



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

LETÍCIA RAMOS DE MENEZES

**DIVERSIDADE MICROBIANA E ESTOCAGEM DO ALIMENTO EM *Cornitermes*
cumulans (ISOPTERA: TERMITIDAE)**

Rio Claro

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



LETÍCIA RAMOS DE MENEZES

**DIVERSIDADE MICROBIANA E ESTOCAGEM DO ALIMENTO EM *Cornitermes
cumulans* (ISOPTERA: TERMITIDAE)**

Defesa de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Rio Claro como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof.^a Dra. Ana Maria Costa Leonardo

Co-orientador: Prof^o Dr. Alberto Arab

Rio Claro

2017

595.736 Menezes, Letícia Ramos de
M543d Diversidade microbiana e estocagem do alimento em
Cornitermes cumulans (Isoptera: Termitidae) / Letícia Ramos
de Menezes. - Rio Claro, 2017
86 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ana Maria Costa Leonardo
Coorientador: Alberto José Arab Olavarrieta

1. Térmita. 2. Armazenamento de alimento. 3. Cupins
superiores. 4. 16S rRNA. 5. Cupins forrageiros. 6.
Comportamento. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIVERSIDADE MICROBIANA E ESTOCAGEM DO ALIMENTO EM
Cornitermes cumulans (ISOPTERA: TERMITIDAE)

AUTORA: LETÍCIA RAMOS DE MENEZES

ORIENTADORA: ANA MARIA COSTA LEONARDO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANA MARIA COSTA LEONARDO
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. FRANCIS DE MORAIS FRANCO NUNES
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dr. TIAGO FERNANDES CARRIJO
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC

Rio Claro, 02 de março de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais e meu irmão, por permanecerem ao meu lado em todos os momentos e demonstrarem seu amor incondicional, pelos seus conselhos que me guiaram e que continuarão a guiar por toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer à minha família (Maria Luisa, Evaldo, Vinícius) pelo apoio moral, financeiro, físico (porque pai e mãe também vai para o campo coletar cupim) todos esses anos, por terem me educado da melhor forma possível. Sou grata também a todos meus familiares, avós, tios, tias (agradecimento especial a Fátima e Helena), primos e primas, por sempre compreenderem, se interessarem e incentivarem a carreira que escolhi.

Sou muito grata aos meus amigos queridos que deixei em Alfenas quando escolhi fazer o Mestrado em outra cidade e compreenderam a minha mudança (Érika, Leandro, Johnathan, Dani, Gustavo, Glaudison, Bruno, Edimar, etc). Vocês marcaram minha vida e desejo manter estes laços cada vez mais fortes!

Agradeço aos meus professores de toda vida: Desde o ensino básico, passando pela graduação e agora pela pós-graduação. Vocês foram a minha inspiração para seguir a carreira acadêmica. Sem os mestres nada é possível.

Quero agradecer a meus colegas de música, aos amigos do coral da UNESP, da orquestra sinfônica de Rio Claro e até do Madrigal de Alfenas, que mesmo de longe ainda faço pequenas participações com muito orgulho! A música sem dúvida tornou possível seguir esta carreira (um pouco) menos insana.

Agradeço especialmente aos amigos do Laboratório de Cupins da UNESP - RC, Vanelize, Luiza, Iago, Célia, Ives, Lara, Murilo e Otávio. Alguns já seguiram outros caminhos, mas permanece minha gratidão pelos momentos de descontração e pela ajuda nos experimentos coletas, dúvidas e por me receberem de braços abertos quando eu “caí” de paraquedas no laboratório de vocês.

Agradeço especialmente aos amigos que fiz aqui em Rio Claro, uma cidade que me recebeu tão bem e me adaptei rapidamente. Obrigada Wander (e família), pelo carinho, pelo companheirismo durante praticamente todo meu mestrado, inclusive sem você minhas coletas e campos teriam sido totalmente impossíveis, não tenho como agradecer por tudo que fez e ainda faz por mim. Obrigada amigos que me apoiaram sempre quando precisei, pelos momentos de descontração, pelos auxílios, pelas conversas, pelos almoços, jantás, festas, etc. (Tiago, Raquel, Yudy, Ariane “Briza”, Carlos “Mexicans”, Mari, João, César, etc).

Agradeço especialmente aos meus Mestres, minha orientadora Professora Dra. Ana Maria Costa-Leonardo e meu Co-orientador Prof. Dr. Alberto Arab, por terem acreditado e investido

em mim desde o início. Obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, puxões de orelha e principalmente pela paciência.

Agradeço pela imensa colaboração do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) em Campinas – SP e pelos colegas de trabalho que me auxiliaram desde a etapa dos experimentos de atividade enzimática até toda análise de diversidade microbiana.

Fui carinhosamente supervisionada pelo Dr. João Paulo Franco Cairo, técnicas Mariana Chinaglia e Gabriela Ematsu, Pesquisadora Dra. Thabata Maria Alvarez e Pesquisador Dr. Fábio Márcio Squina. Muito obrigada pela paciência e aprendizado, foi sensacional poder trabalhar em um laboratório tão conceituado com pesquisadores de primeira.

Agradeço a todos que de alguma forma me auxiliaram para eu conseguir concluir esse trabalho, seja fisicamente ou moralmente. Agradeço ao Prof. Msc. Edimar Moreira, pelos auxílios nas análises de forrageamento, pela parceria nas infinitas semanas de trabalho no CTBE e paciência para me aturar (haja paciência), estou muito feliz de ter ganhado um novo amigo! Obrigada aos amigos que se dispuseram a colaborar de alguma forma, seja contando os cupins no vídeo, auxiliando em coletas, triagens no laboratório, dúvidas, traduzindo textos e até me ouvindo se lamentar (rsrsrs).

Agradeço a CAPES pela bolsa fornecida durante todo o período do mestrado, ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro em projetos individuais.

E finalmente, obrigada Deus por ter me presenteado com a graça da vida e me inspirar todos os dias a continuar nessa caminhada que está apenas começando.

“O amor para com todos os animais é das mais nobres virtudes na natureza humana.”

CHARLES DARWIN

SUMÁRIO

RESUMO	15
REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1. <i>Forrageamento em cupins ceifadores</i>	24
REF _	
Toc47	
54527	
60 \h	
24	
1.2 <i>Biologia e preferência alimentar de <i>Cornitermes cumulans</i></i>	25
Toc475452761 \h 25	
1.3 <i>Armazenamento do alimento</i>	27
REF _	
Toc47	
54527	

62 \h

27

1.3. Desenvolvimento das ferramentas moleculares27

REF _

Toc47

54527

63 \h

27

1.4. Enzimas em cupins e aplicações biotecnológicas.....28

REF _

Toc47

54527

64 \h

28

Artigo I. Caracterização da população forrageira e aspectos do forrageamento em *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae)..... 31

INTRODUÇÃO32

REF _

Toc47

54527

66 \h

32

MATERIAL E MÉTODOS33

REF _

Toc47

54527

67 \h

33

RESULTADOS38

REF _

Toc47

54527

68 \h
38

DISCUSSÃO44

REF _
Toc47
54527
69 \h
44

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS48

REF _
Toc47
54527
70 \h
48

Artigo II. A estocagem de alimento como estratégia na digestão da lignocelulose pelo cupim *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae). Uma abordagem bioquímica e molecular51

INTRODUÇÃO52

REF _

Toc47

54527

72 \h

52

MATERIAIS E MÉTODOS55

REF _

Toc47

54527

73 \h

55

RESULTADOS60

REF _

Toc47

54527

74 \h
60

DISCUSSÃO70

REF_
Toc47
54527
75 \h
70

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS76

REF_
Toc47
54527
76 \h
76

CONCLUSÕES GERAIS82

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS83

RESUMO

O bioma Cerrado possui uma das termitofaunas mais diversas do mundo. *Cornitermes cumulans* é um cupim neotropical conhecido pela construção de ninhos em montículos e por armazenar alimento no núcleo celulósico do ninho. Apesar de ser considerado uma espécie-chave do Cerrado, aspectos básicos da biologia deste cupim não estão esclarecidos, principalmente em relação à fisiologia da sua alimentação e seu comportamento de forrageamento. A simbiose entre cupins superiores e bactérias é considerada essencial para a sobrevivência destes insetos, pois tem papel fundamental na digestão do alimento consumido por estes insetos. No entanto, os ninhos de cupins também possuem uma grande variedade de microrganismos presentes nas paredes destas estruturas, os quais podem estar ou não diretamente associados com a digestão lignocelulósica. Atualmente, análises moleculares têm relevado novas informações sobre os mecanismos de digestão da lignocelulose no intestino de cupins. Contudo, esses estudos não consideram os microrganismos associados ao alimento armazenado no interior dos ninhos e seu papel na biologia de cupins. Em vista do exposto, a presente pesquisa investigou aspectos da coleta do alimento e dinâmica do forrageamento de *C. cumulans* sob condições laboratoriais por meio de bioensaios. Adicionalmente buscou-se comparar morfológica e morfometricamente uma população de operários coletada no interior do ninho com uma população forrageira, levando-se em conta principalmente o desgaste das mandíbulas. Adicionalmente, o presente estudo teve como objetivo compreender a estocagem de alimento por *Cornitermes cumulans*, do ponto de vista bioquímico, por meio de testes de atividade enzimática; e molecular, por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Neste contexto, hipotetizamos que esta espécie armazena o alimento para facilitar a degradação da lignocelulose antes da ingestão do mesmo. A análise da dinâmica do forrageamento mostrou que a casta operária é responsável pela descoberta do alimento e recrutamento dos companheiros do ninho. Nas condições laboratoriais testadas, um operário pioneiro de *C. cumulans* levou $30,72 \pm 16,75$ min para descobrir a fonte alimentar e iniciar o recrutamento. Iniciado o recrutamento, cerca de 10 minutos depois foi considerado recrutamento massivo pelo aumento significativo no recrutamento de companheiros de ninho, e após cerca de 25 minutos, o recrutamento se tornou estável. Este processo de recrutamento em fases também ocorre em espécies do gênero *Nasutitermes* e até mesmo espécies de cupins subterrâneos como *Coptotermes gestroi*. Além disso, o presente estudo comprovou, por meio de bioensaio, a teoria

de que *C. cumulans* armazena alimento no ninho e que amostras de operários forrageiros diferem daquelas coletadas no interior do ninho, principalmente pelo desgaste das mandíbulas. A análise enzimática revelou que o extrato bruto dos operários e soldados de *C. cumulans* é capaz de degradar substratos naturais e sintéticos, como β -glucano e pNP-G, sugerindo a atividade de enzimas das famílias GH 1; 3 (β -glicosidase) 9; 16 (endo- β -1,4-glucanase). Adicionalmente, o extrato bruto do alimento armazenado por esta espécie comportou-se de forma complementar, degradando substratos derivados de hemiceluloses, como xilano e arabinoxilano, indicando a atividade de enzimas das famílias GH 3; 8; 10; 11; 31; e 35 (β -1,4-xilosidases, endo- β -1,3:1,4-xilanases, β -galactosidases e α -galactosidases). A diversidade microbiana mostrou que o alimento armazenado e o material da parede do ninho apresentam comunidades microbióticas semelhantes, predominando bactérias do filo Actinobacteria e Proteobacteria, conhecidas pela capacidade celulolítica, hemicelulolítica e fixação de nitrogênio. Adicionalmente, a microbiota intestinal foi primariamente dominada por Spirochaetes (*Treponema sp*: Spirochaetes) em *C. cumulans* e Firmicutes (*Candidatus Arthromitus*: Clostridia) em *Procornitermes araujo*. Estes filos apresentam espécies conhecidas pela fixação de nitrogênio atmosférico como meio de enriquecimento de dietas pobres em nitrogênio e fermentação do carboidrato através da acetogênese como forma de obtenção de energia, respectivamente. A partir dos dados apresentados, pode-se concluir que a espécie *Cornitermes cumulans* apresenta uma dinâmica de forrageamento em fases e que armazena alimento no interior de seu ninho. Tal alimento armazenado por *C. cumulans* e sua microbiota hemicelulolítica associada aumentam a capacidade de assimilação de outros componentes da biomassa vegetal por este cupim, garantindo a ele uma vantagem em relação às espécies que não possuem o hábito de armazenar alimento no interior do ninho, como *P. araujo*.

Palavras – chave: cupins superiores, armazenamento de alimento, cupins forrageiros, morfometria, comportamento, hidrolases glicolíticas, 16S rRNA, diversidade microbiana.

ABSTRACT

The Cerrado biome has one of the most diverse termitofaunas in the world. *Cornitermes cumulans* is a neotropical termite known for building nests in mounds and store food in the cellulosic core nest. Although it is considered a key species of the Cerrado, basic aspects of the biology of this termite are not clarified, mainly in relation to the physiology of its feeding and its foraging behavior. The symbiosis between upper termites and bacteria is considered essential for the survival of these insects, since it plays a fundamental role in the digestion of the food consumed by these insects. However, termite nests also have a wide variety of microorganisms present on the walls of these structures, which may or may not be directly associated with lignocellulosic digestion. Currently, molecular analyzes have revealed new information on the mechanisms of digestion of lignocellulose in the intestine of termites. However, these studies do not consider the microorganisms associated with food stored inside the nests and their role in termite biology. In view of the above, the present study investigated aspects of food gathering and foraging dynamics of *C. cumulans* under laboratory conditions using bioassays. In addition, we sought to compare morphometrically and morphometrically a population of workers collected inside the nest with a forage population, taking into account mainly the wear of the jaws. Additionally, presente study aimed to understand the food storage for *Cornitermes cumulans*, the biochemical point of view, by means of enzyme activity tests; And molecular, by sequencing the 16S rRNA gene. In this context, we hypothesized that this species stores the food to facilitate the degradation of lignocellulose before its ingestion. The analysis of the foraging dynamics showed that the caste worker is responsible for the discovery of food and recruitment of the companions of the nest. In laboratory conditions tested, a pioneer worker *C. cumulans* took 30.72 ± 16.75 min to find the food source and start recruiting. Initiated recruitment, about 10 minutes later was considered massive recruitment by the significant increase in recruitment of nest mates, and after about 25 minutes, recruitment became stable. This recruitment process in phases also occurs in the genus *Nasutitermes* and even species of subterranean termites such as *Coptotermes gestroi*. Furthermore, this study demonstrated by means of bioassay, the theory that *C. cumulans* stores food in the nest and feed samples differ from those workers collected within the nest, particularly by wear of the jaws. Enzyme analysis revealed that the crude extract of the workers and *C. cumulans* soldiers is capable of degrading

natural and synthetic substrates such as β -glucan and pNP-G, suggesting the activity of enzymes of GH families 1; 3 (β -glycosidase) 9; 16 (endo- β -1,4-glucanase). Additionally, the crude extract of the food stored by this species behaved in a complementary way, degrading substrates derived from hemicelluloses, such as xylan and arabinoxylan, indicating the activity of enzymes of GH 3 families; 8; 10; 11; 31; And 35 (β -1,4-xylosidases, endo- β -1,3: 1,4-xylanases, β -galactosidases and α -galactosidases). The microbial diversity showed that the stored food and the material of the wall of the nest present similar microbiotic communities, predominating bacteria of the phylum Actinobacteria and Proteobacteria, known for the cellulolytic, hemicellulolytic and nitrogen fixation capacity. In addition, the intestinal microbiota was primarily dominated by Spirochaete (Treponema sp: *Spirochaetes*) *C. cumulans* and Firmicutes (*Candidatus* *Arthromitus*: *Clostridia*) in *Procornitermes araujoi*. These phyla present species known by the fixation of atmospheric nitrogen as a means of enriching diets low in nitrogen and fermentation of the carbohydrate through the acetogenesis as a way of obtaining energy, respectively. From the data presented, it can be concluded that the species *Cornitermes cumulans* presents a foraging dynamics in phases and that stores food inside its nest. Such food stored by *C. cumulans* and their associated microbiota hemicelulolítica increase the assimilative capacity of other components of plant biomass by this termite, ensuring him an advantage over species that do not have the habit of storing food inside the nest, as *P. araujoi*.

Key - words: higher termites, food storage, feed termites, morphometry, behavior, glycolytic hydrolases, 16S rRNA, microbial diversity.

REVISÃO DE LITERATURA

Os cupins são insetos hemimetábolos eussociais pertencentes à infraordem Isoptera, atualmente incluída na ordem Blattaria (KRISHNA et al., 2013). A palavra “Isoptera” origina-se do grego, onde “isos” significa igual e “pteron”, asas, em função da morfologia dos indivíduos alados, que apresentam dois pares idênticos de asas membranosas.

Ao todo, foram descritas 3144 espécies de cupins, considerando 2951 vivas e distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Terra, sendo que na região Neotropical foram descritas cerca de 600 espécies (CONSTANTINO, 2016). Atualmente aceita-se que a infraordem Isoptera está distribuída em nove famílias: Archotermopsidae, Hodotermitidae, Kalotermitidae, Mastotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae, Stolotermitidae, Stylotermitidae e Termitidae, sendo esta última considerada a mais diversa e derivada (KRISHNA et al., 2013). No Brasil, as famílias ocorrentes são Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae.

Os Kalotermitidae são cupins considerados menos derivados, habitam madeira seca e não constroem ninhos. Os representantes da família Rhinotermitidae são em sua maioria subterrâneos e forrageiam abaixo e algumas vezes acima do solo para atingir o alimento que consiste principalmente de madeira morta, intacta ou em deterioração, mas também podem atacar plantas vivas isoladas ou em culturas sendo considerados neste caso pragas econômicas importantes (WALLER; LA FAGE, 1987). A família Serritermitidae, endêmica do Brasil, contém apenas dois gêneros e 3 espécies, uma delas é *Serritermes serrifer*, encontrada no Cerrado e em ninhos habitados por outras espécies de cupins. Finalmente, a família Termitidae compreende cerca de 85% das espécies de cupins conhecidas do Brasil, sendo a mais diversa. Dentre os Termitidae, muitos constroem ninhos grandes e complexos e alguns são comedores de madeira, folhas, húmus, solo, raízes de gramíneas e também cultivadores de fungo (não ocorrentes no Brasil) (CONSTANTINO, 1999).

A sociedade dos cupins é formada por indivíduos pertencentes a duas linhagens distintas: a linhagem reprodutiva, da qual fazem parte as ninfas, os indivíduos alados, o rei e a rainha; e a linhagem áptera, da qual fazem parte os indivíduos estéreis, como operários e os

soldados, além dos demais jovens da colônia das duas linhagens (ROISIN, 2000). A reprodução é primariamente dominada pelos indivíduos da linhagem reprodutiva (MATSUURA et al., 2010). A casta de operários é a mais numerosa e é responsável pela construção e manutenção do ninho, forrageamento e alimentação das outras castas e pelo cuidado parental e com os ovos. Já os soldados constituem um ínstar terminal, derivado de larvas ou operários, marcado por um estágio intermediário, não pigmentado e não esclerotizado conhecido como pré-soldado (GRASSÉ, 1982; CONSTANTINO, 1999; CHOUVENC; BASILLE; SU, 2014). A principal função dos soldados remete à defesa da colônia contra predadores e competidores. Para isto, algumas espécies são providas de poderosas mandíbulas, enquanto outras apresentam cápsula cefálica bastante achatada, conhecida como cúbica e, quando posicionada na abertura do ninho podem obstruir a entrada, protegendo contra os inimigos. Existem ainda espécies com soldados especializados, os quais ejetam, por meio de um tubo, denominado nasus, o conteúdo da glândula frontal, o qual pode ser tóxico para seus inimigos naturais (ROISIN, 2000; NOIROT; DARLINGTON, 2000; COSTA-LEONARDO, 2002; COSTA-LEONARDO; HAIFIG, 2010; ŠOBOTNÍK et al., 2010). Entretanto, em algumas espécies de cupins a casta de soldado está ausente e a defesa da colônia é exercida pelos próprios operários (COSTA-LEONARDO, 2004; ŠOBOTNÍK et al., 2012).

Em algumas espécies, os indivíduos que realizam as funções dos operários são conhecidos como “pseudergates”, pseudo-operários ou ainda falsos operários, pois desempenham o papel de auxiliares (“helpers”) nas colônias. O que diferencia esses indivíduos dos operários verdadeiros é a capacidade dos mesmos em originarem qualquer outra casta, ou seja, alados, reprodutores neotênicos ou soldados, mediante necessidade da colônia (GRASSÉ; NOIROT, 1947; THORNE, 1996; ROISIN, 2000; ROISIN; KORB, 2011).

Os cupins são predominantemente detritívoros e se alimentam de material lignocelulósico. Muitos são capazes de se alimentar de madeira seca (morta), alguns de plantas vivas, gramíneas, plantas herbáceas, excremento de herbívoros, fungos, húmus e solo propriamente dito (COSTA-LEONARDO et al., 2007; LIMA; COSTA-LEONARDO, 2007). De acordo com Constantino (2015), os cupins de Cerrado se enquadram em quatro grupos alimentares: xilófagos, humívoros, ceifadores (comedores de serapilheira) e intermediários (espécies que não se enquadram nos outros grupos).

A dispersão das colônias de cupins ocorre por meio do fenômeno conhecido como revoada, onde reprodutores alados liberados do ninho de origem são atraídos para focos de luz. Em seguida, esses insetos pousam, perdem suas asas e iniciam o comportamento de “tandem”

ou dança nupcial, o qual se caracteriza pelo pareamento do macho com a fêmea (COSTA-LEONARDO, 2002). Estas colônias podem ser fundadas por um par monogâmico de reprodutores primários (haplometrose) ou por vários pares (pleometrose) (THORNE, 1984; DARLINGTON, 1985). Na maioria dos Isoptera, após o estabelecimento da colônia, o abdome da rainha começa a se desenvolver lentamente. Este processo, chamado de fisogastria é caracterizado pelo aumento extraordinário dos ovários e da quantidade de hemolinfa, simultaneamente com a modificação de vários órgãos e tecidos como o intestino, o tegumento, o aparelho respiratório e o tecido adiposo. As modificações na cutícula ocorrem em duas fases: na primeira, a cutícula imaginal, presente no alado, se desenruga e na segunda, mais lenta, é produzida uma nova cutícula (COSTA-LEONARDO; IGNATTI, 1992)

Caso os reprodutores primários (rei e rainha) morram, podem surgir reprodutores secundários, também denominados reprodutores de substituição ou neotênicos, os quais podem ser derivados de ninfas (ninfóides) ou de operários (ergatóides) (MYLES, 1999). As rainhas neotênicas atingem a maturidade sexual antes de atingir a idade adulta, sem deixar a colônia parental e também podem desenvolver fisogastria, porém são diferenciadas da rainha primária quanto a sua morfologia e menor taxa de produção de ovos (COSTA-LEONARDO; IGNATTI, 1992; (COSTA-LEONARDO, 2002).

Os cupins predominam em ambientes terrestres Neotropicais, e ocorrem desde florestas úmidas até savanas, sendo encontrados até mesmo em regiões desérticas (LEE; WOOD, 1971) Os Isoptera apresentam ampla distribuição no Cerrado, principalmente os cupins de montículo, os quais alcançam grande densidades (BUSCHINI, 2006). De uma maneira geral, os ninhos dos Isoptera podem ser do tipo “uma peça” em que a colônia vive dentro da fonte alimentar, e “múltiplas peças” em que os insetos constroem ninhos distintos do alimento (ABE, 1987; KORB, 2008)

Apesar dos cupins serem mais conhecidos pelo seu potencial como pragas devido aos danos na agricultura, edifícios e estruturas de madeira (SCHARF; TARTAR, 2008), estes insetos desempenham um papel ecológico fundamental nos ecossistemas terrestres, uma vez que auxiliam na degradação de material celulósico de origem vegetal mantendo o balanço de carbono no meio ambiente (SCHARF; TARTAR, 2008). Adicionalmente, o recurso alimentar e sua subsequente decomposição têm muitas implicações de longo alcance nas relações entre os cupins e o solo, tal qual por suas atividades alimentares quanto pela transformação do alimento por meio do processo digestivo. Portanto, os cupins afetam o ciclo da matéria orgânica e dos nutrientes. Além disso, a concentração de alimento e a perda de produtos a partir da

digestão influenciam a disposição de matéria orgânica e de nutrientes no ecossistema (LEE; WOOD, 1971; WOOD; SANDS, 1978; NOIROT, 1982).

Os cupins são considerados os “engenheiros do ecossistema”, pois além do papel trófico são responsáveis pela modificação física do ambiente através da construção de ninhos e da movimentação e alteração física e química do solo (LAVELLE et al., 1997). A ação destes insetos pode modificar a porosidade e estrutura do solo melhorando a aeração, o que propicia maior infiltração de água e propagação das raízes vegetais. Além disso, as alterações de textura e perfil do solo também modificam o teor de matéria orgânica (LEE; WOOD, 1971; WOOD; SANDS, 1978; COSTA-LEONARDO, 2002).

Estudos moleculares mais recentes evidenciam que os cupins são baratas sociais (Blattaria). A barata *Cryptocercus*, conhecida como barata-da-madeira, é considerada o grupo-irmão dos térmitas. A linhagem dos Isoptera é monofilética e evoluiu a partir de um ancestral comum, sendo que no final do período Jurássico, cerca de 150 milhões de anos atrás, surgiu o grupo mais antigo de insetos verdadeiramente sociais (ENGEL et al., 2009).

A evolução social, como qualquer outra característica altamente adaptativa, pode levar dezenas de milhões de anos para refinar-se. O modo de vida em grandes colônias com extrema divisão de trabalho garantiu sucesso ecológico (ENGEL et al., 2009). O sucesso evolutivo dos térmitas foi decorrente da combinação de diversos fatores, entre eles, a disponibilidade de várias fontes alimentares celulósicas, a bem desenvolvida organização social, baseada no polimorfismo dos indivíduos, com castas especializadas e a existência de simbiose com microrganismos no sistema digestório, os quais auxiliaram o processo de digestão do material lignocelulósico (NOIROT, 1982; COSTA-LEONARDO, 2002).

Segundo Roisin (1999) e Nalepa (2011), a evolução da eussocialidade nos térmitas foi marcada por três grandes transições a partir do antepassado subsocial: (1) a evolução do comportamento auxiliar aloparental (assistência à prole por indivíduos distintos dos pais), (2) a evolução da casta dos soldados, e (3) a evolução da casta operária. A verdadeira eussocialidade surgiu no estágio dois, quando apareceram os soldados, a primeira casta morfológica estéril ou quase estéril. Com exceção da perda secundária de soldados na sub-família Apicotermitinae, todos os cupins satisfazem a condição de eussocialidade.

De acordo com Nalepa (2011) a transição para a organização sub-social nos ancestral dos cupins modernos foi consequência do comportamento de coprofagia, que é o hábito de se alimentar das fezes de outros indivíduos. Este comportamento pode ser visto como uma

adaptação precoce e básica de insetos decompositores. Em muitos dos modernos invertebrados detritívoros que apresentam coprofagia, como os milípedes, a serapilheira mastigada serve como um bom substrato para o crescimento microbiano. O material fecal consiste em muitos fragmentos de tecido vegetal altamente colonizados por bactérias. O benefício de ingerir novamente as fezes é evidente, uma vez que as células microbianas podem ser lisadas e assimiladas (BIGNELL, 1989).

Os Isoptera são agrupados convencionalmente em cupins inferiores e superiores, porém essa classificação não é taxonômica e sim pela presença de simbioses. Cupins inferiores e superiores apresentam diferenças na morfologia do trato digestivo, na natureza dos simbioses intestinais e na diversidade da dieta (BRUNE et al., 2014). A digestão de celulose nos cupins inferiores é auxiliada pelos protozoários flagelados simbioses, os quais são transferidos para outros indivíduos por meio de trofalaxia proctodeal (OHKUMA; BRUNE, 2011). Já os representantes da família Termitidae (cupins superiores) não apresentam protozoários simbioses e a digestão da celulose é assistida por meio de atividade bacteriana (BRUNE et al., 2014).

Atualmente, a família Termitidae é considerada a mais diversificada e derivada, constituindo cerca de 70% da ordem Isoptera (BRUNE et al., 2014). Os termitídeos tiveram sua origem estimada no final do Eoceno (54 milhões de anos) (BOURGUIGNON et al., 2017). Uma das características quase que exclusiva em todas as espécies da família é a presença de operários verdadeiros definido por Noirot e Pasteels (1987) em que um operário tem como prerrogativa exclusiva a obrigação das tarefas sociais.

Segundo Inward e colaboradores (2007) e Engel e colaboradores (2009) a perda de simbioses flagelados e o aparecimento de bactérias no auxílio da digestão destes insetos possibilitou a diversificação das formas de obtenção de alimento como consumidores de gramíneas mortas, fezes, solo e até fungos. A família Termitidae ainda compartilha uma sinapomorfia de comportamento de forrageamento fora do ninho, o que provavelmente reforça a hipótese anterior (ROCHA et al., 2012). Adicionalmente, o desenvolvimento das gramíneas C4 (plantas que produzem como primeiro produto da fotossíntese, uma molécula com 4 carbonos, ácido oxalacético) durante o Mioceno possivelmente colaborou para a variação de espécies, uma vez que este evento diversificou ambientes típicos de savana nas latitudes mais baixas da América do Sul (JACOBS et al., 2014; ENGEL et al., 2009) aumentando o recurso disponível para este novo tipo de consumidor.

1.1. Forrageamento em cupins ceifadores

Nos cupins, o forrageamento é uma atividade coletiva, composta de ações individuais organizadas, caracterizado pela busca do alimento por estes insetos. Este alimento é processado e transferido pelos operários para o interior do ninho onde é consumido. A organização comportamental geralmente está associada a uma divisão de trabalho entre os indivíduos da colônia (CROSLAND et al., 1997). A área de forrageamento é dinâmica, mudando ao longo do tempo, uma vez que os recursos se esgotam (COSTA-LEONARDO, 2008; ARAÚJO et al., 2011). O processo de forrageamento é bastante estudado nos cupins subterrâneos, mas nos cupins tropicais, que constroem ninhos epígeos (acima do solo), este conhecimento é falho. A maioria das espécies se alimenta de material vegetal morto variando de “litter” (serapilheira) a plantas herbáceas e até mesmo húmus (WOOD; SANDS, 1978).

Cupins do tipo múltiplas peças, ou seja, o ninho é separado da fonte alimentar, geralmente constroem túneis para alcançar os recursos alimentares (ABE, 1987; KORB, 2008). Adicionalmente, a diversificação da dieta durante a evolução dos cupins superiores (Termitidae) foi acompanhada pela aquisição de estratégias mais complexas e eficientes no forrageamento (BORDEREAU; PASTEELS, 2011).

Em ecossistemas semiáridos da África, o alimento mais consumido é a serapilheira, que é o recurso alimentar utilizado pelos fungos cultivados pelos cupins da subfamília Macrotermitinae (BAGINE, 1989). Para forragear, estes cupins constroem largos túneis sob o solo que atingem a superfície por pequenos orifícios. Eles também forrageiam na superfície a noite ou cobrem com solo suas trilhas e itens alimentares, que os protegem dos predadores e da dessecação (BAGINE, 1984).

Espécies de *Odontotermes* são bastante frequentes nos ecossistemas semiáridos da África e de acordo com Bagine (1982) ocupam a maior densidade no norte do Quênia. *Trinervitermes* também ocorre na área e é responsável pelo consumo de litter de gramínea (BAGINE, 1989). De acordo com este mesmo autor, os cupins africanos consomem mais litter de gramíneas em áreas secas do que em áreas úmidas, embora em tais condições, as fontes alimentares são limitadas.

Li et al. (2015) discutem que os cupins da subfamília Macrotermitinae apresentam muitas vezes um polietismo complexo, com operários maiores e menores desempenhando funções diferentes na colônia e que o conhecimento deste polietismo é importante para o entendimento das atividades comportamentais, como é o caso do forrageamento. Contudo,

somente em *Macrotermes subhyalinus* e em *Macrotermes bellicosus* é conhecido que existe um polietismo relacionado a idade e casta conectado ao processamento do alimento (LEUTHOLD et al., 1989; HINZE et al., 2002). Os operários mais velhos de *Macrotermes* consomem micélio de fungo maduro, enquanto operários jovens ingerem o material vegetal coletado pelos operários mais velhos e os nódulos de fungo. Estes indivíduos jovens colocam suas fezes como um substrato sobre o favo de fungo. Nas colônias de *Macrotermes*, a maioria dos forrageiros são operários maiores enquanto os operários menores predominam no interior do ninho, na câmara real. Nas colônias de *Odontotermes formosanus*, existe um único operário, contudo Li et al. (2015) observaram em experimentos laboratoriais, a ocorrência de um polietismo etário nas atividades de forrageamento deste cupim, assim como na construção do favo e produção final de fezes. Os autores também encontraram que os operários mais velhos de *O. formosanus* são predominantes e comentam que isto ocorre provavelmente, devido ao fato destes indivíduos possuírem fortes mandíbulas que facilitam o corte do alimento em pequenos pedaços que podem ser carregados para o ninho. A idade dos operários, jovens os velhos, foi diferenciada pela cor da cutícula, conforme ocorre em *Macrotermes bellicosus* (HINZE et al., 2002).

O gênero *Trinervitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) ocorre nas savanas da África e Indomalaya e é a única espécie da região que é capaz de cortar gramíneas, considerada uma ameaça potencial para pastagens. A gramínea cortada é armazenada no ninho. O forrageamento neste cupim é sazonal, ocorrendo durante a estação seca e cessando durante os meses mais úmidos e mais frios. Sands (1965) considerou o armazenamento de alimento como uma adaptação ao forrageamento sazonal.

1.2 Biologia e preferência alimentar de *Cornitermes cumulans*

Cornitermes cumulans (Termitidae: Syntermitinae) é uma espécie de cerrado da região Neotropical encontrada em áreas de vegetação aberta (CONSTANTINO, 2005). *Cornitermes cumulans* começa seu ninho subterrâneo, o qual posteriormente emerge na superfície do solo, sendo que, mais tarde estes ninhos epígeos se tornam conspícuos e atingem densidades de até 160 ninhos/ha (GRASSÉ, 1958; FORTI; ANDRADE, 1995). Segundo Redford (1984), este cupim tem grande importância ecológica e pode ser considerado uma espécie-chave, uma vez que seus ninhos podem ser habitados por diversos inquilinos, entre eles: formigas, aranhas e outras espécies de cupins ocupando galerias diferentes, geralmente menores do que as da espécie hospedeira.

Os ninhos de *C. cumulans* também são conhecidos popularmente como “murundus” e dominam as pastagens das regiões sudeste e centro-oeste do Brasil (COSTA-LEONARDO, 2005). No entanto, do ponto de vista dos pecuaristas, esta espécie pode considerada ser praga, uma vez que seus ninhos podem dificultar o manejo do solo e a renovação do pasto, além de abrigarem animais peçonhentos vistos como ameaça a humanos e animais. Contudo, alguns pesquisadores consideram *C. cumulans* apenas como praga estética (FERNANDES et al., 1998). Adicionalmente, Milano e Fontes (2002) relatam a ocorrência de *C. cumulans* atacando madeira de piso úmida e degradada por fungos, presentes em edificações. Costa-Leonardo (2005) comenta que cupins de ninhos, localizados nas clareiras de mata, preferem como alimento madeiras que estejam em contato com o solo e que tenham sido previamente decompostas por fungos.

Cornitermes cumulans (Termitidae: Syntermitinae) é um cupim ceifador (CONSTANTINO, 2015) que tem preferência por material vegetal seco, basicamente raízes e folhas mortas de gramíneas (FERNANDES; ALVES, 1992; COSTA-LEONARDO, 2005). De Negret; Redford (1982) afirmam que a alimentação desta espécie é capim e que esta gramínea é cortada em pequenos pedaços, que os cupins levam para o ninho.

Torales (1984) constatou em testes de laboratório que *C. cumulans* reduz o material vegetal em fragmentos menores antes de leva-los para o ninho. Posteriormente, o alimento transportado é armazenado nas paredes das câmaras como forma de estocagem. Aparentemente, ele é mastigado e moldado em uma bola compacta, antes de ser estocado, já que este alimento fica reduzido a fragmentos mesclados com solo e está lacrado por um material fecal escuro (TORALES, 1984; COSTA-LEONARDO, 2005). Fernandes e colaboradores. (1998) e Fernandes e Alves (1992) observaram que *C. cumulans* tem preferência por toletes de cana-de-açúcar, sementes de *Brachiaria sp*, sementes de milho e folhas secas de grama. Fernandes et al. (1998) verificaram em testes laboratoriais que *C. cumulans* carregou bagacilho seco de cana-de-açúcar após 28 horas, mostrando uma grande preferência por este alimento. Assim como *C. cumulans*, outros cupins coletam seus recursos alimentares na serapilheira e são conhecidos como “harvest termites” ou cupins ceifadores.

1.3 Armazenamento do alimento

Algumas espécies de Termitidae, conhecidas como espécies “ceifadoras” ou cupins “ceifadores”, possuem o hábito de cortar gramíneas, folhas, galhos, raízes e sementes depositadas na superfície do solo, as quais são transferidas e estocadas no interior do ninho. Alguns gêneros da família Termitidae, como *Cornitermes*, *Drepanotermes*, *Nasutitermes*, *Syntermes*, *Tumilitermes*, *Trinervitermes* e *Velocitermes* acumulam o material coletado no interior dos seus ninhos, algumas vezes em quantidades extremamente grandes garantindo uma proteção contra insolação, como forma de manutenção da temperatura do ninho (LEE; WOOD, 1971). Em algumas espécies, a estocagem do alimento acontece somente nas estações do ano em que o forrageamento é afetado por condições climáticas adversas, como no caso do cupim magnético *Amitermes meridionalis*, uma vez que o forrageamento se torna difícil durante a época chuvosa (SCHMIDT et al., 2014). Outros estudos sugerem que a estocagem do alimento no ninho favorece a degradação da lignocelulose e o enriquecimento com nitrogênio, pela perda progressiva de carbono durante o processo de oxidação do alimento causado por bactérias e fungos existentes na parede dos ninhos (LEE; WOOD, 1971; HOLT, 1998; BIGNELL, 2006). Segundo Lee e Wood (1971), a estocagem de alimento facilita a proliferação de bactérias e fungos. Adicionalmente, alguns estudos sugerem que as estruturas de estocagem de alimento nos ninhos melhoram a desintoxicação e a palatabilidade da serapilheira para os cupins, além de funcionarem como câmaras de decomposição, fornecendo um alimento altamente nutritivo (BIGNELL, 2006; HOLT, 1998). Contudo, a função real do alimento estocado no ninho ainda não foi totalmente desvendada.

1.4. Desenvolvimento das ferramentas moleculares

Atualmente, análises moleculares têm revelado novas informações sobre os mecanismos de digestão da lignocelulose em cupins. No entanto, esses estudos têm ignorado os microrganismos associados ao alimento estocado no interior dos ninhos e o papel destes agentes na biologia dos cupins.

De maneira geral, a comunidade microbiana associada aos cupins em sua maioria é composta por microrganismos não – cultiváveis. Até 1985 pouco se conhecia sobre a diversidade de comunidades microbianas provenientes de amostras ambientais, como o solo e o próprio cupim, em função da ausência de tecnologias que possibilitassem a análise deste tipo de amostra, composta de microrganismos não-cultiváveis (HANDELSMAN et al., 1998). Ao

final da década de 80, ocorreram mudanças neste paradigma a partir de um avanço experimental obtido por Woese (1987), o qual demonstrou que genes do RNA ribossomal (rRNA) poderiam ser utilizados como instrumento de medida de divergência evolutiva. A análise direta das sequências dos genes rRNA 5S e 16S foi usada para descrição da diversidade de microbiota em uma amostra ambiental, independente de isolamento ou cultivo. A partir destes avanços, Woese (1987) permitiu discernir 12 filos do domínio Bacteria por intermédio de metodologias baseadas em cultivo de procariotos. Atualmente, estes filos descritos pelo autor são denominados Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chlorflexi, Chlorobi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Planctomycetes, Spirochaetes e Thermotagae. Mais recentemente, outros autores descobriram e caracterizaram mais 14 novos filos, tais como Acidobacteria, Aquificae, Fusobacteria, Nitrospira, entre outros (RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003).

Com base no sequenciamento do gene rRNA 16S de amostras ambientais descobriu-se 26 novos filos até então sem representantes cultivados (HUGENHOLTZ et al., 1998; HANDELSMAN, 2004). Este gene ganhou destaque nas pesquisas na área de diversidade de comunidades microbianas, evolução e ecologia de procariotos, principalmente por conter regiões com alto potencial de informação filogenética em sua sequência altamente conservada de pares de base (MADIGAN et al., 2012; PONTES et al., 2007). A região espaçadora entre as unidades do gene ribossomal 16S e 23S, conhecida como ITS, também foi utilizada para estimar a variedade entre táxons devido sua maior diversidade de sequência e conservação, utilizado principalmente como DNA “barcode” para identificação de táxons de fungos (SCHOCH et al., 2012).

1.5. Enzimas em cupins e aplicações biotecnológicas

A existência de microrganismos simbiotes no trato digestivo dos cupins é essencial para a degradação do material vegetal das fontes de alimento (BREZNAK, 2002; BREZNAK; BRUNE, 1994). No entanto, estes insetos produzem enzimas nas glândulas salivares e no intestino médio capazes de degradar celulose, como a endo- β -1,4-glucanase e a β -glicosidase (TOKUDA et al., 2002). Desta forma, os térmitas aumentam a eficiência da degradação e absorção da celulose no sistema digestivo em 90% e 65%, no caso das hemiceluloses (KATSUMATA et al., 2007), podendo assim considerá-los um dos mais importantes biorreatores no planeta. Além das enzimas endógenas, as secreções das glândulas salivares do

tórax podem atuar como fagoestimulante dos operários durante o comportamento de forrageamento.

A lignocelulose é um polímero composto por celulose, hemicelulose e lignina (LANGE, 2007), e a sua degradação envolve um processo enzimático complexo que se inicia na trituração do alimento pelas mandíbulas dos cupins, passando pela ação das enzimas endógenas (produzidas pelo próprio cupim) e pelas enzimas produzidas pelos simbioss (BRUNE, 1998; BREZNAK, 2002). Por outro lado, a lignina pode sofrer modificações estruturais no trato digestivo de algumas espécies de cupins, provavelmente pela ação de peroxidases que devem facilitar a sua degradação (GEIB et al., 2008; COY et al., 2010; SCHARF et al., 2011; HONGO, 2011; ZHANG et al., 2012).

A lignocelulose é a maior fonte de energia sustentável do planeta. Uma vantagem de utilizar esse polímero como fonte de energia está na redução dos impactos ambientais causados pelos combustíveis fósseis e na geração de benefícios socioeconômicos (IPCC, 2012). A produção de combustíveis de segunda geração vem sendo realizada em alguns países através da utilização de diversos resíduos lignocelulósicos, tais como bagaço e palha de cana-de-açúcar, resíduos de espiga e palha de milho e cascalho de madeira. Considerando que esses resíduos contêm uma grande quantidade de celulose que pode ser convertida em etanol, o aproveitamento desse material pode incrementar a produção de biocombustível e a redução de áreas destinadas ao plantio, contribuindo para a redução do efeito estufa (TENGERDY; SZAKACS, 2003). Neste contexto, o Brasil tem realizado grandes progressos substituindo combustíveis fósseis pelo etanol produzido a partir do bagaço e outros resíduos da cana-de-açúcar, gerando até 82 milhões de litros de etanol e até 135,000 MWh de eletricidade ao ano na primeira planta instalada na América do Sul (<http://www.granbio.com.br/en/conteudos/biofuels/>). A conversão da lignocelulose em biocombustíveis de segunda geração é realizada por meio de uma degradação de resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, resíduos de papel, etc. Estas biomassas lignocelulósicas sofrem hidrólise por complexos enzimáticos comerciais de última geração. Isto gera enorme impacto positivo no custo de produção do etanol de segunda geração. Atualmente há um grande interesse no desenvolvimento de processos enzimáticos mais eficientes para a degradação da lignocelulose (HYEON et al., 2014). Neste contexto, a capacidade de digestão da lignocelulose pelos cupins e seus microrganismos simbioss têm grande importância para o desenvolvimento de novas fontes de enzimas envolvidas no processamento da lignocelulose, as quais podem aprimorar a eficiência da conversão da

biomassa vegetal em energia (WARNECKE et al., 2007; SCHARF, 2014). Embora a diversidade e a atividade enzimática da microbiota intestinal têm sido determinadas em alguns cupins (SCHARF, 2014), estes estudos estão restritos a poucas espécies alóctones (espécies não pertencentes a nossa região), que não representam a variação da diversidade de dieta dos cupins superiores (família Termitidae) nos ecossistemas tropicais.

Caracterização da população forrageira e aspectos do forrageamento em *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae)

Letícia Ramos de Menezes¹; Alberto Arab²; Ana Maria Costa-Leonardo¹.

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro - SP. Instituto de Biociências – Departamento de Biologia.

² Universidade Federal do ABC – Campus de São Bernardo do Campo. Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH).

RESUMO

Cornitermes cumulans é um cupim neotropical conhecido pela construção de ninhos em montículos. Apesar de ser considerado uma espécie-chave do Cerrado, aspectos básicos da biologia deste cupim não estão esclarecidos, principalmente em relação a sua alimentação e forrageamento. Em vista do exposto, a presente pesquisa investigou aspectos da coleta do alimento e dinâmica do forrageamento de *C. cumulans* sob condições laboratoriais por meio de bioensaios. Adicionalmente buscou-se comparar morfológica e morfometricamente uma população de operários coletada no interior do ninho com uma população forrageira, levando-se em conta principalmente o desgaste das mandíbulas. A análise da dinâmica do forrageamento mostrou que a casta operária é responsável pela descoberta do alimento e recrutamento dos companheiros do ninho. Nas condições laboratoriais testadas, um operário pioneiro de *C. cumulans* levou $30,72 \pm 16,75$ min para descobrir a fonte alimentar e iniciar o recrutamento. Iniciado o recrutamento, cerca de 10 minutos depois foi considerado recrutamento massivo pelo aumento significativo no recrutamento de companheiros de ninho, e após cerca de 25 minutos, o recrutamento se tornou estável. Este processo de forrageamento em fases também ocorre em espécies do gênero *Nasutitermes* e até mesmo espécies de cupins subterrâneos como *Coptotermes gestroi*. Além disso, o presente estudo comprovou por meio de bioensaios a teoria de que *C. cumulans* armazena alimento no ninho e que amostras de operários forrageiros diferem daquelas coletadas no interior do ninho, principalmente pelo desgaste das mandíbulas.

Palavras-Chave: cupins superiores, armazenamento de alimento, cupins forrageiros, morfometria, comportamento

INTRODUÇÃO

Cornitermes cumulans é um cupim Neotropical que constrói ninhos epígeos, ricos em argila, dos quais partem uma rede de galerias subterrâneas que se estendem ao redor do mesmo (GRASSÉ, 1958). Estes ninhos atingem grandes densidades principalmente em áreas de pastagens da região sudeste do Brasil, mas esta espécie está distribuída com maior concentração na região Sudeste e alcançando estados da região Centro-oeste até estados da região Sul do país, com ocorrência em toda a região de Cerrado (CANCELLO, 1989; SCHMIDT, 2007).

Quanto ao grupo alimentar, *C. cumulans* é considerado ceifador, pois seus operários forrageiros coletam gramíneas e serapilheira e levam para o ninho (TORALES, 1984; CONSTANTINO, 2015). Os operários de *C. cumulans* são monomórficos (ROISIN, 1992), e apesar de servirem como modelo para vários estudos laboratoriais (MARINS; DESOUZA, 2008; MIRAMONTES; DESOUZA, 2008; LORETO et al., 2009) existe muito pouca informação sobre a sua biologia básica, principalmente em relação a alimentação e digestão.

Vários fatores ambientais (bióticos e abióticos), influenciam o forrageamento e a atividade dos cupins, entre eles, temperatura, umidade, características do solo e competição, disponibilidade de alimento, presença de predadores, territorialidade, etc. Contudo, a fisiologia alimentar dos cupins que estocam alimento no ninho foi pouco investigada, principalmente devido ao hábito crítico dos cupins e a dificuldade da manutenção destes térmitas e laboratório.

Visando preencher esta falha, o presente estudo teve como objetivo compreender o início do processo de coleta e armazenamento do alimento por *C. cumulans* em condições laboratoriais. Adicionalmente, foram caracterizados os cupins forrageiros em uma área natural, utilizando-se de técnicas morfométricas.

Como hipótese, assumimos que os forrageiros são mais velhos (ROISIN, 1992) e possuem a mandíbula mais gasta que os cupins coletados diretamente do interior do ninho. Neste contexto, a população foi caracterizada por meio de estudo morfométrico de estruturas específicas do corpo do operário e avaliação de desgaste das mandíbulas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cupins: Para este estudo foi utilizada a espécie *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Termitidae: Syntermitinae) que foi coletada no campus da UNESP – Rio Claro – SP.

Manutenção de colônias de *C. cumulans* em laboratório: Ninhos de *C. cumulans* foram mantidos no laboratório para o desenvolvimento das análises descritas a seguir. Os ninhos foram mantidos em recipientes plásticos em temperatura ambiente com fornecimento de água, solo e também bagaço de cana-de-açúcar como fonte de alimento (metodologia adaptada de Leuthold et al. (2004) e utilizada no laboratório de cupins da UNESP – Rio Claro (COSTA-LEONARDO, não publicado).

I. Caracterização da população forrageira: Para este estudo, foram comparados morfometricamente operários forrageiros e operários do interior do ninho de *C. cumulans*. Os operários forrageiros foram coletados em uma área natural, onde armadilhas confeccionadas com latas ou potes plásticos (volume ~ 2L), previamente perfuradas na parte inferior, foram preenchidas com bagaço de cana-de-açúcar esterilizado em estufa por 48h (Figura 1A) e enterradas no solo (30 cm de profundidade), próximas a um ninho de *C. cumulans* (Figura 1B). Neste experimento, foram avaliadas 3 colônias maduras e, para cada colônia, foram amostrados 30 operários forrageiros e 30 operários coletados no interior do ninho, mais precisamente no núcleo celulósico. Ao redor de cada ninho foram instaladas quatro armadilhas na disposição em cruz e distanciadas cerca de 1m do ninho. As armadilhas foram avaliadas após 15 dias no campo e, estando infestadas por cupins, foram recolhidas. Em caso de ausência de infestação, as armadilhas foram mantidas em campo por um período adicional de 15 dias, e então coletadas. Os cupins foram contados e separados por castas e tipos de operários com diferentes origens de coleta (forrageiro ou do interior da colônia) e, posteriormente, fixados em FAA (álcool absoluto, ácido acético glacial, formaldeído 40%, na proporção 3:1:1).



Figura 1. **A.** Armadilha com bagaço de cana-de-açúcar infestada por *Cornitermes cumulans*. **B.** Disposição da armadilha próximo a um ninho de *Cornitermes cumulans*.

Para a análise morfométrica, foram realizadas medidas em micrômetro (μm) da largura da cápsula cefálica (medida dorsal da distância máxima entre as margens laterais da cápsula cefálica – figura 2A) e o comprimento da tíbia posterior direita (distância máxima entre as margens proximal e distal da tíbia posterior direita – figura 2B) de 60 indivíduos de todas as colônias amostradas (30 forrageiros, 30 do interior do ninho) com auxílio do estereomicroscópio Zeiss Discovery.V8 conectado a uma câmera Axiocam. As imagens captadas foram analisadas pelo programa Zen 2.0. A análise dos dados foi desenvolvida no software R (R Core Team 2015). Os dados obtidos foram dispostos em gráficos de dispersão relacionando a medida da cápsula cefálica e da tíbia posterior. Para analisar a significância dos dados ($P < 0,05$) foi realizada uma análise de variância (ANOVA) composta de 2 fatores, considerando colônia e grupo de operários para avaliar as mudanças dos parâmetros morfológicos, separando diferentes tipos de operários, se houver. Adicionalmente, a fim de representar a frequência dos tipos morfológicos, foram construídos histogramas para cada medida, por colônia avaliada.

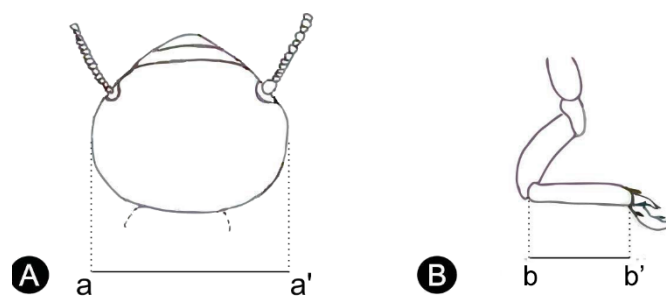


Figura 2: Representação dos caracteres biométricos. **A.** cápsula cefálica (a - a' = largura incluindo os olhos, quando presentes); **B.** Tíbia posterior direita (b - b' = comprimento). Fonte: Pedro (2012)

Para a avaliação do desgaste das mandíbulas, os indivíduos amostrados tiveram suas mandíbulas removidas, as quais foram montadas em lâminas histológicas e observadas sob estereomicroscópio. As bordas de corte das mandíbulas foram medidas do topo do dente apical até a margem anterior da placa molar (medida **a**). Adicionalmente, foram mensuradas a distância linear da margem posterior do côndilo dorsal até o encaixe entre o dente apical e o primeiro dente marginal (medida **b**) e a distância linear da margem posterior do côndilo dorsal até o topo do dente apical (medida **c**) (Figura 3).

Os valores obtidos de todas as colônias foram submetidos à uma Análise de Coordenadas Principais (PCA) para separação dos grupos de operários forrageiros e operários coletados no interior do ninho, juntamente à uma análise de variância ANOVA composta de 2 fatores, considerando colônia e grupo de operários para avaliar significância dos dados ($P < 0,05$). Adicionalmente, a fim de visualizar a separação dos grupos com mais clareza, foi realizada uma PCA individual para cada colônia.

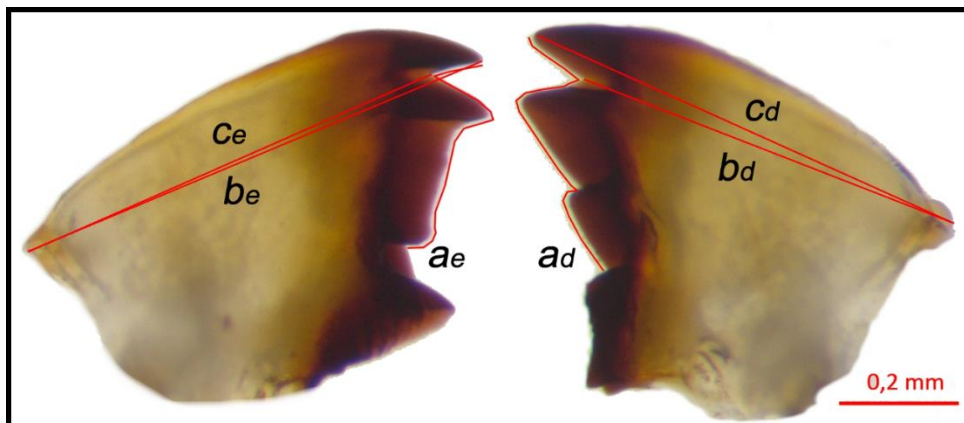


Figura 3: Representação das medidas (a), (b) e (c) nas mandíbulas: esquerda (e) e direita (d) em operários de *Cornitermes cumulans*.

Estudo do forrageamento e armazenamento do alimento no ninho:

II. Bioensaios de descoberta da fonte alimentar

O ninho inteiro de *Cornitermes cumulans* foi coletado e instalado em uma caixa plástica de 50 L sobre uma camada de 10 cm de areia esterilizada umedecida. A caixa plástica contendo o ninho (Figura 4A) foi conectada por meio de um tubo de 15 cm de silicone (10 mm de diâmetro) a uma arena de forrageamento, constituída por uma placa feita de vidro (11 x 11 cm) (Figura 4B), colocada dentro de uma caixa plástica (27 x 18 cm) (Figura 4C).

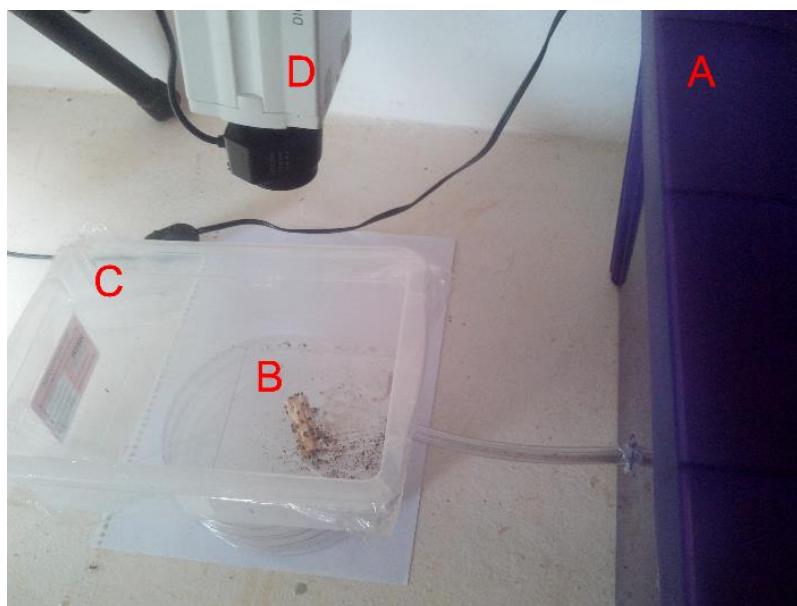


Figura 4. Esquema da arena experimental utilizada nos bioensaios de descoberta do alimento. **A.** Ninho inteiro. **B.** Arena de vidro. **C.** Caixa plástica de apoio. **D.** Câmera Sony de Monitoramento 24h.

Para observar o início do forrageamento em laboratório, foi oferecida uma fonte alimentar celulósica (bagaço de cana-de-açúcar esterilizado 48h em estufa) na arena de forrageamento. O início do forrageamento foi observado, levando-se em consideração a casta que descobre o alimento e o recrutamento dos demais companheiros do ninho. Adicionalmente foi registrado o tempo transcorrido até a ocorrência do recrutamento inicial (visita do operário pioneiro no alimento). As observações foram registradas durante 3 horas com uma câmera Sony de “Monitoramento 24h” (Figura 4D) acoplada a um sistema de DVR para gravação das imagens. Para descrever o início do forrageamento em *C. cumulans*, a partir do recrutamento inicial, os insetos que atravessaram a arena alcançando o alimento foram contabilizados de 3 em 3 minutos totalizando 16 intervalos (48 minutos de análise total para cada réplica). Neste experimento foram realizadas 18 repetições. A análise dos dados foi desenvolvida no software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) a fim de identificar os intervalos de maior atividade, onde se inicia o recrutamento massivo de cupins e quando tal recrutamento se estabiliza.

III. Bioensaios de coleta e armazenamento do alimento

Para este estudo, foram realizadas 10 repetições utilizando subcolônias, no entanto, em 3 repetições os cupins morreram, impossibilitando o registro dos dados. Na montagem das

colônias, 100 operários forrageiros e 5 soldados de *C. cumulans* foram dispostos em recipientes plásticos de 145 mL contendo solo esterilizado e umedecido e um pedaço do ninho de origem dos cupins (referente ao núcleo celulósico) (câmara A – “ninho”), o qual foi conectado a um outro recipiente (câmara B “passagem”), que por sua vez foi conectado ao um terceiro recipiente de mesmo tamanho contendo alimento (câmara C “alimento”). As conexões foram realizadas por meio de tubos plásticos transparentes de 6 cm de comprimento (Figura 5). O alimento fornecido foi pedaços de bagaço de cana-de-açúcar esterilizados em estufa por 48h e corados com solução aquosa de azul de metileno 0,5% (método adaptado de Badertscher et al., (1983)). A câmara B “passagem” foi filmada durante 1 hora para o monitoramento do fluxo dos cupins entre as câmaras. Dentre os operários que retornaram à câmara ninho, foi avaliada a porcentagem de indivíduos que carregam o alimento. No total, foram realizadas 10 repetições. No final de cada experimento foi observado e documentado se o alimento corado foi estocado nas paredes do ninho disposto previamente na câmara A.

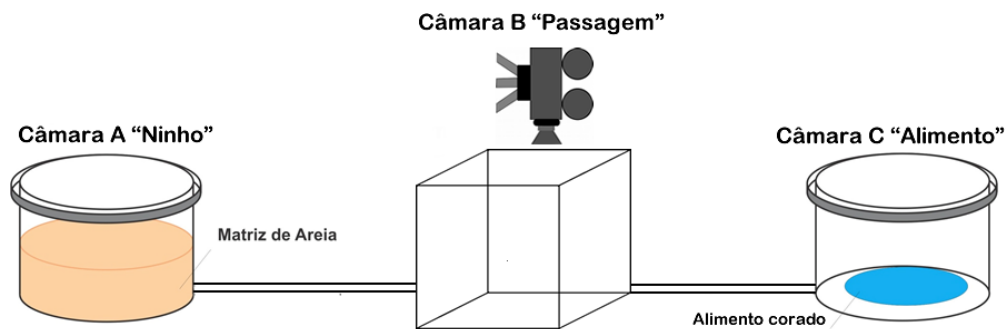


Figura 5: Esquema da arena experimental utilizada nos bioensaios.

RESULTADOS

I. Caracterização da população forrageira

A análise dos dados mostrou que as mandíbulas de operários forrageiros apresentaram maior desgaste quando comparadas àquelas de operários coletados no interior do ninho (ANOVA: $F = 56,67$; $gl = 1, 176$; $p < 0,001$). As componentes principais 1 e 2 são responsáveis por 87,18% da separação entre os grupos na análise de componentes principais, utilizando os dados de todas as colônias (Fig. 6A). Todas as medidas de ambas mandíbulas contribuíram negativamente com a componente principal 1. No entanto, as medidas “a” e “b” da mandíbula direita e a medida “b” da mandíbula esquerda contribuíram positivamente à componente principal 2. Contudo, a medida “c” da mandíbula direita e as medidas “a” e “c” da mandíbula esquerda contribuíram negativamente à componente principal 2.

Em vista do exposto, foi montada uma prancha para demonstrar os diferentes tipos de desgaste da mandíbula adaptada de trabalho prévio de Dukes e Robinson (2014) em formigas *Camponotus*, onde são visíveis exemplos de mandíbulas que não apresentam sinais de desgaste; mandíbulas que apresentam pouco desgaste ao longo dos dentes; mandíbulas com desgaste moderado, podendo apresentar porções sem distinção dos dentes e mandíbulas com desgaste mais elevado, com pouca ou nenhuma evidência de dentes (Figura 7).

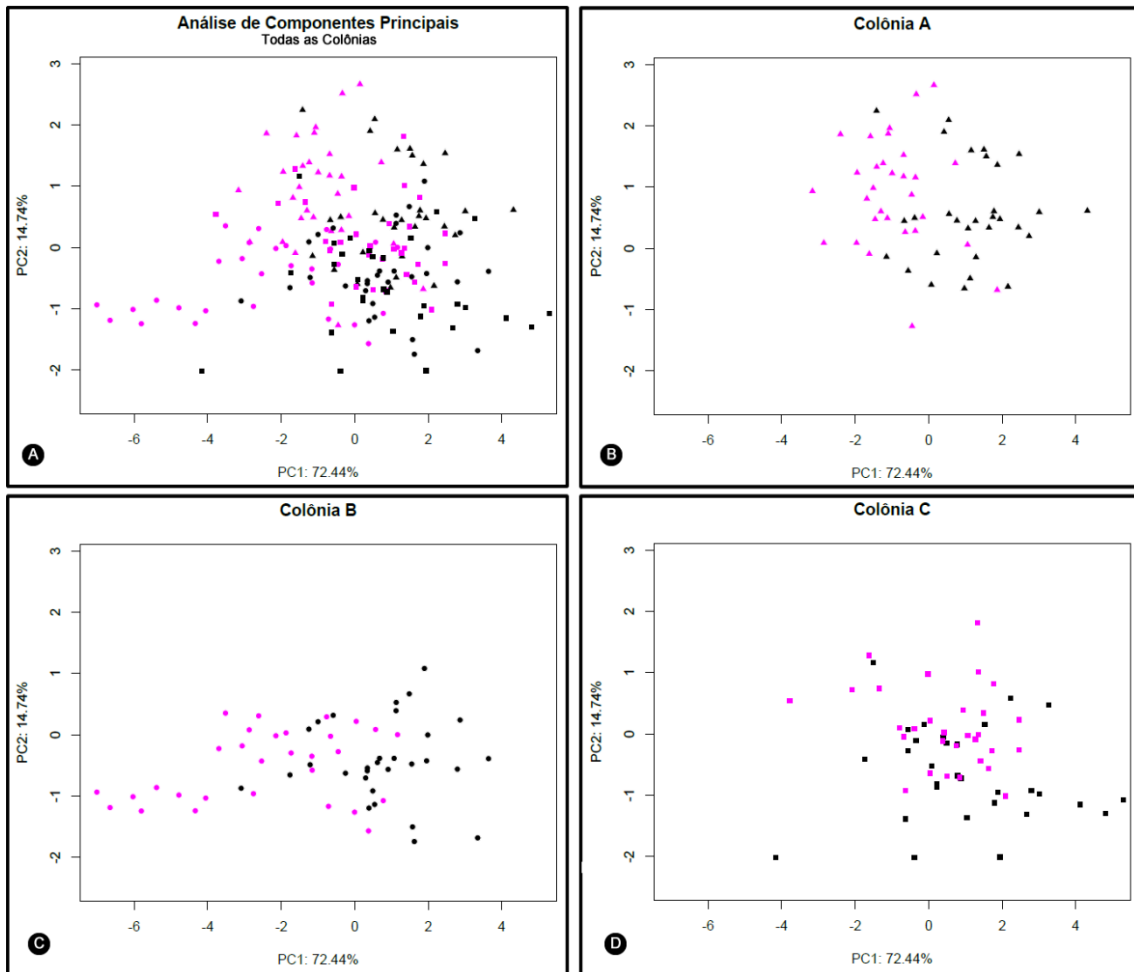


Figura 6. Desgaste mandibular de operários de *Cornitermes cumulans* baseados nas medidas realizadas. **A.** Análise contendo dados de todas as colônias. **B.** Colônia A. **C.** Colônia B. **D.** Colônia C. Triângulos sólidos: colônia A; Círculos sólidos: colônia B; Quadrados sólidos: colônia C. Símbolos cor-de-rosa representam operários coletados do interior do ninho; símbolos pretos representam operários forrageiros coletados em armadilhas.

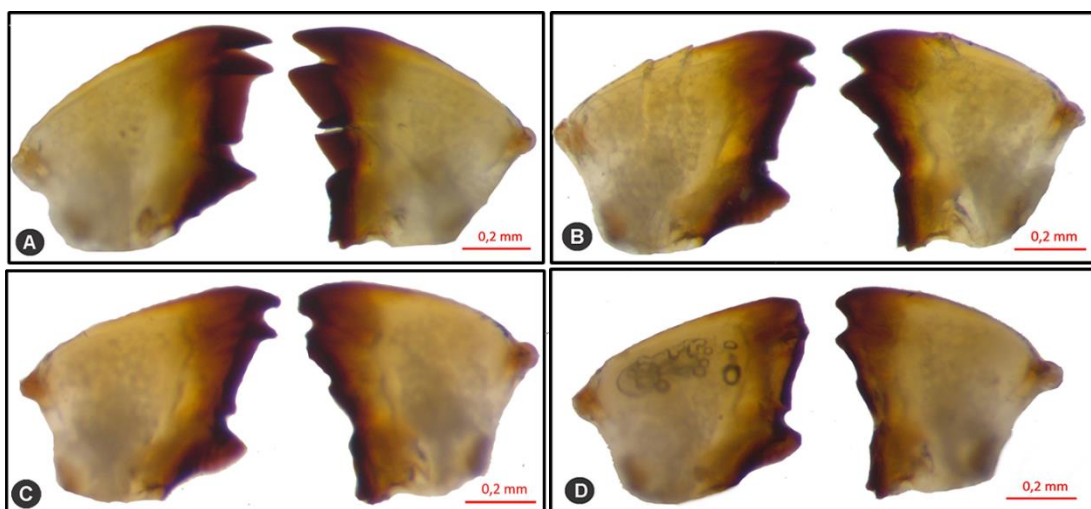


Figura 7: Desgaste mandibular dos operários de *Cornitermes cumulans*. **A.** Mandíbulas não apresentam sinais de desgaste. **B.** Mandíbulas apresentam pouco desgaste ao longo dos dentes. **C.** Mandíbulas com desgaste moderado, podendo apresentar porções sem distinção dos dentes. **D.** Mandíbula com desgaste mais elevado, com pouca ou nenhuma evidência de dentes.

A análise dos dados por meio de uma análise de variância (ANOVA) mostrou que a cápsula cefálica e tibia de operários coletados do interior do ninho são maiores quando comparadas a de operários forrageiros (tabela 1) (ANOVA cápsula cefálica: $F = 4,907$; $gl = 1, 176$; $p < 0,03$; ANOVA tibia: $F = 16,98$; $gl = 1,176$; $p < 0,01$). Além da diferença quanto a tipos de operários, os mesmos dados diferiram a nível de colônia (ANOVA cabeça: $F = 24,419$; $gl = 2, 176$; $p < 0,001$; ANOVA tibia: $F = 57,59$; $gl = 2,176$; $p < 0,001$).

Tabela 1. Média ($\pm DP$) da largura da cápsula cefálica e comprimento da tibia posterior direita em operários de *Cornitermes cumulans* coletados do interior do ninho e forrageiros coletados de armadilhas de três colônias distintas. Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Colônia	Medida	INTERIOR NINHO (mm)		FORRAGEIROS (mm)	
Col A	cab	1,529 a	$\pm 0,04$	1,511 b	$\pm 0,07$
	tib	1,303 c	$\pm 0,03$	1,289 d	$\pm 0,04$
Col B	cab	1,573 a	$\pm 0,07$	1,533 b	$\pm 0,04$
	tib	1,39 c	$\pm 0,06$	1,312 d	$\pm 0,06$
Col C	cab	1,593 a	$\pm 0,03$	1,593 b	$\pm 0,04$
	tib	1,407 c	$\pm 0,03$	1,398 d	$\pm 0,06$

II. Bioensaios de descoberta da fonte alimentar

Neste experimento, foi constatado que em 100% das réplicas, a casta operária foi responsável por descobrir o alimento e recrutar os demais companheiros do ninho. O tempo médio para descoberta do alimento pelo operário pioneiro foi de $30,72 \pm 16,75$ min contados a partir do início do bioensaio (liberação do tubo que conecta o ninho à arena). Em relação à análise da atividade de forrageamento em *Cornitermes cumulans* (Figura 8), os intervalos 1 e 2 apresentaram a menor atividade durante toda a análise ($P < 0,05$) quando comparado ao restante ($H = 75.6347$; $gl = 15$). Os intervalos compreendidos entre o 3 e o 16 não apresentaram diferença significativa, portanto indica uma estabilidade no recrutamento dos companheiros do ninho.

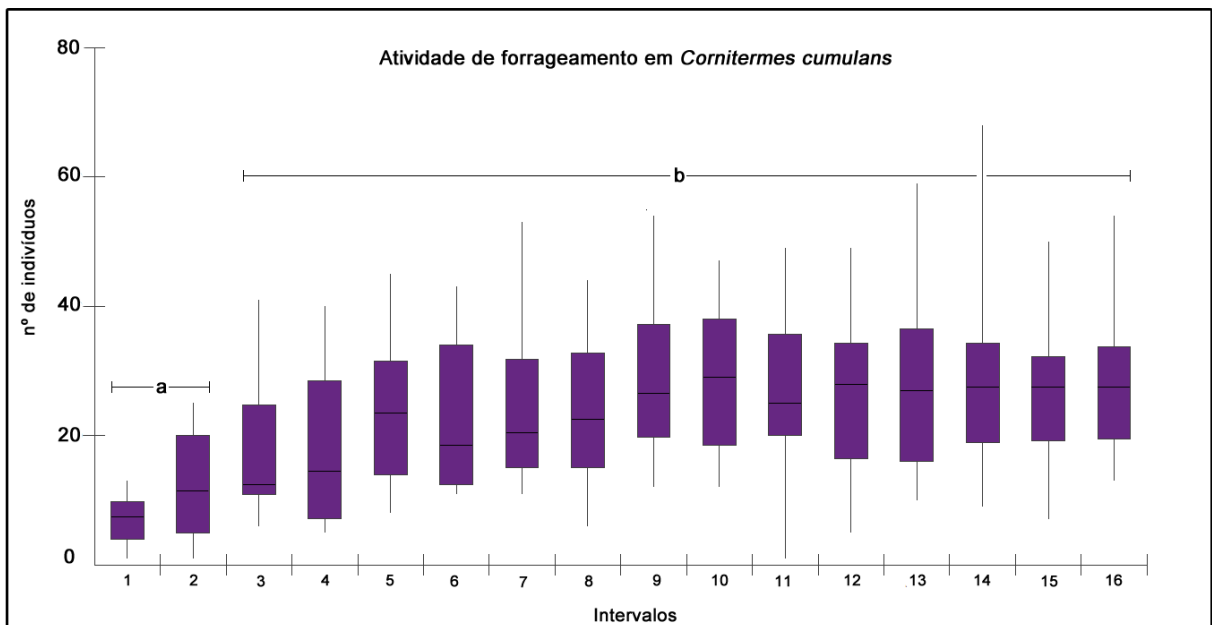


Figura 8. Avaliação da atividade de forrageamento por intervalos em *Cornitermes cumulans*. Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

III. Bioensaios de coleta e armazenamento do alimento:

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que nos experimentos de coleta de alimento, o número (média \pm DP) de indivíduos, que retornaram da câmara de “alimentação” para a câmara “ninho” foi de $62,29 \pm 18,76$, dos quais somente $13,20 \pm 14,19$ % carregavam o alimento nas mandíbulas (Figura 9). Ao final de cada experimento foi documentada a câmara ninho para observação de pedaços de alimento corado em azul de metileno armazenado nas paredes do ninho (Figura 10).

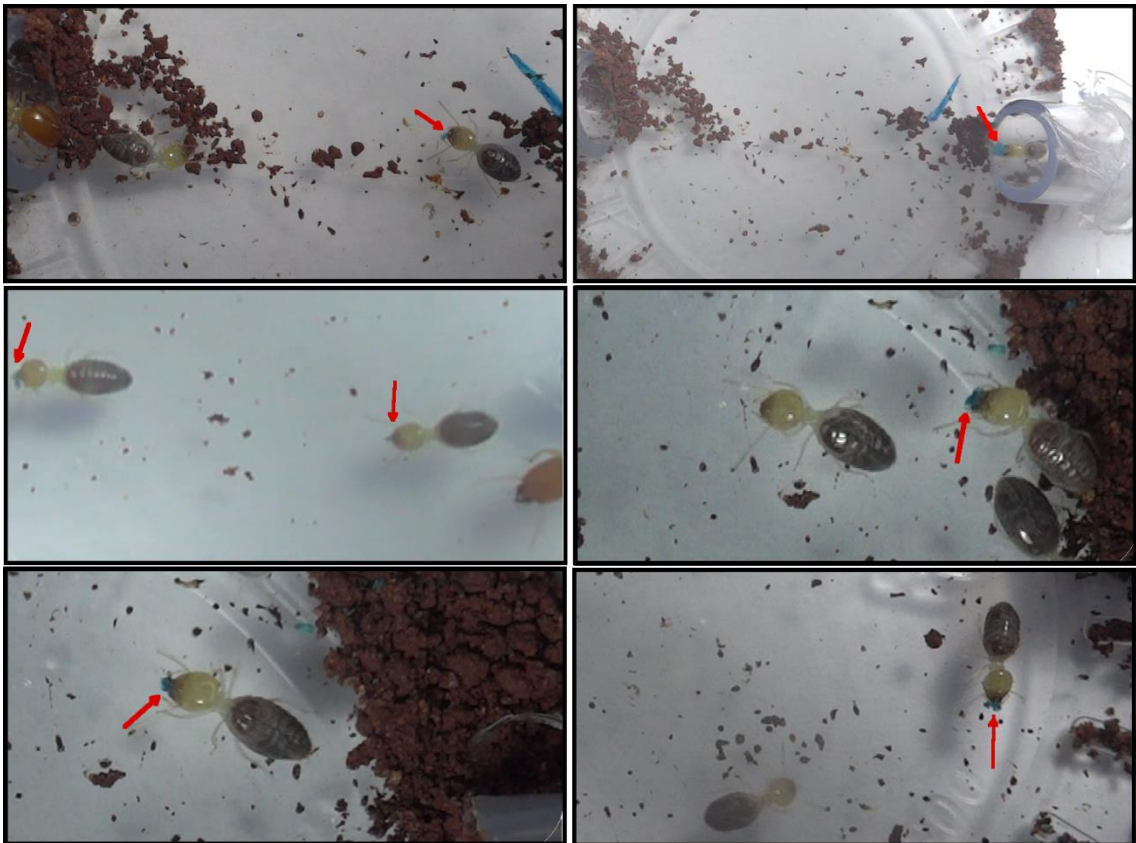


Figura 9: Operários de *Cornitermes cumulans* carregando pedaços do alimento corado nas mandíbulas sentido câmara ninho. Setas vermelhas indicam alimento sendo carregado nas mandíbulas.

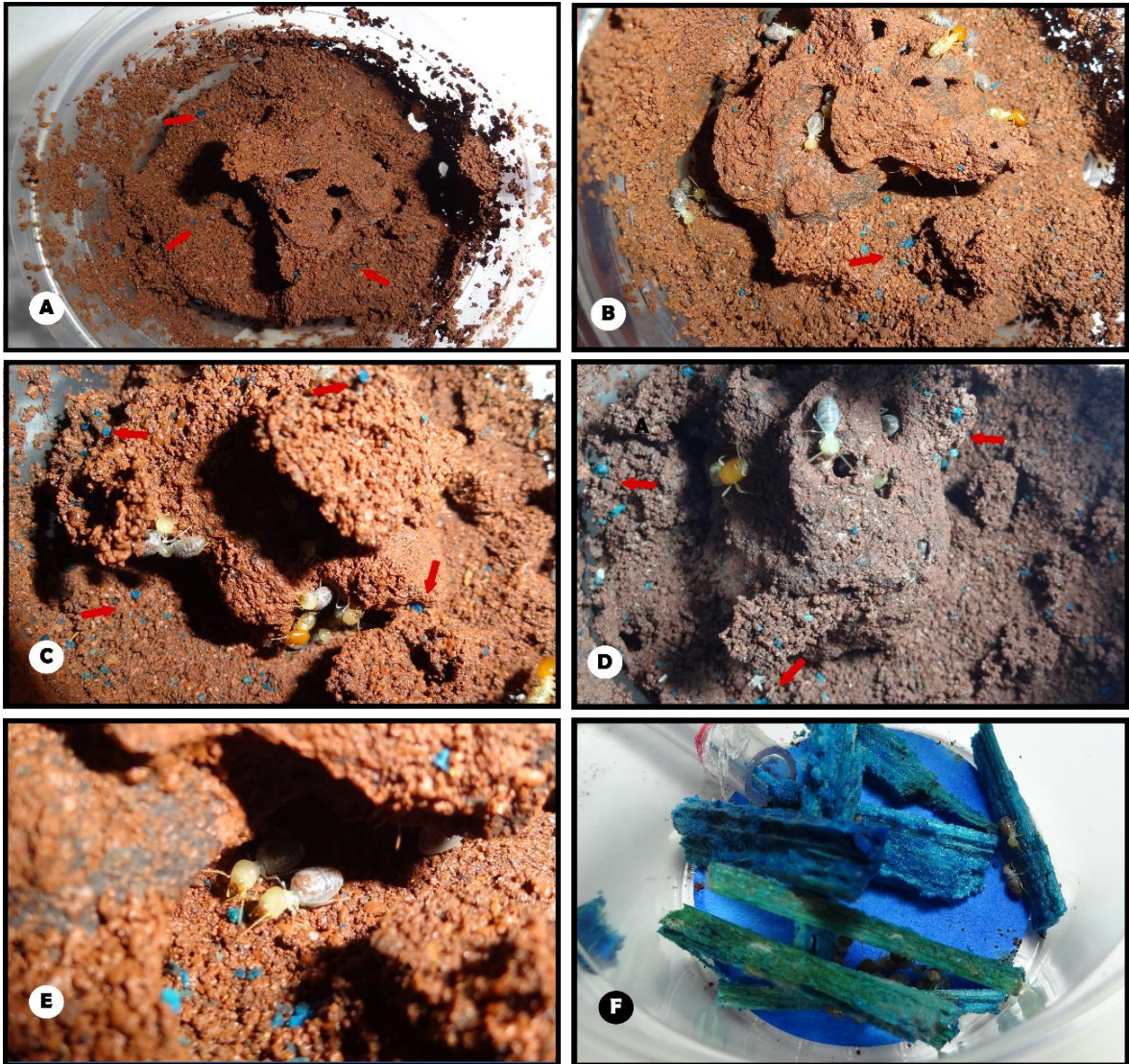


Figura 10: **A-D**. Armazenamento do alimento na câmara ninho. Setas vermelhas indicam pedaços do alimento corado trazido pelos operários e armazenados nas paredes da câmara ninho. **E**. Detalhe de operários manipulando um pedaço de alimento armazenado na parede do ninho. **F**. Câmara de alimentação.

DISCUSSÃO

A estrutura das mandíbulas está geralmente associada ao hábito alimentar dos insetos (CHAPMAN, 1995). Em geral, espécies predatórias possuem mandíbulas longas com dentes incisivos conspícuos e dentes molares para despedaçar as presas. Espécies fitófagas possuem mandíbulas curtas apresentando dentes molares e incisivos reduzidos, utilizados para goivar a superfície das folhas e separar a fibra das plantas (CHAPMAN, 1995). Os cupins possuem hábitos alimentares diversos, podendo consumir serapilheira, madeira seca, plantas vivas, húmus, solo e até fungos (LIMA; COSTA-LEONARDO, 2007). Contudo, ainda não é muito clara a relação entre a morfologia da mandíbula e os hábitos alimentares para alguns pesquisadores. A mandíbula dos soldados dos cupins está adaptada a defesa e, portanto muitas vezes tem amplitude de mordida ampliada (DELIGNE et al., 1981). Alguns autores concordam que a morfologia da mandíbula é extremamente adaptada ao hábito alimentar, baseado no fato de que os cupins que se alimentam de solo apresentam a placa molar côncava com ausência de dentes, enquanto que outras espécies com hábitos alimentares variados possuem região molar côncava a plana com cristas bem desenvolvidas (FONTES, 1987). inferiu que as diferenças morfológicas das mandíbulas entre os diferentes gêneros de cupim resultaram de um processo evolucionário, sem valor adaptativo direto. Estas pesquisas foram baseadas na hipótese de que cupins que se alimentam da mesma fonte alimentar podem apresentar mandíbulas diferentes, enquanto que cupins que se alimentam de fontes diversas podem ter mandíbulas semelhantes. AHMAD, 1950; DONOVAN et al., 2000). Em cupins, o estudo das mandíbulas está geralmente associado a estudos taxonômicos morfológicos, filogenéticos ou estudos sobre polimorfismo e diferenciação de castas (HARE, 1937; AHMAD, 1950; SANDS, 1957; FONTES, 1987; MIURA, 2003; SUCHIYA et al., 2008).

Nos insetos sociais, a divisão de trabalho potencializa a eficiência na realização de diversas atividades e beneficia a integração da colônia (OSTER; WILSON, 1978). A compreensão desta questão do comportamento na sociedade de insetos é fundamental para entender a evolução da sociabilidade (TRANIELLO; ROSENGAUS, 1997). Os resultados do presente estudo evidenciaram a variação na morfologia da mandíbula e morfometria de algumas estruturas do corpo em operários de *Cornitermes cumulans* com funções distintas dentro da colônia. Os operários de cupins pertencem a casta responsável por diversas funções dentro do ninho, tais como, forrageamento, cuidado com a cria, manutenção e construção do ninho e alimentação das castas dependentes como os reprodutores, imaturos e soldados (NOIROT, 1982). Os operários forrageiros, responsáveis pela coleta e processamento do alimento para

colônia apresentaram suas mandíbulas mais desgastadas quando comparados aos coletados do interior do ninho. Estes resultados reforçam uma divisão de trabalho em que operários concentrados dentro da colônia se dedicam a tarefas menos desgastantes em relação à mandíbula, tais como alimentação das castas dependentes, como soldados e larvas, cuidado com a cria e atendimento à rainha. Desta forma, a atividade de forrageamento está totalmente interligada ao desgaste mandibular em *C. cumulans*, considerando ainda, que este é considerado um cupim ceifador, ou seja, que se alimenta cortando folhas e raízes de gramíneas (CONSTANTINO, 2015).

Pricer (1908) relatou que as tarefas iniciais das principais operárias de *Camponotus pennsylvanicus* e *Camponotus chromaoides* foram desenvolvidas principalmente dentro do ninho e envolveu cuidado com a cria e possivelmente, escavação de galerias. No entanto, Fowler e Roberts (1980) observaram operárias menores e maiores forrageando longe de um ninho de *C. pennsylvanicus*. Eles relataram que as operárias menores cuidavam primariamente de pulgões para o melado, enquanto que o restante forrageava no solo e nas árvores em busca de insetos. Esta mudança na tarefa, desde a limpeza doméstica até o forrageamento, pode ter influenciado as alterações observadas nas mandíbulas que as operárias apresentam. Portanto, parece que é essencial o conhecimento da biologia do inseto social para uma conclusão mais consistente.

Os presentes dados indicam uma sutil diferença entre largura da cápsula cefálica e tibia em forrageiros e operários coletados do interior do ninho. Contudo, isto pode ser resultante da amostragem de operários coletada no interior dos ninhos ou até mesmo pelo fato destas medidas não serem adequadas para caracterizar polimorfismo. As incongruências na morfometria dos operários de *C. cumulans* sugerem que a espécie merece um estudo do desenvolvimento pós-embrionário mais detalhado e relacionado com a divisão de trabalho, similar àquele desenvolvido por Miura (2006) para *Hospitalitermes medioflavus*, em que operários pequenos (machos) são mastigadores, operários médios (fêmeas) são mastigadores e carregadores de alimento e operários maiores (fêmeas) são só carregadores de alimento. Como em *C. walkeri* todos os operários são machos, existe a possibilidade de em *C. cumulans* ocorrer da mesma forma. Neste contexto, o que se discute é se são monomórficos (ROISIN, 1992) ou se existem mais morfotipos de operários, visando diferentes atividades (forrageamento e tarefas intracoloniais).

Os cupins apresentam hábito críptico, contudo algumas espécies podem forragear a céu aberto (MATHEWS, 1977). O forrageamento se caracteriza pela busca e manipulação dos

recursos alimentares (BOTEE; BONABEAU, 1998) envolvendo uma sequência previsível de atividades comportamentais para a exploração de novas fontes alimentares (THORNE et al., 2004). Alguns destes insetos nidificam em local específico no solo e podem e construir sistema de túneis e galerias a fim de procurar alimento (THORNE; TRANIELLO, 2003). O forrageamento em *C. cumulans* é caracterizado por apresentar fases distintas, onde inicialmente, os insetos exploram o local em busca de alimento, identificando o caminho por meio de feromônio nas trilhas exploratórias. Posteriormente, o processo é marcado pela descoberta do alimento pelo operário explorador. Este, ao encontrar a fonte alimentar retorna ao ninho marcando o caminho de exploração com feromônio de trilha para recrutar mais companheiros para usufruir do alimento. Muitos cupins fazem também marcação com fezes, caso de *C. cumulans* (TORALES, 1984). Este estudo descreveu pela primeira vez aspectos acerca do forrageamento em uma colônia de *Cornitermes cumulans* em laboratório. Nesta espécie, os operários são responsáveis pela exploração, descoberta do alimento e recrutamento dos demais, o que difere por exemplo em *Heterotermes tenuis* e *Nasutitermes corniger* em que o soldado é responsável pela descoberta da fonte alimentar (CASARIN et al, 2008; SILVA, 2008; SOUZA, 2012). Porém, em geral nestes cupins existe polimorfismo da casta dos soldados.

O baixo recrutamento encontrado logo no início dos experimentos de descoberta do alimento em *C. cumulans* também ocorre em cupins subterrâneos como *Coptotermes gestroi* (COSTA-LEONARDO, 2008). O aumento do recrutamento encontrado a partir do III Intervalo do I Período analisado foi considerado como recrutamento massivo. Este processo de recrutamento massivo, ocorre em também em cupins subterrâneos e até mesmo em *Nasutitermes corniger*, mas o que varia é o tempo, ou seja, de duração da atividade e do período para atingir cada atividade (COSTA-LEONARDO, 2008; SILVA, 2008; SOUZA, 2012). Por exemplo, em *N. corniger*, o recrutamento inicial leva $23 \pm 1,8$ min (SILVA, 2008) e em *C. cumulans* o tempo de ocorrência até o recrutamento inicial foi de $30,72 \pm 16,75$ min.

Cornitermes cumulans é considerada uma espécie com hábito críptico forrageando, geralmente protegida. Até então, muito se especulava acerca da verdadeira dinâmica de forrageamento desta espécie. Torales (1984) relata que este cupim corta o alimento in situ e carrega para dentro da colônia, onde é armazenado em pequenas bolotas nas paredes do núcleo celulósico. Cancelló (comunicação pessoal) observou pedaços de alimento soltos em galerias de ninhos de *C. cumulans* localizados em Botucatu (SP). Contudo, o presente estudo mostrou que, dentro das condições laboratoriais utilizadas, alguns forrageiros carregam pedaços inteiros

de alimento nas mandíbulas até o ninho e “colam” nas paredes do ninho. O armazenamento de alimento é observado em outras espécies tais como, *Amitermes laurensis*, *Constrictotermes cavifrons*, *Drepanotermes rupriceps*, *Globitermes sulphureus*, *Hospitalitermes medioflavus*, *Hospitalitermes rufus*, *Macrotermes sp.*, *Microcerotermes depokensis*, *Nasutitermes magnus*, *Nasutitermes nigriceps*, *Ruptitermes sp.*, *Syntermes sp.*, *Trinervitermes sp.*, *Tumulitermes pastinator* e *Velocitermes sp.* (superiores) (EMERSON, 1938; SANDS, 1965; GILLMAN et al., 1972; DARLINGTON, 1982; NEGRET; REDFORD, 1982; MIURA; MATSUMOTO, 1998; HOLT, 1998; LIMA; COSTA-LEONARDO, 2007; NEOH et al., 2011). Contudo, a literatura específica destas espécies não esclarece o motivo deste armazenamento de alimento no interior das colônias, mas a aparência do alimento varia nas diferentes espécies.

Resumindo, fica claro que o forrageamento de *C. cumulans* precisa ser melhor esclarecido principalmente as etapas finais do forrageamento, inclusive a fase intracolonial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M. The phylogeny of termite genera based on imago-worker mandibles. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 95, n. 2, p. 37–86, 1950.
- AYRES, M. et al. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Ong Mamira ed. Belém. 2007.
- BADERTSCHER, S.; GERBER, C.; LEUTHOLD, R. H. Polyethism in Food Supply and Processing in Termite Colonies of *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 12, n. 2, p. 115–119, 1983.
- BOTEE, H. M.; BONABEAU, E. Evolving ant colony optimization. **Advances in complex systems**, v. 1, n. 02n03, p. 149–159, 1998.
- CANCELLO, E. M. **Revisão de *Cornitermes Wasmann* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae)**. Tese (Doutorado em Zoologia)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP. 1989.
- CASARIN, F. E.; COSTA-LEONARDO, A. M.; ARAB, A. Soldiers Initiate Foraging Activities in the Subterranean Termite, *Heterotermes tenuis*. **Journal of Insect Science**, v. 8, n. 2, p. 1–5, 2008.
- CHAPMAN, R. F. Mechanics of Food Handling by Chewing Insects. In: CHAPMAN, R. F.; DE BOER, G. (Eds.). **Regulatory Mechanisms in Insect Feeding**. Boston, MA: Springer US, 1995. p. 3–31.
- COLES DE NEGRET, H. R.; REDFORD, K. H. The Biology of Nine Termite Species (Isoptera: Termitidae) from the Cerrado of Central Brazil. **Psyche (New York)**, v. 89, n. 1–2, p. 81–106, 1982.
- CONSTANTINO, R. **Cupins de Cerrado**. 1º edição ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2015.
- COSTA-LEONARDO, A. M. Dinâmica do forrageamento em cupins subterrâneos. In: VILELA, E. F. et al. (Eds.). **Insetos Sociais - da Biologia à Aplicação**. Editora UFV, 2008. p. 347–358.
- DARLINGTON, J. P. E. C. The underground passages and storage pits used in foraging by a nest of the termite *Macrotermes michaelseni* in Kajiado, Kenya. **Journal of Zoology**, v. 198, n. 2, p. 237–247, 1982.
- DELIGNE, J.; QUENNEDEY, A.; BLUM, M. S. The enemies and defense mechanisms of termites. **Social insects**, v. 2, p. 1–76, 1981.
- DONOVAN, S. E. et al. Morphological phylogenetics of termites (Isoptera). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 70, n. 3, p. 467–513, 2000.
- DUKES J., I. I. I.; ROBINSON, W. H. Mandibular wear in *Camponotus chromaiodes* workers (Hymenoptera: Formicidae). **Proceedings of the Eighth International Conference of Urban pests**. 2014
- EMERSON, A. E.; MONOGRAPHS, S. E.; APR, N. Termite Nests-a Study of the Phylogeny. **Ecological Monographs**, v. 8, n. 2, p. 247–284, 1938.
- FONTES, L. R. Morphology of the alate and worker mandibles of the soil-feeding nasute termites (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) from the neotropical region. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 3, n. 8, p. 503–531, 1987.

- FOWLER, H. G.; ROBERTS, R. B. Foraging Behavior of the Carpenter Ant , *Camponotus pennsylvanicus*, (Hymenoptera : Formicidae) in New Jersey. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v . 53, n. 2, p. 295–304, 1980.
- GILLMAN, L. R.; JEFFERIES, M. K.; RICHARDS, G. N. Non-soil constituents of termite (*Coptotermes acinaciformis*) mounds. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 5, p. 1005–1013, 1972.
- GRASSÉ, P. P. Sur le nid et la biologie de *Cornitermes cumulans* (Kollar), termite brésilien. **Insect Sociaux**, v. 5, p. 189–200, 1958.
- HARE, L. Termite phylogeny as evidenced by soldier mandible development. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 30, n. 3, p. 459–486, 1937.
- HOLT, J. Microbial activity in the mounds of some Australian termites. **Applied Soil Ecology**, v. 9, n. 1–3, p. 183–187, 1998.
- LEUTHOLD, R. H.; TRIET, H.; SCHILDGER, B. Husbandry and breeding of African Giant Termites (*Macrotermes jeanneli*) at Berne Animal Park. **Der Zoologische Garten**, v. 74, p. 26–37, 2004.
- LIMA, J. T.; COSTA-LEONARDO, A. M. Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 0–0, 2007.
- LORETO, R. G.; DESOUZA, O.; ELLIOT, S. L. Colored glue as a tool to mark termites (*Cornitermes cumulans*; Isoptera. Termitidae) for ecological and behavioral studies. **Sociobiology**, v. 54, n. 2, p. 351–360, 2009.
- MARINS, A.; DESOUZA, O. Nestmate Recognition in *Cornitermes cumulans* termites (insecta: Isoptera). **Sociobiology**, v. 51, n. 1, p. 255–263, 2008.
- MATHEWS, A. G. A. **Studies on Termites from the Mato Grosso State, Brazil**. Rio de Janeiro, RJ. 1977.
- MIRAMONTES, O.; DESOUZA, O. Individual basis for collective behaviour in the termite, *Cornitermes cumulans*. **Journal of Insect Science**, v. 8, n. 24, p. 1–11, 2008.
- MIURA, T. Mandibular morphogenesis during soldier differentiation in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjoestedti* (Isoptera : Termopsidae). **Naturwissenschaften**, v. 90, p. 180–184, 2003.
- MIURA, T. Caste development and division of labor in the processional nasute termite *Hospitalitermes medioflavus* in Borneo. **Tropics**, v. 15, n. 3, p. 275–278, 2006.
- MIURA, T.; MATSUMOTO, T. Foraging organization of the open-air processional lichen-feeding termite *Hospitalitermes* (isoptera, termitidae) in Borneo. **Insectes Sociaux**, v. 45, n. 1, p. 17–32, 1998.
- NEOH, K.-B.; JALALUDIN, N. A.; LEE, C.-Y. Elimination of Field Colonies of a Mound-Building Termite *Globitermes sulphureus* (Isoptera: Termitidae) by Bistrifluron Bait. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 2, p. 607–613, 2011.
- NOIROT, C. La caste des ouvriers, elemento majeur du succès evolutif des Termites. **Revista di Biologia**, v. 75, n. 2, p. 157–195, 1982.
- OSTER, G. F.; WILSON, E. O. **Caste and ecology in the social insects**. Princeton University Press, 1978.
- PEDRO, L. P. A. *Cryptotermes brevis* (Isoptera, Kalotermitidae): **BIOLOGIA E POLIMORFISMO DE IMATUROS**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade

Estadual Paulista, 2012.

PRICER, J. L. The life history of the carpenter ant. **The Biological Bulletin**, v. 14, n. 3, p. 177–218, 1908.

ROISIN, Y. Development of non-reproductive castes in the neotropical termite genera *Cornitermes*, *Embiratermes* and *Rhynchotermes* (Isoptera, Nasutitermitinae). **Insectes Sociaux**, v. 39, n. 3, p. 313–324, 1992.

SANDS, W. A. The soldier mandibles of the Nasutitermitinae (Isoptera, Termitidae). **Insectes Sociaux**, v. 4, n. 1, p. 13–24, 1957.

SANDS, W. A. Termite Distribution in Man-Modified Habitats in West Africa, with Special Reference to Species Segregation in the Genus *Trinervitermes* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **The Journal of Animal Ecology**, v. 34, n. 3, p. 557, 1965.

SCHMIDT, K. **Distribuição potencial de espécies de Isoptera e conservação do Cerrado**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília., 2007.

SILVA, V. S. G. **Comportamento de forrageamento de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae) e sua ocorrência em áreas urbanas**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2008.

SOUZA, J. H. DE. **Comportamento de exploração e tolerância intraespecífica em *Nasutitermes corniger* (Motschulsky, 1855) (Isoptera: Termitidae)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2012.

SUCHIYA, M. T.; ATANABE, D. W.; AEKAWA, K. M. Effect on mandibular length of juvenile hormones and regulation of soldier differentiation in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera : Rhinotermitidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 43, n. 2, p. 307–314, 2008.

THORNE, B. L. et al. Search and destroy: termite foraging behavior and what it means about effective IPM. **Pest Control Technology**, v. 2, p. 44–52, 2004.

THORNE, B. L.; TRANIELLO, J. F. A. Light at the End of the Tunnel. **Pest Control Technology**, p. 90–101, 2003.

TORALES, G. J. Contribution al conocimiento de las termitas de Argentina (Pcia. de corrientes). *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae). **Facena (Corrientes)**, v. 5, p. 97–133, 1984.

TRANIELLO, J. F. A.; ROSENGAUS, R. B. Ecology, evolution and division of labour in social insects. **Animal Behaviour**, v. 53, n. 1, p. 209–213, 1997.

**A estocagem de alimento como estratégia na digestão da lignocelulose pelo cupim
Cornitermes cumulans (Isoptera: Termitidae). Uma abordagem bioquímica e molecular**

Letícia Ramos de Menezes^{1*}; Ana Maria Costa-Leonardo¹; João Paulo Franco Cairo³; Fábio Márcio Squina³; Thabata Maria Alvarez³; Gabriela Felix Persinoti³; Alberto Arab².

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro - SP. Instituto de Biociências – Departamento de Biologia.

² Universidade Federal do ABC – Campus de São Bernardo do Campo. Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH).

³ Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Campinas – SP.

RESUMO

A simbiose entre cupins superiores e bactérias é considerada essencial para a sobrevivência destes insetos. No entanto, ninhos de cupins também possuem uma grande variedade de microrganismos presentes nas paredes destas estruturas, os quais podem estar ou não diretamente associados com a digestão lignocelulósica. Atualmente, análises moleculares têm relevado novas informações sobre os mecanismos de digestão da lignocelulose em cupins. Contudo, esses estudos não consideram os microrganismos associados ao alimento armazenado no interior dos ninhos e seu papel na biologia de cupins. Este estudo teve como objetivo compreender a estocagem de alimento por *Cornitermes cumulans*, um cupim de montículo típico do Cerrado, do ponto de vista bioquímico, por meio de testes de atividade enzimática; e molecular, por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Neste contexto, hipotetizamos que esta espécie armazena o alimento para facilitar a degradação da lignocelulose antes da ingestão do mesmo. A análise enzimática revelou que o extrato bruto dos operários e soldados de *C. cumulans* é capaz de degradar substratos naturais e sintéticos, como β -glucano e pNP-G, sugerindo a atividade de enzimas das famílias GH 1; 3 (β -glicosidase) 9; 16 (endo- β -1,4-glucanase). Adicionalmente, o extrato bruto do alimento armazenado por esta espécie comportou-se de forma complementar, degradando substratos derivados de hemiceluloses, como xilano e arabinoxilano, indicando a atividade de enzimas das famílias GH 3; 8; 10; 11; 31; e 35 (β -1,4-xilosidases, endo- β -1,3:1,4-xilanases, β -galactosidases e α -galactosidases). A diversidade microbiana mostrou que o alimento armazenado e o material da parede do ninho apresentam comunidades microbióticas semelhantes, predominando bactérias do filo Actinobacteria e Proteobacteria, conhecidas pela capacidade celulolítica, hemicelulolítica e fixação de nitrogênio. Adicionalmente, a microbiota intestinal foi primariamente dominada por Spirochaetes (*Treponema sp*: Spirochaetes) em *C. cumulans* e Firmicutes (*Candidatus Arthromitus*: Clostridia) em *Procornitermes araujoii*. Estes filos apresentam espécies conhecidas pela fixação de nitrogênio atmosférico como meio de enriquecimento de dietas pobres em nitrogênio e fermentação do carboidrato através da acetogênese como forma de obtenção de energia, respectivamente. A partir dos dados apresentados, pode-se concluir que o alimento armazenado por *C. cumulans* e sua microbiota hemicelulolítica associada aumentam a capacidade de assimilação de outros componentes da biomassa vegetal por este cupim, garantindo a ele uma vantagem em relação às espécies que não possuem o hábito de armazenar alimento no interior do ninho, como *P. araujoii*.

Palavras-Chave: cupins superiores, armazenamento de alimento, hidrolases glicolíticas, 16S rRNA, diversidade microbiana.

INTRODUÇÃO

Os cupins são importantes nos ecossistemas porque atuam na decomposição da lignocelulose que é ingerida na forma de materiais vegetais, esterco de herbívoros e húmus (BRUNE et al., 2014). Este processo de decomposição contribui para mineralização do carbono (NEUPANE et al., 2015) e ciclagem dos nutrientes (SIEBERS et al., 2015) e contudo, a digestão do material celulósico é um processo complexo, dependente da ação de simbioses e enzimas endógenas, os quais são responsáveis pela degradação eficiente dos produtos derivados de planta (BREZNAK; BRUNE, 1994; ENGEL; MORAN, 2013).

A aquisição de simbioses intestinais celulolíticas e sua transmissão aos parentes foram os principais eventos que marcaram a evolução dos térmitas. Cupins e seu grupo irmão, baratas que se alimentam de madeira, *Cryptocercus* (Cryptocercidae), evoluíram de um ancestral detritívoro similar à barata (INWARD et al. 2007A; ENGEL et al. 2009; DIETRICH et al. 2014; DJERNAES et al. 2015). Ambos os grupos compartilham características comportamentais sociais (NALEPA; BIGNELL; BANDI, 2001) e dependem de simbioses microbianas para a digestão da lignocelulose, os quais são filogeneticamente próximos. (DIETRICH; KÖHLER; BRUNE, 2014; INWARD; VOGLER; EGGLETON, 2007; OHKUMA et al., 2009).

Os simbioses intestinais de Isoptera abrangem vários grupos de protozoários celulolíticos, bactérias e arqueas. Os filos mais abundantes que compõem a microbiota bacteriana de cupins incluem Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fibrobacteres e Spirochaetes (HONGO, 2010; DIETRICH; KÖHLER; BRUNE, 2014; MIKAELIAN et al., 2015).

Cupins inferiores, considerados de linhagens basais, consistem de espécies que alimentam-se basicamente de madeira e dependem de protistas flagelados e procariotos para a digestão da lignocelulose (ENGEL; GRIMALDI; KRISHNA, 2009; HONGO, 2010). Por outro lado, o sucesso evolutivo dos cupins superiores, representantes da família Termitidae, é atribuído à perda de protozoários e à aquisição de uma fauna procariótica especializada, acompanhada por uma diversificação alimentar e um vasto repertório comportamental altamente elaborado (BIGNELL; EGGLETON, 2000; BRUNE, 2014).

As fontes alimentares das linhagens mais derivadas de cupins incluem madeira, gramíneas, serapilheira, húmus, microepífitas e até mesmo o micélio de fungos simbioses (BOURGUIGNON et al., 2011, 2015; DONOVAN et al., 2001; EGGLETON; TAYASU, 2001).

A diversificação da dieta presente nos cupins superiores reflete-se na composição funcional da microbiota intestinal bacteriana (BRUNE, 2014; MIKAELIAN et al., 2015a). Estudos comparativos recentes mostram que espécies do mesmo gênero e pertencentes à grupos alimentares semelhantes apresentam uma convergência na composição simbiótica (ABDUL RAHMAN et al., 2015; DIETRICH; KÖHLER; BRUNE, 2014). Em contraste, existem divergências funcionais das bactérias simbiotes entre os diferentes grupos alimentares de cupins. Por exemplo, a microbiota de cupins xilófagos é constituída principalmente por Fibrobacteres e Spirochaetes, apresentando uma intensa atividade celulolítica (HONGOHO, 2010; KÖHLER et al., 2012; WARNECKE et al., 2007). Por outro lado, as espécies não-xilófagas possuem uma microbiota (MIKAELIAN et al., 2015a) com atividade reduzida de celulases (HE et al., 2013; NI; TOKUDA, 2013), evidenciando assim, que o tipo de dieta é um fator importante para a determinação da comunidade simbiótica nos diferentes grupos alimentares de cupins.

Os cupins superiores apresentam um sistema elaborado de divisão de trabalho com diferenças fundamentais entre idades e castas. Em algumas espécies, os operários deixam a colônia para coletar alimento, enquanto os jovens e as outras castas dependem dos operários para alimentação via trofalaxia. As diferenças na dieta entre as castas também refletem a constituição da comunidade de bactérias simbióticas, sugerindo que polietismo etário pode impulsionar variações na microbiota intestinal dentro da própria colônia (HONGOHO et al., 2006a; LI et al., 2016).

A subfamília neotropical Syntermitinae possui 103 espécies que tem sua alimentação baseada em madeira, serapilheira ou húmus (BOURGUIGNON et al., 2011; CONSTANTINO, 2016). *Cornitermes cumulans* (Kollar 1932) é um cupim de montículo pertencente a esta subfamília muito comum em pastagens e savanas do cerrado, sul do Brasil, Argentina e Paraguai (COLES DE NEGRET; REDFORD, 1984). Em geral, seus ninhos são muito visíveis, subcônicos, podendo variar de região para região, e formam montículos de solo rígido com um núcleo interno feito de material fecal e microagregados de solo (COSARINSKY, 2011). *C. cumulans* é um cupim que se alimenta de serapilheira e seus operários coletam pequenos pedaços de gramíneas para serem estocadas no interior do ninho (REDFORD, 1984).

Até onde sabemos, várias espécies da família Termitidae comedoras de gramíneas ou serapilheira também estocam alimento em galerias subterrâneas ou no interior de câmaras de seus ninhos (CONSTANTINO, 1995; TAYASU et al., 2002). Entretanto, operários de *C. cumulans* depositam o material vegetal no interior das paredes do núcleo do ninho utilizando

material fecal e solo (LIMA & COSTA-LEONARDO 2007), formando estruturas peculiares em formato de bola compacta (Fig. 1). Alguns autores sugerem que o armazenamento de alimento pode oferecer à estes insetos uma provisão nutricional em períodos de baixa disponibilidade de recursos (LEE; WOOD, 1971) ou fornecer um alimento enriquecido em nitrogênio (HOLT, 1998).

Do exposto, hipotetizamos no presente estudo que *C. cumulans* armazena o alimento para facilitar a degradação da lignocelulose antes da ingestão. Já que as fezes utilizadas na construção das galerias do ninho podem oferecer um excelente ambiente para proliferação de microrganismos. Também hipotetizamos que a coleta de alimento por *C. cumulans* pode afetar a composição da microbiota do ninho, a qual por sua vez, deve promover uma pré-degradação da lignocelulose contida no alimento armazenado no interior do ninho. Assim, a presente pesquisa descreveu e comparou a composição funcional e atividade enzimática das comunidades microbianas associadas a um cupim que armazena alimento e outro que não armazena. Isto foi realizado por meio da amostragem dos ninhos e dos intestinos de operários e soldados de *C. cumulans* e da espécie simpátrica *Procornitermes araujoii* (Syntermitinae).



Figura 1. Alimento armazenado no interior do ninho de *Cornitermes cumulans*. Fonte: elaborado pela autora.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos Cupins

Colônias de *Cornitermes cumulans* e *Procornitermes araujo* foram coletadas na região de Campinas, Estado de São Paulo (22° 54' 3'' S; 47° 03' 26'' W) e Alfenas, Estado de Minas Gerais (21° 25' 45'' S; 45° 56' 50'' W), sudeste do Brasil. As regiões eram de Mata Atlântica estacional semidecidual (IBGE, 2004), porém o desenvolvimento agrícola fragmentou a floresta resultando em uma paisagem em sua maioria desmatada. O clima é sazonal e moderadamente úmido; A temperatura média anual e as chuvas são de 23°C e 1513mm, respectivamente, com altitude variando de 720 a 1350m. A região apresenta uma estação seca com duração de 4 meses, de junho a setembro. Realizamos nossas pesquisas em quanto locais com pastagens variando de 20,91 a 87,18 ha.

Ensaio bioquímico

Os ensaios bioquímicos foram realizados utilizando triplicatas biológicas e técnicas dos extratos proteicos brutos de operários e soldados e 500 µl do alimento armazenado por *C. cumulans*, macerado em gral, afim de avaliar a capacidade dos mesmos na hidrólise de polissacarídeos naturais e oligossacarídeos sintéticos. As extrações de proteína total para caracterização bioquímica foram preparadas a partir de 30 corpos inteiros operários e soldados. Estes, foram homogeneizados por meio de Harvest-Potter contendo 1000 µl de tampão SAB (Acetato de Sódio a 50 mM - pH 5.5) contendo 1 µl de inibidores de proteases (Complete Mini EDTA-free; Roche, Mannheim, Germany). Após extração, a mistura foi centrifugada a 14.000 × rpm durante 20 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e considerado a seguir como extrato de enzima bruto. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As reações enzimáticas consistiram em 10 µl de extrato bruto de enzima incubado com 40 µl de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5.5 e 50 µl de substrato específico a 0,5% (em água), em triplicata, a 37°C, durante 40 min. Os ensaios enzimáticos foram interrompidos após adição de 100 µl de ácido dinitrosalicílico-DNS (MILLER, 1959) e aquecidos a 99°C por 5 min. A medição da alteração de cor foi realizada a 540 nm utilizando um leitor de microplacas. Os resultados dos ensaios de atividade enzimática foram expressos em mM de glicose equivalente produzida. Os ensaios enzimáticos com *p*-nitrofenil-glicopiranosídeo (*p*NP-G) foram realizados como se segue: 10 µl de extrato bruto de enzima, incubado em 50 µl de substrato *p*NP-G a 5 mM e 40 µl de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5.5. Os ensaios foram interrompidos após adição de 100 µl de 1 M de Carbonato de Sódio

(Na₂CO₃). A medição de alteração de cor foi realizada a 400 nm utilizando um leitor de microplacas. Os ensaios enzimáticos foram feitos em triplicata e os resultados expressos em termos de mM de p-nitrophenyl-G liberado. Os substratos foram adquiridos da Megazyme e Sigma Aldrich: CMC (carboximetilcelulose); β-glucano de cevada, xilano de madeira de faia, arabinoxilano de centeio, pectina derivada de citrus; 4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (pNP-G).

Extração de DNA

Para os ensaios moleculares, três ninhos de cada espécie foram colocados em recipientes plásticos de 100 litros e transferidos para o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, CTBE /CNPEM, na cidade de Campinas. Uma vez no laboratório, 200 indivíduos de cada colônia (operários ou soldados) foram anestesiados em gelo por 5 minutos e dissecados com pinças finas. Os tubos digestivos inteiros foram colocados em tubos de 2mL contendo 1mL de tampão de lise (500 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM de EDTA e 4% de dodecilsulfato de sódio (SDS)). Todas as amostras foram armazenadas a -20°C até extração e purificação do DNA utilizando um método modificado de batimento de grânulos (YU; MORRISON, 2004). Amostras do material das paredes internas e do alimento armazenado de cada ninho (aproximadamente 500 mg cada) foram extraídas como descrito acima. A amostragem não envolveu espécies ameaçadas de extinção, além disso, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), órgão de fiscalização do Ministério do Meio Ambiente do Brasil, autorizou a amostragem dos cupins (SISBIO nº 33269).

Preparação das bibliotecas e sequenciamento

Para obtenção da comunidade bacteriana e sua abundância, a região V4 do gene 16S bacteriano foi amplificado utilizando os primers a seguir:

Tabela 1. Primers utilizados neste estudo. Os adaptadores Illumina estão sublinhados (CAPORASO et al., 2011).

Primers	Target gene	Reference
515F (5' <u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3')	16S rRNA Bacteria	CAPORASO et al., 2011
806R (5' <u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3')	16S rRNA Bacteria	

As bibliotecas bacterianas foram preparadas por meio de duas etapas de PCR. A primeira etapa de PCR consistiu em 0,4U de Polimerase Phusion (Thermo Scientific), 1X Tampão GC Phusion (Thermo Scientific), 0,2 mM de dNTP, 10 pmol de cada primer e aproximadamente 40 ng de DNA modelo, em um volume final de 20 µL, ajustado com água ultra-pura. Para amplificação do gene, o programa do termociclador foi definido por meio de desnaturação inicial a 98°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 98°C (30 s), 60.1°C (30 s) e 72°C (40 s), terminando com uma extensão final de 72°C (5 min). Posteriormente, foi necessária outra etapa de PCR para adicionar adaptadores duplos Illumina, os quais funcionam como código de barras das amostras no sequenciamento (Nextera Index Kit, Illumina). As reações consistiram em 0,4 U de polimerase Phusion, 0,9X Tampão GC Phusion, 0,2 mM de dNTP, 5 µl de cada índice (adaptador) e em torno de 100 ng da PCR purificada resultante do passo anterior, com adição de água ultra-pura para completar 20 µl de reação. Cada amostra foi amplificada em triplicata e reunida para purificação e quantificação utilizando beads magnéticas Agencourt AMPure (Beckman Coulter) e Fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen), respectivamente. A segunda etapa de PCR foi ajustada para desnaturação inicial a 98°C por 3 min, seguido de 5 ciclos de 98 °C (30 s), 55 °C (30 s) e 72 °C (30 s), com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. As bibliotecas foram quantificadas por PCR em tempo real por meio do Kit de Quantificação de Bibliotecas KAPA Illumina® Platforms (Kappa Biosystems). O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina Miseq (disponível no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE / CNPEM), utilizando o Kit Miseq Reagent V3 (600 ciclos).

Análise das sequências e classificação dos táxons

As bibliotecas de “amplicon” do gene 16S foram analisadas utilizando o pipeline UPARSE (EDGAR, 2013). Resumidamente, as leituras paired-end (fragmentos de sequências de ambas extremidades da molécula de DNA a ser sequenciada) foram primeiramente sobrepostos utilizando a função `fastq_mergepairs` do pacote USEARCH versão 8.1.1803. Apenas os reads com sobreposição mínima de 250 pb e um erro máximo esperado de 0,5 foram utilizados para análises posteriores. Após várias etapas de filtragem, os reads foram agrupadas em OTUs (unidade taxonômica operacional) a 97% de similaridade por meio do algoritmo UPARSE-OTU. As OTUs identificadas foram comparadas a base de dados Gold, utilizada como referência para filtrar as sequências de quimeras (produtos de PCR originados por mais de uma fita de DNA molde, que se formam durante a amplificação, quando a síntese das sequências de um modelo é interrompida e continua em outro) por meio do comando “chimera

UCHIME” (EDGAR et al., 2011), também implementado no pacote USEARCH. A tabela de OTU foi gerada por meio da comparação dos “reads” de cada amostra com as sequências representativas de cada OTU. Além disso, a tabela de OTUs foi filtrada afim de remover potenciais OTUs espúrias, isto é, foram removidas OTUs que não apresentaram um ou mais “reads” em pelo menos 10% das amostras. A atribuição taxonômica foi realizada utilizando-se o classificador RDP (Ribosomal Database Project), implementado no software MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009) utilizando a base de dados DictDB (base de dados de referência para microbiota intestinal de insetos da ordem Dictyoptera) (MIKAELIAN et al., 2015b) como referência, com um limiar de confiança de 0,8. A análise posterior, incluindo análises de α - e β -diversidade (ver abaixo) foi calculada utilizando o pacote phyloseq R (MCMURDIE; HOLMES, 2013), utilizando a tabela de OTUs normalizada pela biblioteca com menor número de reads. As sequências brutas serão depositadas no ENA (European Nucleotide Archive).

Análises Estatísticas

Todos os modelos estatísticos foram conduzidos através do R (R Core Team 2015) com diferentes pacotes de software. A atividade enzimática dos cupins nos diferentes polissacarídeos avaliados foi determinada calculando-se a média aritmética das triplicatas dos ensaios enzimáticos e subtraindo o valor do branco da reação, resultando em uma leitura de absorvância real. Esses valores foram transformados em um dado real expresso em μmol de glicose/mg de proteína. Uma análise de variância de dois fatores (Two-way ANOVA) ($p < 0,05$) foi utilizada para determinar diferenças da atividade enzimática entre as castas dos operários, soldados e o alimento estocado nos polissacarídeos avaliados. Para as análises de variância, os dados foram transformados no $\log(X+1)$ para corrigir normalidade e homogeneidade da variância. No caso de significância, as comparações múltiplas foram realizadas por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$). As estimativas de diversidade alfa foram calculadas usando a função `plot_richness` no pacote Phyloseq, incluindo a riqueza de OTUs observada, o índice de Shannon, o índice de Simpson e o estimador de riqueza Chao1. Por meio do pacote Conover-test, os testes de Kruskal-Wallis com valores de p ajustados para comparações múltiplas via procedimento FDR (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) foram realizados para verificar a existência de diferenças significativas entre as espécies de cupins, castas e ninhos. Os gráficos foram construídos com auxílio dos pacotes `ggplot2`, `RcolorBrewer` e `Phyloseq`. A similaridade da comunidade entre todas as amostras foi calculada utilizando distâncias UniFrac ponderadas e visualizada utilizando a análise de coordenadas principais (PCoA) com o pacote *Phyloseq*. Por meio de uma análise de variância multivariada permutatória (PERMANOVA) baseada em

diferenças de Bray-Curtis foi possível avaliar se os agrupamentos de tratamento (espécies de cupins, castas e ninhos) visualizados nos gráficos de PCoA têm um efeito significativo na composição da comunidade microbiana, considerando níveis de filo, gênero e OTUs. As diferenças entre os grupos foram analisadas através de testes pairwise, quanto o teste geral foi significativo. Todos os testes de PERMANOVA foram realizados através da função *adonis* no pacote Vegan R com 999 permutações. Para testar a heterogeneidade da estrutura da comunidade bacteriana entre os tratamentos, foi utilizado um análogo multivariado do teste de Levene para homogeneidade de dispersões de grupos (função *betadisper*) (ANDERSON, 2006). As taxas responsáveis pelas diferenças na composição da comunidade microbiana entre os tratamentos foram avaliadas utilizando a função *multipatt* no pacote *Indicspecies* R.

RESULTADOS

Análise Enzimática

A análise do extrato bruto proteico de operários, soldados e alimento armazenado por *C. cumulans* indicou a presença de proteínas. A quantidade média de proteína entre os extratos mostrou diferenças significativas ($H= 11,32$; $df= 2$; $p= 0,035$; Teste de Kruskal-Wallis), sendo que o alimento estocado apresentou menor quantidade de proteínas do que os extratos brutos obtidos de operários ($p= 0,001$) e soldados ($0,033$) (Fig. 2).

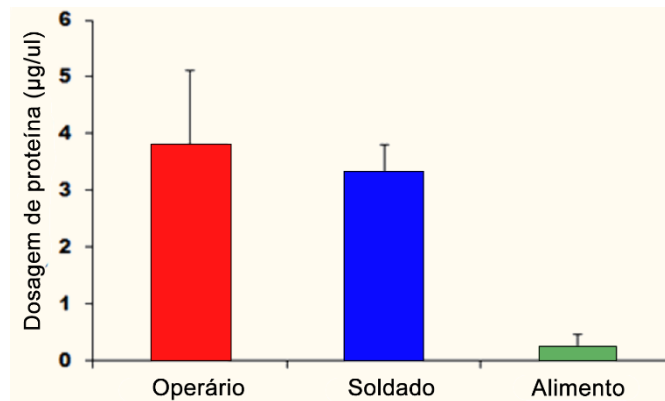


Figura 2. Média (\pm DP) da concentração de proteínas totais em extratos de *C. cumulans* e alimento estocado ($\mu\text{l/ul}$).

Os resultados mostraram que no alimento estocado há uma maior atividade enzimática sobre o xilano e arabinosilano (Ryx) quando comparada a atividade presente no trato digestivo dos operários e soldados ($F=8,37$; $df=10$; $p<0,001$; ANOVA) (Fig. 3).

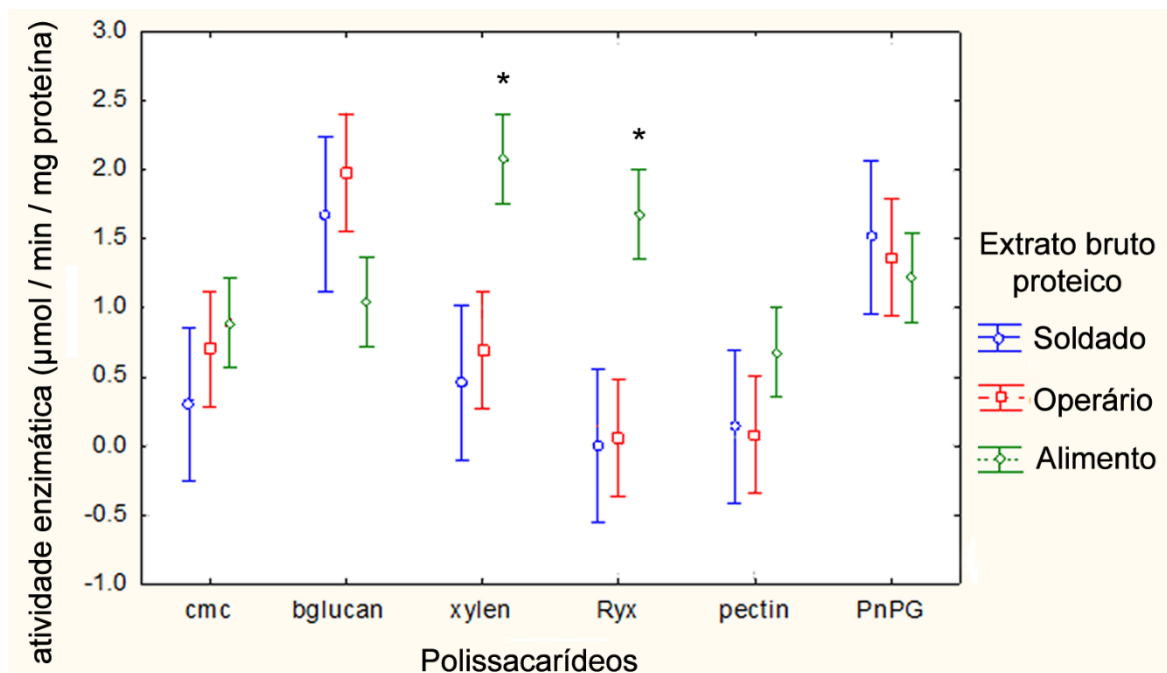


Figura 3. Atividades enzimáticas do extrato bruto de operários, soldados e alimento estocado de *C. cumulans* frente a diversos polissacarídeos. * acima das barras indicam diferenças significativas na atividade enzimática (Teste de Tukey; $p< 0,05$).

Dados do Sequenciamento do gene 16S rRNA de intestinos de cupins e substratos do ninho

As amostras de intestino de operários de *C. cumulans* geraram entre 190827 e 186657 reads (média \pm DP, 169978,67 \pm 32565,86) e entre 107782 e 160473 reads (120155,33 \pm 35773,59) para soldados. Adicionalmente, nós obtivemos entre 164875 e 130437 reads para o material das paredes internas do ninho de *C. cumulans* (128961,67 \pm 36673,26) e entre 84838 e 126875 reads (100886,67 \pm 22712,88) para as amostras de alimento armazenado por *C. cumulans*. As amostras de intestino de operários de *P. araujoii* geraram entre 70990 e 65412 reads (média \pm DP, 87634,00 \pm 33774,29) e entre 150803 e 84897 reads (128943,33 \pm 38145,59) para soldados. Adicionalmente, nós obtivemos entre 59784 e 68193 reads para o material das paredes internas do ninho (PIN) de *P. araujoii* (57833,00 \pm 11460,73). Um total de 2292 OTUs foram identificadas após filtragem e análise das sequências, sendo de 321 a 1224 OTUs por amostra de intestino de cupins (IC), 480 a 1065 OTUs por amostra de PIN e 685 a 984 OTUs por amostra de alimento armazenado (AA) (Tabela 2). Neste estudo, a comunidade de Archaea esteve presente em menos de 1% das sequências. A riqueza microbiana observada e estimada (Chao1) foi significativamente menor no alimento AA e na PIN. Além disso, o AA também apresentou a menor diversidade de microbiota (índices Shannon, Simpson e InvSimpson) em relação aos IC e à PIN (Fig. 4). As curvas de rarefação atingiram platôs, o que indica uma amostragem adequada das sequências de 16S rDNA para todas as amostras (Fig. 5)

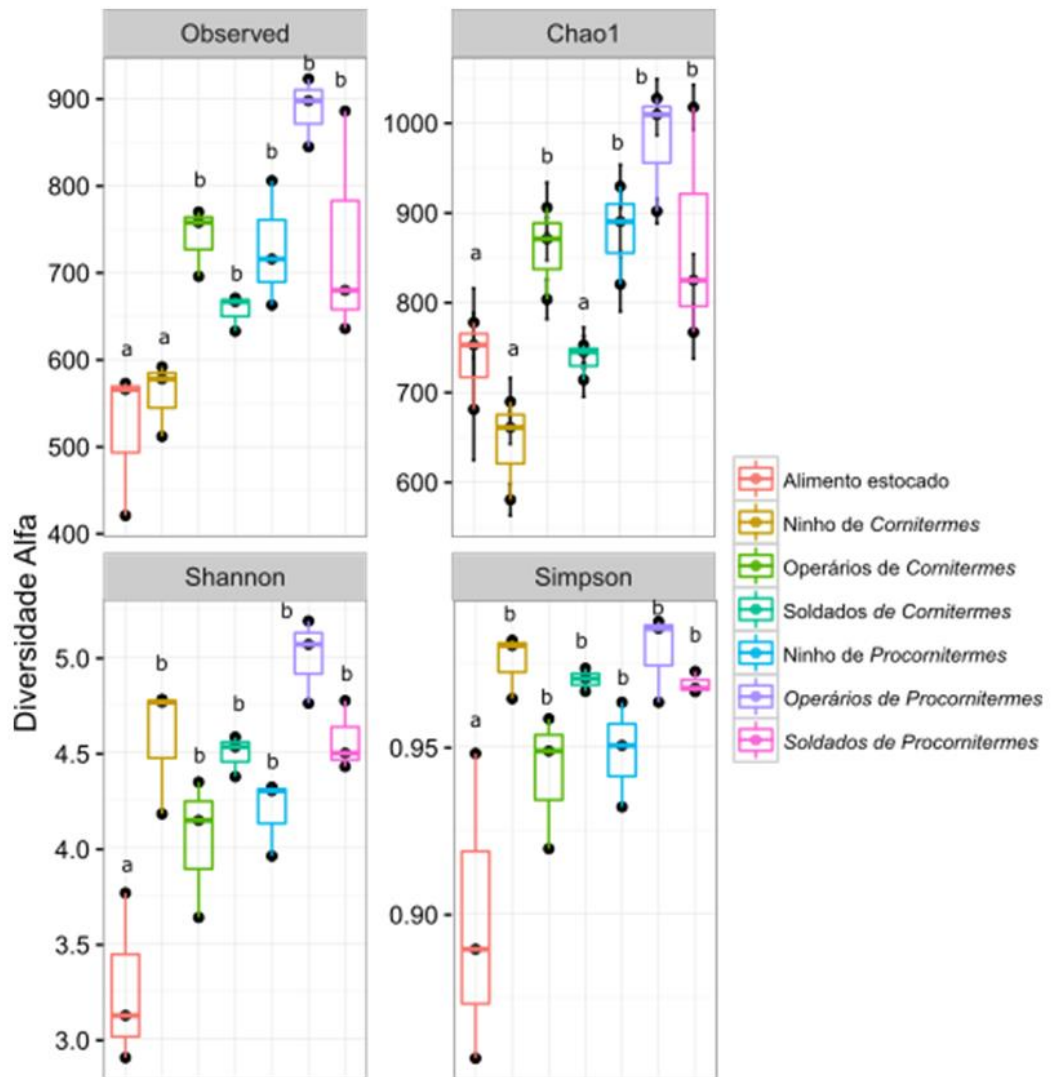


Figura 4. Riqueza estimada e índices de diversidade das comunidades microbianas de castas e substratos dos ninhos das espécies *C. cumulans* e *P. araujoii*. Os gráficos mostram a mediana, os quartis superiores e inferiores e os valores mínimo e máximo. Letras diferentes entre as categorias indicam diferenças estatísticas ($P < 0.05$, Teste Post-Hoc Conover-Iman).

Tabela 2. Número de sequências obtidas após a filtragem de qualidade do gene 16S rRNA; número de táxons identificados por colônia; número de OTUs atribuídas usando bancos de dados DictDb; riqueza estimada; e índices de diversidade alpha das comunidades microbianas dos intestinos de operários e soldados (IC) e substratos do ninho (material da parede interna do ninho (PIN) e alimento armazenado por *C. cumulans* (AA).

Espécies de Cupins	Colônia	Casta	Leituras	Filos	Famílias	Gêneros	OTUs	Chao1	Índice de Shannon	Índice de Simpsom	Índice de InvSimpsom
Instestinos de Cupim	CC.1	Operário	190827	21	86	113	1143	1309,69	5,32	0,99	80,91
	CC.2		132452	18	49	63	321	384,03	3,71	0,95	20,29
	CC.3		186657	22	83	109	1183	1338,26	5,38	0,99	85,77
	CC.1	Soldado	107782	18	69	94	972	1165,15	4,98	0,98	52,92
	CC.2		92211	16	40	50	465	586,69	3,90	0,95	20,02
	CC.3		160473	21	68	91	1054	1160,01	5,42	0,99	99,45
Substratos do ninho	PA.1	Operário	70990	21	67	91	1134	1242,67	5,56	0,99	102,92
	PA.2		126500	23	72	99	1224	1331,67	5,75	0,99	126,51
	PA.3		65412	22	75	99	1188	1263,52	5,55	0,99	97,23
	PA.1	Soldado	150803	21	67	88	1060	1162,42	5,42	0,99	73,14
	PA.2		151130	22	61	83	1084	1208,96	5,17	0,98	46,49
	PA.3		84897	23	67	86	1092	1203,78	5,39	0,99	71,81
Substratos do ninho	CC.1	Parede Interna do ninho	164875	22	109	152	882	1186,53	4,44	0,97	34,71
	CC.2		91573	18	81	94	480	589,25	3,87	0,95	18,40
	CC.3		130437	23	114	161	1054	1240,23	4,42	0,96	25,16
	CC.1	Alimento armazenado	84838	19	95	136	685	914,26	3,41	0,85	6,75
	CC.2		90947	22	117	157	984	1162,18	4,15	0,95	20,48
	CC.3		126875	20	93	115	717	994,07	3,68	0,93	15,27
Substratos do ninho	PA.1	Parede Interna do ninho	59784	22	114	161	1065	1212,80	5,58	0,99	108,64
	PA.2		45522	16	86	103	595	687,26	4,59	0,98	47,35
	PA.3		68193	20	96	126	691	826,84	4,13	0,95	19,57

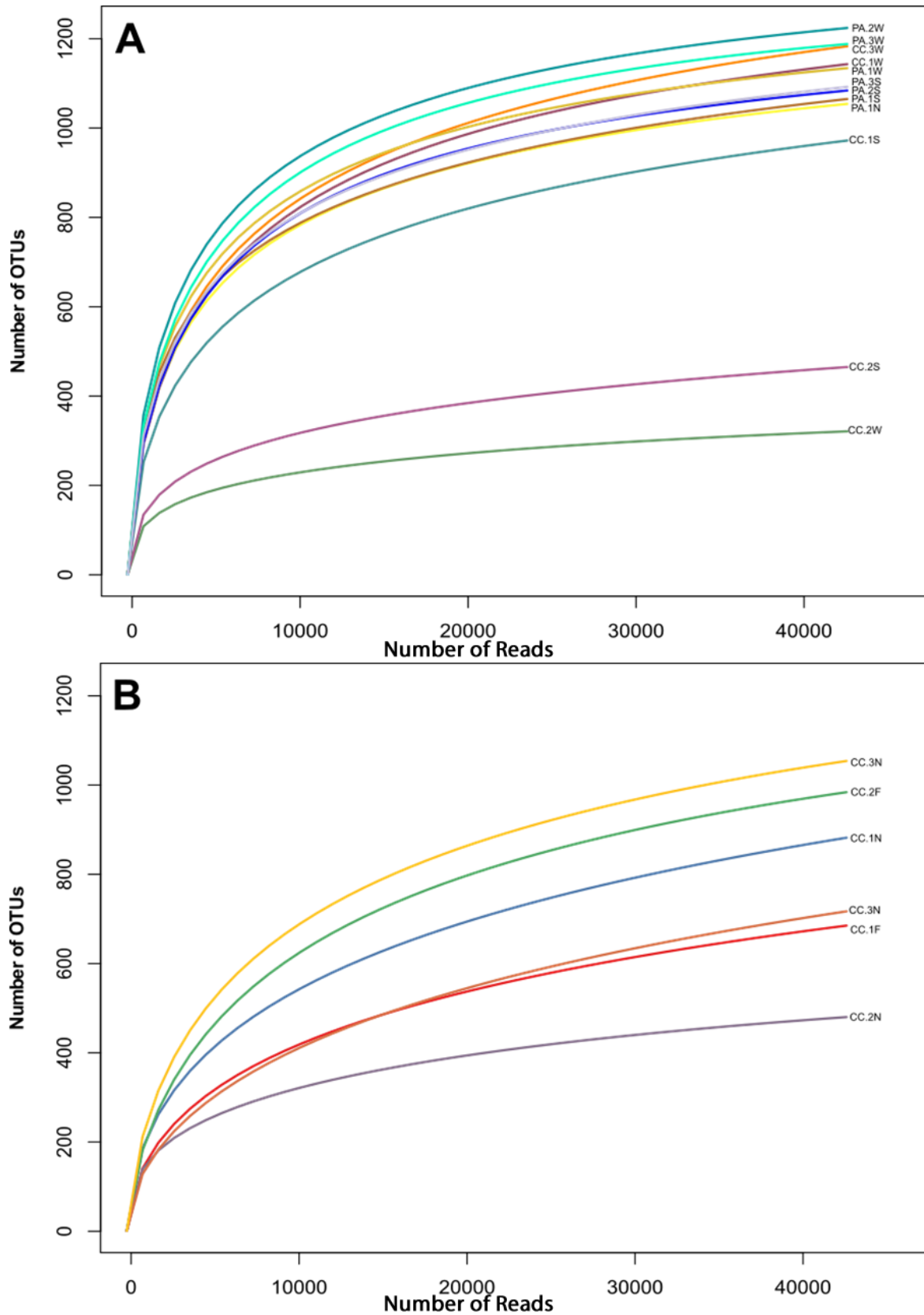


Figura. 5. Curvas de rarefação mostrando o número de OTUs presente nas sequências representando intestinos de operários e soldados (A) e substratos do ninho (PIN e AA por *C. cumulans* (B). Ver tabela 1 para códigos das colônias. W=worker gut (intestino de operários); S= soldier gut (intestino de soldados); N= ninho; F= food pellet (alimento armazenado).

O alimento armazenado e as paredes dos ninhos mostraram comunidades microbianas semelhantes

Vinte e quatro filós representando 139 famílias e 198 gêneros foram encontrados associados aos substratos do ninho: material das PIN e ao AA por *C. cumulans*. A maioria das OTUs comuns (807) (Fig.6) pertencem aos filós Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria e Verrucomicrobia, os quais contabilizaram 97.9 % das sequências de substratos do ninho. Actinobacteria (62.8 % de abundância média) e Proteobacteria (17.2 %) foram os filós predominantes. Os cinco gêneros mais abundantes foram *Nocardioides*, *Acidothermus*, *Curtobacterium*, *Actinoallomorus*, a linhagem 6 não cultivável de Sinobacteraceae (Proteobacteria) e a linhagem 27 não cultivável de Acidobacteriaceae (Acidobacteria), as quais contabilizaram 33.4% das sequências. O gênero *Nocardioides* (9.5 %) apresentou maior abundância média entre as amostras. A PIN mostrou 180 OTUs únicas (a maioria, 24%, pertencente ao filo Actinobacteria), seguido das amostras de AA com 42 OTUs (contendo 47 % de Firmicutes). A estrutura da comunidade bacteriana não mostrou uma distinção clara entre a PIN e o AA (Fig. 7). As análises de variação na estrutura da comunidade confirmaram que as comunidades de bactéria não diferiram em filo (PERMANOVA, $F= 0.58$, $R^2= 0.13$, $p= 0.60$), gênero (PERMANOVA, $F= 1.42$, $R^2= 0.26$, $p= 0.20$) e níveis de OTU (PERMANOVA, $F= 1.18$, $R^2= 0.23$, $p= 0.40$). O teste multivariado de homogeneidade de variância (ou dispersões) de grupos (*betadisper*) mostrou que as variâncias dos substratos do ninho não foram significativamente diferentes nos três níveis de táxon ($p= 0.25$, $p= 0.90$, e $p= 0.54$, respectivamente).

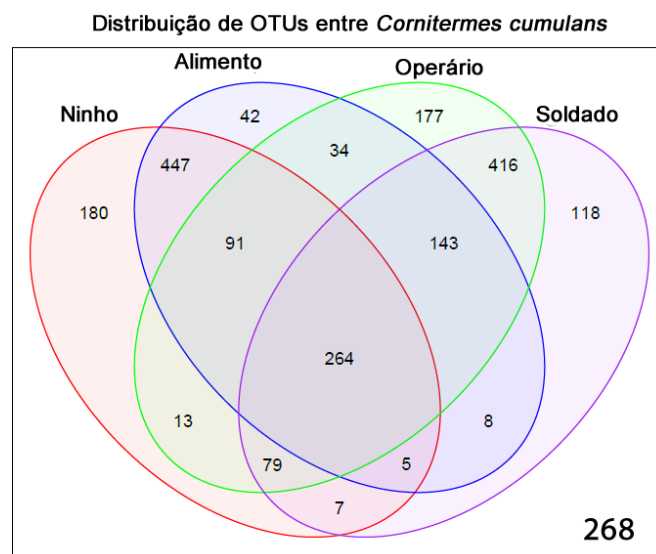


Figura 6. Diagrama de Venn mostrando a distribuição comum das OTUs entre as diferentes castas e substratos do ninho de *Cornitermes cumulans*. O valor externo ao diagrama representa OTUs que não participaram da análise.

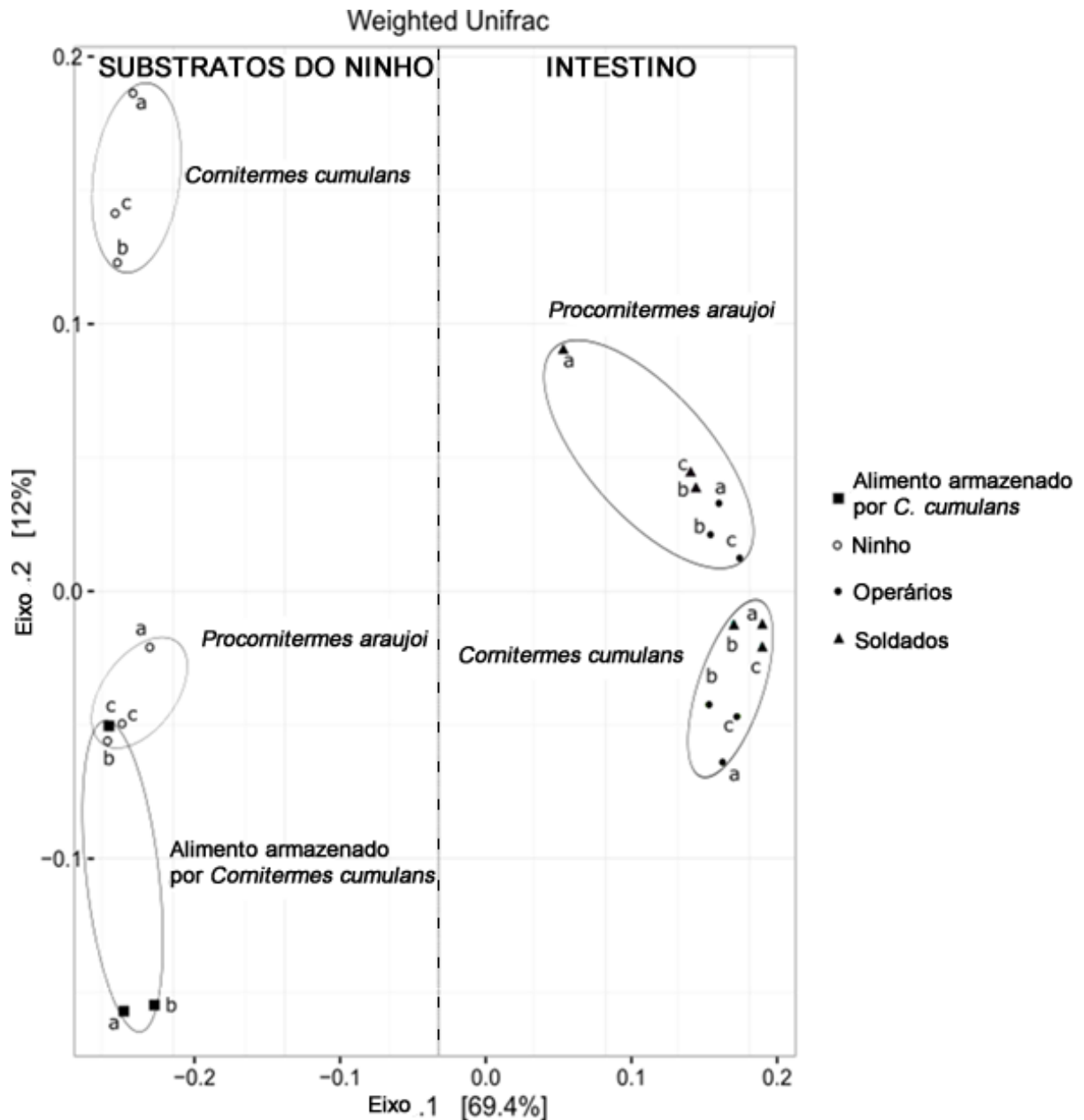


Figura 7. Análise de coordenadas principais (PCoA) da microbiota de IC e substratos dos ninhos baseado em distâncias UniFrac ponderadas e níveis de OTUs. A linha tracejada destaca a separação estatisticamente significativa entre os IC e a microbiota do ninho (PERMANOVA, $F= 69.63$, $p= 0.001$). Os eixos representam as principais coordenadas responsáveis pela maior parte da variação observada. Casa letra representa a comunidade bacteriana de uma colônia e as elipses separam as comunidades bacterianas entre espécies de cupins. Os clusters foram apoiados por análises PERMANOVA ($p < 0.001$)

A comunidade microbiana mostrou uma composição diferente entre intestinos de cupim e substratos de ninho

A estrutura das comunidades mostrou uma distinta separação entre a composição bacteriana de IC e substratos de ninho (Fig. 7). Análises de variação na estrutura da comunidade confirmaram que as comunidades bacterianas diferiram em filo (PERMANOVA, $F= 69.49$, $R^2= 78.53$, $p= 0.001$), gênero (PERMANOVA, $F= 25.92$, $R^2= 57.70$, $p= 0.001$) e níveis de OTUs (PERMANOVA, $F= 4.80$, $R^2= 20.16$, $p= 0.001$). O teste de permutação para homogeneidade de dispersões multivariadas mostrou que as variâncias de amostras de IC e substrato de ninho não foram estatisticamente diferentes e, portanto, não influenciaram os resultados de PERMANOVA. A maioria das OTUs comuns (264) (Fig. 6) pertenceram aos filos Proteobacteria, Firmicutes e Spirochaetes.

A microbiota intestinal de cupins apresentou diferentes estruturas comunitárias: espécie específica e casta específica.

A estrutura da comunidade simbiótica da microbiota intestinal mostrou uma separação distinta da composição das bactérias entre as duas espécies de cupins. Este resultado também foi evidente entre as castas de *C. cumulans* e *P. araujoii*, as quais ocuparam subespaços significativamente distintos nas análises de coordenadas principais (PCoA). No entanto, a microbiota intraespecífica (substratos do ninho) foi mais semelhante entre si do que quando comparada com outras espécies de cupins (Fig. 7). As análises da variação na estrutura da comunidade confirmaram que as comunidades microbianas intestinais (IC) diferem entre as espécies de cupins nos níveis de filo e gênero (PERMANOVA, $F= 19.25$, $R^2= 54.18$, $p= 0.001$ e $F= 31.38$, $R^2= 55.40$, $p= 0.010$, respectivamente). No nível de OTU, um efeito de interação entre as espécies de cupins e castas explicou 12% (PERMANOVA, $F= 4.40$, $p= 0.009$) de disparidade da estrutura da comunidade (Fig. 7). Operários e soldados também diferiram em filo (PERMANOVA, $F= 16.13$, $R^2= 27.47$, $p= 0.002$) e nível de gênero (PERMANOVA, $F= 13.86$, $R^2= 24.48$, $p= 0.004$). O teste de permutação para homogeneidade de dispersões multivariadas mostrou que variâncias de AA e substrato do ninho não foram estatisticamente diferentes, portanto, não influenciaram os resultados de PERMANOVA.

Classificação Taxonômica

A classificação utilizando a base de dados específica para cupins (DictDb) atribuiu com sucesso (100%) das reads em nível de filo, diminuindo para 60,3% no nível de gênero. No total, 26 filos de bactérias representando 148 gêneros e 112 famílias foram identificadas nas amostras

de IC. *C. cumulans* e *P. araujoii* apresentaram 23 filos em comum. Os filos mais abundantes (Actinobacteria, Bacteroidetes, TG3, Fibrobacteres, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes e Synergistetes) representam 96,7% das reads de intestinos. O filo Spirochaetes dominou a comunidade intestinal geral, com uma abundância média de 37,7%, enquanto que Firmicutes e Bacteroidetes representaram 30,7 e 9,7%, respectivamente (Fig. 8A). Os gêneros mais abundantes representaram 45,6% das sequências. Destes, *Treponema* (Spirochaetes) com 131 OTUs e *Candidatus Anthromitus* (Firmicutes) com 168 OTUs, apresentaram uma abundância de 21,8 e 12,8 %, respectivamente. O gênero “Termite Cockroach cluster” pertencente à família Synergistaceae (Synergistetes) apresentou 56 OTUs e 3,9 % de abundância, o subgrupo IIIb do filo TG3 (Termite Group 3), 3 OTUs e a linhagem “24” não cultivável pertencente à família Ruminococcaceae (Firmicutes) apresentou 27 OTUs e abundância de 3,9, 2,4 e 2 %, respectivamente. O gênero “Termite Cluster II” (10 OTUs) e *Tannerella* (9 OTUs) pertencente à família Porphyromonadaceae (Bacteroidetes) apresentaram uma abundância média de 1.1 e 1.6 %, respectivamente (Fig. 8B).

Embora *C. cumulans* e *P. araujoii* compartilhem semelhanças na estrutura de sua comunidade intestinal, diferiram na abundância de Spirochaetes (51,4%), Fibrobacteres (5,5%) e TG3 (4,3%), os quais foram maiores em *C. cumulans*, enquanto que Firmicutes (44,2%) e Synergistetes (6,3%) foram mais abundantes em *P. araujoii*. Cento e quinze gêneros foram comuns nas amostras de IC de ambas as espécies. Os reads classificados como *Treponema* (linhagens Ia, Ic e If) e o subgrupo IIIb pertencente ao filo TG3 foram preferencialmente associadas a *C. cumulans*. Em contrapartida, *Candidatus Anthromitus*, “Termite Cockroach Cluster” na família Synergistaceae, linhagem 24 não cultivável da família Ruminococcaceae e “Termite Cluster II” na família Porphyromonadaceae foram mais abundantes em amostras de intestino de *P. araujoii*. Nossos resultados também revelaram diferentes padrões de associação de microbiota intestinal entre operários e soldados. Os filos Actinobacteria e Proteobacteria apresentaram maior abundância em operários, enquanto Firmicutes, no gênero *Candidatus Anthromitus*, foi mais abundante em soldados. Em relação ao gênero, *Treponema* Ia, foi mais abundante em operários de *C. cumulans*, enquanto que *Treponema* Ic e o subgrupo IIIb do filo TG3 foram mais abundantes em soldados desta espécie. Por outro lado, *Treponema* Ic mostrou maior abundância em amostras de operários de *P. araujoii* do que em soldados (Figs. 8 A e B).

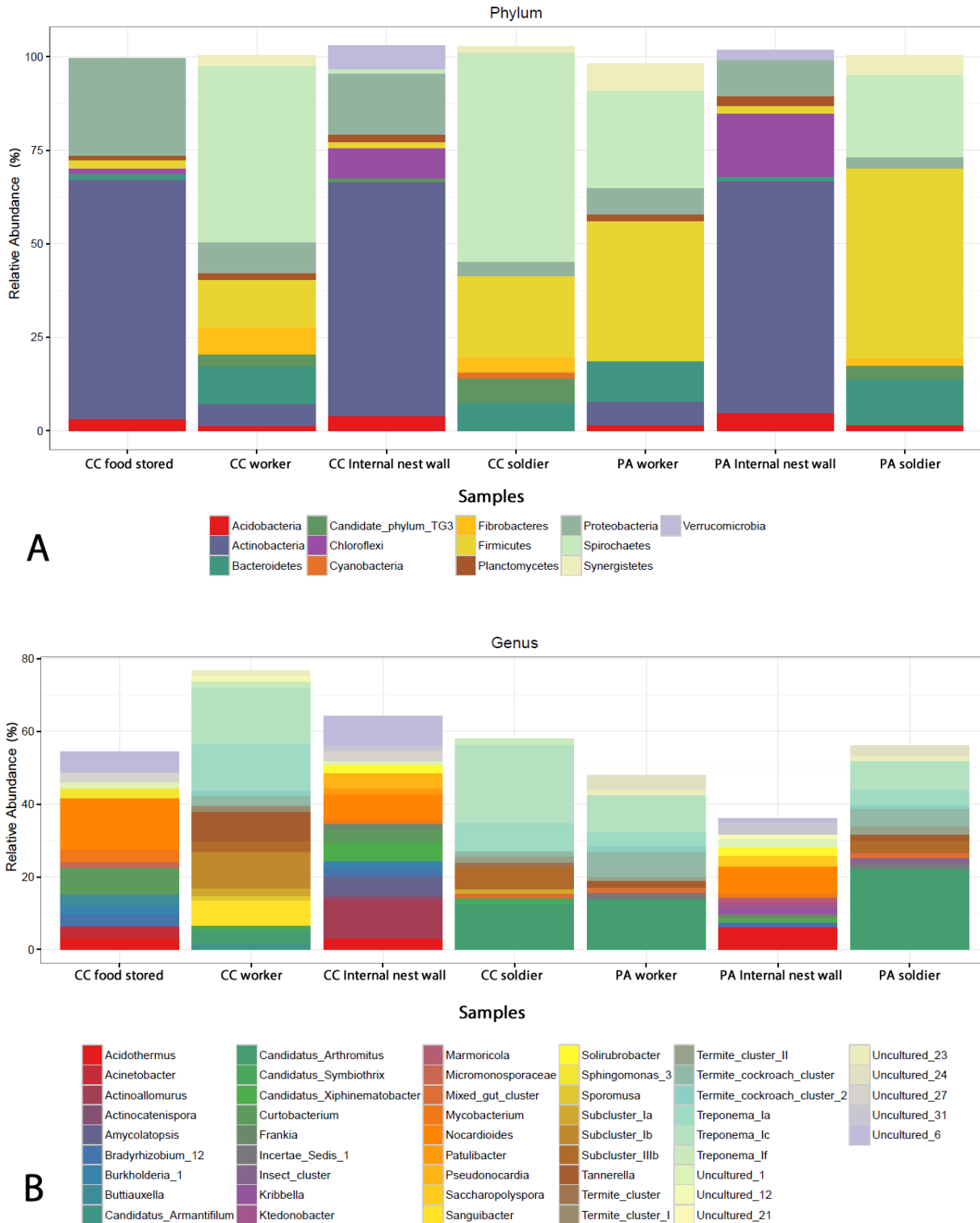


Figura 8. Distribuição taxonômica da comunidade bacteriana presente nos intestinos das castas de operários e soldados e nos substratos de ninhos das espécies *Cornitermes cumulans* (CC) e *Procornitermes araujoii* (PA) em relação a filo (A) e gênero (B). Os dados “unclassified” não foram representados nestes gráficos.

DISCUSSÃO

Do ponto de vista ecológico, os cupins podem ser agrupados em “one piece termites” (OP), em que a colônia vive dentro da fonte alimentar, e “multiple pieces termites” (MP), cupins que buscam o alimento fora do ninho (KORB, 2008). A maioria dos Isoptera OP, são cupins inferiores, ou seja, que possuem protozoários e bactérias simbiotes. No entanto, uma revisão da literatura pertinente mostra que diversas espécies MP armazenam alimento no interior do ninho, tal qual *Cornitermes cumulans*, por exemplo: *Anacanthotermes ochraceus*, *Coptotermes lacteus* (inferiores); CAMERON et al., 2008), *Amitermes laurensis*, *Constrictotermes cavifrons*, *Drepanotermes ruficeps*, *Globitermes sulphureus*, *Hospitalitermes medioflavus*, *Hospitalitermes rufus*, *Macrotermes* sp., *Microcerotermes depokensis*, *Nasutitermes magnus*, *Nasutitermes nigriceps*, *Ruptitermes* sp., *Syntermes* sp., *Trinervitermes* sp., *Tumulitermes pastinator* e *Velocitermes* sp. (superiores) (EMERSON, 1938; SANDS, 1965; GILLMAN et al., 1972; DARLINGTON, 1982; NEGRET; REDFORD, 1982; MIURA; MATSUMOTO, 1998; HOLT, 1998; LIMA; COSTA-LEONARDO, 2007; NEOH et al., 2011). Contudo, a literatura específica destas espécies não esclarece o motivo deste armazenamento de alimento no interior das colônias.

Este estudo fornece a primeira investigação a respeito do alimento armazenado por *Cornitermes cumulans* e sua função na colônia, avaliada por ensaios enzimáticos e composição da microbiota associada. Os extratos brutos proteicos de operários, soldados e alimento de *C. cumulans* foram testados a fim de avaliar a capacidade de quebra de polissacarídeos naturais e oligossacarídeos sintéticos. O extrato bruto de operários foi mais eficiente em desagregar polissacarídeos que possuem glicose como único monômero formador da cadeia polimérica, tal como β -glucano de cevada, com ligações ramificadas do tipo β -1,3:1,4, quando comparado à atividade dos substratos restantes, o que sugere atividade de enzimas da família das Hidrolases Glicolíticas GH9 e GH 16 (endo- β -1,3:1,4-glucanases). O substrato sintético *p*NP-glucopiranosídeo foi hidrolisado por todos os extratos brutos de forma moderada, o que indica atividade de enzimas da família GH1 e GH 3 (β -glucosidases), a qual já foi descrita em tratos digestivos de espécies de cupins como *Nasutitermes* sp., *Neotermes* sp., *Coptotermes formosanus* e *Coptotermes gestroi* (SLAYTOR; VEIVERS; LO, 1997; TOKUDA; SAITO; WATANABE, 2002; NI et al., 2007; FRANCO CAIRO et al., 2011; ZHANG et al., 2011; FRANCO CAIRO et al., 2016). No entanto, nenhum extrato bruto foi eficiente em hidrolisar o substrato linear carboximetilcelulose (CMC) com ligações do tipo β -1,4 e a pectina derivada de Citrus, polímero formado por monômeros de α -D-Ácido galacturônico, sugerindo baixa

atividade de carboximetil celulases e pectinases, respectivamente. De forma geral, o extrato bruto de operários apresentou sinais mais evidentes de atividade enzimática quando comparado àquele dos soldados, uma vez que a casta responsável pela defesa depende dos operários para alimentação via trofalaxia, recebendo um alimento pré-digerido (NALEPA, 2011).

De maneira oposta ao perfil enzimático dos cupins, o extrato bruto do alimento armazenado foi eficiente na hidrólise de hemiceluloses que não possuem glicose como único monômero formador da cadeia polimérica, tais como arabinoxilano (Ryx) e xilano. O alimento apresentou maior eficiência na hidrólise sobre o xilano, composto de ligações β -1,4 de xilose, seguido do arabinoxilano (Ryx) ($p < 0.05$), o que indica possível atividade de enzimas da família GH 3, GH 8, GH 10, GH 11, GH 31 e GH35 (β -1,4-xilosidases, endo- β -1,3:1,4-xilanases, β -galactosidases e α -galactosidases). O arabinoxilano apresenta monômeros de xilose unidos por ligações β -1,4 na cadeia principal e monômeros ou dímeros de arabinose adjuntos a essa cadeia por ligações α -1,3 ou α -1,5 e é o polissacarídeo mais abundante na parede celular de gramíneas, principal alimento consumido por esta espécie (Figura 9).

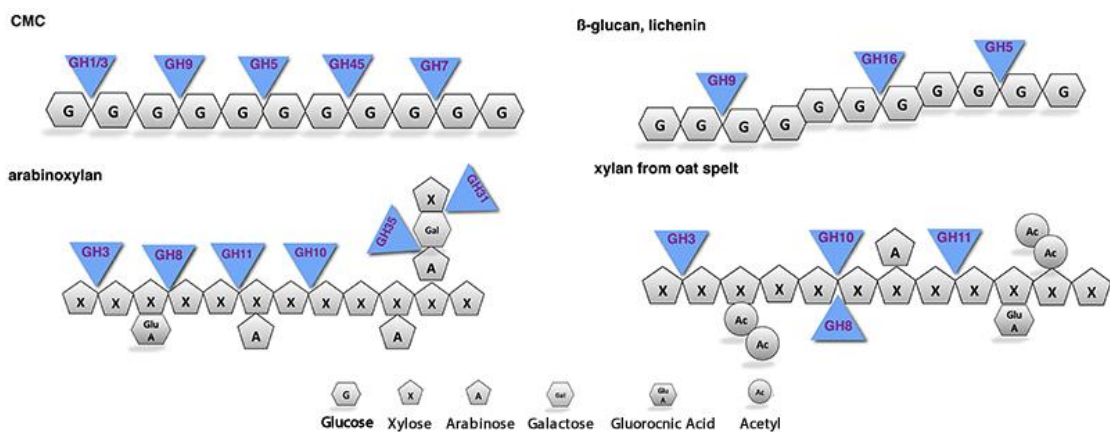


Figura 9. Representação das interações das enzimas hidrolíticas para degradação dos polissacarídeos naturais (Adaptado de FRANCO CAIRO et al., 2016).

A variação das atividades enzimáticas em *C. cumulans* sobre determinados substratos pode ser explicada pela estreita correlação entre a dieta e a composição da microbiota digestiva. Certas hemicelulases e enzimas acessórias produzidas pelos simbiossomas podem ser induzidas ou reprimidas de acordo com a dieta (TANAKA et al., 2006). A capacidade de cupins em hidrolisar tamanha variedade de ligações glicosídicas se deve ao sinergismo entre o arsenal enzimático endógeno e simbiótico (WARNECKE et al., 2007; HONGO, 2011).

Enquanto que cupins inferiores possuem intestinos anatomicamente mais simples e digerem a madeira com auxílio de protozoários celulolíticos, cupins superiores são mais compartimentados e contêm principalmente comunidades microbianas procarióticas

(DIETRICH et al., 2014). Diversos estudos metagenômicos têm avaliado o potencial da microbiota do intestino em térmitas superiores, porém poucos abordam a fauna Neotropical. Diante dos resultados bioquímicos obtidos e da lacuna no conhecimento a respeito da microbiota de materiais associados aos cupins, tais como a parede do ninho e alimento, constatou-se a necessidade de investigar a microbiota de *Cornitermes cumulans*. Adicionalmente, visando uma comparação, foi incluída a análise da microbiota de *Procornitermes araujoi*, uma espécie simpátrica que não armazena alimento. Com isso, o atual trabalho também representa a primeira descrição da comunidade microbiana neste cupim.

Com o desenvolvimento das análises moleculares foi possível constatar que microrganismos passíveis de cultivo já identificados, na maioria dos ambientes, constituem apenas uma pequena parte da diversidade microbiana. Em Isoptera, a microbiota intestinal é altamente diversificada. Nos últimos anos, pesquisadores do mundo todo tentam estabelecer possíveis fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal de cupins. Dentre eles, a dieta tem indicado forte ingerência na estrutura de comunidades microbianas (HUANG et al., 2013; MIKAELIAN et al., 2015; WANG et al., 2016; SU et al., 2016; HUANG et al., 2016; SHUKLA et al., 2016;). No entanto, outros estudos sugerem a heterogeneidade do microambiente, a herança vertical e o polietismo etário como principais forças que modulam o microbioma intestinal de cupins (MIKAELIAN et al., 2016; ABDUL et al., 2015; LI et al., 2016). Contudo, Hongoh e colaboradores (2005; 2006) aborda a influência da filogenia dos Isoptera na estrutura da comunidade microbiana. Tais estudos, revelaram uma correlação entre a microbiota de cupins e seus hospedeiros, o que indica um papel importante para a coevolução na constituição de comunidades microbianas simbiotes.

O estudo envolvendo a microbiota e sua composição fornece uma visão sobre a estrutura da comunidade microbiana em questão no habitat de interesse e sugere o potencial metabólico da mesma (SHADE et al., 2012). Cupins apresentam a trofalaxia proctodeal, a qual se caracteriza pela transferência de alimento rico em simbiotes via anal (SUÁREZ; THORNE, 2000). Este processo perpetua a relação simbiótica e minimiza a influência ambiental sobre a composição da microbiota intestinal, tornando-a mais homogênea em toda colônia (BIGNELL et al., 2011). Os índices de diversidade mostraram que a microbiota associada ao alimento armazenado (AA) apresentou menor riqueza e baixa diversidade quando comparada aos intestinos de cupim (IC), o que é indicativo da presença de poucas espécies dominantes de bactérias.

O AA e o material da PIN, o qual é composto de fezes, solo e saliva, apresentaram-se semelhantes quanto a composição da comunidade microbiana. Os táxons dominantes encontrados, como Actinobacteria e Proteobacteria são conhecidos por constituir grandes grupos de bactérias que compõe uma variedade de solos, inclusive do Cerrado. A predominância das espécies pertencentes ao filo Actinobacteria se deve principalmente às características físico-químicas do montículo, as quais são favoráveis ao desenvolvimento de tal comunidade. As actinobactérias são do tipo Gram-positivas (ZHANG; XU, 2008). Este filo possui diversas capacidades metabólicas, entre elas solubilizante de lignina e atividade celulolítica (MAKONDE et al., 2013), tais como degradação de xilano, amido solúvel, proteínas, lipídeos, ácido úrico e carboximetilcelulose (KHUCHAROENPHAISAN, 2011). Essas informações corroboram os resultados obtidos, dado que o AA apresentou alta atividade enzimática sobre substratos compostos de xilano e predominância de actinobactérias.

As proteobactérias são divididas em subfilos, os quais quatro são comumente detectados no solo, α -, β -, γ - e δ -Proteobacteria (MADIGAN, 2012). O subfilo mais abundante nos substratos do ninho de *C. cumulans* e *P. araujoi* foi α -Proteobacteria, seguido de β -Proteobacteria, δ -Proteobacteria e γ -Proteobacteria. O subfilo α -Proteobacteria é distinto por sua dominância em diferentes solos, além de sua capacidade metilotrófica e fixadora de nitrogênio. Os membros das proteobactérias β e γ são conhecidos por mediar a nitrificação. Por fim, as δ -proteobactérias agem principalmente como redutoras de sulfato e ferro (ZHANG; XU, 2008). Dentre os gêneros mais abundantes deste filo nas amostras de substratos do ninho de *C. cumulans*, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* (α e β -Proteobacteria, respectivamente) têm como uma das atividades descritas, a fixação de nitrogênio e estimulação do crescimento de plantas (HENNECKE, 1990).

Este estudo foi pioneiro em abordar o AA por *C. cumulans* como possível fonte de enzimas capazes de degradar celulose. HOLT (1998) encontrou atividade microbiana no AA pelos cupins australianos: *Nasutitermes magnus*, *Tumulitermes pastinator* e *Drepanotermes ruficeps*, por meio da mensuração da biomassa de bactérias presentes no alimento. O autor constatou 20 vezes mais atividade microbiana no AA, quando comparado à PIN e conseqüentemente, associou a estocagem do alimento a câmaras de decomposição da biomassa vegetal, efeito isolante e fornecimento de alimento enriquecido em nitrogênio através da perda de carbono pela oxidação. O presente trabalho corrobora essa hipótese, uma vez que foi constatada presença de bactérias no AA, já citadas anteriormente, responsáveis por algumas das funções citadas acima.

De acordo com Constantino (2015), os cupins de Cerrado são classificados em quatro grupos alimentares: xilófagos, humívoros ou comedores de solo, ceifadores (comedores de serapilheira) e intermediários (espécies que não se enquadram nos outros grupos). As duas espécies de térmitas, objeto deste estudo, mostraram divergência na dominância de bactérias. *C. cumulans*, um cupim classificado “ceifador”, apresentou dominância do filo Spirochaetes (51,4%) em sua microbiota intestinal, seguido de Firmicutes (17,2%) e Bacteroidetes (7,6%). No entanto, *P. araujoii*, classificado “Intermediário”, apresentou dominância do filo Firmicutes (44,2%), seguido de Spirochaetes (23,9%) e Bacteroidetes (11,6%). MIKAELIAN e colaboradores (2015) descreveram a comunidade microbiótica intestinal de cupins superiores representantes de diferentes grupos alimentares. Ao comparar os resultados obtidos no presente estudo com os dos citados pesquisadores, observa-se que as abundâncias relativas dos filios predominantes em amostras de intestinos de *C. cumulans* foram similares aos resultados encontrados em cupins comedores de serapilheira e madeira. Por outro lado, *P. araujoii*, apresentou abundâncias relativas aproximadas às de cupins que se alimentam de solo, húmus e serapilheira. A dissimilaridade da microbiota intestinal compartilhada entre *C. cumulans* e *P. araujoii* é mais uma evidência da dieta atuando como determinante na estrutura da comunidade microbiana em cupins superiores.

Apesar dos cupins apresentarem enzimas celulolíticas endógenas, (NI; TOKUDA, 2013) as populações bacterianas e arqueanas simbiotes dos cupins são conhecidas por auxiliar na digestão da lignocelulose. Desta forma, a ausência desta complexa microbiota, impossibilitaria a sobrevivência dos cupins (ROSENGAUS et al., 2011). A linhagem mais dominante encontrada em amostras de intestinos de *C. cumulans* foram associadas ao gênero *Treponema*, o qual já foi relatada como parte da microbiota comum de diversas espécies de cupins (BRUNE; DIETRICH, 2015). A dieta de térmitas, em sua maioria, é rica em carbono e pobre em nitrogênio. Algumas espécies do gênero *Treponema* tem a capacidade de aumentar a economia de nitrogênio no cupim por meio de reciclagem do ácido úrico (nitrogênio excretado) e realizam aquisição de novo nitrogênio através da fixação do N₂ atmosférico. Em cupins que se alimentam de madeira (0,05% de N), este processo pode fornecer até 60% do nitrogênio contido na biomassa de cupins (LILBURN et al., 2001).

A predominância do filo Firmicutes em amostras de intestino de *P. araujoii* sugere que esta espécie também digere a biomassa de forma eficiente, uma vez que tais microrganismos estão associados à degradação de lignocelulose, dado ao fato de apresentarem altas atividades celulolíticas, xilanolíticas e proteolíticas (BUGG et al., 2011; COTTA; FORSTER, 2006). O

gênero dominante foi *Candidatus Arthromitus*, pertencente à família Lachnospiraceae, classe Clostridia. Alguns estudos mostram este gênero ligado à parede do intestino posterior de cupins, estando relacionado, de alguma forma, ao metabolismo do metano. Este fato, se deve a presença do gênero estar restrita a artrópodes produtores metano (THOMPSON et al., 2012). Entretanto, bactérias da classe Clostridia também são reconhecidas por sua função fermentadora de carboidratos por meio da redução de gás carbônico a acetato (acetogênese), principal fonte de energia do cupim hospedeiro (KANE et al., 1991; LEADBETTER et al., 1999; ODELSON; BREZNAK, 1983).

Alguns estudos como GRIECO et al., 2013 e COSTA et al., 2013, descreveram a microbiota em *C. cumulans*, no entanto não abordam o AA ou diferentes castas, além dos operários, caso dos soldados, utilizados no atual estudo, enquanto fonte de diversidade microbiana. Adicionalmente, o presente trabalho apresentou variações na abundância relativa dos táxons comuns e identificou táxons com abundância relevante em *C. cumulans*, que não foram encontrados pelos autores, tal como Termite Group 3 (TG3). Este fato pode ser explicado pelo aumento da cobertura da biblioteca, uma vez que a metodologia utilizada sequenciamento de nova geração.

A partir dos dados apresentados neste estudo, conclui-se que o alimento armazenado por *C. cumulans* e sua microbiota associada possui capacidade de degradar hemicelulose, comprovada pela presença de bactérias conhecidas por sua atividade hemicelulítica, o que possibilita mais eficiência na assimilação de outros componentes da biomassa vegetal utilizados por este cupim, garantindo a ele uma vantagem em relação a espécies que não possuem o hábito de armazenar alimento, tal qual *P. araujoi*. Assim, os dados obtidos no presente estudo representam um avanço na compreensão da simbiose dos térmitas e da digestão lignocelulósica mediada por simbiontes. Além disso, fornece uma base para outras análises “ômicas” das comunidades específicas de intestinos, materiais associados ao ninho e seus papéis no complexo processo de digestão da biomassa vegetal. Adicionalmente, o conhecimento a respeito das comunidades de bactérias do intestino dos cupins também pode produzir benefícios para o processamento dos substratos poliméricos complexos, como bagaço-de-cana, para o desenvolvimento de biocombustíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL RAHMAN, N. et al. A molecular survey of Australian and North American termite genera indicates that vertical inheritance is the primary force shaping termite gut microbiomes. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 5, 2015.
- ANDERSON, M. J. Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. **Biometrics**, v. 62, n. 1, p. 245–253, 2006.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society B**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.
- BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. **Biology of termites: A Modern synthesis**. 2011.
- BIGNELL, D.; EGGLETON, P. Termites in ecosystems. In: ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (Eds.). **Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology**. Kluwer Academy, 2000. p. 363–387.
- BOURGUIGNON, T. et al. Feeding ecology and phylogenetic structure of a complex neotropical termite assemblage, revealed by nitrogen stable isotope ratios. **Ecological Entomology**, v. 36, n. 2, p. 261–269, 2011.
- BOURGUIGNON, T. et al. The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 2, p. 406–421, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BREZNAK, J. A.; BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Most**, 1994.
- BRUNE, A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 168–180, 2014.
- BRUNE, A.; DIETRICH, C. The Gut Microbiota of Termites: Digesting the Diversity in the Light of Ecology and Evolution. **Annual review of microbiology**, v. 69, n. 1, p. 150720190645000, 2015.
- BUGG, T. D. H. et al. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 394-400, 2011.
- CAMERON, D. A. et al. Optimal reproduction strategies in two species of mound-building termites. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 70, n. 1, p. 189–209, 2008.
- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 4516–22, 2011.
- COLES DE NEGRET, H. R.; REDFORD, K. H. The Biology of Nine Termite Species (Isoptera: Termitidae) from the Cerrado of Central Brazil. **Psyche (New York)**, v. 89, n. 1–2, p. 81–106, 1982.
- CONSTANTINO, R. Revision of the Neotropical termite genus *Syntermes* Holmgren (Isoptera: Termitidae). **University of Kansas Science Bulletin**, v. 55, p. 455–518, nov. 1995.

CONSTANTINO, R. **Cupins de Cerrado**. 1^o edição ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2015.

CONSTANTINO, R. **On-Line Termites Database**.. Disponível em: <<http://164.41.140.9/catal/>>. Acesso em: 02/02/2017.

COSARINSKY, M. I. The nest growth of the neotropical mound-building termite, *Cornitermes cumulans*: a micromorphological analysis. **Journal of Insect Science**, v. 11, n. 122, p. 1–14, 2011.

COSTA, P. S. et al. Phylogenetic diversity of prokaryotes associated with the mandibulate nasute termite *Cornitermes cumulans* and its mound. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 5, p. 567–574, 11 out. 2013.

COTTA, M.; FORSTER, R. The Family Lachnospiraceae, Including the Genera *Butyrivibrio*, *Lachnospira* and *Roseburia*. In: DWORKIN, M. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria**. New York, NY: Springer US, 2006. p. 1002–1021.

DARLINGTON, J. P. E. C. The underground passages and storage pits used in foraging by a nest of the termite *Macrotermes michaelseni* in Kajiado, Kenya. **Journal of Zoology**, v. 198, n. 2, p. 237–247, 1982.

DIETRICH, C.; KÖHLER, T.; BRUNE, A. The cockroach origin of the termite gut microbiota: Patterns in bacterial community structure reflect major evolutionary events. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2261–2269, 2014.

DJERNÆS, M.; KLASS, K. D.; EGGLETON, P. Identifying possible sister groups of Cryptocercidae+Isoptera: A combined molecular and morphological phylogeny of Dictyoptera. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 84, p. 284–303, 2015.

DONOVAN, S. E.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D. E. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. **Ecological Entomology**, v. 26, n. 4, p. 356–366, 2001.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 996–8, 2013.

EGGLETON, P.; TAYASU, I. Feeding groups, lifestyles and the global ecology of termites. **Ecological Research**, v. 16, n. 5, p. 941–960, 2001.

EMERSON, A. E.; MONOGRAPHS, S. E.; APR, N. Termite Nests-a Study of the Phylogeny. **Ecological Monographs**, v. 8, n. 2, p. 247–284, 1938.

ENGEL, M. S.; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, K. Termites (Isoptera): Their Phylogeny, Classification, and Rise to Ecological Dominance. **American Museum Novitates**, v. 3650, n. 3650, p. 1–27, 2009.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699–735, 2013.

FRANCO CAIRO, J. P.; CARAZZOLLE, M.F.; LEONARDO. F.C.; MOFATTO, L.S.; BRENELLI, L.B.; GONÇALVES, T.A.; UCHIMA, C.A.; DOMINGUES, R.R.; ALVAREZ, T.M.; TRAMONTINA, R.; VIDAL, R.O.; COSTA, F.F.; COSTA-LEONARDO, A.M.; PAES LEME, A.F.; PEREIRA, G.A.G.; SQUINA, F.M. Expanding the knowledge on lignocellulolytic and redox enzymes of worker and soldier castes from the lower termite

Coptotermes gestroi. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1518, 2016.

GILLMAN, L. R.; JEFFERIES, M. K.; RICHARDS, G. N. Non-soil constituents of termite (*Coptotermes acinaciformis*) mounds. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 5, p. 1005–1013, 1972.

GRIECO, M. A. B. et al. Microbial Community Diversity in the Gut of the South American Termite *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae). **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 197–204, jan. 2013.

HE, S. et al. Comparative Metagenomic and Metatranscriptomic Analysis of Hindgut Paunch Microbiota in Wood- and Dung-Feeding Higher Termites. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

HENNECKE, H. Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. **FEBS Letters**, 1990.

HOLT, J. Microbial activity in the mounds of some Australian termites. **Applied Soil Ecology**, v. 9, n. 1–3, p. 183–187, 1998.

HONGO, Y.; DEEVONG, P.; INOUE, T.; MORIYA, S.; TRAKULNALEAMSAI, S.; OHKUMA, M.; VONGKALUANG, C.; NOPARATNARAPORN, N.; KUDO, T. Intra- and Interspecific Comparisons of Bacterial Diversity and Community Structure Support Coevolution of Gut Microbiota and Termite Host. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6590–6599, 2005.

HONGO, Y.; EKPORNPRASIT, L.; INOUE, T.; MORIYA, S.; TRAKULNALEAMSAI, S.; OHKUMA, M.; NOPARATNARAPORN, N.; KUDO, T. Intracolony variation of bacterial gut microbiota among castes and ages in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus*. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 2, p. 505–516, 2006a.

HONGO, Y. et al. Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum Fibrobacteres, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6780–6788, 2006b.

HONGO, Y. Diversity and Genomes of Uncultured Microbial Symbionts in the Termite Gut. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 6, p. 1145–1151, 2010a.

HONGO, Y. Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 6, p. 1145–1151, 2010b.

HONGO, Y. Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 1311–1325, 2011.

Huang, X.F.; Chaparro, J.M.; Reardon, K.F.; Judd, T.M.; Vivanco, J.M.. Supplementing Blends of Sugars, Amino Acids, and Secondary Metabolites to the Diet of Termites (*Reticulitermes flavipes*) Drive Distinct Gut Bacterial Communities. **Microbial Ecology**, p. 1–6, 2016.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 02/02/2017.

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

INWARD, D. J. G.; VOGLER, A. P.; EGGLETON, P. A comprehensive phylogenetic analysis

of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 3, p. 953–967, 2007.

KANE, M. D.; BRAUMAN, A.; BREZNAK, J. A. *Clostridium mayombe* sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the gut of the African soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. **Archives of Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 99–104, 1991.

KHUCHAROENPHAISAN, K., U. PUANGPETCH, K. P. AND K. S. Grouping of actinomycetes isolated from termites using biochemical character. **J. Biol. Sci.**, v. 11, p. 314–319, 2011.

KÖHLER, T.; Dietrich, C.; Scheffrahn, R.H.; Brune, A. High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes spp.*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4691–4701, 2012.

KORB, J. The ecology of social evolution in termites. **Ecology of Social Evolution**, p. 151–74, 2008.

LEADBETTER, J. R. et al. Acetogenesis from H₂ plus CO₂ by spirochetes from termite guts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 283, n. 5402, p. 686–689, 1999.

LEE, K. E.; WOOD, T. G. **Termites and soils**. Academic Press. 1971.

LI, H. et al. Age polyethism drives community structure of the bacterial gut microbiota in the fungus-cultivating termite *Odontotermes formosanus*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1440–1451, 2016.

LILBURN, T. G. et al. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5526, p. 2495–8, 2001.

LIMA, J. T.; COSTA-LEONARDO, A. M. Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 0–0, 2007.

MADIGAN, M. Brock Biology of Microorganisms, 13th edn. **International Microbiology**, p. 550–551, 2012.

MAKONDE, H. M. et al. 16S-rRNA-based analysis of bacterial diversity in the gut of fungus-cultivating termites (*Microtermes* and *Odontotermes* species). **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 869–883, 2013.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2013.

MIKAELIAN, A. et al. Diet is the primary determinant of bacterial community structure in the guts of higher termites. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 20, p. 5284–5295, 2015a.

MIKAELIAN, A. et al. Classifying the bacterial gut microbiota of termites and cockroaches: A curated phylogenetic reference database (DictDb). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 472–482, 2015b.

MIKAELIAN, A.; MEUSER, K.; BRUNE, A. Microenvironmental heterogeneity of gut compartments drives bacterial community structure in wood- and humus-feeding higher termites. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 3, n. October 2016, p. 1–11, 2016.

- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MIURA, T.; MATSUMOTO, T. Foraging organization of the open-air processional lichen-feeding termite *Hospitalitermes* (isoptera, termitidae) in Borneo. **Insectes Sociaux**, v. 45, n. 1, p. 17–32, 1998.
- NALEPA, C. A. Altricial Development in Wood-Feeding Cockroaches: The Key Antecedent of Termite Eusociality. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds.). . **Biology of Termites: a Modern Synthesis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 69–95.
- NALEPA, C. A.; BIGNELL, D. E.; BANDI, C. Detritivory, coprophagy, and the evolution of digestive mutualisms in Dictyoptera. **Insectes Sociaux**, v. 48, n. 3, p. 194–201, 2001.
- NEOH, K.-B.; JALALUDIN, N. A.; LEE, C.-Y. Elimination of Field Colonies of a Mound-Building Termite *Globitermes sulphureus* (Isoptera: Termitidae) by Bistrifluron Bait. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 2, p. 607–613, 2011.
- NEUPANE, A.; MAYNARD, D. S.; BRADFORD, M. A. Consistent effects of eastern subterranean termites (*Reticulitermes flavipes*) on properties of a temperate forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 91, p. 84–91, 2015.
- NI, J. et al. Random exchanges of non-conserved amino acid residues among four parental termite cellulases by family shuffling improved thermostability. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 20, n. 11, p. 535–542, 2007.
- NI, J.; TOKUDA, G. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 838–850, 2013.
- ODELSON, D. A.; BREZNAK, J. A. Volatile fatty acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. **Applied and Environmental Microbiology**, 1983.
- OHKUMA, M. et al. Inheritance and diversification of symbiotic trichonymphid flagellates from a common ancestor of termites and the cockroach *Cryptocercus*. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 276, n. 1655, p. 239–245, 2009.
- REDFORD, K. H. The Termitaria of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) and Their Role in Determining a Potential Keystone Species. **Biotropica**, v. 16, n. 2, p. 112–119, 1984.
- ROSENGAUS, R. B. et al. Disruption of the termite gut microbiota and its prolonged consequences for fitness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4303–4312, 2011.
- SANDS, W. A. Termite Distribution in Man-Modified Habitats in West Africa, with Special Reference to Species Segregation in the Genus *Trinervitermes* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). **The Journal of Animal Ecology**, v. 34, n. 3, p. 557, 1965.
- SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.
- SHADE, A. et al. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. **Frontiers in Microbiology**, 2012.
- SHUKLA, S. P. et al. Gut microbiota of dung beetles correspond to dietary specializations of adults and larvae. **Molecular Ecology**, v. 49, 2016.

- SIEBERS, N. et al. Origin and Alteration of Organic Matter in Termite Mounds from Different Feeding Guilds of the Amazon Rainforests. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123790, abr. 2015.
- SLAYTOR, M.; VEIVERS, P. C.; LO, N. Aerobic and anaerobic metabolism in the higher termite *Nasutitermes walkeri* (Hill). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 291–303, 1997.
- SU, L. et al. Variation in the Gut Microbiota of Termites (*Tsitermes ampliceps*) Against Different Diets. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 93, p. 1–16, 2016.
- SUÁREZ, M. E.; THORNE, B. L. Rate, Amount, and Distribution Pattern of Alimentary Fluid Transfer via Trophallaxis in Three Species of Termites (Isoptera: Rhinotermitidae, Termopsidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 93, n. 1, p. 145–155, 2000.
- TANAKA, H. et al. Influence of the diet components on the symbiotic microorganisms community in hindgut of *Coptotermes formosanus* Shiraki. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 907–917, 2006.
- TAYASU, I. et al. Nitrogen and carbon stable isotope ratios in the sympatric Australian termites, *Amitermes laurensis* and *Drepanotermes rubriceps* (Isoptera: Termitidae) in relation to their feeding habits and the quality of their food materials. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 297–301, 2002.
- THOMPSON, C. L. et al. “*Candidatus Arthromitus*” revised: Segmented filamentous bacteria in arthropod guts are members of Lachnospiraceae. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 1454–1465, 2012.
- TOKUDA, G.; SAITO, H.; WATANABE, H. A digestive β -glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): Distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5- and 3-RACE amplifications with degenerate primers. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 12, p. 1681–1689, 2002.
- WANG, Y. et al. Diversity and resilience of the wood-feeding higher termite *Mironasutitermes shangchengensis* gut microbiota in response to temporal and diet variations. **Ecology and Evolution**, n. August, p. 8235–8242, 2016.
- WARNECKE, F. et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 560–565, 22 nov. 2007.
- YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, v. 36, n. 5, p. 808–812, 2004.
- ZHANG, D. et al. Characterization of a new endogenous endo- β -1,4-glucanase of Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 4, p. 211–218, 2011.
- ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 8, n. 6, p. 379–388, 2008.

CONCLUSÕES GERAIS

- A casta responsável pela descoberta do alimento e recrutamento dos demais membros da colônia em *Cornitermes cumulans* é a casta operária;
- A dinâmica do forrageamento em *C. cumulans* é dividida em fases;
- Operários forrageiros apresentam mandíbulas significativamente mais desgastadas quando comparadas àquelas de operários coletados no interior do ninho;
- Operários de *C. cumulans* carregam pedaços inteiros de alimento na mandíbula para o interior do ninho e “colam” nas paredes do mesmo;
- O alimento armazenado por *C. cumulans* potencializa a degradação da biomassa vegetal garantindo vantagem quanto a espécies simpráticas que não armazenam alimento (*Procornitermes araujo*);
- A parede de ninhos de *C. cumulans* e o alimento armazenado possuem comunidades microbianas semelhantes, predominando bactérias do filo Actinobacteria e Proteobacteria, conhecidas pela capacidade celulolítica, hemicelulolítica e fixação de nitrogênio;
- A microbiota intestinal foi dominada por Spirochaetes (*Treponema sp*: Spirochaetes) em *C. cumulans* e Firmicutes (*Candidatus Arthromitus*: Clostridia) em *Procornitermes araujo*, bactérias conhecidas pela fixação de nitrogênio atmosférico como meio de enriquecimento de dietas pobres em nitrogênio e fermentação do carboidrato através da acetogênese como forma de obtenção de energia, respectivamente;
- Este estudo representou a primeira descrição da comunidade microbiana intestinal e das paredes do ninho em *P. araujo* e ampliou a diversidade até então conhecida de *C. cumulans* por meio de técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (Illumina).
- A presente pesquisa representa um avanço na compreensão da simbiose entre térmites e microrganismos, pois bactérias presentes no alimento armazenado colaboram antecipadamente na degradação da biomassa vegetal pelas bactérias simbiontes intestinais presentes nos cupins.
- Este estudo fornece ainda, uma base para análises “ômicas”
- Conhecimento das enzimas (dos cupins e de seus simbiontes) gera tecnologia para os biocombustíveis de segunda geração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T. Evolution of life types in termites. In: KAWANO, S.; CONNELL, J.H.; HIDAKA, T. (Ed.). **Evolution and Coadaptation in Biotic Communities**. Tokyo: University of Tokyo press, 1987. p. 125–148.
- ARAÚJO, A. P. A.; ARAÚJO, F. S.; DESOUZA, O. Resource Suitability Affecting Foraging Area Extension in Termites (Insecta , Isoptera). **Sociobiology**, v. 57, n. November 2014, p. 271–283, 2011.
- BAGINE, R. K. N. **The Role Of Termites In Litter Decomposition And Soil Translocation With Special Reference To Odontotermes In Arid Lands Of Northern Kenya**. University of Nairobi, 1982.
- BAGINE, R. K. N. Soil Translocation by Termites of the Genus *Odontotermes* (Holmgren) (Isoptera : Macrotermitinae) in an Arid Area of Northern Kenya. **Internacional association for ecology**, v. 64, n. 2, p. 263–266, 1984.
- BAGINE, R. K. N. Plant litter consumption by termites in an arid environment of northern Kenya. **Sociobiology**, v. 15, n. 2, p. 113–124, 1989.
- BIGNELL, D. E. Relative assimilations of ¹⁴C-labelled microbial tissues and ¹⁴C-plant fibre ingested with leaf litter by the millipede *Glomeris marginata* under experimental conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, n. 6, p. 819–827, 1989.
- BIGNELL, D. E. Termites as soil engineers and soil processors. In: KÖNIG, H.; VARMA, A. (Eds.). **Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates**. Berlin Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg, 2006. p. 183–220.
- BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. **Biology of termites: A Modern synthesis**.
- BOURGUIGNON, T. et al. Feeding ecology and phylogenetic structure of a complex neotropical termite assemblage, revealed by nitrogen stable isotope ratios. **Ecological Entomology**, v. 36, n. 2, p. 261–269, 2011.
- BOURGUIGNON, T. et al. Mitochondrial Phylogenomics Resolves the Global Spread of Higher Termites, Ecosystem Engineers of the Tropics. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 589–597, 1 mar. 2017.
- BREZNAK, J. A. Phylogenetic Diversity and Physiology of Termite Gut Spirochetes. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 2, p. 313–318, 2002.
- BREZNAK, J. A; BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Most**, 1994.
- BRUNE, A. **Termite guts: The world's smallest bioreactors** **Trends in Biotechnology**, 1998.
- BRUNE, A. et al. **Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts**. **Nature reviews. Microbiology**, 2014.
- BUSCHINI, M. Spatial Distribution Of Nests Of *Cornitermes Cumulans* (Isoptera : Termitidae) In A Pasture In The Municipality Of Rio Claro (Sp) , Brazil. **Ambiência**, v. 2, n. 1, p. 65–72, 2006.

- CHOUVENC, T.; BASILLE, M.; SU, N. Y. The production of soldiers and the maintenance of caste proportions delay the growth of termite incipient colonies. **Insectes Sociaux**, v. 62, n. 1, p. 23–29, 2014.
- CONSTANTINO, R. Chave ilustrada para identificação dos gêneros de cupins (Insecta: Isoptera) que ocorrem no Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 40, n. 25, p. 387–448, 1999.
- CONSTANTINO, R. Padrões de diversidade e endemismo de térmitas no bioma Cerrado. In: SCARIOT, A. O.; SILVA, J. C. S.; FELFILI, J. M. (Eds.). . **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 319–333.
- CONSTANTINO, R. **Cupins de Cerrado**. 1º edição ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2015.
- CONSTANTINO, R. **On-Line Termites Database**.
- COSTA-LEONARDO, A. M.; CASARIN, F. E.; CAMARGO-DIETRICH, C. R. R. Identificação e práticas de manejo de cupins em áreas urbanas. In: PINTO, A. S.; ROSSI, M. M.; SALMERON, E. (Ed.). . **Manejo de pragas urbanas**. Piracicaba: CP 2, 2007. p. 41–54.
- COSTA-LEONARDO, A. M. **Cupins-Praga: Morfologia, Biologia e Controle**. Rio Claro: 2002.
- COSTA-LEONARDO, A. M. A new interpretation of the defense glands of neotropical *Ruptitermes* (Isoptera, Termitidae, Apicotermitinae). **Sociobiology**, v. 44, n. 2, p. 391–402, 2004.
- COSTA-LEONARDO, A. M. Arquitetos das paisagens e beiras de estradas. **Ciência Hoje**, v. 36, n. 216, p. 62–65, 2005.
- COSTA-LEONARDO, A. M. Dinâmica do forrageamento em cupins subterrâneos. In: VILELA, E. F. et al. (Eds.). . **Insetos Sociais - da Biologia à Aplicação**. [s.l.] Editora UFV, 2008. p. 347–358.
- COSTA-LEONARDO, A. M.; HAIFIG, I. Pheromones and Exocrine Glands in Isoptera. In: LITWACK, G. (Ed.). . **Pheromones. Vitamins & Hormones**. [s.l.] Academic Press, 2010. v. 83p. 521–549.
- COSTA-LEONARDO, A. M.; IGNATTI, A. C. A rainha dos cupins. **Ciência Hoje**, v. 15, p. 6–7, 1992.
- COY, M. R. et al. Phenol-oxidizing laccases from the termite gut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 10, p. 723–732, 2010.
- CROSLAND, M. et al. Division of labour in a lower termite: the majority of tasks are performed by older workers. **Animal behaviour**, v. 54, n. 4, p. 999–1012, 1997.
- DARLINGTON, J. P. E. C. Multiple primary reproductives in the termite *Macrotermes michaelseni* (Sjostedt). **Caste differentiation in social insects / guest editors, J.A.L. Watson ; B.M. Okot-Kotber, and Ch. Noirot**, 1985.
- DE NEGRET, H. R. C.; REDFORD, K. H. The Biology of Nine Termite Species (Isoptera: Termitidae) From the Cerrado of Central Brazil. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 89, p. 81–106, 1982.
- ENGEL, M. S.; GRIMALDI, D. A.; KRISHNA, K. Termites (Isoptera): Their Phylogeny, Classification, and Rise to Ecological Dominance. **American Museum Novitates**, v. 3650, n.

3650, p. 1–27, 2009.

FERNANDES, P. M.; ALVES, S. B. Preferência alimentar e danos de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) às plantas cultivadas em laboratório. **An. Soc. Ent. Brasil**, v. 2, n. 21, p. 125–132, 1992.

FERNANDES, P. M.; CZEPAK, C.; VELOSO, V. R. R. Cupins de montículos em pastagens: prejuízo real ou praga estática? In: FONTES, L. R.; BERTI FILHO, E. (Ed.). . **Cupins: o desafio do conhecimento**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 187–210.

FORTI, L. C.; ANDRADE, M. L. Populações de cupins. In: FONTES, L. R.; BERTI FILHO, E. (Ed.). . **Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins**. Piracicaba: FEALQ, 1995. p. 29–51.

GRASSÉ, PIERRE-P; NOIROT, C. Le polymorphisme social du termite à cou jaune (*Calotermes flavicollis*): les faux-ouvriers ou pseudergates et les mues régressives. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris**, v. 224, p. 219–221, 1947.

GRASSÉ, P.-P. **Termitologia - Tome I**. Paris, New York, Barcelona, Milan, Mexico, Sao Paulo: Masson, 1982.

GRASSÉ, P. P. Sur le nid et la biologie de *Cornitermes cumulans* (Kollar), termite brésilien. **Insect Sociaux**, Insectes Sociaux. v. 5, p. 189–200, 1958.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004.

HINZE, B.; CRAILSHEIM, K.; LEUTHOLD, R. H. Polyethism in food processing and social organisation in the nest of *Macrotermes bellicosus* (Isoptera, Termitidae). **Insectes Sociaux**, v. 49, n. 1, p. 31–37, 2002.

HOLT, J. . Microbial activity in the mounds of some Australian termites. **Applied Soil Ecology**, v. 9, n. 1–3, p. 183–187, 1998.

HONGO, Y. Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2011.

HUGENHOLTZ, P. et al. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 2, p. 366–376, 1998.

HYEON, J. E. et al. Enzymatic degradation of lignocellulosic biomass by continuous process using laccase and cellulases with the aid of scaffoldin for ethanol production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1266–1273, 2014.

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

IPCC. **Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation** Renewable energy sources and climate change mitigation: special report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

JACOBS, B. F. et al. The Origin of Grass-Dominated Ecosystems All use subject to JSTOR Terms and Conditions THE ORIGIN OF GRASS- DOMINATED ECOSYSTEMS '. v. 86, n. 2, p. 590–643, 2014.

KATSUMATA, K. S. et al. Structural changes in lignin of tropical woods during digestion by termite, *Cryptotermes brevis*. **Journal of Wood Science**, v. 53, n. 5, p. 419–426, 2007.

KORB, J. The ecology of social evolution in termites. In: KORB, J.; HEINZE, J. (Ed.). . **Ecology of Social Evolution**. Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 151–74.

KRISHNA, K. et al. Treatise on the Isoptera of the World. Basal Families. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 377, n. 2, p. 205–621, 2013.

LANGE, J. P. Lignocellulose conversion: An introduction to chemistry, process and economics. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2007.

LAVELLE, P. et al. Soil function in a changing world : the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology**, v. 33, n. May 1996, p. 159–193, 1997.

LEE, K. E.; WOOD, T. G. **Termites and soils**. 1971.

LEUTHOLD, R. H.; BADERTSCHER, S.; IMBODEN, H. The inoculation of newly formed fungus comb with *Termitomyces* in *Macrotermes colonies* (Isoptera, Macrotermitinae). **Insectes Sociaux**, v. 36, n. 4, p. 328–338, 1989.

LI, H. et al. Investigation of Age Polyethism in Food Processing of the Fungus-Growing Termite *Odontotermes formosanus* (Blattodea : Termitidae) Using a Laboratory Artificial Rearing System. 2015.

LIMA, J. T.; COSTA-LEONARDO, A. M. Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta: Isoptera). **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 0–0, 2007.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms, 13th Edition**.

MATSUURA, K. et al. Identification of a pheromone regulating caste differentiation in termites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 29, p. 12963–8, 2010.

MILANO, S.; FONTES, L. R. **Cupim e Cidade: Implicações ecológicas e controle**. São Paulo: Conquista Artes Gráficas, 2002.

MYLES, T. G. **Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution** **Sociobiology**, 1999.

NALEPA, C. A. Altricial Development in Wood-Feeding Cockroaches: The Key Antecedent of Termite Eusociality. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds.). . **Biology of Termites: a Modern Synthesis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011a. p. 69–95.

NOIROT, C; DARLINGTON, J. P. E. C. Termite nests: architecture, regulation and defence. In: ABE, T; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (Ed.). . **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. London: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 121–139.

NOIROT, C. La caste des ouvriers, elemento majeur du succès evolutif des Termites. **Revista di Biologia**, v. 75, n. 2, p. 157–195, 1982.

NOIROT, C.; PASTEELS, J. M. Ontogenetic development and evolution o f the worker caste in termites. **Experientia**, v. 43, n. 8, p. 851–952, 1987.

- PONTES, D. S. et al. **Molecular approaches: Advantages and artifacts in assessing bacterial diversity** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007.
- RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 369–394, 2003.
- REDFORD, K. H. The Termitaria of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) and Their Role in Determining a Potential Keystone Species. **Biotropica**, v. 16, n. 2, p. 112–119, 1984.
- ROCHA, M. M.; CANCELLO, E. M.; CARRIJO, T. F. Neotropical termites: revision of *Armitermes* Wasmann (Isoptera, Termitidae, Syntermitinae) and phylogeny of the Syntermitinae. **Systematic Entomology**, v. 37, n. 4, p. 793–827, 12 out. 2012.
- ROISIN, Y. Philopatric reproduction, a prime mover in the evolution of termite sociality? **Insectes Sociaux**, 1999.
- ROISIN, Y. Diversity and evolution of caste patterns. In: ABE, T.; BIGNELL, D.; HIGASHI, M. (Eds.). . **Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 95–119.
- ROISIN, Y.; KORB, J. Social Organisation and the Status of Workers in Termites. In: BIGNELL, D. E.; ROISIN, Y.; LO, N. (Eds.). . **Biology of Termites: a Modern Synthesis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 133–164.
- SANDS, W. A. Mound Population Movements and Fluctuations in *Trinervitermes ebenerianus* (Sjostedt) (Isoptera, Termitide, Nasutitermitinae). **Insectes Sociaux**, v. 12, n. 1, p. 49–58, 1965.
- SCHARF, M. E. et al. Multiple levels of synergistic collaboration in termite lignocellulose digestion. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.
- SCHARF, M. E. Termites as Targets and Models for Biotechnology. **Annual review of entomology**, n. October, p. 1–26, 2014.
- SCHARF, M. E.; TARTAR, A. Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2008.
- SCHMIDT, A. M.; JACKLYN, P.; KORB, J. “Magnetic” termite mounds: Is their unique shape an adaptation to facilitate gas exchange and improve food storage? **Insectes Sociaux**, v. 61, n. 1, p. 41–49, 2014.
- SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 1–6, 2012.
- ŠOBOTNÍK, J. et al. Explosive backpacks in old termite workers. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6093, p. 436, 2012.
- ŠOBOTNÍK, J.; JIROŠOVÁ, A.; HANUS, R. Chemical warfare in termites. **Journal of Insect Physiology**, 2010.
- TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 2003.
- THORNE, B. L. Polygyny in the Neotropical termite *Nasutitermes corniger*: life history consequences of queen mutualism. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 14, n. 2, p. 117–136, 1984.

- THORNE, B. L. Termite terminology. **Sociobiology**, v. 28, p. 253–263, 1996.
- TOKUDA, G., SAITO, H., WATANABE, H. A. digestive beta-glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 12, p. 1681–198, 2002.
- TORALES, G. J. Contribution al conocimiento de las termitas de Argentina (Pcia. de corrientes). *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae). **Facena (Corrientes)**, v. 5, p. 97–133, 1984.
- WALLER, D. A.; LA FAGE, J. P. Nutritional ecology of termites. In: **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. p. 487–532.
- WARNECKE, F. et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 560–565, 22 nov. 2007.
- WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.
- WOOD, T. G.; SANDS, W. A. The role of termites in ecosystems. In: BRIAN, M. V. (Ed.). . **Production Ecology of Ants and Termites**. Cambridge: Cambridge: Cambridge University Press, 1978. p. 245–292.
- ZHANG, D.; ALLEN, A. B.; LAX, A. R. Functional analyses of the digestive β -glucosidase of Formosan subterranean termites (*Coptotermes formosanus*). **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 1, p. 205–210, 2012.