

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 02/03/2019.



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 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 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. araujoii*.

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 grandes 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 filios do domínio Bacteria por intermédio de metodologias baseadas em cultivo de procariotos. Atualmente, estes filios 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 filios, 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 filios 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 simbiontes (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; HONGOHO, 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 simbiontes 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.

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 araujoii*);
- 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 araujoii*, 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. araujoii* 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 térmitas 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, Apicotermatinae). **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 termites 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.