi: 10.1093/gbe/evu265
- Baroni Urbani C, de Andrade ML (1994) First description of fossil Dacetini ants with a critical analysis of the current classification of the tribe (amber collection Stuttgart: Hymenoptera, Formicidae. VI: Dacetini). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Serie B* 198:1–65
- Berman M, Austin CM, Miller AD (2014) Characterisation of the complete mitochondrial genome and 13 microsatellite loci through next-generation sequencing for the new Caledonian spider-ant *Leptomymex pallens*. *Molecular Biology Reports* 41:1179–1187. doi: 10.1007/s11033-013-2657-5
- Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritzsche G, Pütz J, Middendorf M, Stadler PF (2013) MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69:313–319. doi: 10.1016/j.ympev.2012.08.023
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27:1767–1780. doi: 10.1093/nar/27.8.1767
- Boore JL, Lavrov DV, Brown WM (1998) Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392:667–668. doi: 10.1038/33577
- Brown Jr. WL (1948) A preliminary generic revision of the higher Dacetini (Hymenoptera: Formicidae). *Transactions of the American Entomological Society* 74:101–129.
- Brown WLJ (1949) Revision of the ant tribe Dacetini. I. Fauna of Japan, China and Taiwan. *Muschi* 20:1:25.
- Cameron SL, Downton M, Castro LR, Ruberu K, Whiting MF, Austin AD, Diement K, Stevens J (2008) Mitochondrial genome organization and phylogeny of two vespid wasps. *Genome* 51:800–808. doi: 10.1139/g08-066
- Cameron SL (2014) Insect Mitochondrial Genomics: Implications for evolution and Phylogeny. *Annual Review of Entomology* 59:95–117. doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162007
- Dlussky GM, Brothers DJ, Rasnitsyn AP (2003) The first late Cretaceous ants (Hymenoptera: Formicidae) from southern Africa, with comments on the origin

- of the Myrmicinae. *Insect Systematics & Evolution* 35:1–13. doi: 10.1163/187631204788964727
- do Amaral R F, Neves LG, Resende MFR, Mobili F, Miyaki CY, Pellegrino KCM, Biondo C (2015) Ultraconserved elements Sequencing as a low-cost source of complete Mitochondrial Genomes and Microsatellite markers in non-model Amniotes. *PLOS ONE* 10: e0138446. doi: 10.1371/journal.pone.0138446
- Dowton M, Austin AD (1999) Evolutionary dynamics of a mitochondrial rearrangement 'hot spot' in the Hymenoptera. *Molecular Biology and Evolution* 16:298–309. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026111
- Dowton M, Cameron SL, Dowavic JI, Austin AD, Whiting MF (2009) Characterization of 67 Mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that Mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. *Molecular Biology and Evolution* 26:1607–1617. doi: 10.1093/molbev/msp072
- Duan X-Y, Peng X-Y, Qian Z-Q (2016) The complete mitochondrial genomes of two globally invasive ants, the Argentine ant *Linepithema humile* and the little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *Conservation Genetics Resources*. doi: 10.1007/s12686-016-0555-6
- Dunn CW, Giribet G, Edgecombe GD, Hejnol A (2014) Animal Phylogeny and its evolutionary Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45:371–395. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-120213-091627
- Faircloth BC, Glenn TC (2012) Not all sequence tags are created equal: Designing and validating sequence identification tags robust to Indels. *PLoS ONE* 7: e42543. doi: 10.1371/journal.pone.0042543
- Faircloth BC (2013) Illumiprocessor: A Trimmomatic wrapper for parallel adapter and quality trimming. <http://dx.doi.org/10.6079/J9ILL>
- Faircloth BC (2016) PHYLUCE is a software package for the analysis of conserved genomic loci. *Bioinformatics* 32:786–788. doi: 10.1093/bioinformatics/btv646
- Faircloth BC, Branstetter MG, White ND, Brady SG (2014) Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among Hymenoptera. *Molecular Ecology Resources* 15:489–501. doi: 10.1111/1755-0998.12328
- Faircloth BC, McCormack JE, Crawford NG, Harvey MG, Brumfield RT, Glenn TC (2012) Ultraconserved elements anchor Thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary Timescales. *Systematic Biology* 61:717–726. doi: 10.1093/sysbio/sys004
- Fisher S, Barry A, Abreu J, Minie B, Nolan J, Delorey TM, Young G, Fennell TJ, Allen A, Ambrogio L, Berlin AM, Blumenstiel B, Cibulskis K, Friedrich D,

- Johnson R, Juhn F, Reilly B, Shammass R, Stalker J, Sykes SM, Thompson J, Walsh J, Zimmer A, Zwirko Z, Gabriel S, Nicol R, Nusbaum C (2011) A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biology* 12: R1. Doi: 10.1186/gb-2011-12-1-r1
- Forel A (1917) Cadre synoptique actuel de la faune universelle des fourmis. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 51:229–253.
- Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, Fennell T, Giannoukos G, Fisher S, Russ C, Gabriel S, Jaffe DB, Lander ES, Nusbaum C (2009) Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature Biotechnology* 27:182–189. doi: 10.1038/nbt.1523
- Gotzek D, Clarke J, Shoemaker D (2010) Mitochondrial genome evolution in fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *BMC Evolutionary Biology* 10:300. doi: 10.1186/1471-2148-10-300
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29:644–652. doi: 10.1038/nbt.1883
- Gutrich JJ, VanGelder E, Loope L (2007) Potential economic impact of introduction and spread of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, in Hawaii. *Environmental Science & Policy* 10:685–696. doi: 10.1016/j.envsci.2007.03.007
- Hasegawa E, Kobayashi K, Yagi N, Tsuji K (2011) Complete mitochondrial genomes of normal and cheater morphs in the parthenogenetic ant *Pristomyrmex punctatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News* 15:85:90.
- Havird JC, Santos SR (2014) Performance of single and Concatenated sets of Mitochondrial genes at Inferring Metazoan relationships relative to full Mitogenome data. *PLoS ONE* 9: e84080. doi: 10.1371/journal.pone.0084080
- Hölldobler B, Wilson EO (1990) *The ants*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA
- Hung C-M, Lin R-C, Chu J-H, Yeh C-F, Yao C-J, Li S-H (2013) The de novo assembly of Mitochondrial Genomes of the extinct passenger pigeon (*Ectopistes migratorius*) with next generation Sequencing. *PLoS ONE* 8: e56301. doi: 10.1371/journal.pone.0056301
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond

- A (2012) Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Le TH, Blair D, Agatsuma T, Humair P-F, Campbell NJH, Iwagami M, Littlewood DTJ, Peacock B, Johnston DA, Bartley J, Rollinson D, Herniou EA, Zarlenga DS, McManus DP (2000) Phylogenies inferred from Mitochondrial gene orders--a cautionary tale from the parasitic Flatworms. *Molecular Biology and Evolution* 17:1123–1125. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026393
- Liu G-H, Shao R, Li J-Y, Zhou D-H, Li H, Zhu X-Q (2013) The complete mitochondrial genomes of three parasitic nematodes of birds: A unique gene order and insights into nematode phylogeny. *BMC Genomics* 14:414. doi: 10.1186/1471-2164-14-414
- Liu N, Duan X-Y, Qian Z-Q, Wang X-Y, Li X-L, Ding M-Y (2016) Characterization of the complete mitochondrial genome of the Myrmicine ant *Vollenhovia emeryi* (Insecta: Hymenoptera: Formicidae). *Conservation Genetics Resources*. doi: 10.1007/s12686-016-0535-x
- Lohse M, Bolger AM, Nagel A, Ferine AR, Lunn JE, Stitt M, Usadel B (2012) RobiNA: A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Research* 40: W622–W627. doi: 10.1093/nar/gks540
- Mao M, Valerio A, Austin AD, Dowton M, Johnson NF (2012) The first mitochondrial genome for the wasp superfamily Platygastroidea: The egg parasitoid *Trissolcus basalis*. *Genome* 55:194–204. doi: 10.1139/g2012-005
- Mao M, Gibson T, Dowton M (2015) Higher-level phylogeny of the Hymenoptera inferred from mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 84:34–43. doi: 10.1016/j.ympev.2014.12.009
- Moritz C (1987) Evolution of animal Mitochondrial Dna: Relevance for population biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:269–292. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.18.1.269
- Pérez SP, Corley JC, Farji-Brener AG (2010) Potential impact of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* on conifer plantations in northern Patagonia, Argentina. *Agricultural and Forest Entomology* 13:191–196. doi: 10.1111/j.1461-9563.2010.00515.x
- Perseke M, Golombek A, Schlegel M, Struck TH (2013) The impact of mitochondrial genome analyses on the understanding of deuterostome phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66:898–905. doi: 10.1016/j.ympev.2012.11.019
- Picardi E, Pesole G (2012) Mitochondrial genomes gleaned from human whole-exome sequencing. *Nature Methods* 9:523–524. doi: 10.1038/nmeth.2029

- Ramakodi MP, Singh B, Wells JD, Guerrero F, Ray DA (2015) A 454 sequencing approach to dipteran mitochondrial genome research. *Genomics* 105:53–60. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.10.014
- Rodvalho C de M, Lyra ML, Ferro M, Bacci M (2014) The Mitochondrial genome of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*: A Mitogenome with a large number of Intergenic spacers. *PLoS ONE* 9: e97117. doi: 10.1371/journal.pone.0097117
- Rohland N, Reich D (2012) Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Research* 22:939–946. doi: 10.1101/gr.128124.111
- Saito S, Tamura K, Aotsuka T (2005) Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics* 171:1695–705.
- Sankoff D, Bryant D, Deneault M, Lang BF, Burger G (2000) Early Eukaryote evolution based on Mitochondrial Gene Order Breakpoints. *Journal of Computational Biology* 7:521–535. doi: 10.1089/10665270075005092
- Shen H, Braband A, Scholtz G (2015) The complete mitogenomes of lobsters and crayfish (Crustacea: Decapoda: Astacidea) reveal surprising differences in closely related taxa and convergences to Priapulida. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53:273–281. doi: 10.1111/jzs.12106
- Smith MJ, Arndt A, Gorski S, Fajber E (1993) The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *Journal of Molecular Evolution* 36:545–554. doi: 10.1007/bf00556359
- Song S-N, Tang P, Wei S-J, Chen X-X (2016) Comparative and phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes in basal hymenopterans. *Scientific Reports* 6:20972. doi: 10.1038/srep20972
- Tan MH, Gan HM, Schultz MB, Austin CM (2015) Corrigendum to ‘MitoPhAST, a new automated mitogenomic phylogeny tool in the post-genomic era with a case study of 89 decapod mitogenomes including eight new freshwater crayfish mitogenomes’ [*Mol. Phylogenet. Evol.* 85 (2015) 180–188]. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 87:118. doi: 10.1016/j.ympev.2015.03.017
- Ward PS, Brady SG, Fisher BL, Schultz TR (2014) The evolution of Myrmicine ants: Phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomology* 40:61–81. doi: 10.1111/syen.12090
- Way M (1992) Role of ants in pest-management. *Annual Review of Entomology* 37:479–503. doi: 10.1146/annurev.ento.37.1.479
- Wei S, Shi M, Sharkey MJ, van Achterberg C, Chen X (2010) Comparative mitogenomics of Braconidae (Insecta: Hymenoptera) and the phylogenetic utility of mitochondrial genomes with special reference to Holometabolous insects. *BMC Genomics* 11:371. doi: 10.1186/1471-2164-11-371

- Xiao J-H, Jia J-G, Murphy RW, Huang D-W (2011) Rapid evolution of the Mitochondrial genome in Chalcidoid Wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea) driven by parasitic lifestyles. *PLoS ONE* 6: e26645. doi: 10.1371/journal.pone.0026645
- Yang, S., Li, X., Cai, L.-G., and Qian, Z.-Q. 2016. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Formica selysi* (Insecta: Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *Mitochondrial DNA* 27(5): 3378–3380
- Yuan Y, Li Q, Yu H, Kong L (2012) The complete Mitochondrial Genomes of Six Heterodont Bivalves (Tellinoidea and Solenoidea): Variable gene arrangements and Phylogenetic implications. *PLoS ONE* 7: e32353. doi: 10.1371/journal.pone.0032353

Capítulo IV

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>.

ARAKI, R. **A história do clima de São Paulo**, 2012. Campinas: UNICAMP/IG.

BACCARO, F. B.; FEITOSA, R. M.; FERNANDEZ, F.; et al. **Guia para os gêneros de Formigas do Brasil**. Manaus: INPA, 2015.

BAER, B. The copulation biology of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, v. 14, p. 55–68, 2011.

BARKER, B. S.; RODRÍGUEZ-ROBLES, J. A.; ARAN, V. S.; et al. Sea level, topography and island diversity: Phylogeography of the Puerto Rican red-eyed Coquí, *Eleutherodactylus antillensis*. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 24, p. 6033–6052, 2012. Wiley-Blackwell.

BATALHA-FILHO, H.; CABANNE, G.; MIYAKI, C. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. **Molecular phylogenetics and evolution.**, v. 65, n. 3, p. 892–902, 2012.

BATALHA-FILHO, H.; FJELDSA, J.; FABRE, P.-H.; MIYAKI, C. Y. Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. **Journal of Ornithology**, v. 154, n. 1, p. 41, 2013.

BATALHA-FILHO, H.; MIYAKI, C. Y. Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic forest: Multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 54, n. 2, p. 137–147, 2016. Wiley-Blackwell.

BLAIMER, B. B.; BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R.; et al. Phylogenomic methods outperform traditional multi-locus approaches in resolving deep evolutionary history: A case study of formicine ants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, 2015.

BOUCKAERT, R. R. DensiTree: Making sense of sets of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 26, n. 10, p. 1372–1373, 2010. Oxford University Press (OUP).

BRAGAGNOLO, C.; PINTO-DA-ROCHA, R.; ANTUNES; CLOUSE, R. M. Phylogenetics and phylogeography of a long-legged harvestman (Arachnida: Opiliones) in the Brazilian Atlantic rain forest reveals poor dispersal, low diversity and extensive mitochondrial introgression. **INVERTEBRATE SYSTEMATICS**, v. 29, n. 4, p. 386, 2015.

BRAGG, J. G.; POTTER, S.; BI, K.; MORITZ, C. Exon capture phylogenomics: Efficacy across scales of divergence. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 5, p. 1059–1068, 2015. Wiley-Blackwell.

BRYANT, D.; BOUCKAERT, R.; FELSENSTEIN, J.; ROSENBERG, N. A.; ROYCHOUDHURY, A. Inferring species trees directly from Biallelic genetic markers: Bypassing Gene Trees in a full Coalescent analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1917–1932, 2012. Oxford University Press (OUP).

CABANNE, G. S.; CALDERÓN, L.; TRUJILLO ARIAS, N.; et al. Effects of Pleistocene climate changes on species ranges and evolutionary processes in the Neotropical Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, 2016. Wiley-Blackwell.

CABANNE, G. S.; D'HORTA, F. M.; SARI, E. H. R.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 3, p. 760–773, 2008.

CARDOSO, D. C.; CRISTIANO, M. P.; TAVARES, M. G.; SCHUBART, C. D.; HEINZE, J. Phylogeography of the sand dune ant *Mycetophylax simplex* along the Brazilian Atlantic forest coast: Remarkably low mtDNA diversity and shallow population structure. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, 2015. Springer Nature.

CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785–789, 2009.

CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 7, p. 1187–1201, 2008. Wiley-Blackwell.

CARNAVAL, A. C.; WALTARI, E.; RODRIGUES, M. T.; et al. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, v. 281, n. 1792, 2014.

CI- CONSERVATION INTERNACIONAL. Hotspots. Disponível em: <<http://www.conservation.org/How/Pages/Hotspots.aspx>>. Acesso em: 15/8/2016.

COLOMBI, V. H.; LOPES, S. R.; FAGUNDES, V. Testing the Rio Doce as a riverine barrier in shaping the Atlantic rainforest population divergence in the rodent *Akodon cursor*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 785, 2011.

D'HORTA, F. M.; CABANNE, G. S.; MEYER, D.; MIYAKI, C. Y. The genetic effects of late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: Diversification of an Atlantic forest passerine. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 9, p. 1923–1935, 2011. Wiley-Blackwell.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012. Oxford University Press (OUP).

ESCOBAR, H. Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1138–1139, 2015.

FAIRCLOTH, B. Illumiprocessor: a trimmomatic wrapper for parallel adapter and quality trimming. Disponível em: <[illumiprocessor: a trimmomatic wrapper for parallel adapter and quality trimming](#)>. Acesso em: 2013.

FAIRCLOTH, B. C. PHYLUCE is a software package for the analysis of conserved genomic loci. **Bioinformatics**, v. 32, n. 5, p. 786–788, 2016.

FAIRCLOTH, B. C.; BRANSTETTER, M. G.; WHITE, N. D.; BRADY, S. G. Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among Hymenoptera. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 3, p. 489–501, 2014. Wiley-Blackwell.

FAIRCLOTH, B. C.; GLENN, T. C. Not all sequence tags are created equal: Designing and validating sequence identification tags robust to indels. (S.-H. Shiu, Org.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42543, 2012. Public Library of Science (PLoS).

FAIRCLOTH, B. C.; MCCORMACK, J. E.; CRAWFORD, N. G.; et al. Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. **Systematic Biology**, v. 61, n. 5, p. 717–726, 2012. Oxford University Press (OUP).

FISHER, S.; BARRY, A.; ABREU, J.; et al. A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture

libraries. **Genome Biology**, v. 12, n. 1, p. R1, 2011. Springer Science + Business Media.

GALINDO-LEAL, C.; DE GUSMÃO CÂMARA, E. **Mata Atlântica - Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas - Ame Livros**. S. O. S Mata Atlântica, 2005.

GARRICK, R. C.; BONATELLI, I. A. S.; HYSENI, C.; et al. The evolution of phylogeographic data sets. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 6, p. 1164–1171, 2015. Wiley-Blackwell.

GLENN, T. C.; NILSEN, R.; KIERAN, T. J.; et al. Adapterama I: Universal stubs and primers for thousands of dual-indexed Illumina libraries (iTru & iNext). **bioRxiv**, 2016. doi: <https://doi.org/10.1101/049114>.

GNIRKE, A.; MELNIKOV, A.; MAGUIRE, J.; et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 182–189, 2009. Nature Publishing Group.

GOETZE, M.; PALMA-SILVA, C.; ZANELLA, C. M.; BERED, F. East-to-west genetic structure in populations of *Aechmea calyculata* (Bromeliaceae) from the southern Atlantic rainforest of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 477–490, 2016. Wiley-Blackwell.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 2011. Nature Publishing Group.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): Past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic forest. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 13, p. 3969–3982, 2006. Wiley-Blackwell.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, n. 3889, p. 131–7, 1969.

HARE, M. P. Prospects for nuclear gene phylogeography. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 12, p. 700–706, 2001. Elsevier.

HARVEY, M. G.; SMITH, B. T.; GLENN, T. C.; FAIRCLOTH, B. C.; BRUMFIELD, R. T. Sequence capture versus restriction site associated DNA Sequencing for shallow Systematics. **Systematic Biology**, 2016. Oxford University Press doi: [10.1093/sysbio/syw036](https://doi.org/10.1093/sysbio/syw036).

HEWITT, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages: Abstract: Nature. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 907–913, 2000.

HIJMANS, R. J.; CAMERON, S. E.; PARRA, J. L.; JONES, P. G.; JARVIS, A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, v. 25, n. 15, p. 1965–1978, 2005. Wiley-Blackwell.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press, 1990.

HÖSS, M.; JARUGA, P.; ZASTAWNY, T. H.; DIZDAROGLU, M.; PAABO, S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 7, p. 1304–1307, 1996.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013. Oxford University Press (OUP).

LEDRU, M.-P.; MONTADE, V.; BLANCHARD, G.; HÉLY, C. Long-term spatial changes in the distribution of the Brazilian Atlantic forest. **Biotropica**, v. 48, n. 2, p. 159–169, 2015. Wiley-Blackwell.

LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; LOSS, A. C.; et al. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 4, 2016a.

LEITE, Y.; COSTA, L.; LOSS, A.; et al. Reply to Raposo do Amaral et al.: The “Atlantis forest hypothesis” adds a new dimension to Atlantic forest biogeography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 15, 2016b.

LEPPÄNEN, J.; VEPSÄLÄINEN, K.; SAVOLAINEN, R. Phylogeography of the ant *Myrmica rubra* and its inquiline social parasite. **Ecology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 46–62, 2011. Wiley-Blackwell.

LOARIE, S. R.; DUFFY, P. B.; HAMILTON, H.; et al. The velocity of climate change. **Nature**, v. 462, n. 7276, p. 1052–1055, 2009. Nature Publishing Group.

LOCKWOOD, J. G. Abrupt and sudden climatic transitions and fluctuations: A review. **International Journal of Climatology**, v. 21, n. 9, p. 1153–1179, 2001. Wiley-Blackwell.

LOHSE, M.; BOLGER, A. M.; NAGEL, A.; et al. RobiNA: A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W622–W627, 2012. Oxford University Press (OUP).

LUNDBERG, J. G.; MARSHALL, L. G.; GUERRERO, J.; et al. The stage for neotropical fish diversification: A history of tropical south American rivers. In: L. Malabarba; R. Reis; R. Vari; Z. Lucena; C. Lucena (Orgs.); **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. p.13–48, 1998. Porto Alegre: EDIPUCRS.

MADDISON, W. P.; KNOWLES, L. L. Inferring Phylogeny despite incomplete lineage sorting. **Systematic Biology**, v. 55, n. 1, p. 21–30, 2006.

MARCHESE, C. Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. **Global Ecology and Conservation**, v. 3, p. 297–309, 2015.

MARTA-ALMEIDA, M.; MENDES, R.; AMORIM, F. N.; CIRANO, M.; DIAS, J. M. Fundão dam collapse: Oceanic dispersion of river Doce after the greatest Brazilian environmental accident. **Marine Pollution Bulletin**, 2016.

MARTINS, F. D. M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: What do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 104, n. 3, p. 499–509, 2011. Wiley-Blackwell.

MCCORMACK, J. E.; HIRD, S. M.; ZELLMER, A. J.; CARSTENS, B. C.; BRUMFIELD, R. T. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 66, n. 2, p. 526–538, 2013.

MEROW, C.; SMITH, M. J.; SILANDER, J. A. A practical guide to Maxent for modeling species' distributions: What it does, and why inputs and settings matter. **Ecography**, v. 36, n. 10, p. 1058–1069, 2013. Wiley-Blackwell.

MORALES, N. S.; FERNÁNDEZ, I. C.; CARRASCO, B.; ORCHARD, C. Combining niche Modelling, land-use change, and genetic information to assess the conservation status of *Pouteria splendens* populations in central Chile. **International Journal of Ecology**, v. 2015, 2015.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities: Abstract: Nature. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v403/n6772/full/403853a0.html>>. Acesso em: 15/8/2016.

NEMÉSIO, A.; SILVA, D. P.; NABOUT, J. C.; VARELA, S. Effects of climate change and habitat loss on a forest-dependent bee species in a tropical fragmented landscape. (R. Didham & C. Hassall, Orgs.) **Insect Conservation and Diversity**, v. 9, n. 2, p. 149–160, 2016. Wiley-Blackwell.

NESJE, A.; DAHL, S. O. The “little ice age” – only temperature? **The Holocene**, v. 13, n. 1, p. 139–145, 2003.

NICOLAS, V.; MARTÍNEZ-VARGAS, J.; HUGOT, J.-P. Molecular data and ecological niche modelling reveal the evolutionary history of the common and Iberian moles (Talpidae) in Europe. **Zoologica Scripta**, 2016. Wiley-Blackwell.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. A study of the origin of central Brazilian Forests by the analysis of plant species distribution patterns. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 52, p. 141–194, 1995.

PEARSON, R. G.; RAXWORTHY, C. J.; NAKAMURA, M.; TOWNSEND PETERSON, A. ORIGINAL ARTICLE: Predicting species distributions from small

numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. **Journal of Biogeography**, v. 34, n. 1, p. 102–117, 2006. Wiley-Blackwell.

PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; WAITE, A. N.; et al. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): Genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 1, p. 13–26, 2005. Wiley-Blackwell.

PERES, E. A.; SOBRAL-SOUZA, T.; PEREZ, M. F.; et al. Pleistocene niche stability and lineage diversification in the subtropical spider *Araneus omnicolor* (Araneidae). (W. Arthofer, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0121543, 2015. Public Library of Science (PLoS).

PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, v. 190, n. 3-4, p. 231–259, 2006. Elsevier BV.

PIE, M. R.; MEYER, A. L. S.; FIRKOWSKI, C. R.; RIBEIRO, L. F.; BORNSCHEIN, M. R. Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. **Ecological Modelling**, v. 250, p. 165–176, 2013.

PINHEIRO, F.; DE BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; et al. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: A Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 10, p. 1923–1935, 2011. Wiley-Blackwell.

PRATES, I.; RIVERA, D.; RODRIGUES, M. T.; CARNAVAL, A. C. A mid-Pleistocene rainforest corridor enabled synchronous invasions of the Atlantic forest by Amazonian anole lizards. **Molecular Ecology**, 2016. Wiley-Blackwell.

QUEK, S.-P.; DAVIES, S. J.; ASHTON, P. S.; ITINO, T.; PIERCE, N. E. The geography of diversification in mutualistic ants: A gene's-eye view into the Neogene history of Sundaland rain forests. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2045–2062, 2007. Wiley-Blackwell.

RAPOSO, F.; AMARAL; EDWARDS, S. V.; et al. The “Atlantis forest hypothesis” does not explain Atlantic forest phylogeography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 15, p. 2097–2098, 2016.

RESENDE, H. C.; YOTOKO, K. S. C.; DELABIE, J. H. C.; et al. Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 101, n. 4, p. 949–960, 2010. Wiley-Blackwell.

RIBEIRO, R. A.; LEMOS-FILHO, J. P.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Heredity - abstract of article: Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): Insights into the evolutionary history and

conservation of the Brazilian Atlantic forest. **Heredity**, v. 106, n. 1, p. 46–57, 2010.

ROHLAND, N.; REICH, D. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. **Genome Research**, v. 22, n. 5, p. 939–946, 2012. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ROSSETTI, D. DE F.; POLIZEL, S. P.; COHEN, M. C. L.; PESSEDA, L. C. R. Late Pleistocene–Holocene evolution of the Doce river delta, southeastern Brazil: Implications for the understanding of wave-influenced deltas. **Marine Geology**, v. 367, p. 171–190, 2015.

SAINT-HILAIRE, A. DE. **Segunda viagem do Rio de Janeiro a Minas Gerais e a São Paulo, 1822: [diário]**. 1932.

SANT'ANNA NETO, J. L.; GALVANI, E.; VIEIRA, B. C. Climates of Brazil: Past and present. **Landscapes and Landforms of Brazil**. p.33–41, 2015. Springer Science + Business Media.

SEGURA, F. R.; NUNES, E. A.; PANIZ, F. P.; et al. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, 2016.

ŞEKERCIOĞLU, Ç. H.; PRIMACK, R. B.; WORMWORTH, J. The effects of climate change on tropical birds. **Biological Conservation**, v. 148, n. 1, p. 1–18, 2012. Elsevier BV.

SHAFER, A. B. A.; WOLF, J. B. W.; ALVES, P. C.; et al. Genomics and the challenging translation into conservation practice. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 30, n. 2, p. 78–87, 2015.

SMITH, B. T.; HARVEY, M. G.; FAIRCLOTH, B. C.; et al. Target capture and massively parallel Sequencing of Ultraconserved elements for comparative studies at shallow evolutionary time scales. **Systematic Biology**, v. 63, n. 1, p. 83–95, 2014. Oxford University Press.

SOLOMON, S. E.; BACCI, M.; MARTINS, J.; VINHA, G. G.; MUELLER, U. G. Paleodistributions and comparative molecular Phylogeography of Leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. (P. M. Bennett, Org.) **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. e2738, 2008. Public Library of Science (PLoS).

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014. Oxford University Press.

STRÖHER, P. R.; ZARZA, E.; TSAI, W. L. E.; et al. The mitochondrial genome of *Octostruma stenognatha* and its phylogenetic implications. **Insectes Sociaux**, 2016. Springer Nature.

TAVARES, W. C.; PESSÔA, L. M.; SEUÁNEZ, H. N. Plio-Pleistocene history of the endangered spiny rat *Trinomys eliasi* (Echimyidae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 96, n. 1, p. 94–106, 2015. Oxford University Press (OUP).

THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; GIOVANELLI, J. G. R.; et al. Phylogeography of endemic toads and post-pleistocene persistence of the Brazilian Atlantic forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 1018–1031, 2010. Elsevier BV.

THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. Barriers, rather than refugia, underlie the origin of diversity in toads endemic to the Brazilian Atlantic forest. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 24, p. 6152–6164, 2014. Wiley-Blackwell.

TONINI, J. F. R.; COSTA, L. P.; CARNAVAL, A. C. Phylogeographic structure is strong in the Atlantic forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 51, n. 2, p. 114–121, 2013. Wiley-Blackwell.

WIENS, J. J.; KUCZYNSKI, C. A.; STEPHENS, P. R. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: Implications for speciation and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, n. 2, p. 445–461, 2010. Wiley-Blackwell.

Material Suplementar

Table S1. Sample locations across the Brazilian Atlantic Forest and their corresponding coordinates and resulting DNA extract concentrations.

ID	Species	Location	Log	Lat	Extract concentration (ng/ μ l)
660	<i>Fulakora elongata</i>	São Bonifácio- SC	-48.683	-27.82	0.491
646	<i>Fulakora elongata</i>	São Bonifácio- SC	-48.683	-27.82	0.713
658	<i>Fulakora elongata</i>	Horto 2 irmãos - PE	-34.933	-8	0.487
645	<i>Fulakora elongata</i>	São Bonifácio-SC	-48.683	-27.82	0.778
169	<i>Heteroponera dentinodis</i>	Palhoça -SC	-48.683	-27.73	0.974
508	<i>Heteroponera dentinodis</i>	Morretes-PR	-48.833	-25.47	0.965
41	<i>Heteroponera dentinodis</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	0.779
578	<i>Heteroponera dentinodis</i>	Lauraceas-PR	-48.717	-24.85	2.28
37	<i>Heteroponera dentinodis</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	0.456
636	<i>Heteroponera dentinodis</i>	Lauraceas-PR	-48.717	-24.85	0.993
511	<i>Heteroponera dentinodis</i>	Morretes-PR	-48.833	-25.47	0.629
720	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Santa Tereza-ES	-40.533	-19.97	0.941
626	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Lauraceas-PR	-48.717	-24.85	1.08
214	<i>Hylomyrma reitteri</i>	São Bonifácio-SC	-48.683	-27.82	0.817
777	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Cardoso- SP	-47.917	-25.08	0.433
29	<i>Hylomyrma reitteri</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	1.07
953	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Tapiraí-SP	-47.45	-24.02	1.07
858	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Picinguaba- SP	-44.833	-23.33	0.518
708	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Santa Tereza-ES	-40.533	-19.97	to low
406	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Intervales-SP	-48.35	-24.3	0.53
30	<i>Hylomyrma reitteri</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	1.6
614	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Lauraceas-PR	-48.717	-24.85	1.4
89	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Blumenau-SC	-49.15	-27.1	2.05
87	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Blumenau-SC	-49.15	-27.1	1.34
874	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Picinguaba- SP	-44.833	-23.33	0.668
187	<i>Hylomyrma reitteri</i>	Palhoça - SC	-48.683	-27.73	0.837
927	<i>Megalomyrmex drifti</i>	Tapiraí-SP	-47.45	-24.02	0.512
466	<i>Megalomyrmex drifti</i>	Cubatão-SP	-46.533	-23.97	0.578
35	<i>Megalomyrmex drifti</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	0.818
846	<i>Megalomyrmex drifti</i>	Sapiranga-BA	-38.033	-12.55	0.089
725	<i>Octostruma rugifera</i>	Santa Tereza-ES	-40.533	-19.97	0.162
905	<i>Octostruma rugifera</i>	Picinguaba- SP	-44.833	-23.33	1.88
100	<i>Octostruma rugifera</i>	Blumenau-SC	-49.15	-27.1	0.478
198	<i>Octostruma rugifera</i>	São Bonifácio-SC	-48.683	-27.82	0.715
715	<i>Octostruma rugifera</i>	Santa Tereza-ES	-40.533	-19.97	0.232
143	<i>Octostruma rugifera</i>	Palhoça-SC	-48.683	-27.73	1.58
279	<i>Octostruma rugifera</i>	Cunha-SP	-45	-23.25	0.338
787	<i>Octostruma rugifera</i>	Cardoso-SP	-47.917	-25.08	0.072
77	<i>Octostruma rugifera</i>	Blumenau 48- SC	-49.15	-27.1	0.571
599	<i>Octostruma rugifera</i>	Lauraceas-PR	-48.717	-24.85	0.351
289	<i>Octostruma rugifera</i>	Cunha-SP	-45	-23.25	0.2
469	<i>Octostruma rugifera</i>	Cubatão-SP	-46.533	-23.97	0.206
583	<i>Octostruma rugifera</i>	Lauraceas-PR	-48.717	-24.85	0.298
1117	<i>Octostruma rugifera</i>	Madalena - ES	-41.95	-21.97	0.269
173	<i>Octostruma rugifera</i>	Palhoça-SC	-48.683	-27.73	0.13
217	<i>Octostruma rugifera</i>	São Bonifácio-SC	-48.683	-27.82	to low
394	<i>Octostruma rugifera</i>	Intervales-SP	-48.35	-24.3	0.193

ID	Species	Location	Log	Lat	Extract concentration (ng/μl)
534	<i>Octostruma rugifera</i>	Morretes 16-PR	-48.833	-25.47	0.196
16	<i>Octostruma stenognatha</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	0.726
5	<i>Octostruma stenognatha</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	0.641
1031	<i>Octostruma stenognatha</i>	Ilhéus-BA	-39.05	-14.78	0.294
419	<i>Octostruma stenognatha</i>	Horto 2 irmãos - PE	-34.933	-8	0.313
591	<i>Octostruma stenognatha</i>	Lauraceas -PR	-48.717	-24.85	0.13
498	<i>Octostruma stenognatha</i>	Porto Seguro- BA	-39.167	-16.38	0.068
111	<i>Octostruma stenognatha</i>	Blumenau- SC	-49.15	-27.1	0.149
577	<i>Octostruma stenognatha</i>	Lauraceas-PR	-48.717	-24.85	0.307
1038	<i>Octostruma stenognatha</i>	Ilhéus-BA	-39.05	-14.78	0.096
204	<i>Octostruma stenognatha</i>	São Bonifácio-SC	-48.683	-27.82	0.66
481	<i>Octostruma stenognatha</i>	Porto Seguro-BA	-39.167	-16.38	0.163
437	<i>Octostruma stenognatha</i>	Horto 2 irmãos - PE	-34.933	-8	0.562
124	<i>Octostruma stenognatha</i>	Blumenau-SC	-49.15	-27.1	0.39
386	<i>Octostruma stenognatha</i>	Intervales-SP	-48.35	-24.3	to low
745	<i>Octostruma stenognatha</i>	Santa Tereza-ES	-40.533	-19.97	0.096
200	<i>Octostruma stenognatha</i>	São Bonifácio-SC	-48.683	-27.82	0.2
829	<i>Odontomachus meinerti</i>	Sapiranga-BA	-38.033	-12.55	1.06
676	<i>Odontomachus meinerti</i>	Buraquinho-PB	-34.85	-7.133	4.05
960	<i>Odontomachus meinerti</i>	Tapiraí-SP	-47.45	-24.02	1.28
853	<i>Odontomachus meinerti</i>	Picinguaba- SP	-44.833	-23.33	2.66
153	<i>Odontomachus meinerti</i>	Palhoça -SC	-48.683	-27.73	to low
673	<i>Odontomachus meinerti</i>	Buraquinho- PB	-34.85	-7.133	to low
327	<i>Odontomachus meinerti</i>	Areia Branca- SE	-37.317	-10.75	to low
851	<i>Odontomachus meinerti</i>	Picinguaba- SP	-44.833	-23.33	to low
1024	<i>Odontomachus meinerti</i>	Sooterama- ES	-40.117	-18.98	to low
522	<i>Odontomachus meinerti</i>	Morretes -PR	-48.833	-25.47	to low
808	<i>Odontomachus meinerti</i>	Cardoso - SP	-47.917	-25.08	to low
414	<i>Odontomachus meinerti</i>	Horto 2 irmãos - PE	-34.933	-8	to low
499	<i>Odontomachus meinerti</i>	Porto Seguro-BA	-39.167	-16.38	14.2
164	<i>Odontomachus meinerti</i>	Palhoça-SC	-48.683	-27.73	5.16
932	<i>Odontomachus meinerti</i>	Tapiraí-SP	-47.45	-24.02	to low
753	<i>Odontomachus meinerti</i>	Cardoso-SP	-47.917	-25.08	1.84
338	<i>Odontomachus meinerti</i>	Areia Branca- SE	-37.317	-10.75	12.4
415	<i>Odontomachus meinerti</i>	Horto 2 irmãos - PE	-34.933	-8	3.72
528	<i>Odontomachus meinerti</i>	Morretes-PR	-48.833	-25.47	1.33
1012	<i>Odontomachus meinerti</i>	Sooterama-ES	-40.117	-18.98	1.05
810	<i>Odontomachus meinerti</i>	Sapiranga - BA	-38.033	-12.55	to low
21	<i>Odontomachus meinerti</i>	São Bento do Sul- SC	-49.267	-26.35	0.192
978	<i>Odontomachus meinerti</i>	Castro-SE	-37.417	-11.37	to low
654	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Morretes-PR	-48.833	-25.47	0.419
251	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Cunha-SP	-45	-23.25	0.817
965	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Tapiraí - SP	-47.45	-24.02	to low
655	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Blumenau-SC	-49.15	-27.1	to low
888	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Picinguaba- SP	-44.833	-23.33	to low
811	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Sapiranga-BA	-38.033	-12.55	0.11
1063	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Juréia-SP	-47.233	-24.53	0.079

ID	Species	Location	Log	Lat	Extract concentration (ng/ μ l)
667	<i>Strumigenys crassicornis</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	to low
840	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Sapiranga-BA	-38.033	-12.55	to low
921	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Tapiraí-SP	-47.45	-24.02	to low
1080	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Juréia-SP	-47.233	-24.53	to low
769	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Cardoso-SP	-47.917	-25.08	to low
311	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Cunha-SP	-45	-23.25	to low
657	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Lauraceas-PR	-48.717	-24.85	to low
662	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Morretes-PR	-48.833	-25.47	to low
436	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Horto 2 irmãos - PE	-34.933	-8	to low
1044	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Ilhéus-BA	-39.05	-14.78	to low
652	<i>Strumigenys crassicornis</i>	São Bento do Sul- SC	-49.267	-26.35	0.221
884	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Picinguaba- SP	-44.833	-23.33	0.335
649	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Blumenau-SC	-49.15	-27.1	0.378
732	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Santa Tereza-ES	-40.533	-19.97	0.064
431	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Horto 2 irmãos - PE	-34.933	-8	0.275
648	<i>Strumigenys crassicornis</i>	Lauraceas-PR	-48.717	-24.85	0.229
801	<i>Strumigenys denticulata</i>	Cardoso-SP	-47.917	-25.08	0.482
181	<i>Strumigenys denticulata</i>	Palhoça-SC	-48.683	-27.73	1.01
421	<i>Strumigenys denticulata</i>	Horto 2 irmãos - PE	-34.933	-8	0.501
24	<i>Strumigenys denticulata</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	0.168
993	<i>Strumigenys denticulata</i>	Castro-SE	-37.417	-11.37	0.442
441	<i>Strumigenys denticulata</i>	Cubatão-SP	-46.533	-23.97	0.217
533	<i>Strumigenys denticulata</i>	Morretes-PR	-48.833	-25.47	0.075
832	<i>Strumigenys denticulata</i>	Sapiranga-BA	-38.033	-12.55	0.054
411	<i>Strumigenys denticulata</i>	Horto 2 irmãos - PE	-34.933	-8	0.738
852	<i>Strumigenys denticulata</i>	Picinguaba- SP	-44.833	-23.33	to low
1059	<i>Strumigenys denticulata</i>	Juréia-SP	-47.233	-24.53	to low
677	<i>Strumigenys denticulata</i>	Buraquinho-PB	-34.85	-7.133	0.377
1020	<i>Strumigenys denticulata</i>	Sooterama-ES	-40.117	-18.98	to low
345	<i>Strumigenys denticulata</i>	Areia Branca- SE	-37.317	-10.75	0.225
158	<i>Strumigenys denticulata</i>	Palhoça- SC	-48.683	-27.73	0.309
926	<i>Strumigenys denticulata</i>	Tapiraí-SP	-47.45	-24.02	0.083
443	<i>Strumigenys denticulata</i>	Cubatão-SP	-46.533	-23.97	to low
333	<i>Strumigenys denticulata</i>	Areia Branca- SE	-37.317	-10.75	1.07
485	<i>Strumigenys denticulata</i>	Porto Seguro-BA	-39.167	-16.38	to low
819	<i>Strumigenys denticulata</i>	Sapiranga-BA	-38.033	-12.55	0.154
1125	<i>Strumigenys denticulata</i>	Madalena - ES	-41.95	-21.97	0.095
28	<i>Strumigenys denticulata</i>	São Bento do Sul-SC	-49.267	-26.35	0.216
675	<i>Strumigenys denticulata</i>	Buraquinho -PB	-34.85	-7.133	to low
550	<i>Strumigenys denticulata</i>	Morretes-PR	-48.833	-25.47	0.295
969	<i>Strumigenys denticulata</i>	Castro-SE	-37.417	-11.37	0.24
890	<i>Strumigenys denticulata</i>	Picinguaba- SP	-44.833	-23.33	0.2
1037	<i>Strumigenys denticulata</i>	Ilhéus-BA	-39.05	-14.78	0.133
778	<i>Strumigenys denticulata</i>	Cardoso-SP	-47.917	-25.08	0.071
484	<i>Strumigenys denticulata</i>	Porto Seguro- BA	-39.167	-16.38	0.196
956	<i>Strumigenys denticulata</i>	Tapiraí - SP	-47.45	-24.02	to low
1030	<i>Strumigenys denticulata</i>	Ilhéus- BA	-39.05	-14.78	0.211
1002	<i>Strumigenys denticulata</i>	Sooterama- ES	-40.117	-18.98	0.089

Figure S1. Figure of Bioanalyzer results showing the overall initial conditions in eleven of our samples. Note the wide variation in the concentration and quality among samples.

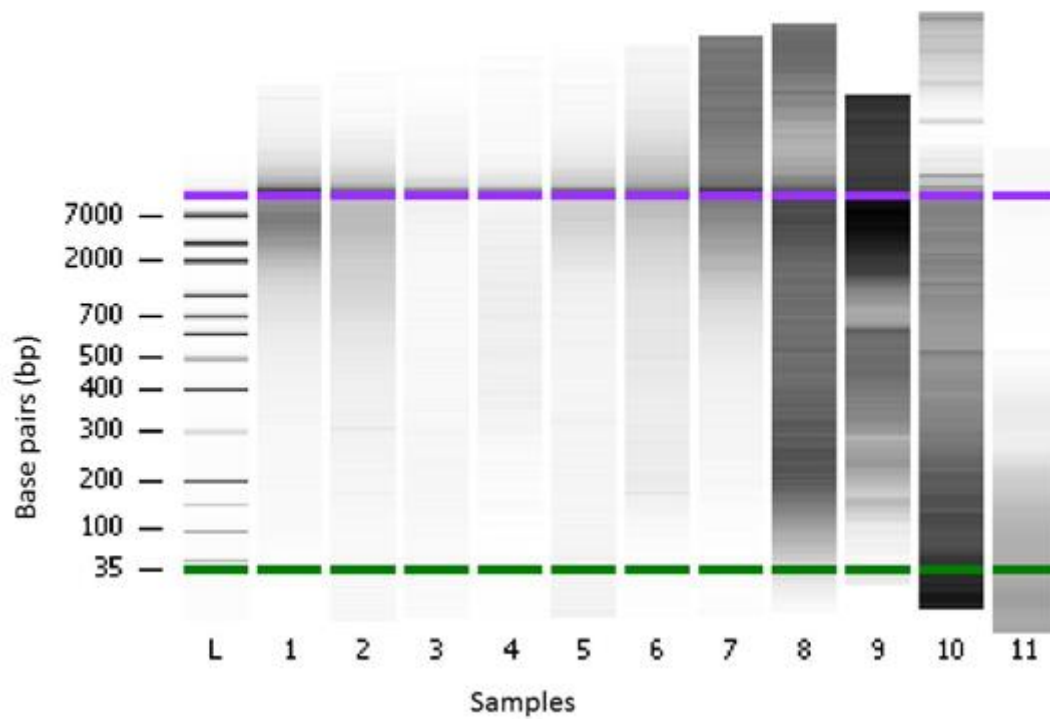


Table S2. List of sequenced ultraconserved elements and their success (1) or not (0) in being amplified in each species.

Locus	<i>Octostruma rrugifera</i>	<i>Octostruma stenognatha</i>	<i>Odontomachus meinerti</i>	<i>Strumigenys crassicornis</i>	<i>Strumigenys denticulata</i>	<i>Heteroponera dentinodis</i>	<i>Hylomyrma reitteri</i>	<i>Megalomyrmex drifti</i>
uce-1012.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-1028.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-1030.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-1035.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-1038.nexus	1	0	0	1	0	1	1	1
uce-104.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-1064.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-1074.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-1086.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-1096.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-1126.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-1127.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-1129.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-1144.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-1155.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-1166.nexus	1	0	0	1	0	1	1	1
uce-1173.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-1195.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-120.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-1200.nexus	1	0	0	1	0	1	0	0
uce-1203.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-1213.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-1218.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-122.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-1223.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-1228.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-1239.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-1253.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-1257.nexus	1	0	0	1	0	1	0	0
uce-1263.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-1304.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-132.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-1343.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1

uce-1345.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-1348.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-1349.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-135.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-136.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-1366.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-1368.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-1374.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-1384.nexus	1	0	0	1	0	1	0	0
uce-1396.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-1418.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-1420.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-1423.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-145.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-1472.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-1477.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-1487.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-1492.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-1497.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-168.nexus	1	0	0	1	0	1	1	0
uce-172.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-182.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-186.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-188.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-193.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-197.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-220.nexus	1	0	1	0	0	0	1	1
uce-236.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-237.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-239.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-244.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-258.nexus	1	0	0	1	0	0	0	1
uce-272.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-275.nexus	1	0	1	0	0	1	1	1
uce-297.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-310.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-33.nexus	1	0	0	1	0	0	1	1
uce-334.nexus	1	0	0	1	0	0	0	0
uce-335.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-337.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-34.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-345.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-35.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-36.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-38.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1

uce-381.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-399.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-401.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-407.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-412.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-416.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-419.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-423.nexus	1	0	0	1	0	1	0	1
uce-435.nexus	1	0	0	1	0	1	1	1
uce-436.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-446.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-448.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-450.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-46.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-47.nexus	1	1	0	0	0	1	0	0
uce-476.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-480.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-481.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-484.nexus	1	0	1	0	0	0	0	1
uce-485.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-50.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-502.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-510.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-512.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-513.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-518.nexus	1	0	0	1	0	1	1	0
uce-528.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-533.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-537.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-541.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-542.nexus	1	0	0	1	0	1	1	1
uce-554.nexus	1	0	0	1	0	1	1	0
uce-573.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-580.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-582.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-596.nexus	1	0	1	0	0	1	1	1
uce-606.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-610.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-613.nexus	1	1	0	1	0	1	1	0
uce-615.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-617.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-618.nexus	1	0	0	1	0	0	0	1
uce-633.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-635.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-636.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1

uce-64.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-642.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-645.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-65.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-662.nexus	1	0	0	1	0	0	1	0
uce-669.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-670.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-673.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-676.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-69.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-694.nexus	1	0	0	1	0	1	1	0
uce-695.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-699.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-702.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-719.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-723.nexus	1	0	0	1	0	0	0	0
uce-743.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-753.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-759.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-768.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-769.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-787.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-790.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-793.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-794.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-812.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-821.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-836.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-839.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-844.nexus	1	0	0	0	0	1	0	1
uce-862.nexus	1	0	0	0	0	1	1	0
uce-864.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-880.nexus	1	0	0	0	0	1	0	0
uce-902.nexus	1	0	0	1	0	0	0	1
uce-927.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-928.nexus	1	0	0	0	0	0	1	1
uce-947.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-983.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-984.nexus	1	0	0	0	0	0	1	0
uce-99.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-990.nexus	1	0	0	0	0	0	0	0
uce-991.nexus	1	0	0	0	0	0	0	1
uce-998.nexus	1	0	0	0	0	1	1	1
uce-1115.nexus	0	1	0	0	0	0	1	1
uce-1135.nexus	0	1	0	0	0	1	0	0

uce-1208.nexus	0	1	0	0	0	0	0	0
uce-1260.nexus	0	1	0	0	0	1	1	0
uce-1279.nexus	0	1	0	0	0	1	1	0
uce-1286.nexus	0	1	0	0	0	1	1	0
uce-1335.nexus	0	1	0	0	0	0	1	1
uce-1351.nexus	0	1	0	0	0	0	1	0
uce-1394.nexus	0	1	0	0	0	0	0	1
uce-315.nexus	0	1	0	0	0	1	1	0
uce-349.nexus	0	1	0	0	0	1	0	0
uce-438.nexus	0	1	0	0	0	0	0	0
uce-649.nexus	0	1	0	0	0	1	1	0
uce-683.nexus	0	1	0	0	0	0	0	1
uce-749.nexus	0	1	0	0	0	1	1	1
uce-763.nexus	0	1	1	0	0	0	1	1
uce-846.nexus	0	1	0	0	0	1	1	0
uce-976.nexus	0	1	0	0	0	1	1	1
uce-989.nexus	0	1	0	0	0	0	0	0
uce-1075.nexus	0	0	1	0	0	1	1	1
uce-1113.nexus	0	0	1	0	0	0	0	0
uce-1156.nexus	0	0	1	0	0	0	1	1
uce-1285.nexus	0	0	1	0	0	1	1	1
uce-17.nexus	0	0	1	0	0	0	0	0
uce-382.nexus	0	0	1	0	0	0	1	1
uce-387.nexus	0	0	1	1	0	1	1	1
uce-449.nexus	0	0	1	0	0	0	1	0
uce-496.nexus	0	0	1	0	0	0	1	1
uce-547.nexus	0	0	1	0	0	1	0	1
uce-583.nexus	0	0	1	0	0	0	1	1
uce-621.nexus	0	0	1	0	0	1	1	1
uce-651.nexus	0	0	1	0	0	0	1	1
uce-686.nexus	0	0	1	0	0	1	1	1
uce-751.nexus	0	0	1	0	0	1	0	1
uce-87.nexus	0	0	1	0	0	1	1	0
uce-905.nexus	0	0	1	0	0	0	1	0
uce-979.nexus	0	0	1	0	0	0	1	1
uce-1020.nexus	0	0	0	1	0	1	1	1
uce-1025.nexus	0	0	0	1	0	1	1	0
uce-1107.nexus	0	0	0	1	0	0	1	1
uce-1109.nexus	0	0	0	1	0	0	0	0
uce-1139.nexus	0	0	0	1	0	1	0	0
uce-1206.nexus	0	0	0	1	0	1	0	1
uce-1245.nexus	0	0	0	1	0	0	0	1
uce-1259.nexus	0	0	0	1	0	1	1	1
uce-1333.nexus	0	0	0	1	0	1	1	0
uce-1421.nexus	0	0	0	1	0	0	1	1

uce-151.nexus	0	0	0	1	0	0	1	1
uce-192.nexus	0	0	0	1	0	0	0	0
uce-206.nexus	0	0	0	1	0	0	1	1
uce-278.nexus	0	0	0	1	0	1	0	0
uce-288.nexus	0	0	0	1	0	1	0	1
uce-344.nexus	0	0	0	1	0	0	1	1
uce-366.nexus	0	0	0	1	0	1	0	1
uce-421.nexus	0	0	0	1	0	0	1	0
uce-432.nexus	0	0	0	1	0	1	1	1
uce-472.nexus	0	0	0	1	0	1	1	0
uce-489.nexus	0	0	0	1	0	1	1	1
uce-493.nexus	0	0	0	1	0	1	1	1
uce-499.nexus	0	0	0	1	0	0	1	1
uce-500.nexus	0	0	0	1	0	1	0	1
uce-511.nexus	0	0	0	1	0	1	0	1
uce-529.nexus	0	0	0	1	0	1	1	0
uce-58.nexus	0	0	0	1	0	1	0	1
uce-591.nexus	0	0	0	1	0	0	1	0
uce-652.nexus	0	0	0	1	0	1	0	1
uce-7.nexus	0	0	0	1	0	0	1	0
uce-700.nexus	0	0	0	1	0	0	0	1
uce-711.nexus	0	0	0	1	0	1	0	1
uce-748.nexus	0	0	0	1	0	0	0	0
uce-803.nexus	0	0	0	1	0	0	0	0
uce-877.nexus	0	0	0	1	0	0	0	1
uce-886.nexus	0	0	0	1	0	0	1	1
uce-907.nexus	0	0	0	1	0	1	0	1
uce-134.nexus	0	0	0	0	1	1	1	1
uce-710.nexus	0	0	0	0	1	0	0	1
uce-1.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1006.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1008.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1011.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1014.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1022.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1026.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1027.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1029.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-103.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1031.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1033.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1036.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1045.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1046.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1049.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0

uce-1052.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1055.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1065.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1066.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-107.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1071.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1080.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1081.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1085.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1091.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1094.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1098.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-111.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1110.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1124.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1125.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1128.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-113.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1134.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1138.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1142.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1146.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-115.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1150.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1151.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1159.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1162.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1167.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1168.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1171.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1172.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1177.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1178.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1182.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1191.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1198.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1202.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1205.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-121.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1211.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1212.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1214.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1216.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1217.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1220.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0

uce-1227.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1232.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1234.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1236.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1238.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1240.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1243.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1244.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-126.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1268.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1272.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1275.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1281.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1287.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1288.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-13.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1301.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1303.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1323.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1325.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1327.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1329.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1330.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1334.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1337.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1339.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1340.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1350.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1362.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1369.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1371.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1377.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1378.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1379.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1383.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1388.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-139.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1392.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1393.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1397.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1403.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-141.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1411.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1415.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1429.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1

uce-143.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1430.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1432.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1434.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1438.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1442.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1446.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1451.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1452.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1457.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-146.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1462.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1473.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1476.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-1481.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1484.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-1485.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-1490.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-1504.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-153.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-154.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-155.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-177.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-189.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-191.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-194.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-196.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-199.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-20.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-200.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-205.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-208.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-21.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-217.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-22.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-222.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-233.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-234.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-25.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-253.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-256.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-257.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-265.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-269.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-273.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0

uce-28.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-285.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-29.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-293.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-295.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-298.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-308.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-309.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-31.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-32.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-323.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-329.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-330.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-340.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-342.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-353.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-356.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-370.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-371.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-380.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-388.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-389.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-39.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-390.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-396.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-397.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-400.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-402.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-406.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-413.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-415.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-42.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-431.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-447.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-454.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-458.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-466.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-468.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-478.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-497.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-498.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-514.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-516.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-520.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-521.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0

uce-525.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-530.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-534.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-539.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-54.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-549.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-55.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-550.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-553.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-559.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-563.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-565.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-566.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-57.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-575.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-589.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-59.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-598.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-599.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-600.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-607.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-608.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-609.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-612.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-616.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-620.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-626.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-629.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-632.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-643.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-646.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-647.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-654.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-661.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-672.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-674.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-677.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-688.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-690.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-698.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-701.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-706.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-713.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-733.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-734.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1

uce-741.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-754.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-760.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-766.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-767.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-774.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-775.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-785.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-786.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-79.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-792.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-796.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-797.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-806.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-816.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-822.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-823.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-824.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-832.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-833.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-835.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-840.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-842.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-845.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-847.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-858.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-860.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-861.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-871.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-876.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-88.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-884.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-885.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-888.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-89.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-892.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-901.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-909.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-911.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-912.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-914.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-923.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-929.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-930.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-931.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1

uce-932.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-936.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-938.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-948.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-95.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-950.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-952.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-957.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-959.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-961.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-97.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-974.nexus	0	0	0	0	0	1	1	0
uce-975.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-977.nexus	0	0	0	0	0	1	0	0
uce-978.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-98.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-982.nexus	0	0	0	0	0	1	1	1
uce-997.nexus	0	0	0	0	0	1	0	1
uce-10.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-100.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1004.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1013.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1023.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1024.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1037.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-106.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1061.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1062.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1069.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1078.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1090.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1112.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1131.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-114.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1149.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1170.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1193.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1196.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1225.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1242.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1249.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1266.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1283.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-129.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1292.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0

uce-1297.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1298.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1307.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1308.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1314.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1358.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1381.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1391.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1425.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1437.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1443.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1447.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1475.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1483.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-1494.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1495.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-158.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-163.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-170.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-171.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-173.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-204.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-228.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-240.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-242.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-249.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-252.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-270.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-290.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-3.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-30.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-313.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-314.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-316.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-319.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-320.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-325.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-326.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-336.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-343.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-346.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-348.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-361.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-365.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-40.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1

uce-404.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-441.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-455.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-460.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-479.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-48.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-49.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-505.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-506.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-507.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-508.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-527.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-535.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-545.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-548.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-556.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-558.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-562.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-577.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-588.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-594.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-595.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-6.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-627.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-628.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-634.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-655.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-659.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-693.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-697.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-707.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-71.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-742.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-745.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-747.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-764.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-77.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-791.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-8.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-815.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-841.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-848.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-851.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-852.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-855.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1

uce-879.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-882.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-898.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-899.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-908.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-915.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-917.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-925.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-933.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-934.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-942.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-956.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-96.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-981.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-988.nexus	0	0	0	0	0	0	1	1
uce-992.nexus	0	0	0	0	0	0	1	0
uce-1007.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1034.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1041.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1053.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1058.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1095.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1097.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-110.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1102.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1136.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1163.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1194.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1207.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1235.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1258.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-127.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1306.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1309.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1354.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1355.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-137.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1416.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1428.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1463.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-148.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-1486.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-159.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-18.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-184.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1

uce-195.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-229.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-230.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-263.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-27.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-276.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-306.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-351.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-359.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-383.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-409.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-411.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-442.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-459.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-475.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-488.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-492.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-495.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-501.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-515.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-522.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-531.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-574.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-60.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-624.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-631.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-657.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-658.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-660.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-67.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-682.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-72.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-728.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-752.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-758.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-761.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-771.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-782.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-800.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-804.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-805.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-809.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-843.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-857.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-868.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1

uce-9.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-93.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-946.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-949.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-954.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-962.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-965.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1
uce-966.nexus	0	0	0	0	0	0	0	1

Table S3. Table of occurrence records used in environmental niche modeling.

<i>Strumigenys crassicornis</i>		<i>Octostruma stenognatha</i>		<i>Octostruma rugifera</i>		<i>Odontomachus meinerti</i>	
Longitude	Latitude	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude
-46.63333	-23.46667	-46.63333	-23.46667	-39.84772	-12.90685	-84.03885	9.92683
-50.3	-29.267	-50.3	-29.267	-67.68787	10.34756	-84.13655	9.96055
-52.38333	-27.18333	-52.38333	-27.18333	-67.68498	10.35373	-84.18783	9.97275
-49	-22.46667	-49	-22.46667	-67.7027	10.33801	-84.07257	9.93955
-52.38361	-27.18556	-52.38361	-27.18556	-67.70333	10.33833	-85.48	10.98
-45.86667	-23.63333	-45.86667	-23.63333	-41.95	-21.97806	-86.66833	15.58333
-48.9114	-27.8183	-48.9114	-27.8183	-45.85	-23.53333	-85.61	10.85
-44.56667	-22.5	-44.56667	-22.5	-45.86667	-23.63333	-83.32833	8.40667
-45.85	-23.53333	-45.85	-23.53333	-52.31	-27.153	-92.30164	17.51615
-48.911389	-27.818333	-34.933	-8	-52.38333	-27.18333	-90.90145	16.16025
-48.697222	-27.741111	-39.05	-14.783	-45.00722	-23.25083	-91.63687	17.1238
-49.271111	-26.364167	-39.167	-16.383	-67.14344	10.15683	-91.63045	17.12641
-49.153889	-27.104167	-40.533	-19.967	-50.17477	-29.48086	-91.63798	17.12352
-48.716667	-24.854444	-48.717	-24.85	-50.166667	-29.5	-90.89689	16.15149
-47.235556	-24.544167	-49.267	-26.35	-47.2383	-24.54420	-92.42802	17.38542
-46.54	-23.975278	-49.15	-27.1	-45.007198	-23.25079	-90.91838	16.14125
-44.875833	-23.336111	-48.683	-27.816	-46.540001	-23.9753	-90.9014	16.16099
-45.007222	-23.250833			-48.3494	-24.31500	-91.6364	17.1238
-43.414167	-22.570556			-47.465599	-24.0319	-90.89554	16.14713
-41.95	-21.978056			-45.766701	-23.6514	-91.62997	17.12707
-40.5375	-19.969167			-39.84772	-12.90685	-90.90159	16.15956
-33.131111	-12.631389			-41.95	-21.97806	-91.63789	17.12354
-9.065556	-14.796389			-40.533	-19.967	-90.90149	16.16051
-37.418611	-11.475833			-44.833	-23.333	-91.63678	17.1238
-34.944444	-8.008889			-48.35	-24.3	-91.63673	17.1238
-34.942222	-7.201944			-48.833	-25.467	-92.30231	17.51604
-45.1375	-22.748889			-48.683	-27.733	-92.30221	17.51606
-42.881944	-20.753889			-48.5489	-27.5969	-91.63041	17.12649
-50.5075	-25.909722			-48.9878	-22.4689	-91.63083	17.12574
-54.7925	-27.124722			-46.59	-23.4014	-90.89713	16.14833
-49.502222	-27.390556			-44.5592	-22.4914	-90.90158	16.15974
-52.793056	-26.101111					-90.91668	16.13677
-51.424722	-26.721111					-91.5861	16.98023
-54.356111	-24.786944					-91.59357	16.9486
-50.434722	-28.669167					-91.6305	17.12634
-51.086389	-29.533889					-91.63748	17.12365
-52.250556	-30.523333					-91.63743	17.12366
-51.795833	-30.318611					-92.30236	17.51594
-44.120278	-23.117222					-90.8953	16.14752

<i>Odontomachus meinerti</i>		<i>Odontomachus meinerti</i>		<i>Odontomachus meinerti</i>		<i>Odontomachus meinerti</i>	
Longitude	Latitude	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude
-91.63811	17.12348	-84.04315	10.40352	-84.02144	10.4134	-85.61667	10.85
-91.63682	17.1238	-84.06222	10.31241	-69.9752	-4.1219	-83.03333	9.66667
-91.63752	17.12364	-84.06177	10.31242	-84.06667	10.33333	-84.03333	10.3
-90.90159	16.15961	-84.06195	10.31241	-84.08333	10.33333	-82.83333	9.71667
-90.89704	16.14826	-84.01822	10.41317	-67.81667	10.36667	-79.84705	9.15567
-90.90145	16.16016	-84.05894	10.31153	-59.96615	5.37472	-71.44524	8.71329
-91.63081	17.12578	-84.05549	10.31155	-78.1833	2.9667	-84.8096	10.3082
-91.63	17.12704	-84.05512	10.31155	-84.01667	10.43333	-96.92372	18.88402
-92.30204	17.5161	-84.05931	10.31153	-69.7444	-2.8998	-97.02969	18.75731
-91.63771	17.12359	-84.05922	10.31153	-72.6233	0.18	-94.91815	17.50439
-90.90124	16.16121	-84.05255	10.33319	-77.2167	0.5	-58.2	-25.98333
-90.90146	16.16043	-84.04903	10.33203	-55.43333	-24.13333	-87.452	15.72521
-91.63699	17.12373	-84.01945	10.41302	-83.525	8.70833	-85.02334	13.76846
-85.47	10.93	-84.04835	10.3365	-83.525	8.7083	-88.86604	15.5136
-84.06058	10.3088	-84.04909	10.33167	-85.5	10.96667	-88.69683	15.41764
-84.04851	10.33552	-84.04913	10.3314	-82.96667	8.78333	-84.8627	15.70851
-84.05337	10.33999	-84.05376	10.31065	-84.01249	10.4336	-85.0259	13.76462
-84.0564	10.30792	-84.04075	10.39954	-85.42948	10.99261	-84.01409	10.42446
-84.0583	10.30791	-84.05666	10.3043	-61.2	-14.56667	-87.90025	14.87131
-84.06067	10.3088	-84.05839	10.3061	-47.06667	-22.8	-85.2327	12.96009
-84.05785	10.30792	-84.06004	10.31152	-63.45	-17.66667	-84.98394	13.76896
-84.05867	10.30791	-58.94612	1.3889	-83.56671	8.6791	-85.036	10.714
-84.05666	10.30792	-84.05685	10.3043	-83.71651	10.59427	-88.86611	15.51353
-84.05648	10.30792	-84.05785	10.30611	-84.01252	10.42116	-88.86439	15.51161
-84.05803	10.30792	-84.03658	10.40739	-85.43333	10.98333	-88.86204	15.50906
-84.06122	10.3088	-84.05621	10.30431	-85.47042	10.93008	-88.86268	15.50966
-84.02165	10.42094	-84.05366	10.31065	-89.96667	15.04179	-88.70953	15.41307
-84.01857	10.41738	-84.01943	10.41775	-77.61667	-1.06667	-88.71023	15.41274
-84.05366	10.30975	-84.04733	10.33105	-84.01304	10.42042	-87.90472	14.86972
-84.05557	10.30431	-84.04677	10.33481	-82.96667	8.48333	-85.012	10.698
-84.05785	10.3043	-84.05465	10.33158	-83.55	8.700	-83.02214	9.66735
-84.0553	10.30431	-84.01972	10.41265	-91.73333	14.6	-83.02284	9.66671
-84.05385	10.30975	-69.92326	4.14167	-84.7165	10.30877	-83.2396	9.87192
-84.05376	10.30975	-84.03931	10.40094	-83.51667	10.58333	-88.86154	15.51112
-84.05184	10.3318	-84.03956	10.40703	-83.98333	10.43333	-84.88078	15.72245
-84.04626	10.33812	-84.02052	10.42094	-83.65	9.900	-85.23249	12.96079
-90.90147	16.13853	-84.01715	10.41309	-77.7	7.71667	-84.0302	10.42797
-91.73748	17.19052	-84.0368	10.40592	-70.8	8.06667	-87.47707	15.69479
-84.03866	10.40664	-84.05439	10.31246	-84.08333	10.28333	-84.9841	13.76887
-91.58592	16.97417	-84.05821	10.3052	-84.08333	10.26667	-83.71253	12.6726
-89.67638	15.05872	-84.0583	10.30972	-84.05	10.4	-89.53447	16.44071
-91.63081	17.1255	-84.05803	10.30972	-84.05	10.43333	-84.88173	15.72153
-92.29515	17.51328	-84.05448	10.31246	-61.5	6.15	-87.45188	15.72422

<i>Odontomachus meinerti</i>		<i>Odontomachus meinerti</i>		<i>Odontomachus meinerti</i>		<i>Odontomachus meinerti</i>	
Longitude	Latitude	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude
-78.45035	8.78803	-86.01415	14.79972	-78.45246	8.7917	-85.0635	12.27641
-87.90567	14.87045	-84.86191	15.70613	-85.00446	13.7702	-88.86528	15.51403
-87.4497	15.72792	-85.01134	13.77123	-85.22736	12.95903	-85.225	12.9589
-84.98064	13.77053	-95.08226	18.57707	-89.53447	16.44116	-84.86284	15.70849
-83.71149	12.68852	-89.61253	17.21405	-71.40153	-12.888	-83.32765	8.4082
-83.23955	9.87195	-89.53447	16.44161	-89.53478	16.44185	-83.02791	9.65936
-83.02598	9.65727	-89.53534	16.44227	-89.53447	16.4404	-83.23955	9.87127
-89.54987	16.44562	-85.02439	13.76788	-84.98446	13.76867	-78.46095	8.79487
-89.54928	16.4461	-88.86616	15.51341	-85.02445	13.7677	-83.02346	9.66535
-89.53447	16.44165	-84.00344	10.42545	-83.02236	9.66656	-83.02206	9.65238
-89.53491	16.44189	-89.27444	14.50796	-87.90332	14.87238	-34.933	-8.00
-88.86512	15.51412	-83.32778	8.40779	-87.90025	14.87153	-37.317	-10.75
-88.69514	15.41152	-87.8982	14.86613	-89.64591	17.16841	-38.033	-12.55
-91.63808	17.12403	-85.23258	12.96055	-89.68206	17.13202	-40.117	-18.983
-77.3864	0.6044	-83.02346	9.66476	-84.88325	15.722	-47.45	-24.016
-87.90029	14.87134	-87.47202	15.69914	-85.02475	13.7668	-48.833	-25.467
-84.01791	10.4293	-88.86158	15.51115	-86.86352	15.69449	-49.267	-26.35
-88.86185	15.51133	-89.62344	17.23207	-84.99771	13.77199	-48.683	-27.733
-85.22486	12.9601	-85.13578	9.58363	-83.32791	8.40781	-85.00496	13.77041
-84.98466	13.76856	-87.47636	15.69652	-89.62009	17.24037	-87.90514	14.87159
-92.30186	17.51583	-87.47291	15.70493	-84.01805	10.4283	-83.53	8.71
-88.86647	15.51351	-88.86549	15.51392	-88.86101	15.51075	-88.8644	15.51465
-83.32753	8.40815	-88.86326	15.5103	-88.86483	15.51428	-88.8648	15.51077
-86.86091	15.69175	-89.53447	16.44147	-71.41095	-12.8753	-91.18815	14.54074
-85.22486	12.96006	-87.45065	15.72687	-88.86446	15.51448	-85.00076	13.77125
-87.89794	14.86933	-91.19663	14.5276	-89.55037	16.44532	-85.35346	12.28882
-88.70953	15.41392	-85.23246	12.96079	-85.23252	12.96407	-86.17773	13.96828
-89.54984	16.44565	-84.86188	15.70861	-95.08214	18.57706	-83.71331	12.68772
-92.30144	17.51624	-89.62825	17.23004	-77.56918	-0.73015	-85.23282	12.96092
-84.89278	10.32247	-89.635	17.19752	-88.86443	15.5145	-83.02698	9.66019
-85.01212	13.77167	-89.55006	16.44543	-84.86304	15.71011	-88.86079	15.5106
-85.23302	12.96081	-85.02434	13.76805	-83.02305	9.66444	-89.53495	16.44202
-86.86399	15.69449	-78.45897	8.79387	-85.00156	13.77077	-83.02489	9.65423
-88.86173	15.51021	-87.47797	15.69374	-91.63127	17.12577	-44.30611	-23.59583
-85.23298	12.96083	-87.47451	15.69714	-89.53447	16.44089	-54.17	-27.19333
-89.54755	16.44472	-87.47256	15.69843	-89.48697	16.40112	-52.42444	-28.27333
-86.86338	15.69445	-89.62099	17.24034	-87.45567	15.7657	-47.49416	-24.63694
-85.0129	13.77174	-84.01701	10.42979	-85.02604	13.77093	-91.63086	17.12562
-85.0124	13.77169	-87.89735	14.86613	-83.23877	9.87133	-90.89571	16.14686
-85.02193	13.76874	-87.90297	14.87314	-83.23877	9.87142	-91.63635	17.1238
-84.77545	11.99288	-87.47304	15.70207	-83.23955	9.87109	-91.63039	17.12653
-89.55053	16.44487	-84.99233	13.77338	-87.45198	15.72503	-91.63757	17.12363
-46.164444	-24.509167	-46.20194	-24.68638	-50.38611	-22.42083	-47.75194	-24.84527

<i>Odontomachus meinerti</i>	
Longitude	Latitude
-84.01995	10.41546
-84.05	10.35
-90.90155	16.15929
-91.63838	17.12341
-92.29549	17.51514
-91.63649	17.1238
-47.516389	-24.400556
-48.151667	-24.398889
-84.03444	10.40316
-91.27132	16.14028
-84.03774	10.40753
-84.01995	10.41546
-84.05	10.35
-84.01604	10.41464
-84.83334	10.26667
-95.08333	18.58333
-84.6	9.78333
-84.98065	13.77009
-84.98446	13.76866
-85.02436	13.76837

