

Universidade Federal De Minas Gerais
Instituto De Ciências Biológicas
Departamento De Biologia Geral
Programa De Pós-Graduação Em Ecologia, Conservação E Manejo De
Vida Silvestre
(PPG-ECMVS)



ARLEU BARBOSA VIANA JUNIOR

**INTERAÇÕES ENVOLVENDO CUPINS: FATORES
AMBIENTAIS ALTITUDINAIS E REVISÃO META-
ANALÍTICA**

Belo Horizonte

2017

ARLEU BARBOSA VIANA JUNIOR

**INTERAÇÕES ENVOLVENDO CUPINS: FATORES AMBIENTAIS
ALTITUDINAIS E REVISÃO META-ANALÍTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida
Silvestre do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ecologia, Conservação e Manejo da
Vida Silvestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico de Siqueira Neves (UFMG)

Co-orientador: Prof. Dr. Og Francisco Fonseca de Souza (UFV)

Belo Horizonte

2017

AGRADECIMENTOS

“*Nósinhora*”, é inacreditável que já se passaram quatro anos que saí do menor estado em território geopolítico do Brasil (Sergipe), da décima nona capital mais populosa desse país (Aracaju), para viver na grande Minas Gerais, especificamente em Belo Horizonte (BH), a sexta maior capital do Brasil. Pense no medo que foi sair de lá para vir para cá, “*nú...*”. Mesmo sem saber o que me aguardava, fui chegando “*de mansinho*”, como dizem no velho e bom mineirês “*cumendo pelas beradas*” e quando me dei conta, já tinha uma família formada aqui. Pense “*num trem baum, sô*”.

Porém eu gostaria de fazer um enorme agradecimento a minha família biológica. Mesmo de forma relutante, me apoiou na escolha de tentar desbravar essa parte do Brasil. Eu não sou o melhor membro da família para demonstrar o quanto sou grato a todos vocês. E é nesse momento, com essas palavras rebuscadas, diante do computador, que venho dizer a cada integrante da minha família o meu MUITO OBRIGADO! A minha tia Hortência que me criou, a minha mãe (Ana Maria) que sempre esteve presente, as minhas tias (Virgínia, Tânia, Izabel) pela crença que me foi dada, aos meus tios (Jorge e Guga) pela solidez, ao grande mestre seu Zaca e a minha tia-avó Guilhermina e minha madrinha Caíta. Não há palavra de agradecimento tudo que foi feito para que eu chegasse até aqui. Agradeço também a Dona Neide e ao seu Lielson por me receber logo quando cheguei em BH e por estar sempre a disposição caso eu precisasse de qualquer ajuda.

Em segundo lugar, e não tem como deixar para depois, quero agradecer a pessoa que me recebeu da melhor maneira possível, o professor orientador Frederico Neves. Você foi uma pessoa muito além ou aquém de um orientador. Tenho em você um mentor, uma pessoa de espírito agregador, me passou a energia do que é ser mineiro, do

que é ser um integrante do LEI (Laboratório de Ecologia de Insetos), do que é ter uma família dentro do ambiente de trabalho, a Villa Parentoni. Nos momentos mais difíceis, onde pensei que boa parte do que tentei construir poderia ter ido por “água abaixo”, eu ouvi de você palavras de apoio, de incentivo e de poder seguir em frente. Muito obrigado professor Fred, realmente você me fez querer ficar nessa terra e não sair dela tão cedo.

Outra pessoa que merece um parágrafo de agradecimento é o professor Ricardo Solar, vulgo Bob. Em você enxerguei a inspiração, a motivação de que se um dia eu for me tornar um bom investigador, eu quero ser igual a você. Muito obrigado por todos os conselhos, palavras de motivação, puxões de orelhas e senso de justiça.

Não posso deixar essa sessão em branco sem falar da parte mais feliz do que tenho de Minas Gerais, a família Villa Parentoni. “*Nósinhora*” que galera sensacional. Risos, experiências, festas e tantas outras coisas que não caberiam nessas páginas. Sem ordem de importância, João Mateus, Izabela Vilani, Fernanda Costa, Marina Beirão, Flavim Raiz (Siqueira), Flavim Nutella (Camarota), Doisberto, Paloma, Gabizola, Bolo doido (Agregado), Rodrigo Massara, Ana Paschoal, Dudu cabeça, Lucas Perillo (maior referência de biólogo que já conheci), Cajuru Demo (Ivan), Leo “gordinho gostoso”, Luiza Panetoni, Reuber cobra criada, Guilherme Capita (e descobri que Capita não é seu sobrenome $\neg \neg$), Rafael Pinheiro, Gabriel Feliz, Augusto Gomes, Fábio Túlio, cada um de vocês fazem parte do que eu sou hoje. Meu muito obrigado a cada um. E aqui gostaria de deixar um agradecimento especial a cada mulher dessa família que pude conhecer. Para mim vocês representam muito bem o que é a força da mulher na ciência e foi com vocês que aprendi o quanto todos nós (homens e mulheres) precisamos lutar para uma equidade de gênero na ciência, então dessa forma coloco aqui o meu apoio #WomenInScience.

Porém dentro dessa gigante família, duas pessoas foram muito especiais. A primeira dela é o meu amigo e irmão Rafael Almeida. Bicho, que foi isso, hein! Estou aqui a meia hora, com o cursor do teclado ativo, sem saber o que falar do que foi nossa parceira. Acho que se eu descrever não caberia nessas linhas, nesse espaço, não caberia nessa tese. O apoio foi tão imenso que essa tese tem uma grande contribuição sua. Meus campos, no qual você foi em todos, sem pestanejar, sem dizer em nenhum dia que não poderia, jogando seu carro em cada buraco e subindo cada serra com um esforço surreal na qual eu percebia que só a nossa amizade era que lhe dava força. Cara muito obrigado mesmo. Esses quatro foram os melhores da minha vida porque em 50% deles era a gente junto. Valeu meu parceiro!

A outra pessoa se chama Ludmila Rufnagel. Eita “*trenzin*” sinistro essa “*muiê*”. Lurdinha minha filha, que mulher sensacional eu pude conhecer em você. Jamais poderia imaginar uma amizade tão fraternal, tão honesta, tão alegre, tão bonita, tão alcoólica quanto a nossa. Aprendi com você a melhor parte do povo mineiro. Aprendi com você o que é fazer parte da nossa “tradicional família mineira”. Foi com você que conheci coisas da qual não merecem ser colocadas nesse texto. Espero que você lembre daquele momento lá nos meus primeiros dias de BH, no meu primeiro “buteco da bio” (risos). Foi com os seus ensinamentos, de todos os níveis, que compreendi o que é ser de minas, e porque esse povo tem orgulho de dizer que é mineiro. Está registrado em nossos corações que vamos além desses quatros anos. Saiba que você tem de mim a melhor parte do que sou e por isso lhe digo, obrigado!

Acho que já estou me estendo demais. No entanto não posso deixar em branco o momento mais inimaginável do meu período de doutoramento na UFMG. O meu período de doutorado sanduiche no exterior. Conheci o México por cinco meses, fui recebido maravilhosamente pelo professor Dr. Wesley Dattillo, e conheci grandes

pessoas. A equipe de laboratório é maravilhosa (Pedro Luna, Erick, Diana, Juan e Edgar) e todo o apoio recebido foi sensacional. Todos vocês merecem um grande obrigado.

No entanto, regressando do México, deixei três pessoas da qual jamais esquecerei, Gisele, Julliana e Patrícia. Espero rever todas vocês rapidamente e frequentemente. Essa parte do Brasil no México revirou boa parte daquele país de cabeça para baixo. E parafraseando minha estimada amiga Julliana, “saiba que eu me senti amado por cada uma de vocês...”. Nossos momentos foram inesquecíveis. Obrigado por todo apoio, conversas, discussões, gargalhadas e aconchegos. Com vocês o meu México foi mais Brasil.

Ufa!!! Falta pouco. Meu muito obrigado também tem que ir para Juliana Maria Navia, a “*roomie*” da maior parte do tempo que vivi em BH. Muito obrigado por ter me aguentado por mais de um ano e meio. Foram maravilhosos nossos momentos em nossa casa. Obrigado Juju!

Agradeço imensamente ao secretariado do PPG-ECMVS. Frederico e Cris, vocês aguentam uma barra e tanto para fazer funcionar a máquina da pós-graduação. Além dos meus agradecimentos, peço-lhes também minhas humildes desculpas por qualquer inconveniente e por todo trabalho demasiado que por ventura eu tenha dado. Muito obrigado!

Agradeço também a presença dessa ilustre banca de doutorado, os professores doutores Eraldo Lima (UFV), Ricardo Campos (UFV), Ricardo Solar (UFMG), Milton Barbosa (UFMG), Newton Barbosa (UFMG), Pedro Giovani (UFMG) por aceitar essa tarefa árdua e por todas as sugestões. Agradeço especialmente ao meu co-orientador Og de Souza (UFV) por cada puxão de orelha muito bem dado.

Finalmente, agradeço a Coordenação de Apoio de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da minha bolsa de doutorado. Outros financiamentos como o PELD-CRSC e a PPG em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre por tudo que vem fazendo até este momento.

Aos demais não citados, porém lembrados, meu muito obrigado!!!

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------|----|
| Agradecimentos..... | 03 |
| Dedicatória..... | 09 |
| Resumo Geral..... | 10 |
| General Abstract..... | 12 |
| Introdução Geral..... | 14 |
| General Introduction..... | 19 |
| Referências..... | 23 |
| Capítulo 1..... | 26 |
| Resumo..... | 28 |
| Introdução..... | 30 |
| Material e Método..... | 32 |
| Resultados..... | 37 |
| Discussão..... | 43 |
| Referência..... | 46 |
| Capítulo 2..... | 50 |
| Resumo..... | 52 |
| Introdução..... | 53 |
| Material e Método..... | 54 |
| Resultados..... | 58 |
| Discussão..... | 61 |
| Referência..... | 63 |
| Capítulo 3..... | 67 |
| Abstract..... | 69 |
| Introduction..... | 70 |
| Material and Methods..... | 72 |
| Results..... | 74 |
| Discussion..... | 78 |
| Reference..... | 83 |
| Considerações Finais..... | 87 |

DEDICATÓRIA

Novamente a minha falecida avó, Angélica das Chagas, eu te dedico.

“Tudo está no seu lugar, graças a Deus, graças a Deus...”

RESUMO GERAL

Interações biológicas envolvendo insetos sociais, sejam elas intra ou inter-específicas, têm sido de amplo interesse à comunidade científica. Essas interações nos ajudam a compreender os aspectos sobre a história evolutiva e processos ecológicos envolvendo a origem e o desenvolvimento dos insetos sociais. Além disso, gera conhecimento básico a ser aplicado na conservação e manejo das espécies. Nesta tese de doutorado, dividida em três capítulos, tentamos responder: (i) como fatores ambientais (gradiente altitudinal) têm influência na composição do perfil químico cuticular e na capacidade de reconhecimento intra-específico de *Nasutitermes* cf. *Coxipoensis*; (ii) como o estresse ambiental, causado pela elevação, define as interações inter-específicas entre cupins e seus coabitantes em ninhos de *N. cf. Coxipoensis*; e (iii) quais os efeitos da presença de fungos habitantes da madeira nos comportamentos alimentares e na sobrevivência de cupins. Verificamos que o efeito ambiental gerado pelo gradiente de altitude de uma montanha do sudeste do Brasil não explica de maneira evidente a composição do perfil químico em *N. cf. coxipoensis*. Entretanto, verificamos que a dissimilaridade química de *N. cf. coxipoensis* é afetada pela distância espacial e não pela variação altitudinal. Observamos também que o estresse ambiental provocado pelo gradiente de elevação foi um fator que promoveu a coabitação em ninhos de *N. cf. coxipoensis*. Por último mostramos que a presença de fungos habitantes da madeira tem efeitos positivos ou neutros nos comportamentos alimentares e na sobrevivência de cupins. Em suma, os resultados dessa tese de doutorado destacam como fatores ambientais podem agir sobre as interações envolvendo cupins, além de demonstrar como interações entre fungos e cupins são mais próximas de mutualismo do que de antagonismo.

Palavras-chaves: hidrocarboneto cuticular, interações inter-específicas, interações intra-específicas, Isoptera, meta-análise.

GENERAL ABSTRACT

Biological interactions involving social insects, both intra-and inter-specific, are widely interesting to the scientific community. These interactions help us to understand aspects of the evolutionary history and ecological processes involving the origin and development of social insects. Furthermore, it generates basic knowledge to be applied in the conservation and management of species. In this doctoral thesis, which is divided into three chapters, we try to answer: i) how environmental factors (altitudinal gradient) influence the cuticular chemical profile composition and the ability of intra-specific recognition of *Nasutitermes* cf. *coxipoensis*; ii) how the environmental stress generated by elevation defines the inter-specific interactions between termites and their cohabitants in nests of *N. cf. coxipoensis*; and iii) what are the effects of the wood-inhabiting fungi presence on the termite feeding behaviors and on termite survival? We verified that the environmental effect generated by the altitudinal gradient in a mountain located in the southeastern Brazil does not clearly explain the chemical profile composition to *N. cf. coxipoensis*. However, we verified that the chemical dissimilarity of *N. cf. coxipoensis* is affected by spatial distance and not by altitudinal variation. We also observed that the environmental stress generated by the elevation gradient was a factor that promoted the cohabitation in nests of *N. cf. coxipoensis*. Finally, we showed that the wood-inhabiting fungi presence has positive or neutral effects on termite feeding behaviors and on termite survival. To conclude, the results of this doctoral thesis highlight how environmental factors can act on the interactions involving termites, besides to demonstrate how the interactions between fungi and termites are closer to mutualism than to antagonism.

Keywords: Cuticular hydrocarbons, inter-specific interactions, intra-specific interactions, Isoptera, meta-analysis.

INTRODUÇÃO GERAL

Existe uma infinidade de interações biológicas, sejam elas entre os indivíduos de uma mesma espécie (intra-específica), ou entre espécies dentro de uma comunidade (inter-específica; Ricklefs 2010). As interações envolvendo insetos sociais, têm interessado cientistas de todo o mundo, seja para compreender a história evolutiva da complexidade da estruturação social (Richard e Hunt 2013) ou para a conservação das espécies (Tylianakis et al. 2009). As interações intra-específicas têm ganhado destaque uma vez que nos ajudam a compreender a ecologia e a evolução da comunicação social (Leonhardt et al. 2016). Já as associações inter-específicas, interações do tipo antagonismos e mutualismos, têm sido estudadas em uma gama de grupos de insetos sociais como abelhas (Genini et al. 2010, Ramírez-Flores et al. 2015), formigas (Barriga et al. 2015, Costa et al. 2016) e cupins (Campbell et al. 2016, Marins et al. 2016).

A comunicação em insetos sociais fascina os cientistas desde o século passado. Um dos exemplos mais conhecidos foi descrito por Karl von Frisch, no qual as abelhas se movimentam para informar aos companheiros do ninho sobre uma fonte de recurso (von Frisch 1967). Desde então, nossa compreensão sobre mecanismos de comunicação em insetos sociais tem avançado significativamente (Kaib et al. 2004, Sharma et al. 2015, Leonhardt et al. 2016).

Em cupins, cuja maioria das espécies é composta por indivíduos com olhos não funcionais, grupos de compostos químicos são importantes para manutenção da integridade física da colônia e da homeostase social (ex.: divisão de tarefas; Costa-Leonardo et al. 2009). Esses grupos de compostos, conhecidos como semioquímicos, possuem diversas funções que vão desde auxiliar na realização de atividades comportamentais complexas, tais como forrageamento e divisão de tarefas dentro da colônia, a simplesmente ajudar na capacidade de reconhecimento de um indivíduo da

colônia (Costa-Leonardo et al. 2009). Dentre os diferentes tipos de semioquímicos existentes nos cupins, os hidrocarbonetos cuticulares (HCC's) têm ganhado destaque como grupo de composto que auxilia no entendimento da comunicação desses insetos (Blomquist e Bagnères 2010).

Os HCC's têm a função primária de servir como barreira física contra a dessecação dos insetos (Gibbs 2011). No entanto, sabe-se que os HCC's estão envolvidos no reconhecimento entre parceiros de mesmo ninho (Batista-Pereira et al. 2004, Kaib et al. 2004). Dessa forma, quando cupins de colônias diferentes se encontram, pode ocorrer comportamentos agressivos (Rojo e Acda 2016) devido a diferenças na composição química de certos compostos presentes em distintas colônias (Jmhasly e Leuthold 1999, Kaib et al. 2002, Howard e Blomquist 2005). Assim, estudos que envolvem observações e testes desses comportamentos têm sido usados para determinar territórios de forrageamento (Haverty et al. 1999) bem como os caminhos para o entendimento do reconhecimento entre os indivíduos (Su e Haverty 1991).

Ter a capacidade de reconhecer se um indivíduo é companheiro do ninho é extremamente importante para evitar a invasão de possíveis intrusos na colônia (Marins e De Souza 2008). Porém, é muito comum encontrar uma diversidade de outros invertebrados associados aos ninhos de uma espécie, fenômeno conhecido como parasitismo social (Breed et al. 2012). É um grande desafio compreender os processos e mecanismos relacionados à invasão e ao estabelecimento de uma espécie intrusa no ninho do seu hospedeiro. Estudos têm demonstrado que estratégia de evitar conflitos por parte dos inquilinos, regulam a coexistência entre intrusos e hospedeiros (Florencio et al. 2013, Cristaldo et al 2014). Outros fatores, tais como tamanho do ninho, presença de formigas associadas ou distúrbios como fogo podem determinar a quantidade e a probabilidade de se encontrar os coabitantes (Cristaldo et al. 2012, Marins et al. 2016,

Monteiro et al. 2017). No entanto, as interações inter-específicas relacionadas às espécies de cupins vão muito além daquelas relacionadas ao parasitismo social. Por exemplo, interações entre cupins e fungos demonstram como existe uma amplitude de relações que esses insetos podem realizar na natureza (Martin 1992).

Dentre as interações que cupins realizam com fungos, temos exemplos de cupins da família Macrotermitinae (Sands 1969, Rouland-Lefèvre et al. 2006) associados a fungos *Termitomyces*, que utilizam esses fungos na alimentação; outra interação pode ser encontrada com os fungos associados ao aparelho intestinal dos cupins, os quais podem ajudar na degradação da celulose (Breznak e Brune 1994, Barbosa-Silva et al. 2016); e, por último, é comum cupins se associarem com fungos habitantes da madeira, os quais podem auxiliar ou prejudicar os térmitas na busca por recursos celulósicos (Esenther et al. 1961, Amburgey 1979). A fim de compreender qual a importância da presença de um fungo em um determinado recurso utilizado por cupins, muitos estudos avaliam como esses fungos afetam os comportamentos alimentares e a sobrevivência dos termitas (Kamaluddin et al. 2016, Clay et al. 2017). Dessa forma, os resultados gerados a partir dessas interações podem ter aplicação no controle biológico de cupins pragas (Cornelius et al. 2002, 2004, Su 2005). Contudo, além de apresentar um potencial aplicado a estratégias de controles de térmitas, essa relação pode, também, auxiliar em conhecimentos de taxonomia e ecologia do grupo (Wong e Cheok 2001, Maynard et al. 2015). No entanto, não está evidente se a presença de fungos em um recurso tem efeitos positivos ou negativos para os comportamentos alimentares e a sobrevivência dos cupins (Amburgey 1979).

Assim, essa tese tem o objetivo de responder as seguintes perguntas relacionadas às interações intra e inter-específicas envolvendo cupins: i) compreender como a elevação influencia no perfil químico cuticular e na capacidade de reconhecimento de

companheiros de ninho de *Nasutitermes* cf. *Coxipoensis*, ii) testar o efeito do estresse ambiental causado pela elevação na diversidade de coabitantes associados a *N. cf. coxipoensis* e, por último, iii) avaliar quais os efeitos da presença de fungos habitantes da madeira em um recurso utilizado por cupins nos comportamentos alimentares e sobrevivência de cupins. Para tal, a tese está dividida em três capítulos. O primeiro capítulo, destinado a compreender interações intra-específicas, tem como predição que a elevação é um fator capaz de modificar o perfil químico cuticular de *N. cf. coxipoensis* e influenciar na capacidade de reconhecimento em ninhos de *N. cf. coxipoensis*, indicado por testes de agressividade. Essa predição é baseada na premissa que fatores ambientais (temperatura, pluviosidade, etc.) são preditores importantes para a modificação do perfil químico, refletindo, assim, na quantidade de comportamentos agressivos (Valadares et al. 2015, Kaib et al. 2004, Gibbs et al. 1998, Shelton e Grace 1997). Para o segundo capítulo, já em uma escala inter-específica, temos como predição que o estresse ambiental causado por um gradiente altitudinal aumentará a riqueza e abundância de coabitantes associados a ninhos de *N. cf. coxipoensis*. Essa previsão está baseada na premissa da hipótese de gradiente-estresse onde interações simbióticas, aqui cupim-coabitante, aumentam com a elevação do estresse ambiental, uma vez que processos de facilitação são favorecidos em ambientes mais estressantes (Bulleri et al. 2015, Millar e Bennett 2016). No último capítulo, também focado em interações inter-específicas, realizamos uma meta-análise para responder quais os reais efeitos da presença de fungos habitantes da madeira nos comportamentos alimentares e sobrevivência de uma ampla diversidade de cupins. Essa meta-análise foi motivada pelo fato de ser muito comum encontrar na literatura resultados contraditórios (positivos e negativos) sobre os efeitos da presença de fungos nos comportamentos alimentares e sobrevivência de cupins.

GENERAL INTRODUCTION

There are a multitude of biological interactions, whether they be among individuals of a species, or between species within a community (Ricklefs 2010). Both interactions (intra- and inter-specific) involving social insects have interested scientists from all over the world, either to understand the evolutionary history of the complexity of social structuring (Richard and Hunt 2013) or to species conservation (Tylianakis et al., 2009). Intra-specific interactions have gained prominence as they help us understand the ecology and evolution of social communication (Leonhardt et al., 2016). In relation to inter-specific associations, interactions of the type antagonisms and mutualisms have gained prominence in a range of groups of social insects such as bees (Genini et al., 2010, Ramírez-Flores et al., Costa et al., 2016) and termites (Campbell et al., 2016, Marins et al., 2016).

Communication in social insects has fascinated scientists since the last century, where one of the best-known examples was described by Karl von Frisch, in which bees move to inform their nest mates of a resource (von Frisch 1967). Since then, our understanding of communication mechanisms in social insects has advanced significantly (Leonhardt et al., 1996, Sharma et al., 2000, Kaib et al., 2004).

In termites, in which most species are composed of individuals with non-functional eyes, groups of chemical compounds are important for maintaining the colony's physical integrity and social homeostasis (eg division of tasks) (Costa-Leonardo et al. 2009). These groups of compounds, known as semiochemicals, have several functions ranging from assisting in the performance of complex behavioral activities, such as foraging and division of tasks within the colony, to simply assist in the colony's recognition capacity (Costa-Leonardo et al., 2009). Among the different types of semiochemicals in termites, cuticular hydrocarbons (HCC's) have gained

prominence as a composite group that helps to understand the communication of these insects (Blomquist and Bagnères 2010).

HCC's have the primary function of serving as a physical barrier against insect desiccation (Gibbs 2011). However, it is believed that HCCs are involved in the recognition among partners of the same nests (Batista-Pereira et al., 2004, Kaib et al., 2004). This relationship between chemistry and recognition is due to the fact that differences in the chemical composition of certain compounds present in different colonies of the same species increase intercolonial aggression (Howard and Blomquist 2005, Kaib et al., 2002, Jmhasly and Leuthold 1999). Thus, when termites from different colonies meet, aggressive behavior may occur (Rojo and Acda 2016). Thus, studies involving observations and tests of these behaviors have been used to determine foraging territories (Haverty et al., 1999) as well as the ways of understanding recognition among individuals (Su and Haverty 1991).

This way having the capacity to recognize if an individual is a companion of the nest is extremely important to avoid the invasion of possible intruders in the colony (Marins and De Souza 2008). However, it is very common to find a diversity of other invertebrates associated with the nests of a species, a phenomenon known as social parasitism (Breed et al., 2012). It is a great challenge to understand the processes and mechanisms related to the invasion and the establishment of an intrusive species at the nest of its host. Studies have shown that intrinsic processes between species, as a strategy to avoid conflicts, regulate the coexistence between intruders and hosts (Florencio et al., 2013, Cristaldo et al 2014). Other factors, such as nest size, presence of associated ants, or disturbances such as fire can determine the amount and likelihood of encountering cohabitants (Marins et al., 2016, Cristaldo et al., 2012, Monteiro et al. Inter-specific interactions related to termite species go far beyond those related to social

parasitism. For example, interactions between termites and fungi demonstrate how there is a range of relationships that these insects can carry out in nature (Martin 1992).

Among the interactions that termites perform together with fungi are examples of termites of the family Macrotermitinae (Sands 1969, Rouland-Lefèvre et al., 2006) associated to Termitomyces fungi, that use these fungi in the feeding; another interaction can be found with the fungi associated with the intestinal tract of termites, which can help cellulose degradation (Breznak and Brune 1994, Barbosa-Silva et al., 2016); It is also common for termites to associate with wood-borne fungi, in which they can aid or impair termites in the search for cellulosic resources (Esenther et al., 1961, Amburgey 1979).

Thus, this thesis aims to answer the following questions related to intra and inter-specific interactions involving termites: i) to understand how the elevation influences on the chemical cuticular profile and the recognition ability of *Nasutitermes* cf. *coxipoensis*, ii) to test the effect of environmental stress caused by the increase in the diversity of cohabitants associated with *N. cf. coxipoensis* and finally, iii) to evaluate the effects of the presence of woody fungi on a resource used by termites in feeding behaviors and termite survival. For this, the thesis is divided into three chapters. The first chapter, intended to understand intra-specific interactions, predicts that elevation is a factor capable of modifying the cuticular chemical profile of *N. cf. coxipoensis* and influence on the recognition ability in nests of *N. cf. coxipoensis* through tests of aggressiveness. This prediction is based on the premise that environmental factors (temperature, diet, etc.) are important predictors of chemical profile modification, thus reflecting the amount of aggressive behavior (Valibert et al. 1998, Shelton and Grace 1997). For the second chapter, already on an inter-specific scale, we predict that the environmental stress caused by an altitudinal gradient will increase the richness and

abundance of cohabitants associated with nests of *N. cf. coxipoensis*. This prediction is based on the premise of the gradient-stress hypothesis where symbiotic interactions, here term-cohabitant, increase with the elevation of environmental stress, since facilitation processes are favored in more stressful environments (Bulleri et al. Bennett 2016). In the last chapter, also focused on inter-specific interactions, we performed a meta-analysis to answer the real effects of the presence of woody fungi on food behaviors and survival of a wide range of termites. This meta-analysis was motivated while it is very common to find in the literature contradictory results (positive and negative) on the effects of the presence of fungi on feeding behaviors and termite survival.

REFERÊNCIAS

- Amburgey, T.L. (1979). Review and checklist of the literature on interactions between wood-inhabiting fungi and subterranean termite: 1960-1978. *Sociobiology*, 4, 279-296.
- Barbosa-Silva, A.M., Farias, M.A.A., Mello, A.P., Souza, A.E.F.S., Garcia, H.H.M. & Bezerra-Gusmão, M.A. (2016). Lignocellulosic fungi in nests and food content of *Constrictotermes cyphergaster* and *Inquilinitermes fur* (Isoptera, Termitidae) from the semiarid region of Brazil. *Fungal Ecology*, 20, 75-78.
- Barriga, P.A.; Dormann, C.F.; Gbur, E.E. e Sagers, C.L. (2015). Community structure and ecological specialization in plant–ant interactions. *Journal of Tropical Ecology*, 31: 325–334.
- Batista-Pereira, L.G.; Santos, M.G., Corrêa, A.G.; Fernandes, J.B.; Arabb, A.; Costa-Leonardob, A.M.; Dietrich, C.R.R.C.; Pereira, D.A. e Bueno, O.C. (2004). Cuticular hydrocarbons of *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae): analyses and electrophysiological studies. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 135-139.
- Blomquist, G.J. e Bagnères, A.G. (2010). *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Breed, M.D.; Cook, C. e Krasnec, M.O. (2012). Cleptobiosis in social insects. *Psyche*, doi:10.1155/2012/484765.
- Breznak, J.A. Brune, A. (1994). Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by Termites. *Annual Review of Entomology*, 39, 453-487.
- Bulleri, F.; Bruno, F.J.; Silliman, B.R. e Stachowicz, J.J. (2015). Facilitation and the niche: implications for coexistence, range shifts and ecosystem functioning. *Functional Ecology*, doi: 10.1111/1365-2435.12528.
- Campbell, C.; Russo, L.; Marins, A.; DeSouza, O.; Schönrogge, K; Mortensen, D.; Tooker, J.; Albert, R. e Shea, K. (2016). Top-down network analysis characterizes hidden termite–termite interactions. *Ecology and Evolution*, 6: 6178–6188.
- Clay, N.A.; Little, N. e Riggins, J.J. (2017). Inoculation of ophiostomatoid fungi in loblolly pine trees increases the presence of subterranean termites in fungal lesions. *Arthropod-Plant Interactions*, 11: 213–219.
- Cornelius ML, Bland JM, Daigle DJ, Williams KS, Lovisa MP, Connick Jr WJ, Lax AR (2004) Effect of a lignin-degrading fungus on feeding preferences of formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) for different commercial lumber. *J Econ Entomol* 97:1025-1035. doi: 10.1603/0022-0493(2004)097[1025:EOALFO]2.0.CO;2
- Cornelius ML, Daigle DJ, Connick Jr WJ, Parker A, Wunch K (2002) Responses of *Coptotermes formosanus* and *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) to three types of wood rot fungi cultured on different substrates. *J Econ Entomol* 95:121-128. doi: 10.1603/0022-0493-95.1.121

- Costa, F.V.; Mello, M.A.R.; Bronstein, J.L.; Guerra, T.J.; Muylaert, R.L.; Leite, A.C. e Neves, F.N. (2016). Few ant species play a central role linking different plant resources in a network in rupestrian grasslands. *PLoS ONE*, 11(12): e0167161. doi:10.1371/journal.pone.0167161.
- Costa-Leonardo, A.M.; Casarin, F.E. e Lima, J.T. (2009). Chemical communication in Isoptera. *Neotropical Entomology*, 38: 001-006.
- Cristaldo, P.F.; DeSouza, O.; Krasulová, J.; Jiřosová, A.; Kotalová, K.; Lima, E.L.; Sobotník, J. e Sillam-Dussès, D. (2014). Mutual use of trail following chemical cues by a termite host and its inquiline. *PLoS ONE*, 9(1): e85315. doi:10.1371/journal.pone.0085315.
- Cristaldo, P.F.; Rosa, C.S.; Florencio, D.F.; Marins, A.; DeSouza, O. (2012). Termitarium volume as a determinant of invasion by obligatory termitophiles and inquilines in the nests of *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae). *Insectes Sociaux*, 59: 541–548.
- Esenther, G.R., Allen, T.C., Casida, J.E. & Shenepelt, R.D. (1961) Termite attractant from fungus-infected wood. *Science*, 134, 50.
- Florencio, D.F.; Marins, A.; Rosa, C.S.; Cristaldo, P.F.; Araújo, A.P.A.; Silva, I.V. e DeSouza, O. (2013). Diet segregation between cohabiting host and inquiline termite species. *PLoS One*, 8(6): e66535.
- Genini, J.; Morellato, L.P.C; Guimarães-Jr, P.R. e Olesen, J.M. (2010). Cheaters in mutualism networks. *Biology letters*, 6: 494-497.
- Gibbs, A.G. (2011). Thermodynamics of cuticular transpiration. *Journal of Insect Physiology*, 57: 1066–1069.
- Gibbs, A.G; Louie, A. K. e Ayala, J.A. (1998). Effects of temperature on cuticular lipids and water balance in a deserte *Drosophila*: is thermal acclimation beneficial? *The Journal of Experimental Biology*, 201: 71–80.
- Haverty, M.I; Copren, K.A; Getty, G.M. e Lewis, V.R. (1999). Agonistic behavior and cuticular hydrocarbons phenotypes of colonies of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) from Northern California. *Annual Entomology Society American*, 92: 269-277.
- Howard, R.W. e Blomquist, G.J. (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review Entomology*, 50: 371–393.
- Jmhasly, P. e Leuthold, R.H. (1999). Intraspecific colony recognition in the termites *Macrotermes subhyalinus* and *Macrotermes bellicosus* (Isoptera, Termitidae). *Insectes Sociaux*, 46: 164–170.
- Kaib, M.; Jmhasly, P.; Wilfert, L.; Durka, W.; Franke, S.; Francke, W.; Leuthold, R.H. e Brandl, R. (2004). Cuticular hydrocarbons and aggression in the termite *Macrotermes subhyalinus*, *Journal of Chemical Ecology*, 30: 365-385.
- Kamaluddin NN, Nakagawa-Izumi A, Nishizawa S, Fukunaga A, Doi S, Yoshimura T., Horisawa F (2016) Evidence of subterranean termite feeding deterrent produced

by brown rot fungus *Fibroporia radiculosa* (Peck) Parmasto 1968 (Polyporales, Fomitopsidaceae). *Insects* 7:41

- Leonhardt, S.D.; Menzel, F.; Nehring, V. e Schmitt, T. (2016). Ecology and evolution of communication in social insects. *Cell*, 164: 1277:1287.
- Marins, A. e DeSouza, O. (2008). Nestmate recognition in *Cornitermes cumulans* termites (Insecta: Isoptera). *Sociobiology*, 51: 1-9.
- Marins, A.; Costa, D.; Russo, L.; Campbell, C.; DeSouza, O.; Bjornstad, O.N. e Shea, K. (2016). Termite cohabitation: the relative effect of biotic and abiotic factors on mound biodiversity. *Ecological Entomology*, doi: 10.1111/een.12323
- Martin, M.M. (1992). The evolution of insect-fungus associations: from contact to stable symbiosis. *American Zoology*, 32: 593-605.
- Maynard, D.S., Crowther, T.W., King, J.R., Warren, R.J. & Bradford, M.A. (2015) Temperate forest termites: ecology, biogeography, and ecosystem impacts. *Ecological Entomology*, 40, 199-210.
- Millar, N.S. e Bennett, A. E. (2016). Stressed out symbiotes: hypotheses for the influence of abiotic stress on arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*, 182: 625–641.
- Monteiro, I. Viana_Junior, A.B.; Solar, R.; Neves, F.S e DeSouza, O. (2017). Disturbance-modulated symbioses in termitophily. *Disturbance-modulated symbioses in termitophily*. *Ecology and Evolution*, in press.
- Ramírez-Flores, V.A.; Villanueva-Gutiérrez, R; Roubik, D.W.; Vergara, C.H.; Lara-Rodríguez, N.; Dáttilo, W.; Ferrer, M.E.B. e Rico-Gray, V. (2015). Topological Structure of Plant-bee Networks in Four Mexican Environments. *Sociobiology*, 62: 56-64.
- Richard, F.-J. e Hunt, J.H. (2013). Intracolony chemical communication in social insects. *Insectes Sociaux*, 60: 275–291.
- Ricklefs, R.E. *A economia da Natureza*. (2010). 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Rojo, M.J.A. e Acda, M.N. (2016). Interspecific agonistic behavior of *Macrotermes gilvus* (Isoptera: Termitidae): implication on termite baiting in the Philippines. *Journal Insect Behavior*, 29: 273–282.
- Rouland-Lefèvre, C., Inoue, T. & Johjima T. (2006) *Termitomyces/termite interactions*. *Intestinal microorganisms of soil invertebrates* (ed. by König, H. and Varma, A.), pp. 335-350. Springer-Verlag, Berlin.
- Sands, W.A. (1969) The association of termites and fungi. *Biology of Termites* (ed. by Krishna, K. & Weesner, F.M.), pp. 495-519. Academic Press, New York.
- Sharma, K.R.; Enzmann, B.L.; Schmidt, Y.; Moore, D.; Jones, G.R.; Parker, J.; Berger, S.L.; Reinberg, D.; Zwiebel, L.J.; Breit, B; Liebig, J. e Ray A. (2015). Cuticular hydrocarbon pheromones for social behavior and their coding in the ant antenna. *Cell Reports*, 12: 1261–1271.

- Shelton, T. G. e Grace, J.K. Impact of low temperature conditioning on intercolonial agonism in *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology*, 30: 197-211.
- Su NY (2005) Directional change in tunneling of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in response to decayed wood attractants. *J Econ Entomol* 98:471-475. doi: 10.1603/0022-0493-98.2.471
- Su, N.-Y. e Haverty, M.I. (1991). Agonistic behavior among colonies of the formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae), from Florida and Hawaii: lack of correlation with cuticular hydrocarbon composition. *Journal of InsectBehavior*, 4: 115-128.
- Tylianakis, J.M.; Laliberté, E.; Nielsen, A. e Bascompte, J. (2010). Conservation of species interaction networks. *Biological Conservation*, 143: 2270–2279.
- Valadares, L.; Nascimento, D. e Nascimento, F.S. (2015). Foliar Substrate Affects Cuticular Hydrocarbon Profiles and Intraspecific Aggression in the Leafcutter Ant *Atta sexdens*. *Insects*, 6: 141-151.
- von Frisch, K. (1967). *The dance language and orientation of bees* (Cambridge: Harvard University Press).
- Wong, A.H.H. & Cheok, K.S. (2001) Observations of termite-Fungus interactions of potential significance to wood biodeterioration and protection. *Timber Technology Bulletin*, 24, 1-9.

Capítulo 1

**O GRADIENTE ALTITUDINAL NÃO INFLUENCIA COMPORTAMENTOS
AGRESSIVOS EM CUPIM: EFEITOS AMBIENTAIS E ESPACIAIS NA
DISSIMILARIDADE QUÍMICA EM *Nasutitermes cf. coxipoensis***

O GRADIENTE ALTITUDINAL NÃO INFLUENCIA COMPORTAMENTOS
AGRESSIVOS EM CUPIM: EFEITOS AMBIENTAIS E ESPACIAIS NA
DISSIMILARIDADE QUÍMICA EM *Nasutitermes cf. coxipoensis*

A. B. VIANA-JUNIOR^{1,2*} • P. MITRAUD¹ • D. M. VIDAL³ • P. H. G. ZARBIN⁴ • F. S. NEVES^{1,2}

¹ *Laboratório de Ecologia de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

² *Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

³ *Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

⁴ *Department of Chemistry, Federal University of Parana, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil*

*Manuscrito a ser submetido a *Journal Chemical Ecology*.

Resumo – Em insetos sociais a capacidade de distinguir os indivíduos do ninho dos demais é essencial para a manutenção da atividade social da colônia. Como os fatores ambientais e espaciais são capazes de modificar o perfil químico cuticular, esses fatores podem influenciar na capacidade de reconhecimento entre os indivíduos. Dessa forma, neste estudo, testamos como a variação altitudinal influencia na composição química dos lipídios cuticulares e se os efeitos ambientais são mais fortes que os efeitos espaciais para explicar a dissimilaridade química em *Nasutitermes cf. coxipoensis*. Realizamos testes de agressividade para verificar se a elevação influencia no número de comportamentos agressivos entre pares de ninhos. Observamos que a elevação somente influenciou a mudança na composição do perfil químico quando avaliamos a matriz completa de compostos e os monometil-alcanos, porém com baixo poder de explicação ($R^2 = 0.10$ e 0.11 , respectivamente). Mesmo com a correlação entre variação altitudinal e distância geográfica, somente distância geográfica teve relação significativa com a dissimilaridade química entre todos os pares de ninhos. Ou seja, ninhos geograficamente mais distantes são mais dissimilares. Verificamos que os comportamentos agressivos não mudam com a elevação, porém verificamos que o comportamento agressivo foi relacionado com a distância química para o grupo dos *n*-alcanos lineares, mostrando que quanto mais diferentes são para esse grupo de composto, mais agressivos são os pares de colônias. Esses resultados refutam a possibilidade de os efeitos ambientais serem importantes fatores para explicar modificações na composição do perfil químico e na capacidade de reconhecimento de *N. cf. coxipoensis*. Nós sugerimos que fatores genéticos possuem mais força na identificação intercolonial entre indivíduos de *N. cf. coxipoensis* encontrados nos ambientes altimontanos do sudeste do Brasil.

Palavras-chaves – comportamento agonístico, relação dissimilaridade-distância, Isoptera, lípidos cuticulares, semioquímicos.

INTRODUÇÃO

A comunicação entre membros de um grupo social é essencial para a manutenção das funções vitais associadas a vida em sociedade. Dentre essas funções podemos citar a coordenação de atividades, identificação de castas e atribuição de funções dentro da colônia (Richard e Hunt 2013). Em insetos sociais, a camada de hidrocarbonetos cuticulares (HCC's) tem demonstrado, em diversos trabalhos, ter um papel fundamental nessa capacidade de reconhecimento mútuo entre parceiros de ninho (Singer 1998; Blomquist e Bagnères 2010). Os HCC's têm a função primária de servir como barreira física contra a dessecação dos insetos (Gibbs 2011). No entanto, eles podem ajudar como feromônios de reconhecimento de sexo/gênero, cariomônios, reconhecimento intra e inter-específico e, também, para os organismos miméticos não serem reconhecidos como intrusos em ninhos (von Beeren et al. 2011, Sharma et al. 2015, Wurdack et al. 2015). Dentre os HCC's é comum encontrar certos grupos de *n*-alcanos lineares, compostos insaturados (com ligação dupla) e compostos com alguma ramificação metílica (Menzel et al. 2017a). Contudo os padrões associados a esses grupos de compostos podem ser influenciados ambos por fatores genéticos ou do ambiente (Leonhardt et al. 2013, Martin et al. 2013).

Dentre os fatores ambientais que afetam a composição química de HCC's podemos citar a dieta (Florane et al. 2004, Valadares et al. 2015), fatores abióticos como temperatura, pluviosidade e umidade (Shelton e Grace 1997, Menzel et al. 2017a, b, Woodrow et al. 2000, Toolson e Hadley 1979). Entretanto, além de fatores ambientais existem processos espaciais que também podem estar atrelados a dissimilaridade química entre populações (Bonelli et al. 2014). A relação de dissimilaridade-distância descreve como a similaridade da composição de espécies varia dentro da sua distância

geográfica ou ambiental (Morlon et al. 2008). Assim, fatores geográficos sendo importantes, processos neutros, como a capacidade dispersiva de uma espécie, podem estar associados à dissimilaridade. Já para a variação ambiental, processos de nicho são importantes para explicar a (dis)similaridade entre habitats (Fitzpatrick et al. 2013). Dessa forma, tanto processos ambientais quanto espaciais podem contribuir para a diferenciação da composição do perfil químico de uma população (Fitzpatrick et al. 2013, Kaib et al 2004).

A mudança na composição do perfil químico é importante para a capacidade de reconhecimento de insetos sociais e pode ser mensurada pelo comportamento agressivo entre os indivíduos (ver Rojo e Acda 2016). O comportamento agressivo de um indivíduo durante uma luta inclui comportamentos de defesa e/ou ataque (King 1973). Esse comportamento pode ocorrer na tentativa de proteger ou competir por um recurso para o ninho (Thorne e Haverty 1991). Assim, diversos comportamentos podem ser exibidos pelos cupins, como a luta direta, o comportamento de escape ou até submissão (Haverty e Thorne 1989). Embora seja comum visualizar a casta soldado exibir comportamentos agressivos, os operários também são capazes de demonstrar agressão (Thorne 1982, Binder 1988, Haverty e Thorne 1989, Jones 1990, Delaplane 1991, Polizzi e Forschler 1998). Em cupins já foi verificado que o comportamento agressivo aumenta quando existe uma maior dissimilaridade do perfil químico entre os indivíduos co-específicos (Kaib et al. 2004).

Assim os ambientes altimnontanos, por possuírem uma modificação gradual das condições abióticas e estrutura da vegetação, são ótimos lugares para verificar o efeito ambiental e espacial na mudança de perfil cuticular de espécies de cupins. Entretanto, estudos avaliando os efeitos do gradiente altitudinal na mudança do perfil cuticular e na capacidade de reconhecimento de cupins ainda não foram reportados. Dessa forma,

verificamos aqui qual o papel da elevação na composição do perfil químico cuticular e o papel da distância ambiental (variação altitudinal) e espacial na dissimilaridade dos lipídios cuticulares da espécie de cupim *Nasutitermes cf. coxipoensis*, comum em todo o gradiente altitudinal da Serra do Cipó, Minas Gerais (Nunes et al. 2017). Além de determinar os padrões químicos cuticulares, realizamos testes de agressividade para observar qual o efeito da elevação na capacidade de reconhecimento dessa mesma espécie.

Diante do exposto temos como hipótese que fatores ambientais, associados ao gradiente altitudinal, são preditores importantes para a estruturação da composição do perfil químico em *N. cf. coxipoensis*. A partir desta mudança composicional, esperamos que a variação altitudinal seja mais importante para a dissimilaridade química entre pares de ninhos do que a distância geográfica, uma vez que fatores ambientais afetam a composição química cuticular de cupins (Kaib et al. 2004). Finalmente, esperamos que a quantidade de agressividade seja influenciada pela elevação, uma vez que a quantidade de comportamento agressivo está relacionada à dissimilaridade química dos ninhos, e a diferença química relacionada ao gradiente de altitude.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. Conduzimos o estudo ao longo do gradiente altitudinal de cerrado e campo rupestre situado na Serra do Cipó, no município de Santana do Riacho (ver Fernandes et al. 2016). A Serra do Cipó está inserida na Área de Proteção Ambiental Morro da Pedreira, localizada na parte sudeste da cadeia do Espinhaço, no estado de Minas Gerais, Brasil. O clima da região é considerado mesotermal (Cwb), de acordo com a classificação de Köpper, com precipitação média anual variando entre 1,300 mm e 1,622 mm (Ribeiro e Figueira 2011, Negreiros et al. 2014, Carvalho et al. 2014). As

condições climáticas locais dentro do gradiente altitudinal da Serra do Cipó mudam como qualquer padrão climático global elevacional (diminuição da temperatura e aumento da umidade do ar e padrão unimodal para pluviosidade; Fernandes et al. 2016;

Fig. 1).

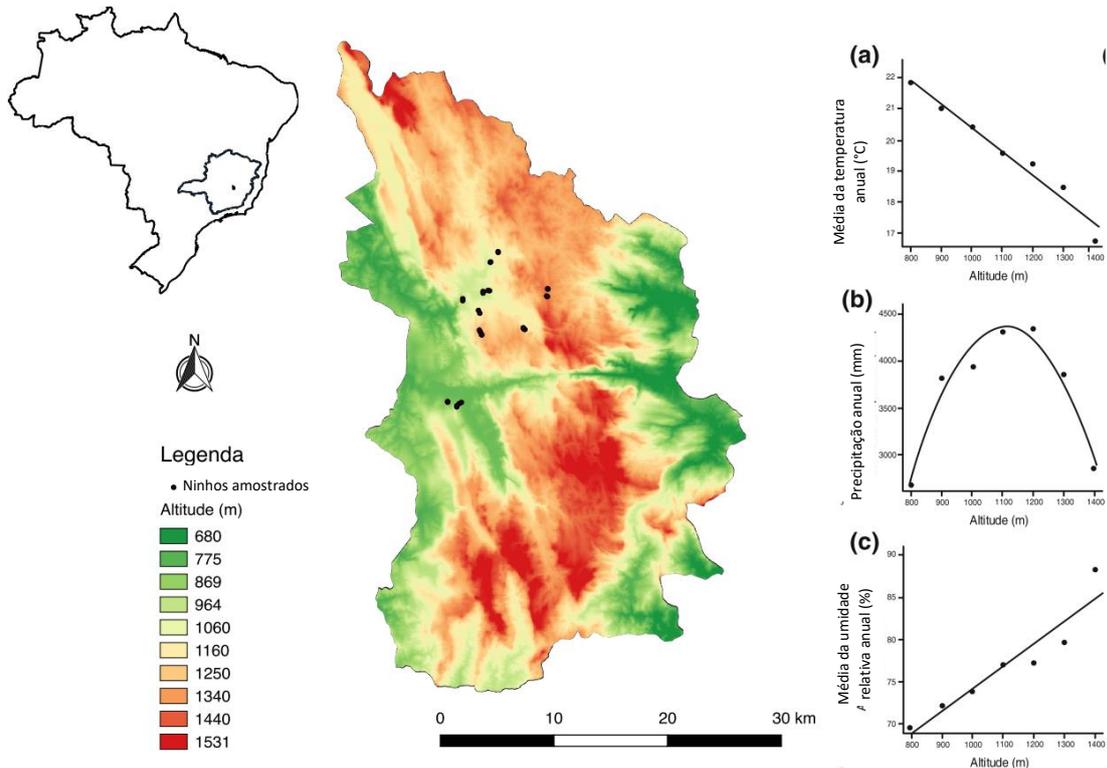


Fig. 1 – Mapa da área do Parque Nacional Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Os pontos negros são a localização dos ninhos amostrados. Detalhe do lado direito mostra a variação de temperatura (a), pluviosidade (b) e umidade (c) em relação à elevação (gráficos retirados de Fernandes et al. 2016).

Modelo de estudo: Foram utilizados como modelo de estudo ninhos da espécie de cupim *Nasutitermes cf. coxipoensis* (Holmgren). Essa espécie é muito comum em regiões tropicais e frequentemente encontrada associada a campos e solos arenosos (Almeida et al. 2016). Na área de estudo essa é a espécie mais abundante (Nunes et al. 2017) e seu ninho se caracteriza por possuir uma superfície irregular com protuberâncias granulares. A parede do ninho possui uma consistente e fina camada de areia e a parte aérea é facilmente removida. A coloração dos ninhos varia de marrom

claro e escuro a marrom avermelhado (Laffont et al. 2012). Para todos os experimentos utilizamos um total de 30 ninhos, no qual foram manejados como descritos abaixo.

Extração dos lipídios cuticulares e análises dos hidrocarbonetos. Os compostos cuticulares foram extraídos em triplicatas de um *pool* de 50 indivíduos da casta de operários de cada um dos 30 ninhos utilizados nos ensaios comportamentais (ver abaixo). Antes da extração os indivíduos foram colocados temporariamente em freezer para diminuir o seu metabolismo e assim facilitar a coleta sem haver qualquer dano aos indivíduos. Os indivíduos coletados foram imersos em uma mistura de dois ml *n*-hexano + 100 µl de tridecanoato de metila, por dois minutos. Após esse período, o solvente foi removido e os extratos resultantes armazenados em vials de 1.5 ml para análise em um espectrômetro Shimadzu QP2010 Plus, operando em modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV, *fullscan*), acoplado à um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010. As amostras foram injetadas em modo *splitless* e eluídas em uma coluna capilar DB-5 (30 m X 0,25 mm d.i.; 0,25 µm de espessura de filme; Agilent Technologies, EUA), sob um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, mantida por 1 minuto. Após esse tempo, a temperatura sofreu acréscimos de 7 °C/min até alcançar 270 °C, mantendo-se nesse valor por 30 minutos.

As identificações dos compostos foram realizadas com base na comparação de seus respectivos espectros de massa com os descritos na literatura e também na biblioteca NIST, assim como através de seus respectivos índices de retenção (Carlson et al. 1998). A quantificação dos componentes presentes nos extratos foi realizada através de padronização interna (tridecanoato de metila). Os índices de retenção foram calculados com base no método proposto por van den Dool e Kratz (1963). Para isto, uma solução estoque contendo os hidrocarbonetos lineares de C₁₀ e C₃₆ foi preparada

com concentração próximo de 10 ppm para cada componente. Alíquotas contendo 1 µl da solução de hidrocarbonetos e 1 µl do extrato natural foram analisados por cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM). A rampa de temperatura do CG foi programada para iniciar em 50 °C, com acréscimo constante de 3 °C.min⁻¹ até 300 °C, mantendo-se a esta temperatura por 10 minutos. As análises foram realizadas no mesmo tipo de coluna descrito anteriormente.

Ensaio comportamentais. Um total de 15 pares (n = 30) de ninhos da espécie *Nasutitermes cf. coxipoensis* (Holmgren) foram coletados ao longo do gradiente altitudinal da Serra do Cipó. A escolha dos ninhos foi feita arbitrariamente seguindo critérios de distância mínima entre os pares (> 50 m) e ao longo do gradiente altitudinal manejável para o nosso objetivo. Para cada termiteiro marcamos a elevação e a coordenada geográfica, e posteriormente colocamos em sacos plásticos para realização dos ensaios comportamentais em laboratório. Em placas de Petri de seis centímetros de diâmetro por um centímetro de altura, forrada com papel filtro e umedecida com água, montamos 10 réplicas de ensaios comportamentais para cada par de ninho. Cada ensaio continha cinco operários de cada colônia de um par no qual foram realizadas observações durante cinco minutos em intervalos de 30 segundos. Em cada intervalo de tempo foram registrados três possíveis comportamentos: exame, que consiste em antenação ou palpação; alarme, ou seja, visualização de tremores rápidos para cima e para baixo ou perseguições; e agressão, que compreende lutas diretas por mordidas e apreensões. Dessa forma cada comportamento teve um escore que variou entre 0 (nenhum comportamento visualizado) e 10 (máximo de eventos possíveis; Jmhasly e Leuthold 1999).

Análises estatísticas. Para verificar se a composição química cuticular muda com a altitude, geramos uma matriz química utilizando apenas os compostos que contribuíram $\geq 0.5\%$ do total de componentes identificados (Valadares et al. 2015, Bonelli et al. 2014) e transformamos a matriz em raiz quadrada para reduzir a amplitudes dos valores dos compostos (Valadares et al. 2015). Realizamos análises de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) para verificar se a composição química está relacionada com a elevação registrada de cada ninho (9999 permutações, método = “Bray”). Nós representamos os resultados da PERMANOVA com um gráfico de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS).

Para entender se o perfil cuticular é mais influenciado pelos fatores ambientais ou pelos espaciais, testamos as correlações dos dados químicos com a distância geográfica e com a variação altitudinal entre todos os ninhos ($n = 30$) usando teste de Mantel sobre a dissimilaridade de Bray-Curtis para as distâncias químicas (9999 permutações, pacote *vegan* do R; Leonhardt et al. 2013, Frizzi et al. 2015).

Avaliamos como o número de comportamentos agressivos varia em função da elevação e distância química, construindo modelos lineares generalizados seguindo distribuição binomial e função de ligação *logit*. Calculamos o índice de agressividade usando a fórmula: $IA = \text{número de comportamentos agressivos} / \text{número total de comportamentos}$. A distância química entre os pares de ninhos usado nos comportamentos de agressividade, foi calculada utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis. Em modelos separados, relacionamos o AI com elevação e com as distâncias químicas dos perfis cuticulares usando diferentes matrizes de compostos: i) compostos totais; ii) *n*-alcanos; iii) monometil-alcanos; e iv) dimetil-alcanos.

RESULTADOS

O perfil cuticular de *Nasutitermes cf. coxipoensis* foi caracterizado por 28 diferentes hidrocarbonetos, em uma variação de tamanho de C₁₂ a C₃₄. A identificação dos lipídios cuticulares é basicamente composta por componentes saturados incluindo *n*-alcanos lineares (sete componentes, 25%) e alcanos com ramificação metílica (42.8% monometil-alcanos, 12 componentes; 28.5% dimetil-alcanos, oito componentes; e 3.5% trimetil-alcano, um componente). A lista dos compostos e seus índices de retenções, com a média e seus desvios padrões estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Média e desvio padrão da concentração cuticular de hidrocarbonetos extraídos da espécie de cupim *Nasutitermes cf. coxipoensis* e usado subsequentemente nas análises estatísticas. Os valores são da média da raiz quadrada das triplicatas realizadas. IR = Índice de retenção.

| Classe química | Componente | IR | Formula química | Média ± (DP) |
|-------------------|------------------------------|------|---------------------------------------|---------------|
| Alcanos lineares | | | | |
| | Eicosano | 1995 | C ₂₀ H ₄₂ | 1.35 ± (0.64) |
| | Tetracosano | 2402 | C ₂₄ H ₅₀ | 2.56 ± (1.15) |
| | Pentacosano | 2504 | C ₂₅ H ₅₂ | 2.63 ± (1.47) |
| | Hexacosano | 2602 | C ₂₆ H ₅₄ | 3.16 ± (1.23) |
| | Heptacosano | 2696 | C ₂₇ H ₅₆ | 3.56 ± (1.07) |
| | Nonacosano | 2905 | C ₂₉ H ₆₀ | 5.08 ± (2.06) |
| | Triacotano | 3005 | C ₃₀ H ₆₂ | 1.62 ± (0.71) |
| Monometil-alcanos | | | | |
| | a-Metil-Pentadecano | 1546 | a-C ₁₆ H ₃₄ | 1.43 ± (0.35) |
| | a-Metil-Heptadecano | 1759 | a-C ₁₈ H ₃₈ | 1.79 ± (0.20) |
| | a-Metil-Nonadecano | 1930 | a-C ₂₀ H ₄₂ | 1.46 ± (0.47) |
| | a-Metil-Pentacosano | 2537 | a-C ₂₆ H ₅₄ | 2.05 ± (0.71) |
| | a-Metil-Heptacosano | 2727 | a-C ₂₈ H ₅₈ | 5.68 ± (1.55) |
| | a-Metil-Heptacosano | 2752 | a-C ₂₈ H ₅₈ | 7.34 ± (3.26) |
| | a-Metil-Octacosao | 2841 | a-C ₂₉ H ₆₀ | 2.35 ± (0.81) |
| | a-Metil-Nonacosano | 2931 | a-C ₃₀ H ₆₂ | 5.85 ± (1.93) |
| | a-Metil-Triacotano | 3033 | a-C ₃₁ H ₆₄ | 1.64 ± (0.74) |
| | a-Metil-Hentriacotano | 3120 | a-C ₃₂ H ₆₆ | 3.34 ± (1.93) |
| | a-Metil-Hentriacotano | 3148 | a-C ₃₂ H ₆₆ | 3.37 ± (1.95) |
| | a-Metil-Tritriacotano | 3354 | a-C ₃₄ H ₆₈ | 1.47 ± (0.46) |
| Dimetil-alcanos | | | | |
| | a,b-Dimetil-Dodecano | 1325 | a,b-C ₁₂ H ₂₆ | 1.39 ± (0.67) |
| | a,b-Dimetil-Octadecano | 1890 | a,b-C ₁₈ H ₃₈ | 1.51 ± (0.50) |
| | a,b-Dimetil-Nonadecano | 1971 | a,b-C ₁₉ H ₄₀ | 2.08 ± (0.80) |
| | a,b-Dimetil-Heptacosano | 2787 | a,b-C ₂₉ H ₆₀ | 3.74 ± (1.76) |
| | a,b-Dimetil-Heptacosano | 2816 | a,b-C ₂₉ H ₆₀ | 1.66 ± (1.17) |
| | a,b-Dimetil-Octacosano | 2877 | a,b-C ₃₀ H ₆₂ | 3.10 ± (0.98) |
| | a,b-Dimetil-Nonacosano | 2973 | a,b-C ₃₁ H ₆₄ | 2.49 ± (1.11) |
| | a,b-Dimetil-Triacotano | 3082 | a,b-C ₃₂ H ₆₆ | 2.58 ± (0.83) |
| Trimetil-alcanos | | | | |
| | a,b,c-Trimetil-Hentriacotano | 3207 | a,b,c-C ₃₄ H ₇₀ | 1.82 ± (0.78) |

Quando analisamos a matriz inteira de hidrocarbonetos, verificamos que o gradiente elevacional é um fator que altera a composição química presente dentro dessa população da Serra do Cipó (Fig. 2 Total). Quando avaliamos os grupos de

hidrocarbonetos separadamente, verificamos que para os *n*-alcanos e os dimetil-alcanos a elevação é um fator que não explica a mudança no perfil químico. (Fig. 2). No entanto a elevação possui efeito na mudança da composição para o grupo dos monometil-alcanos (Fig. 2 Monometil-alcanos).

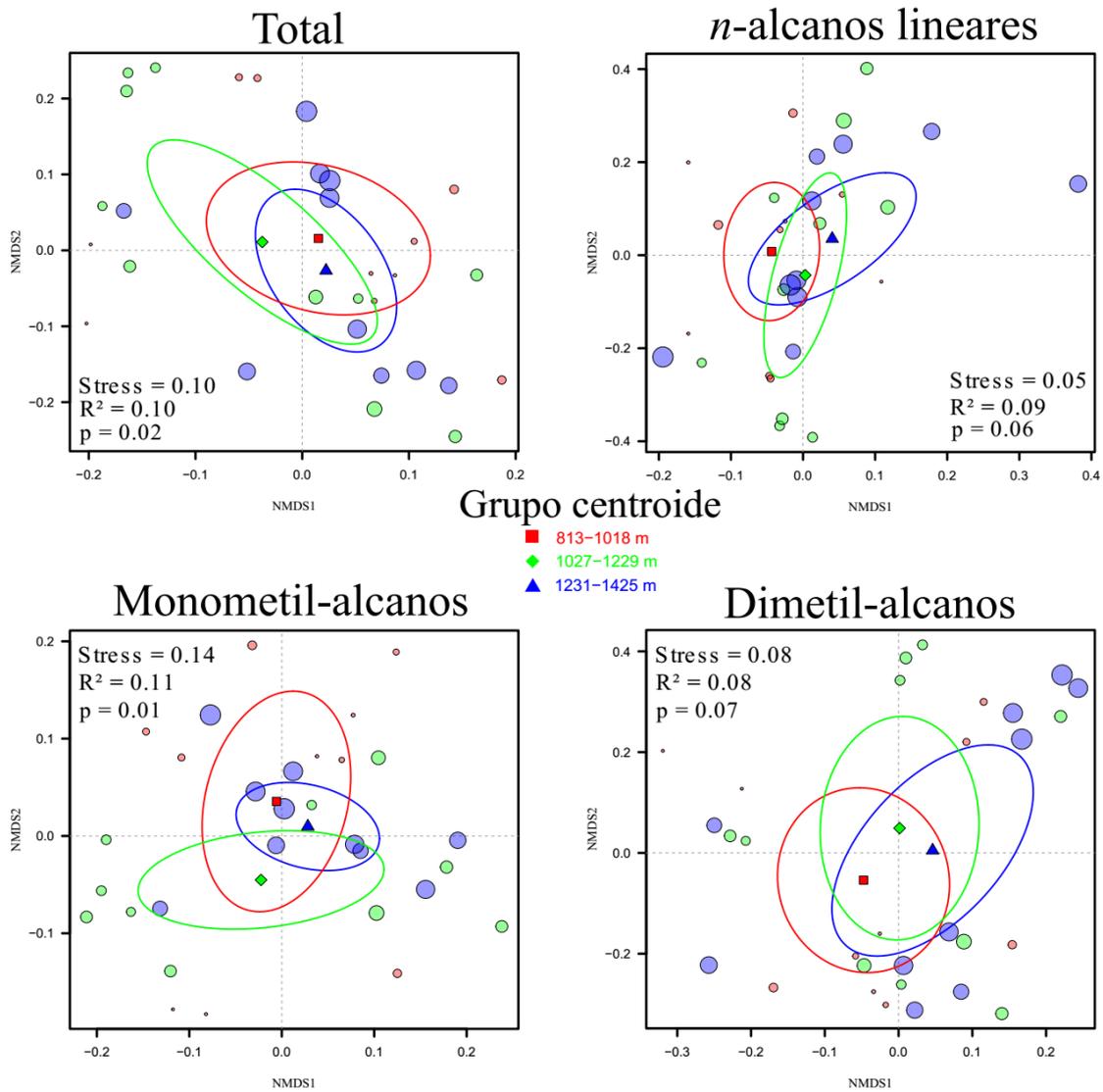


Fig. 2 – Representação dos resultados da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) em um gráfico bi-dimensional de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) dos extratos dos 30 ninhos amostrados. Os tamanhos dos círculos representam a elevação onde foram registrados os ninhos. As cores e os elipses são uma representação subjetiva da categorização dos ninhos em três grupos elevacionais em 95% de intervalo de confiança. Quadrado, triângulo e losango representam os grupos centroides das categorias elevacionais.

Verificamos que existe uma correlação significativa entre distância química e geográfica para os pares de ninhos quando a distância química foi calculada para todos os componentes. Encontramos também relação significativa com a distância geográfica quando calculamos as distâncias químicas para os *n*-alcanos ($r = 0.19$, $p = 0.006$), monometil-alcanos ($r = 0.19$, $p = 0.004$) e dimetil-alcanos ($r = 0.26$, $p = 0.001$). Por outro lado, não foi verificada significância na correlação entre distância química e variação da elevação (total – $r = 0.07$, $p = 0.10$; *n*-alcanos – $r = 0.03$, $p = 0.21$; monometil-alcanos – $r = 0.08$, $p = 0.09$; dimetil-alcanos – $r = 0.06$, $p = 0.11$), mesmo com alta correlação entre variação altitudinal e distância geográfica ($r = 0.52$, $p < 0.001$) (Fig. 3).

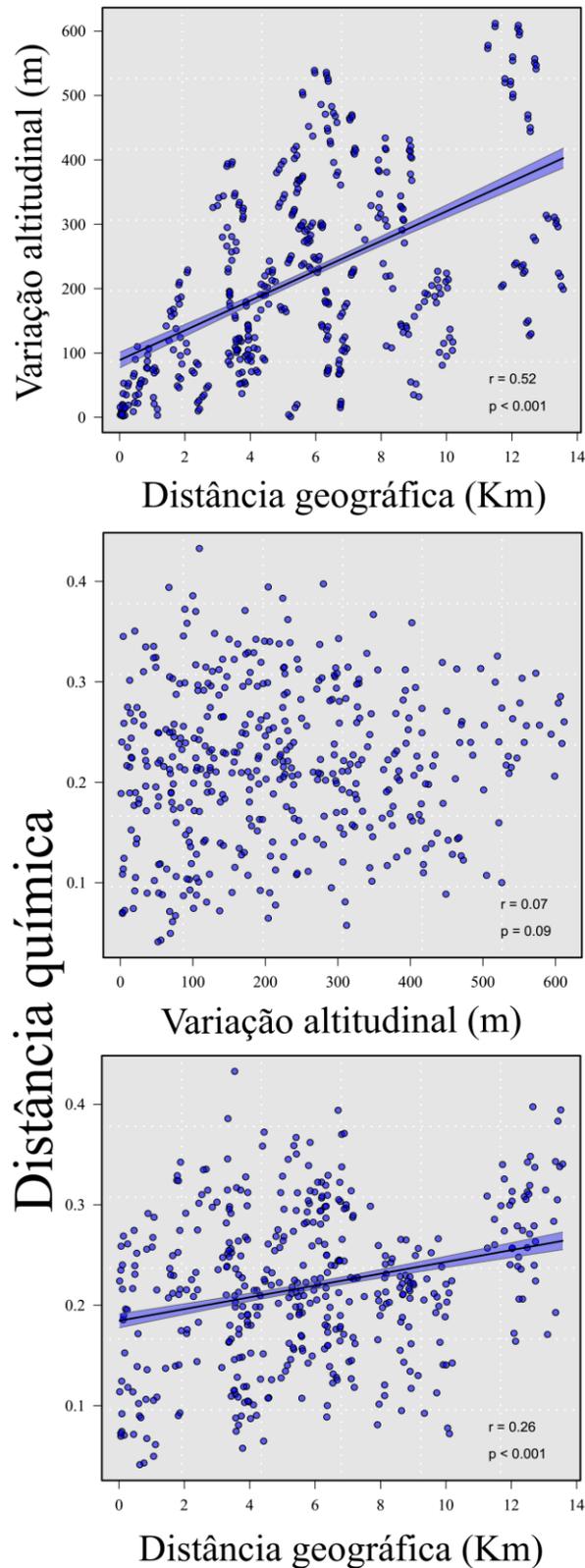


Fig. 3 – Correlações entre distancias químicas, geográficas e variação altitudinal entre todos os pares de ninhos (matriz para todos os compostos). Cada ponto representa um par de ninho de *N. cf. coxipoensis* dentro da população de 30 indivíduos. A área sombreada representa o erro padrão da linha ajustada.

Nas análises de agressividade observamos que não existe uma relação significativa quando avaliamos o índice de comportamento agressivo com a elevação (Deviance = 1.90; d.f. = 1, 13; $p = 0.30$). Quando avaliamos a relação entre o índice de agressividade e distâncias químicas para todos os componentes identificados, grupos de *n*-alcanos, monometil-alcanos e dimetil-alcanos, verificamos que somente os *n*-alcanos mostram uma relação significativa com a capacidade de reconhecimento colonial em *N. cf. coxipoensis* (Fig 4).

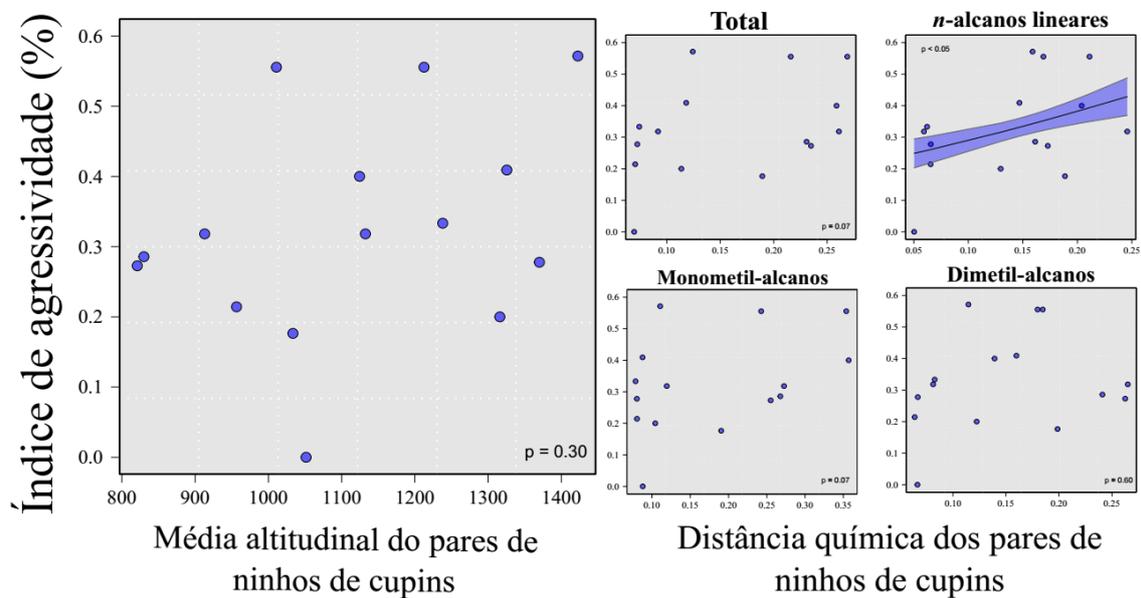


Fig. 4 – Relação entre o índice de agressividade e a elevação média do par de ninho e a distância química para cada um dos componentes, *n*-alcanos, monometil-alcanos e dimetil-alcanos. A área sombreada representa o erro padrão da linha ajustada.

DISCUSSÃO

Mostramos que os *n*-alcanos cuticulares podem ser utilizados para o reconhecimento entre colônias da espécie de cupim *Nasutitermes* cf. *coxipoensis*. Esse resultado não condiz com os padrões encontrados para a maioria das espécies de insetos, onde compostos de cadeia com ramificação metílica são mais propensos a serem considerados componentes de reconhecimento quando comparados aos *n*-alcanos (Gibbs e Rajpurohit 2010, Châline et al. 2005, Dani et al. 2001, Lorenzi et al. 2011, Martin et al. 2008a, b). Isso se deve ao fato dos *n*-alcanos terem pontos de fusão mais elevados que os componentes ramificados, possuindo o papel como um composto importante para proteção contra dessecação (Chung e Carroll 2015). Entretanto, já é bem estabelecido que as vias metabólicas para a produção de hidrocarbonetos como os *n*-alcanos estão sobre controle genético (Blomquist e Bagnères 2010). Esse padrão pode sugerir que a capacidade de reconhecimento, juntamente com a modificação química dos compostos cuticulares dessa espécie de cupim, possa ser controlada mais por fatores genéticos do que ambientais.

Trabalhos evidenciam o possível papel dos *n*-alcanos na capacidade de reconhecimento entre indivíduos de uma mesma espécie. Greene e Gordon (2007), mostraram que é uma mistura de compostos, incluindo *n*-alcanos, são os responsáveis pelo comportamento de reconhecimento em formigas das espécies *Linepithema humile* e *Aphaenogaster cockerelli*. Ou seja, os grupos de componentes isolados não são capazes de incitar respostas agressivas nessas duas espécies. É preciso que haja mudanças nas abundâncias relativas de ambos grupos de compostos, tanto dos *n*-alcanos como dos componentes metil-alcanos (Greene e Gordon 2007).

Apesar de ocorrem mudanças significativas no clima e na estrutura da vegetação na medida em que subimos as montanhas da Serra do Cipó (ver Fernandes et al. 2016),

verificamos que a composição química cuticular não muda quando analisamos todos os compostos cuticulares. Mesmo tendo sido encontrado um efeito significativo para a matriz que inclui todos os compostos, é verificado que apenas os monometil-alcenos são os grupos de compostos que realmente são afetados pela elevação, porém, com uma alta sobreposição para as categorias ($R^2 = 0.11$). O papel ambiental na diferenciação e formação do perfil químico já foi evidenciado em insetos sociais (Valadares et al. 2015, Fournier et al. 2016, Teseo et al. 2014). Entretanto, um resultado semelhante ao nosso foi verificado por Uva et al. (2004) no qual o perfil químico em populações de uma espécie de cupim, *Reticulitermes lucifugus*, é semelhante dentro de uma abrangência de 10 km. Adicionalmente, o estudo de Gibbs et al. (1991) mostrou que, embora existam efeitos ambientais significativos, os fatores genéticos são mais importantes do que os fatores ambientais na determinação de variações nos lipídios cuticulares no gafanhoto *Melanoplus sanguinipes*. A ausência de relação da distância química com a variação altitudinal sugere a inexistência de um efeito ambiental na dissimilaridade química dessa espécie de cupim nas montanhas do sudeste brasileiro. Assim, sugerimos que os efeitos genéticos devem ser preponderantes na determinação dos compostos cuticulares de *N. cf. coxipoensis*.

Apesar de não apresentar uma relação com a elevação, verificamos que a população de *N. cf. coxipoensis* situada na Serra do Cipó parece seguir um padrão de isolamento químico consistente com a hipótese da distância-dissimilaridade. Assim, os efeitos associados à capacidade dispersiva do indivíduo, torna os perfis cuticulares mais semelhantes entre indivíduos mais próximos devido ao isolamento geográfico (Wright 1943, Bonelli et al. 2014). Portanto, se o efeito genético está associado à capacidade de reconhecimento dessa espécie, quando comparado aos efeitos ambientais, não é surpresa esperar essa correlação entre distância química e geográfica. O aumento da distância

pode diminuir o fluxo gênico entre populações, gerando maior diversidade genética entre ninhos mais distantes e refletindo, portanto, no perfil cuticular desses insetos (Bonelli et al. 2014, Thomas e Simmons 2008, Tsutsui et al. 2003, van Zweden et al. 2010).

A compreensão dos fatores que afetam os perfis cuticulares de uma espécie social é importante para o entendimento da evolução da comunicação química e das interações entre indivíduos dentro de uma população local. Em nosso trabalho podemos refutar a importância de fatores ambientais para a formação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de *N. cf. coxipoensis*, principalmente aqueles relacionados à fatores altitudinais. Esses resultados sugerem que fatores genéticos tenham maior relevância na estruturação química dessa espécie localizada na Serra do Cipó e, dessa forma, no reconhecimento de indivíduos da mesma colônia. Investigar simultaneamente como fatores genéticos, espaciais e ambientais contribuem para a comunicação dessa espécie é importantes para entender quais mecanismos afetam a variação geográfica do perfil de HCC em insetos sociais. Assim, podemos concluir que, com a falta de evidência para os efeitos ambientais altitudinais na composição química de *N. cf. coxipoensis*, a não relação da agressividade com a elevação e os efeitos geográficos na dissimilaridade química da cutícula, fatores genéticos tenham influência no fenótipo químico dessa espécie. Todos esses resultados e evidências em conjunto podem, mesmo que minimamente, sugerir um processo de isolamento geográfico entre as populações de *N. cf. coxipoensis* levando a um processo de especiação dentro da área de montanha do sudeste do Brasil.

REFERÊNCIA

- Almeida CS, Cristaldo PF, Florencio DF et al (2016) Combined foraging strategies and soldier behaviour in *Nasutitermes aff. coxipoensis* (Blattodea: Termitoidea: Termitidae). *Behav Process* 126:76–81
- Blomquist, G.J. e Bagnères, A.G. (2010). *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bonelli, M.; Lorenzi, M.C.; Christidès, J.-P.; Dupont, S. e Bagnères, A.-G. (2014). Population Diversity in Cuticular Hydrocarbons and mtDNA in a Mountain Social Wasp. *Journal of Chemical Ecology*, doi: 10.1007/s10886-014-0531-0.
- Carlson, D.A.; Bernier, U.R. e Sutton, B. D. (1998). Elution patterns from capillary CG for methyl-branched alkanes. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 1845-1865.
- Carvalho F, Godoy EL, Lisboa FJG, Moreira FMS, Souza FA, Berbara RLL, Fernandes GW (2014) Relationship between physical and chemical soil attributes and plant species diversity in tropical mountain ecosystems from Brazil. *J Mt Sci* 11:875–883
- Chaline N., Sandoz J. C., Martin S. J., Ratnieks F. L. W., Jones G. R. (2005). Learning and discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honeybees (*Apis mellifera*). *Chem. Senses* 30, 327–335 doi:10.1093/chemse/bji027
- Chung, H. e Carroll, S. B. (2015). Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *Bioessays* 37, 822–830.
- Dani, F.R., Jones, G.R., Destri, S., Spencer, S.H. and Turillazzi, S. (2001) Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Anim. Behav.*, 62, 165–171
- Fernandes, G.W., Almeida, H.A.; Nunes, C.A.; Xavier, J.H.X.; Cobb, N.S.; Carneiro, M.A.A.; Cornelissen, T.; Neves, F.N.; Ribeiro, S.P.; Nunes, Y.R.F.N.; Pires, A.C.V. e Beirão, M.B. (2016). Cerrado to Rupestrian Grasslands: Patterns of Species Distribution and the Forces Shaping Them Along an Altitudinal Gradient. In: G.W. Fernandes (ed.). *Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil*. pp 345-377.
- Fitzpatrick MC, Sanders NJ, Normand, S.; Svenning, J-C; Ferrier S.; Gove, A.D.; Dunn, R.R. (2013). Environmental and historical imprints on beta diversity: insights from variation in rates of species turnover along gradients. *Proc R Soc B* 280: 20131201. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1201>
- Florane, C. B.; Bland, J.M.; Husseneder, C. e Raina, A.K. (2004). Diets-mediated inter-colonial aggression in the Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus*. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 2559-2574.
- Fournier D, de Biseau J-C, De Laet S, Lenoir A, Passera L, Aron S (2016) Social Structure and Genetic Distance Mediate Nestmate Recognition and Aggressiveness in the Facultative Polygynous Ant *Pheidole pallidula*. *PLoS ONE* 11(5): e0156440. doi:10.1371/journal.pone.0156440

- Gibbs AG, Rajpurohit S. (2010). Cuticular lipids and water balance. In G.J. Blomquist e A.G. Bagnères (eds). *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 100-120.
- Gibbs, A.G. (2011). Thermodynamics of cuticular transpiration. *Journal of Insect Physiology*, 57: 1066–1069.
- Greene M.J., Gordon D.M. (2007). Structural complexity of chemical recognition cues affects the perception of group membership in the ants *Linepithema humile* and *Aphaenogaster cockerelli*. *J. Exp. Biol.* 210, 897–905
- Haverty MI, Thorne BL (1989) Agonistic behavior correlated with hydrocarbon phenotypes in dampwood termites, *Zootermopsis* (Isoptera:Termopsidae). *J Insect Behav* 2:523–543
- Jmhasly, P. e Leuthold, R.H. (1999). Intraspecific colony recognition in the termites *Macrotermes subhyalinus* and *Macrotermes bellicosus* (Isoptera, Termitidae). *Insectes Sociaux*, 46: 164–170.
- Kaib, M.; Jmhasly, P.; Wilfert, L.; Durka, W.; Franke, S.; Francke, W.; Leuthold, R.H. e Brandl, R. (2004). Cuticular hydrocarbons and aggression in the termite *Macrotermes subhyalinus*, *Journal of Chemical Ecology*, 30: 365-385.
- King, J.A. (1973). The ecology of aggressive behavior. *Annual Review Ecology System*, 4: 117-138.
- Laffont, E.R.; Coronel, J.M.; Godoy, M.C. e Torales, G.J. (2012). Nest Architecture, Colony Composition and Feeding Substrates of *Nasutitermes coxipoensis* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae) in Subtropical Biomes of Northeastern Argentina. *Sociobiology*, 59: 1-17.
- Leonhardt, S.D.; Rasmussen C., Schmitt, T. (2013) Genes versus environment: geography and phylogenetic relationships shape the chemical profiles of stingless bees on a global scale. *Proc R Soc B* 280: 20130680. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.0680>
- Martin SJ, Helanterä H, Drijfhout FP (2008) Evolution of Species-Specific Cuticular Hydrocarbon Patterns in *Formica* Ants. *Biological Journal of the Linnean Society* 95, 131-140
- Martin SJ, Vitikainen E, Helanterä H, Drijfhout FP (2008) Chemical basis of nestmate recognition in the ant *Formica exsecta*. *Proceedings of the Royal Society B* 275, 1271-1278.
- Martin, S.J.; Vitikainen, E.; Shemilt, S.; Drijfhout, F.P. e Sundström, L. (2013). Sources of Variation in Cuticular Hydrocarbons in the Ant *Formica exsecta*. *Journal Chemical Ecology*, 39: 1415–1423.
- Menzel F, Blaimer BB, Schmitt T. 2017 How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait. *Proc. R. Soc. B* 284: 20161727. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2016.1727>

- Menzel, F.; Zumbusch, M.; Feldmeyer, B. (2017). How ants acclimate: impact of climatic conditions on the cuticular hydrocarbon profile. *Functional ecology*, doi: 10.1111/1365-2435.13008
- Morlon, H.; Chuyong, G.; Condit, R.; Hubbell, S.; Kenfack, D.; Thomas, D.; Valencia, R. e Green, J.L. (2008). A general framework for the distance decay of similarity in ecological communities. *Ecology Letters*, 11: 904–917.
- Negreiros D, Le Stradic S, Fernandes GW, Rennó HC (2014) CSR analysis of plant functional types in highly diverse tropical grasslands of harsh environments. *Plant Ecol* 215:379–388
- Nunes, C. A.; Quintino, A.V.; Constantino, R.; Negreiros, D.; Reis-Junior, R. e Fernandes, G.w. (2017). Patterns of taxonomic and functional diversity of termites along a tropical elevational gradient. *Biotropica*, 49: 186-194.
- Polizzi JM, Forschler BT (1999) Factors that affect aggression behavior among worker caste of *Reticulitermes* spp, subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Insect Behav* 12:133–146
- Ribeiro MC, Figueira JEC (2011) Uma abordagem histórica do fogo no Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. *Biodiv Bras* 2:212–227
- Richard, F.-J. e Hunt, J.H. (2013). Intracolony chemical communication in social insects. *Insectes Sociaux*, 60: 275–291.
- Rojo, M.J.A. e Acda, M.N. (2016). Interspecific agonistic behavior of *Macrotermes gilvus* (Isoptera: Termitidae): implication on termite baiting in the Philippines. *Journal Insect Behavior*, 29: 273–282.
- Sharma, K.R.; Enzmann, B.L.; Schmidt, Y.; Moore, D.; Jones, G.R.; Parker, J.; Berger, S.L.; Reinberg, D.; Zwiebel, L.J.; Breit, B; Liebig, J. e Ray A. (2015). Cuticular hydrocarbon pheromones for social behavior and their coding in the ant antenna. *Cell Reports*, 12: 1261–1271.
- Singer, T.L. (1998). Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *American Zoology*, 38: 394-405.
- Teseo, S.; Lecoutey, E.; Kronauer, D.J.C.; Hefetz, A.; Lenoir, A.; Jaisson, P.; Châline, N. (2014). Genetic Distance and Age Affect the Cuticular Chemical Profiles of the Clonal Ant *Cerapachys biroi*. *Journal of Chemical Ecology*, doi: 10.1007/s10886-014-0428-y.
- Thorne, B.L. (1982). Termite-termite interactions: works as an agonistic caste. *Psyche*, 89: 133-150.
- Thorne, B.L. e Haverty, M. I. (1991). A review of intracolony, intraspecific, and interespecific agosnism in termites. *Sociobiology*, 19: 114-145.
- Toolson, E.C. e Hadley, N. F. (1979). Seasonal Effects on Cuticular Permeability and Epicuticular Lipid Composition in *Centruroides sculpturatus* Ewing 1928 (Scorpiones: Buthidae). *Journal of Comparative Physiology. B*, 129: 319-325.

- Uva, P.; Clément, J.-L. e Bagnères, A.-G. (2004). Colonial and geographic variations in agonistic behaviour, cuticular hydrocarbons and mtDNA of Italian populations of *Reticulitermes lucifugus* (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux*, 51: 163–170.
- Valadares, L.; Nascimento, D. e Nascimento, F.S. (2015). Foliar Substrate Affects Cuticular Hydrocarbon Profiles and Intraspecific Aggression in the Leafcutter Ant *Atta sexdens*. *Insects*, 6: 141-151.
- Van den Dool H, Kratz PD (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. *J Chromatogr* 11: 463-471.
- von Beeren, C.; Schulz, S.; Hashim, R. e Witte, V. (2011). Acquisition of chemical recognition cues facilitates integration into ant societies. *BMC Ecology*, 11: 30-42.
- Woodrow, R.J.; Grace, J.K.; Nelson, J. e Haverty, M.I. (2000). Modification of Cuticular Hydrocarbons of *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae) in Response to Temperature and Relative Humidity. *Environmental Entomology*, 29: 1100—1107.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.
- Wurdack M, Herbertz S, Dowling D, Kroiss J, Strohm E, Baur H, Niehuis O, Schmitt T. 2015 Striking cuticular hydrocarbon dimorphism in the mason wasp *Odynerus spinipes* and its possible evolutionary cause (Hymenoptera: Chrysididae, Vespidae). *Proc. R. Soc. B* 282: 20151777. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.1777>.

Capítulo 2

ESTRESSE ALTITUDINAL MODULANDO COABITAÇÃO EM NINHOS DE CUPINS

Viana-Junior *et al.*

Termitofilia em uma montanha tropical

Estresse altitudinal modulando coabitação em ninhos de cupins

**Arleu Barbosa Viana-Junior^{1,2,5}, Paola Mitraud¹, Wesley Dáttilo³, Og de Souza⁴ e
Frederico de Siqueira Neves^{1,2}**

¹Laboratório de Ecologia de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

²Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

³Red de Ecoetología, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, 91070, Mexico

⁴Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

*Manuscrito a ser submetido a *Biotropica*.

Resumo Gradientes altitudinais são modelos interessantes para verificar padrões e testar hipóteses relacionadas a possíveis mudanças climáticas e estresse ambiental. Interações ecológicas podem ser mais favorecidas quando ambientes possuem condições abióticas mais adversas. Sendo assim, cupins podem ser organismos ideais para testar empiricamente como o estresse ambiental modula a simbiose entre térmitas e seus coabitantes de ninhos. Dessa forma, nós testamos como a riqueza e abundância de coabitantes é afetada pelo gradiente altitudinal em uma montanha tropical localizada do sudeste do Brasil. Amostramos 20 ninhos de cupins da espécie *Nasutitermes* cf. *coxipoensis* ao longo do gradiente de altitude da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Os ninhos foram dissecados e todos os invertebrados coabitantes encontrados foram coletados. Registramos 483 coabitantes, identificados em 66 morfo-espécies dentro das classes Arachnida, Insecta, Crustacea e Myriapoda. Verificamos que tanto riqueza quanto a abundância de coabitantes aumentam significativamente com a elevação. Assim, fornecemos evidência que o estresse abiótico modula a interação entre cupins e os seus termitófilos uma vez que o aumento da altitude aumenta a diversidade de coabitantes (riqueza e abundância). Esses resultados possibilitam discussões sobre como os ninhos de cupins promoverem o efeito espécie-berçário, já que oferecerem condições de microhabitats adequados para outros organismos que estão sob condições adversas externas ao ninho. Por fim, ficou evidente que o estresse ambiental aumenta a termitofilia em ninhos de cupim ao longo de um gradiente altitudinal.

Palavras-chaves: estresse ambiental, espécie-berçário, facilitação, habitat aclimatado, termitofilia.

INTRODUÇÃO

Estresse ambiental pode ser definido como uma influência ambiental que causa mudanças ecológicas mensuráveis (Freedman 1995) e que a frequência continuada do evento impossibilita o meio de voltar ao seu estado anterior (Borics et al. 2013). Dessa maneira, gradientes altitudinais podem servir como exemplos de modelos para testar hipóteses de gradiente-estresse. Nos sistemas altimontanos o aumento da altitude cria um aumento do estresse abiótico influenciando nas interações entre as espécies (Calaway et al. 2002) e determina uma mudança da estrutura da vegetação e da fauna associada (Fernandes et al. 2016, Nunes et al. 2016a, b). A hipótese de gradiente-estresse prediz que a frequência, intensidade e importância de certas interações intrer-específicas são diretamente correlacionadas com os níveis de estresses abióticos (Bertness e Callaway 1994, Brooker e Callaghan 1998, *para mais ver* Maestre et al. 2009). Dessa forma, a simbiose como definida por de Bary (1879) - “*organismos que vivem juntos em um mesmo habitat*” – é um tipo de interação ainda pouco explorada, principalmente quando consideramos a simbiose ao longo de gradientes altitudinais (ver Seckbach e Grube 2010).

O inquilinismo, considerado nesse estudo como um tipo de simbiose, é comum em ninhos de cupins (Cunha e Brandão 2000, Okabe 2013). Distintos organismos podem ser encontrados simultaneamente ocupando ninhos de cupins e essa interação inter-específica é conhecida como termitofilia (Redford 1984, Wang et al. 2002, Cunha et al. 2009, Costa et al. 2009, Costa e Vanin 2010). Os ninhos de cupins com suas paredes isolantes podem proporcionar um habitat adequado e com condições ótimas para algumas espécies em locais que apresentam condições mais adversas (DeSouza et al. 2003, Avitabile et al. 2015, Monteiro et al. 2017). Além disso, os ninhos de cupins podem servir como refúgio contra distúrbios como fogo (Joseph et al. 2011, 2013, Monteiro et al. 2017). Entretanto, a diversidade de inquilinos associados a ninhos de

cupins pode ser influenciada por diversos fatores. Dentre eles, o volume do termiteiro tem efeito positivo na riqueza de coabitantes, relação baseada na associação entre espécie-área (Marins et al. 2016, Cristaldo et al. 2012, Cunha e Moraes 2010, Cunha et al. 2003, Cunha e Brandão 2000). Outro fator é a presença do construtor no ninho, o qual diminui a riqueza e altera a composição de coabitantes (Marins et al. 2016, Lisboa et al. 2013). Além das características intrínsecas do ninho, a presença de formigas compartilhando o ninho com cupins pode, também, alterar os padrões de coabitação (Jaffe et al. 1995, Monteiro et al. 2017). Dessa forma pode-se esperar que haja um aumento da coabitação em ambientes estressantes (Lortie 2007, Monteiro et al. 2017).

Sendo assim investigamos como a riqueza e abundância de coabitantes de ninhos de cupins variam ao longo do gradiente altitudinal de uma montanha do sudeste brasileiro. Esperamos encontrar um padrão inverso do comumente encontrado ao longo de gradientes altitudinais para insetos de vida livre nesse mesmo sistema (*ver* Fernandes et al. 2016, Nunes et al. 2016a, b). Então, esperamos verificar um aumento da riqueza e abundância de coabitantes, pois à medida que o ambiente se torna mais severo com o aumento da elevação, o ambiente estável proporcionado pelos ninhos de cupins torna-se progressivamente mais atraente para os organismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. O estudo foi realizado ao longo do gradiente altitudinal localizado na Serra do Cipó, na porção sudeste da Cadeia do Espinhaço, no estado de Minas Gerais, Brasil (19°100' S e 19°220' S, 43°290' O e 43°360' O). O clima é classificado como tropical de altitude (Cwb Köpper), com média da temperatura anual e pluviosidade de 20 °C e 1500 mm, respectivamente (Madeira e Fernandes 1999, Fernandes et al. 2016). O solo é composto principalmente por quartzito e arenito, é ácido, arenoso e superficial,

com pouca capacidade de retenção de água, concentração oligotrófica e alta concentração de alumínio (Negreiros et al. 2009, 2011). A Serra do Cipó é bem conhecida por sua alta diversidade de plantas e animais, além do grande número de espécies endêmicas e é considerada uma área de paisagens antiga, inférteis e tamponadas historicamente pelos efeitos climáticos (OCBILs; Silveira et al. 2016). No gradiente altitudinal é verificado uma mudança de cerrado *stricto sensu* para campos rupestres, com uma alteração da vegetação e uma queda significativa da riqueza de espécies de plantas (*ver* Mota et al. 2017), além de mudanças nas condições climáticas (Fernandes et al. 2016).

Sistema de estudo: Foram utilizados como sistema de estudo ninhos da espécie de cupim *Nasutitermes cf. coxipoensis* (Holmgren). Essa espécie é muito comum em regiões tropicais e frequentemente encontrada associadas a campos e solos arenosos (Almeida et al. 2016). Na área de estudo essa é a espécie mais abundante (Nunes et al. 2016) e seu ninho se caracteriza por possuir uma superfície irregular com protuberâncias granulares. A parede do ninho possui uma consistente fina camada de areia cuja parte aérea é facilmente removida e possui uma coloração variando de marrom claro e escuro a marrom avermelhado (Laffont et al. 2012).

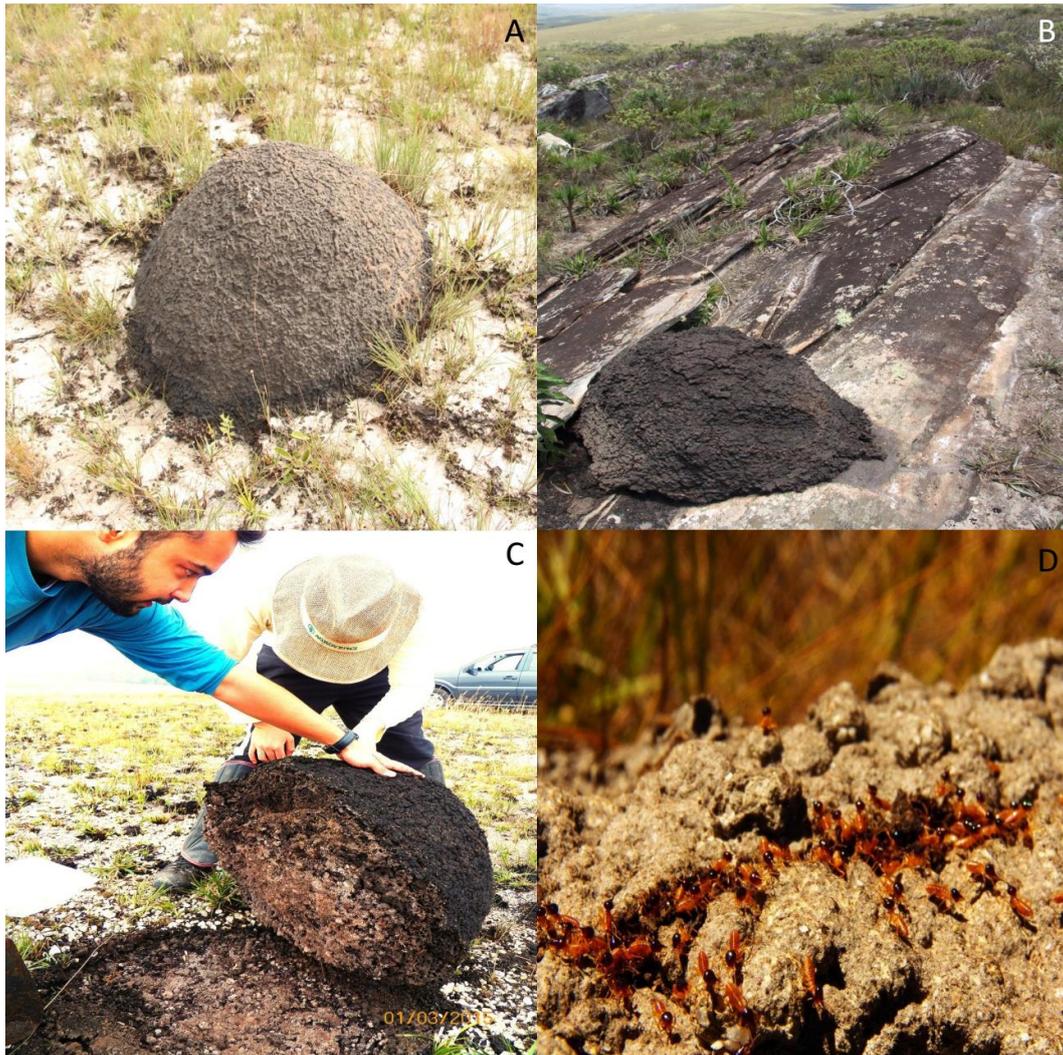


Figura 1 – Ninho de *Nasutitermes* cf. *coxipoensis* (Holmgren) nas áreas da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. A – Ninho de *Nasutitermes* cf. *coxipoensis* em solo arenoso aproximadamente na elevação de 1100 m da Serra do Cipó. B - Ninho de *Nasutitermes* cf. *coxipoensis* em afloramento rochoso aproximadamente na elevação de 1400 m da Serra do Cipó. C – Detalhe demonstrando a retirada completa da parte aérea de um ninho de *Nasutitermes* cf. *coxipoensis* aproximadamente na elevação de 1100 m da Serra do Cipó. D – Detalhe fotográfico da liberação de soldados do ninho de *Nasutitermes* cf. *coxipoensis* após a perfuração da parede do ninho.

Coleta dos dados. Foram coletados 20 termiteiros entre junho de 2015 e setembro de 2016. Nós removemos todos os ninhos, aferimos o seu volume e registramos a sua localização geográfica e elevação. Para garantir que os ninhos coletados eram de colônias distintas, a distância mínima foi de 120 m. A escolha dos ninhos foi feita arbitrariamente, selecionando ninhos de volume acima de 20 L, considerado o volume ideal para encontrar termitófilos (Cristaldo et al. 2012), e dentro da variação altitudinal

continua da Serra do Cipó. Evitamos ninhos em que a presença de colônias de formigas foi evidenciada, pois há indícios de que a formiga atua como um mutualismo de proteção e diminui a quantidade de coabitantes (Monteiro et al. 2017). Os volumes dos ninhos foram calculados com uma fórmula para a forma geométrica que mais se aproximava do formato do ninho, que em nosso caso é semelhante a forma de domo. Assim para calcular o volume utilizamos a fórmula $V = \pi \times d^2 \times h / 6$, onde d é diâmetro basal e h é altura do montículo (Takuma 1990).

Em laboratório, cada ninho foi quebrado em pequenos pedaços que foram batidos cuidadosamente para liberação de todos os organismos encontrados (construtor e coabitante). Após liberação da maior parte dos organismos, o material foi passado em duas peneiras de diferentes malhas. O material retido na malha mais espessa (0.3 mm) e o filtrado na malha mais fina (500 nm) foi descartado e o restante foi armazenado em 80% de álcool. Em microscópio estereoscópico, o armazenado foi cuidadosamente triado e todos os coabitantes encontrados no ninho foram coletados com pinças entomológicas, armazenados em álcool 80%, rotulados e tomados para identificação. A identificação dos coabitantes foi feita para o menor nível taxonômico possível.

Análise dos dados. Para verificar os efeitos do estresse sobre a ocupação termitófila nos ninhos, construímos modelos lineares generalizados (GLMs) utilizando a riqueza de espécies e abundância de termitófilos (não-sociais e sociais) como variáveis resposta e a altitude e o volume de termiteiro como variáveis explicativas. A inserção do volume no modelo se deve ao fato dessa variável ser um importante preditor na dinâmica de invasão de cupins e coabitantes (Marins et al. 2016, Cristaldo et al. 2012, Cunha e Moraes 2010, Cunha et al. 2003, Cunha e Brandão 2000). Para cada variável resposta, um modelo completo foi construído. O modelo mínimo adequado foi obtido com a

retirada dos termos não significativos ($p > 0.05$). Uma análise de correlação de Pearson foi realizada entre volume e elevação para evitar fator de confusão e observamos que as variáveis têm baixa correlação ($r_{\text{Pearson}} = 0.19$). Todos os modelos seguiram inicialmente a distribuição de erros de Poisson e foram submetidos a análises de resíduo, a fim de avaliar a adequação da distribuição de erros. Quando necessário, os modelos foram corrigidos para a sobredispersão usando a distribuição erros binomial negativo (Crawley 2012, Lindén e Mäntyniemi 2011).

RESULTADOS

Nos 20 termiteiros de *Nasutitermes cf. coxipoensis* analisados registramos um total de 483 coabitantes pertencentes a 66 morfoespécies de invertebrados das classes Arachnida, Insecta, Crustacea e Myriapoda. Encontramos duas espécies de ordem social (Insecta: Blattodea e Hymenoptera), das quais três morfoespécies são da família Termitidae e 12 são de Fomicidae. As identidades das morfoespécies bem como a distribuição dos termiteiros nas elevações estão apresentadas na Tabela S1.

A amplitude altitudinal dos ninhos amostrados variou entre 825 e 1411 metros e a amplitude do volume entre 29 e 188 litros. A abundância e a riqueza dos coabitantes foram significativamente relacionadas apenas com a altitude e não encontramos relação significativa com o volume ou interação entre altitude e volume (*ver* Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1. Análise de *deviancia* do modelo mínimo adequado mostrando o efeito da altitude sobre a riqueza e abundância de coabitantes em ninhos de *N. cf. coxipoensis* da Serra do Cipó. N = 20 ninhos. Os modelos abaixo seguem distribuição de erros binomial negativa.

| Variável repostada | Termos | g. l. | Deviância | Pr (>X²) |
|---------------------------|---------------|--------------|------------------|-------------------------------|
| Abundância | | | | |
| | Elevação | 1 | 8.18 | 0.004 |
| | log(Volume) | 1 | 0.22 | 0.632 |
| | Resíduo | 17 | 23.17 | |
| Riqueza | | | | |
| | Elevação | 1 | 4.66 | 0.030 |
| | log(Volume) | 1 | 0.07 | 0.789 |
| | Resíduo | 17 | 22.00 | |

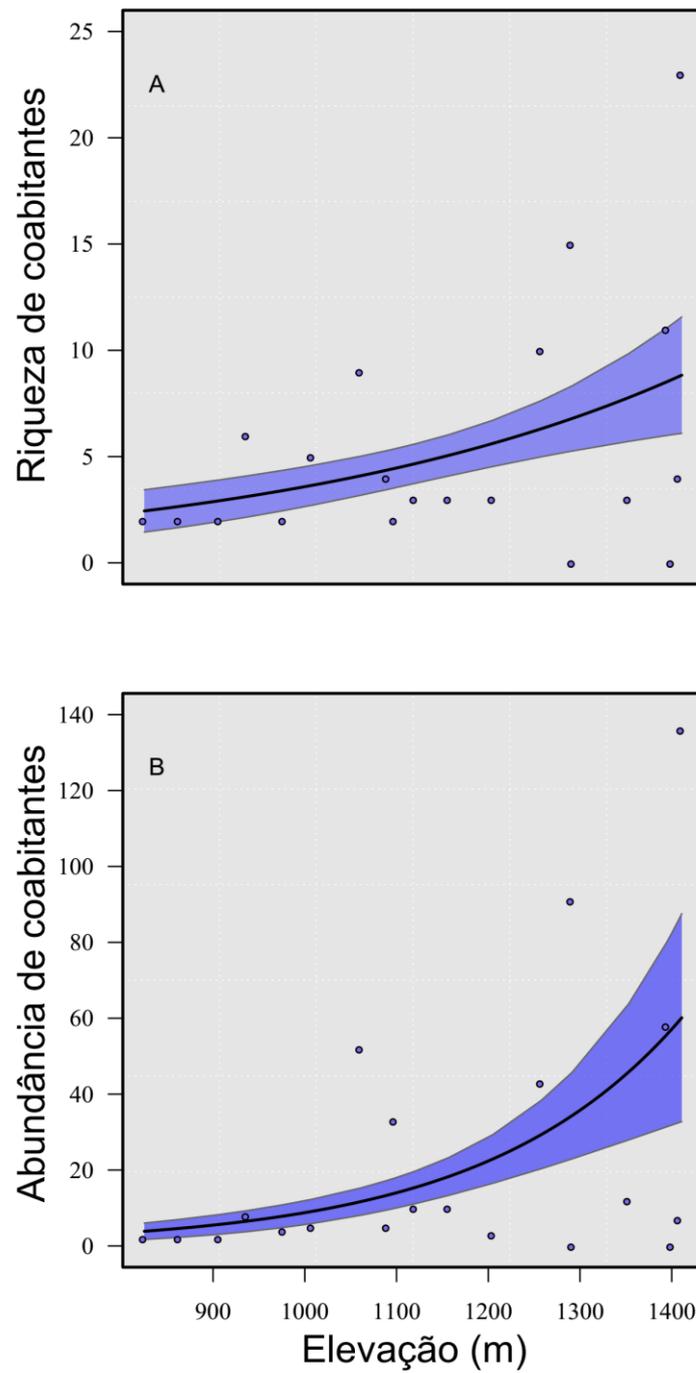


Figura 2 – Relação entre riqueza de espécies (A) e abundância (B) de coabitantes em função da elevação dos ninhos de *Nasutitermes* cf. *coxipoensis* na Serra do Cipó, sudeste do Brasil.

DISCUSSÃO

Mostramos que o estresse ambiental pode agir como um importante mecanismo para o aumento da simbiose em ninhos de *Nasutitermes cf. coxipoensis* uma vez que modela um aumento da riqueza e abundância de coabitantes em cupinzeiros em montanhas tropicais. As condições estáveis encontradas nos termiteiros podem ser uma importante força na estruturação da comunidade de coabitantes, uma vez que a simbiose é mais comum em ambientes severos (Bertness et al. 1999, Bertness e Callaway 1994, Callaway e Walker 1997) ou sob algum tipo de distúrbio, como o fogo (Monteiro et al. 2017). Assim, essas evidências geram novas perspectivas de os cupins, aqui a espécie *N. cf. coxipoensis*, proporcionarem um efeito de espécie-berçário, por melhorarem as condições de microhabitats e trazerem consigo uma fauna associada (Lortie 2007).

É comum encontrar padrões positivos de associação entre espécies que mudam as condições do habitat, principalmente em sistemas de interações entre plantas (Pugnaire et al. 2001, Callaway et al. 2002, Schob et al. 2013). Como exemplo, a espécie de planta *Arenaria tetraquetra ssp. amabilis*, é considerada uma promotora do efeito berçário em ambientes altimontanos, pois ela cria um habitat com maior quantidade de umidade, amenizando a temperatura e aumentando o conteúdo de matéria orgânica no solo, em comparação a um local vizinho sem a sua presença (Schob et al. 2013). Consequentemente, essas modificações no micro-habitat aumentam a riqueza e a abundância de espécies associadas à *A. tetraquetra ssp. amabilis* (Schob et al. 2013). Esse mesmo padrão do efeito berçário, onde uma espécie aumenta a diversidade local, se aplica à espécie de planta *Arenaria polytrichoides*, em uma montanha de 4900 m, na China (ver Yang et al. 2017) e em gradientes altitudinais de zonas interdiais (ver Watt e Scrosati 2013). O mesmo se aplica a ninhos de cupins em ambientes que sofreram distúrbios ecológicos de fogo (Monteiro et al. 2017). Foi verificado por Monteiro et al.

(2017) que o distúrbio afeta positivamente a abundância de coabitantes dentro do termiteiro.

Geralmente as condições encontradas nos ninhos de cupins são mais estáveis se comparadas ao ambiente externo (Korb e Linsenmair 2000), visto que a arquitetura dos termiteiros confere termorregulação. Dessa forma, ninhos em habitats frios são adaptados a reduzir a perda de calor, produzido metabolicamente, para o ambiente (Korb 2003). Na área em que realizamos nosso estudo, o padrão de diversidade de cupins diminui com o aumento da elevação (Nunes et al. 2016). Nas elevações mais baixas, observa-se uma maior diversidade formas de termiteiros (arbóreos, montículos, ninhos epígeos, ninhos cônicos). Porém, nos pontos mais elevados (entre 1100 m a 1400 m) percebe-se uma grande densidade de ninhos da espécie *N. cf. coxipoensis*. A forma na qual essa espécie constrói seus ninhos (forma de domo) pode ser considerada adequada para uma adaptação a ambientes mais frios, como sugerido por Korb (2003). Em ambientes mais quentes, os ninhos que possuem formas de cátedras têm uma melhor eficiência na circulação de ar, enquanto que ninhos em forma de domo, com a redução da complexidade da superfície, necessitam conciliar demandas conflitivas (*trade-offs*) entre a troca de gases e a termorregulação (Korb 2003).

Neste estudo, mostramos que o aumento do estresse ambiental ao longo do gradiente altitudinal tem um papel importante na coabitação de ninhos de *Nasutitermes cf. coxipoensis* em montanhas tropicais. Especificamente, adicionamos mais uma evidência empírica de que a presença de ninho é um abrigo importante para muitas espécies de invertebrados, principalmente onde o ambiente é mais severo.

REFERÊNCIAS

- Antonsson, A., R. G. Björk and U. Molau. 2009. Nurse plant effect of the cushion plant *Silene acaulis* (L.) Jacq. in an alpine environment in the subarctic Scandes, Sweden. *Plant Ecol. Divers.* 2: 17–25.
- Avitabile, S. C., D. G. Nimmo, A. F. Bennett, and M. F. Clarke. 2015. Termites are resistant to the effects of fire at multiple spatial scales. *PLoS one* 10: 140-114.
- Bary, A. 1879. *Die Erscheinung der Symbiose*. Privately printed in Strasburg.
- Beck, J., C. M. McCain, J. C. Axmacher, L. A. Ashton, F. Bärtschi, G. Brehm, S. Choi, O. Cizek, R. K. Cowell, K. Fiedler, C. L. Francois, S. Highland, J. D. Holloway, J. Intachat, T. Kadlec, R. L. Kitching, S. C. Maunsell, T. Merckx, A. Nakamura, E. Odell, W. Sang, P. S. Toko, J. Zamecnik, Y. Zou, and V. Novotny. 2017. Elevational species richness gradients in a hyperdiverse insect taxon: a global meta-study on geometrid moths. *Global Ecol. Biogeogr.* 26: 412-424.
- Bertness, M. D. and R. M. Callaway. 1994. Positive interactions in communities. *TREE* 9: 191–193.
- Brooker, R.W. and T. V. Callaghan. 1998. The balance between positive and negative interactions and its relationship to environmental gradients: a model. *Oikos* 81: 196–207.
- Callaway R. M., R. W. Brooker, P. Choler, Z. Kikvidze, C. J. Lortie, R. Michalet, L. Paolini, F. I. Pugnaire, B. Newingham, E. T. Aschehoug, C. Armas, D. Kikodze, and B. J. Cook. 2002. Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nat.* 417: 844–848.
- Campbell1, C., L. Russo, A. Marins, O. DeSouza, K. Schonrogge D. Mortensen, J. Tooker, R. Alber and K. Shea. 2016. Top-down network analysis characterizes hidden termite–termite interactions. *Ecol. Evol* 6: 6178–6188.
- Cavieres, L. A., M. T. K. Arroyo, M. Molina-Montenegro, C. Torres, and A. Peñaloza. 2002. Nurse effect of *Bolax gummifera* (Apiaceae) cushion plants in the alpine vegetation of the Chilean Patagonian Andes. *J. Veg. Sci.* 13: 547–554.
- Cortney A. W. and R. A. Scrosati. 2013. Bioengineer effects on understory species richness, diversity, and composition change along an environmental stress gradient: Experimental and mensurative evidence. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 123: 10-18.
- Costa C., and S. A. Vanin. 2010. Coleoptera larval fauna associated with termite nests (Isoptera) with emphasis on the “bioluminescent termite nests” from Central Brazil. *Psyche* 2010: 1-12.

- Costa, D. A., R. A. Carvalho, G. F. L. Filho and D. Brandão. 2009. Inquilines and invertebrate fauna associated with termite nests of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) in the Emas National Park, Mineiros, Goiás, Brazil. *Sociobiology* 53: 443-453.
- Cristaldo, P. F., C. S. Rosa, D. F. Florencio, A. Marins, O. DeSouza. 2012. Termitarium volume as a determinant of invasion by obligatory termitophiles and inquilines in the nests of *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae, Nasutitermitinae). *Insect. Soc.* 59: 541-548.
- Cunha, H. F. and P. P. A. M. Morais. 2010. Relação espécie-área em cupinzeiros de pastagem, Goiânia-GO, Brasil. *EntomoBrasilis* 3: 60-63.
- Cunha, H. F. and D. Brandão. 2000. Invertebrates associated with the Neotropical termite *Constrictotermes cyphergaster* (Isoptera: Termitidae, Nasutitermitinae). *Sociobiology* 37: 593-599.
- Cunha, H. F., D. A. Costa, K. E. S. Filho, L. O. Silva and D. Brandão. 2003. Relationship between *Constrictotermes cyphergaster* and inquiline termites in the Cerrado (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology* 42:1-10.
- DeSouza, O., L. B. Albuquerque, V. M. Tonello, L. P. Pinto, and R. R. Junior. 2003. Effects of fire on termite generic richness in a savanna-like ecosystem ('cerrado') of Central Brazil. *Sociobiology* 42: 639-649.
- Fernandes, G. W. 2016. Ecology and conservation of mountaintop grasslands in Brazil. Springer.
- Jaffe, K., C. Ramos and S. Issa. 1995. Trophic Interactions Between Ants and Termites that Share Common Nests. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 328-333.
- Joseph, G. S., C. L. Seymour, G. S. Cumming, Z. Mahlangu, and D. H. M. Cumming. 2013. Escaping the flames: large termitaria as refugia from fire in miombo woodland. *Landsc. Ecol.* 28:1505-1516.
- Joseph, G. S., G. S. Cumming, D. H. M. Cumming, Z. Mahlangu, R. Altwegg, and C. L. Seymour. 2011. Large termitaria act as refugia for tall trees, deadwood and cavity-using birds in a miombo woodland. *Landsc. Ecol.* 26:439-448.
- Kikvidze, Z., F. I. Pugnaire, R. W. Brooker, P. Choler, C. J. Lortie, R. Michalet, and R. M. Callaway. 2005. Linking patterns and processes in alpine plant communities: a global study. *Ecology* 86: 1395-1400.
- Kikvidze, Z., R. Michalet, R. W. Brooker, L. A. Cavieres, C. J. Lortie, F. I. Pugnaire, and R. M. Callaway. 2011. Climatic drivers of plant-plant interactions and diversity in alpine communities. *Alpine Bot.* 121: 63-70.
- Korb, J. 2003. Thermoregulation and ventilation of termite mounds. *Naturwissenschaften* 90: 212-219.
- Korb, J. and K. E. Linsenmair. 2000. Ventilation of termite mounds: new results require a new model. *Behavior. Ecol.* 11: 486-494.

- Latapy, M., C. Magnien, and N. Del Vecchio. 2008. Basic notions for the analysis of large two-mode networks. *Soc. Networks* 30: 31–48.
- le Roux, P. C. and M. A. McGeoch. 2010. Interaction intensity and importance along two stress gradients: adding shape to the stress-gradient hypothesis. *Oecologia* 162: 733–745.
- Lisboa, J. T., E. C. G. Couto, P. P. Santos, J. H. C. Delabie and P. B. Araujo. 2013. Terrestrial isopods (Crustacea: Isopoda: Oniscidea) in termite nests (Blattodea: Termitidae) in a cocoa plantation in Brazil. *Biota Neotrop.* 13: 393-397.
- Lortie, C. J. 2007. An ecological tardis: the implications of facilitation through evolutionary time. *Trends Ecol Evol* 22: 627-630.
- Maestre, F.T., R. M. Callaway, F. Valladares, and C. F. Lortie. 2009. Refining the stress gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *J. Ecol.* 97: 199–205.
- Marins, A., D. Costa, L. Russo, C. Campbell, O. DeSouza, O. Bjornst, and K. Shea. 2016. Termite cohabitation: the relative effect of biotic and abiotic factors on mound biodiversity. *Ecol. Entomol.* 41: 532-541.
- McCain, C. M. and J.-A. Grytnes. 2010. Elevational gradients in species richness. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Miller III, D. G. 2004. The ecology of inquilinism in communally parasitic *Tamalia* aphids (Hemiptera: Aphididae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 1233-1241.
- Monteiro, I., A. B. Viana-Junior, R. R. C. Solar, F. S. Neves O. DeSouza.(2017). Disturbance-modulated symbioses in termitophily. *Ecol. Evol.* in press.
- Nunes, C. A., A. V. Quintino, R. Constantino, D. Negreiros, R. R. Junior and G. W. Fernandes. 2017. Patterns of taxonomic and functional diversity of termites along a tropical elevational gradient. *Biotropica* 49: 186–194.
- Peters, M. K., A. Hemp, T. Appelhans, C. Behler, A. Classen, F. Detsch, A. Ensslin, S. W. Feger, S. B. Frederiksen, F. Gebert, M. Haas, M. Helbig-Bonitz, C. Hemp, W. J. Kindeketa, E. Mwangomo, C. Ngereza, I. Otte, J. Röder, G. Rutten, D. S. Costa, J. Tardanico, G. Zancolli, J. Deckert, C. D. Eardley, R. S. Peters, M.-O. Rödel, M. Schleuning, A. Ssymank, V. Kakengi, J. Zhang, K. Böhning-Gaese, R. Brandl, E. K. V. Kalko, M. Kleyer, T. Nauss, M. Tschapka, M. Fischer, and I. Steffan-Dewenter. 2016. Predictors of elevational biodiversity gradients change from single taxa to the multi-taxa community level. *Nat. Commun.* 7: 1-11.
- Pugnaire, F. I. and M. T. Luque. 2001. Changes in plant interactions along a gradient of environmental stress. *Oikos* 93: 42–49.
- Qian, H., Z. Hao and J. Zhang. 2014. Phylogenetic structure and phylogenetic diversity of angiosperm assemblages in forests along an elevational gradient in Changbaishan, China. *J. Plant Ecol. Adv.* 11: 1-12.

- Rahbek, C. 1995. The elevational gradient of species richness: a uniform pattern? *Ecography* 18: 200–205.
- Rahbek, C. 2005. The role of spatial scale and the perception of large-scale species–richness patterns. *Ecol. Lett.* 8: 224–239.
- Redford, K. H. 1984. The termitaria of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) and their role in determining a potential keystone species. *Biotropica* 16: 112–119.
- Schob, C., C. Armas, M. Guler, I. Prieto and F. I. Pugnaire. 2013. Variability in functional traits mediates plant interactions along stress gradients. *J. Ecol.* 101: 753–762.
- Seckbach, J. and M. Grube. 2010. *Symbioses and Stress*. Springer.
- Wang, C., J. E. Powell and B. M. O’connor. 2002. Mites and nematodes associated with three subterranean termite species (Isoptera: Rhinotermitidae). *Fla. Entomol.* 85: 499–506.
- Yang, Y., J.-G. Chen J-G, C. Schöb and H. Sun. 2017. Size-mediated interaction between a cushion species and other non-cushion species at high elevations of the Hengduan Mountains, SW China. *Front. Plant Sci.* 8: 465.

Capítulo 3

INTERACTIONS BETWEEN WOOD-INHABITING FUNGI AND TERMITES:

A META-ANALYTICAL REVIEW

Viana-Junior, AB; Côrtes, MO; Cornellissen, TG e Neves, FS (2017). Interactions between wood-inhabiting fungi and termites: a meta-analytical review. *Arthropod-Plant Interactions*, p. 1:7. Doi: 10.1007/s11829-017-9570-0

Interactions between wood-inhabiting fungi and termites: a meta-analytical review

Arleu Barbosa Viana-Junior^{1,2}, Mariana Osório Côrtes¹, Tatiana Garabini Cornelissen^{2,3}
and Frederico de Siqueira Neves^{1,2}

¹Laboratório de Ecologia de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

²Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

³Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del Rei, MG, Brazil.

E-mail addresses: arleubarbosa@gmail.com (A. B. Viana-Junior, ORCID: 0000-0002-9964-9875, phone: +55 79 98836-9339), mariana.ocrts@gmail.com (M. O. Côrtes, phone: +55 31 9325-9198), tatiana@ufsj.edu.br (T. G. Cornelissen), fred.neves@gmail.com (F. S. Neves, ORCID: 0000-0002-2691-3743, phone: +55 31 8850-0757).

*Artigo publicado na Arthropod-Plant Interactions. Viana-Junior, AB; Côrtes, MO; Cornellissen, TG e Neves, FS (2017). Interactions between wood-inhabiting fungi and termites: a meta-analytical review. Arthropod-Plant Interactions, p. 1:7. Doi: 10.1007/s11829-017-9570-0

Abstract The foraging behavior and survivorship of termites is modified by the presence of wood-inhabiting fungi. Nonetheless, it is not clear if these interactions are beneficial, negative or neutral for termites. We conducted a meta-analytical review to determine if the presence of wood-inhabiting fungi affects the foraging behavior and survivorship of termites. Overall, the presence of wood-inhabiting fungi in a resource used by termites was positive, increasing resource consumption by 120%, and aggregation behavior by 81%. The presence of fungi also increased termite trail-following by approximately 200% and increased survival by 136%. The results varied, however, according to the type of fungi evaluated. Decay-fungi and sap-stain fungi elicited positive responses in termites, whereas molds did not affect the consumption of cellulose by termites. Amongst the decay-fungi group, white-rot fungi caused the strongest and most positive response in all termite behaviors evaluated, although brown-rot fungi is known to be preferred by termites. The results of our study therefore suggest that wood-inhabiting fungi are potential facilitators of the foraging behavior and survivorship of termites. These results have great implications for termite biocontrol, as well as for knowledge of the ecological aspects of termite–fungi interactions.

Keywords Decay fungi · Meta-analysis · Sap-stain fungi · Subterranean termites · Wood-rot fungi

Introduction

Termites and wood-inhabiting fungi are two groups of organisms that use the same resources to acquire energy (Kamaluddin et al. 2016). The amount and quality of the resources acquired by termites can be affected by wood density, the presence of secondary metabolites, wood moisture content, the presence of certain fungi species and the degree of wood decomposition (Peralta et al. 2004). Previous studies have shown that termites can be both attracted and have their food consumption stimulated by the presence of wood-inhabiting fungi, or they can avoid wood already used by certain types of fungi (Amburgey 1979).

The presence of fungi can bring nutritional benefits to termites. For example, it increases the availability of nutrients, detoxifies wood, and improves the ability of termites to metabolize cellulose through physical and chemical modification of the wood (Waller and La Fage 1987). Laboratory tests have shown that the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus* Shiraki 1909) increases in survival, wood consumption and aggregation behavior when the wood is decomposed by the fungal species *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill (1908) or *Marasmiellus troyanus* (Murrill) Singer (Lenz 1980; Cornelliuss et al. 2003, 2004, 2012). It is known that *C. formosanus* is more successful, faster in finding food resources and increases its trail-following activity when the resource is decomposed by these fungi (Cornelliuss et al. 2002; Su 2005). Similar results have been found for other termite species, such as *Reticulitermes* spp. (Grace and Wilcox 1988; Getty and Haverty 1998; Cornelliuss et al. 2002; Su 2005), *Nasutitermes* spp. (Ruyooka and Edwards 1981; Gazal et al. 2012), *Cryptotermes brevis* (Moein and Rust 1992) and *Glyptotermes dilatatus* (Senanayake et al. 2015).

Although beneficial interactions between termites and fungi have been commonly reported, other studies have shown that wood decomposed by certain types of fungi (e.g., *Ganoderma applanatum* [Pers.] Pat. and *Fibroporia radiculosa* [Peck] Parmasto 1968) are actually avoided by termites due to the deposition of toxic compounds (Amburgey and Beal 1977; Grace et al. 1992; Kamaluddin et al. 2016). Field studies have shown that stakes of different wood species colonized by basidiomycete fungi, for example, do not affect the feeding preferences of termites (Peralta et al. 2003). Additionally, the Western subterranean termite (*Reticulitermes hesperus*) aggregates less in wood stakes decomposed by certain basidiomycete fungi and dies more frequently when in contact with blocks that contain extracts of wood decomposed by those fungi (Kamaluddin et al. 2016). It has also been shown that the feeding activity of *C. formosanus* is inhibited by extracellular metabolites (siderophores) produced by the fungus *G. trabeum*, suggesting that the presence of this species creates a low-quality food resource (Grace et al. 1992). A correlation between the presence of certain fungi and the absence of termites has also been found in the field (Kirker et al. 2012). In addition, two other studies have shown that termites do not bring any benefit to the dispersion of fungal species, and there is evidence that some termites may use symbiotic fungi (integument or gut) to inhibit the growth of other wood-inhabiting fungi (e.g., Jayashima and Henderson 2007a, b).

Depending on the species of termites, fungi and wood involved in these complex systems, the interaction can be either positive or negative (Lenz et al. 1980). A greater understanding of these interactions can help in the development of new technologies for termite pest control (Esenther et al. 1961; Amburgey 1979; Su and Scheffrahn 1993; Rojas and Morales-Ramos 2001; Cornelius et al. 2002, 2004; Su 2005). If the effect is beneficial, wood colonized by fungi can be used to attract termites to toxic bait (Grace and Su 2001). Conversely, if the effect is negative, active biological compounds can be

isolated from wood colonized by fungi and used as pesticides, killing the termites or inhibiting their feeding behavior (Kirker et al. 2012).

Although qualitative reviews regarding termite–fungi interactions have been published (e.g., Amburgey 1979; Grace 1991), a quantitative approach to this interaction is still lacking. The use of meta-analytic techniques can therefore help in the understanding and quantification of the real effects of the presence of wood fungi on termite foraging behavior and survivorship. Here, we conduct a meta-analytical review to quantify the overall effect of fungi–termite interactions, as well as to quantify effect strength regarding fungal groups (e.g., decay fungi, mold and sap-stain fungi) and fungal types (brown-, white-, soft- and litter-rot).

Materials and Methods

Data collection - We based our meta-analytical review on an extensive review of the interactions between wood-inhabiting fungi and termites conducted by Amburgey (1979), and hence reviewed all studies published after that review (1980 – 2015). In order to carry out the meta-analysis, a systematic search was conducted using the database ISI Web of Science (www.isiknowledge.com). We searched electronically for the following terms within titles, abstracts and keywords: termite*, Rhinotermitidae, Termitidae, termes, wood inhabiting fung*, wood rot* fung*, wood decay* fung*, ophiostomatoid fung*, sapwood fung*, sap stain wood fung* and soft rot* fung*. Patents were excluded and the search was supplemented using the reference lists of the articles that were found.

For a study to be included in our meta-analysis, the following criteria were established: 1) the study was published in a peer-reviewed journal; 2) the same variable was reported in both the presence (treatment) and absence (control) of fungi; and 3) data

were presented with mean, sample size and a measurement of variance (standard deviation, standard error or confidence intervals) for both control and treatment groups, with a clear indication of replication. When these data were only available in figures, they were digitized, and the values of means and deviations were obtained through the use of the software ImageJ (imagej.nih.gov/ij), after calibrating the figure using the y-axis as a reference. All units of variance reported in the studies were converted into units of standard deviation.

Meta-analysis - The standardized difference between control and treatment groups was used to interpret and summarize the effects of the presence of fungi on termites. For each study, the magnitude of effect (d) was calculated as: $d = (X_t - X_c)/SD * J$, where X_t is the response of the treatment group, X_c is the response of the control group, SD is the pooled standard deviation and J is a correction term to remove small sample size bias (Rosenberg et al. 2000).

After the calculation of Hedge's d for each independent comparison, the cumulative effect (d_{++}) for each of the variables surveyed (trail-following, survivorship, aggregation behavior and wood consumption) was calculated using a fixed-effect model. We also used mixed-effect models for analysis of the moderator variables (groups and decay types of fungi; Gurevitch and Hedges 1999), because this model assumes that the differences between studies within a class are determined by sampling errors and random variation. For studies that involve the synthesis of ecological data, the principles of mixed-effect models are usually fulfilled and, therefore, these are preferably used (Gurevitch and Hedges 1999; Gurevitch and Hedges 2001; Mengersen et al. 2013). Inferior and superior confidence intervals were calculated according to the average cumulative effect and intervals that did not overlap with zero, with $n-1$ degrees of freedom, were considered significant.

By convention, d_{++} values around 0.2 are considered weak effects, 0.5 are considered moderate effects, and 0.8 are considered strong effects (Cohen 1992). Positive d_{++} values indicate that the presence of the fungus has a positive effect on the variable measured (foraging behaviors and survival), whereas negative values indicate a negative effect of the presence of the fungus on the effects measured. Heterogeneity analyses (Q statistic) were employed to test whether or not categorical groups were homogeneous with respect to calculated effect sizes. We calculated the total heterogeneity (Q_T) for all effects tested, as well as heterogeneity within (Q_W) and between groups (Q_B). The significance of these statistics was evaluated using a X^2 distribution. Fail-safe numbers were also calculated for all total effects evaluated, indicating the number of non-significant, unpublished or missing studies that would need to be added to the meta-analysis in order to change its results from significant to non-significant (Rosenthal, 1979). All analyses were carried out with the statistical software R (R Core Team 2016), using the “metafor” package (Viechthbauer 2010).

Results

A total of 45 studies addressing some aspect of fungi–termite interaction were found, but only 18 met our criteria and were included in our meta-analytic review (Supporting Information SI 01). These 18 studies generated 279 independent comparisons of the effects of fungal presence on foraging behaviors or termite survivorship (Supporting Information SI 02). Of the total comparisons, 49.1% evaluated the effect of fungi on the amount of resource consumed, 29% evaluated aggregation behavior, 18.3% investigated termite survivorship and 3.6% surveyed the influence of fungi in termite trail following.

Overall, the presence of fungi had a positive effect on termites ($d_{++} = 1.12$, CI 1.06 to 1.17, $df = 278$). The presence of fungi increased resource consumption ($d_{++} = 1.20$, CI 1.12 to 1.28, $df = 136$), aggregation behavior ($d_{++} = 0.81$, CI 0.71 to 0.91, $df = 80$), survivorship ($d_{++} = 1.36$, CI 1.15 to 1.56, $df = 50$) and trail following ($d_{++} = 2.01$, CI 1.76 to 2.26, $df = 9$) (Fig. 1). Fail-safe numbers for effects of consumption (56,287 studies), aggregation behavior (16,190 studies), survivorship (3,097 studies) and trail following (1,181 studies) were large relative to the number of independent comparisons included in the meta-analysis (137 studies, 81 studies, 51 studies and 10 studies, respectively), indicating the strength of our results.

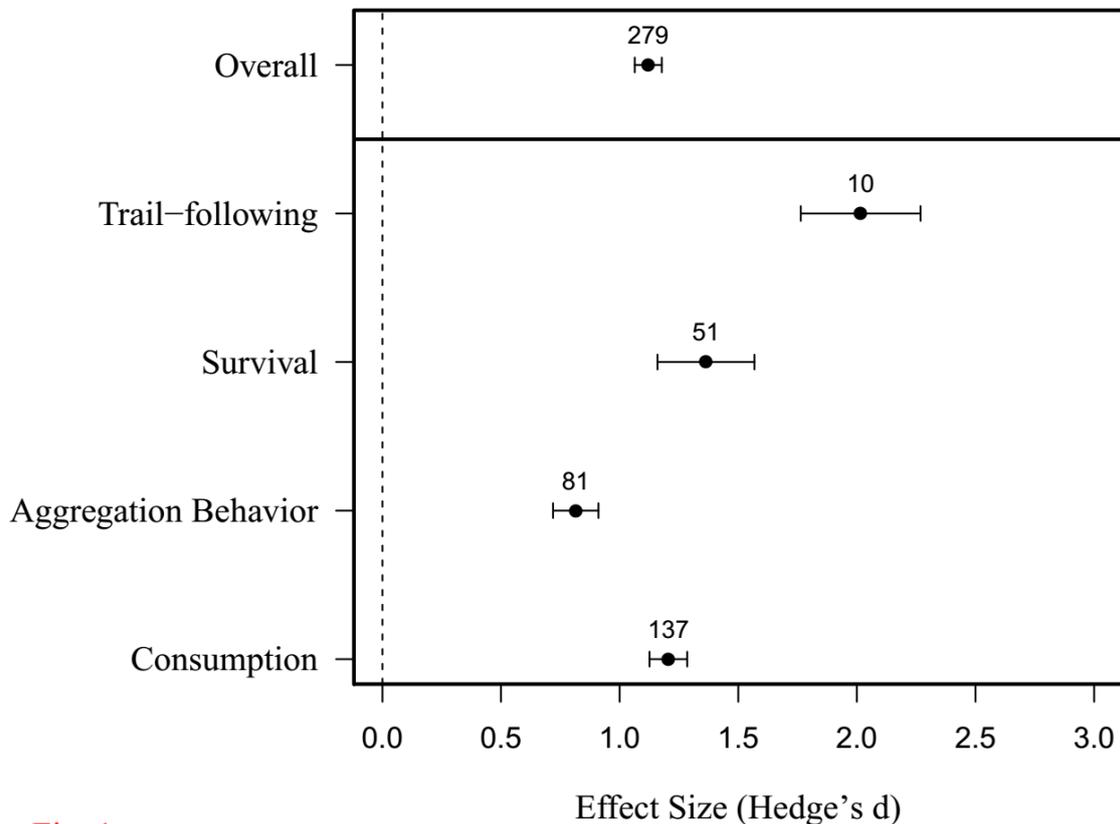


Fig. 1 Effects of the presence of wood-inhabiting fungi on the foraging behaviors and survivorship of termites. The cumulative effect size is reported for each effect measured with its 95% confidence intervals, and effects are significant if confidence intervals do not overlap with zero. Superscript numbers indicate the number of independent comparisons for each effect.

When contrasting the effects according to fungal groups, only molds showed no effect on termites' consumption of cellulose ($d_{++} = -0.13$, CI = -0.86 to 0.58, $df = 27$; Fig. 2). Both consumption and survivorship showed a statistically significant difference among all the fungal groups (consumption: $Q_B = 33.43$, $p < 0.01$; survivorship: $Q_B = 10.50$, $p < 0.01$). When we separated effects according to different types of decaying fungi, however, only white-rot fungi had a positive and significant effect on all the studied variables (consumption: $d_{++} = 2.64$, CI 2.07 to 3.21, $df = 25$; aggregation behavior: $d_{++} = 2.12$, CI 1.55 to 2.69, $df = 24$; survivorship: $d_{++} = 1.78$, CI 0.98 to 2.58, $df = 7$), whereas the effects of other fungal types varied from positive to non-significant (Fig. 3). It is important to mention that there was a dominance of the species *Gloeophyllum trabeum* in the collection of data related to type of fungi grouped brown-rot fungi, which shows an interest in understanding how this species affects the behavior of termites. Only survivorship was not significantly different from zero for brown-rot and white-rot fungi ($Q_B = 1.01$, $p = 0.31$), showing that both these fungal types have similar effects on the survivorship of termites.

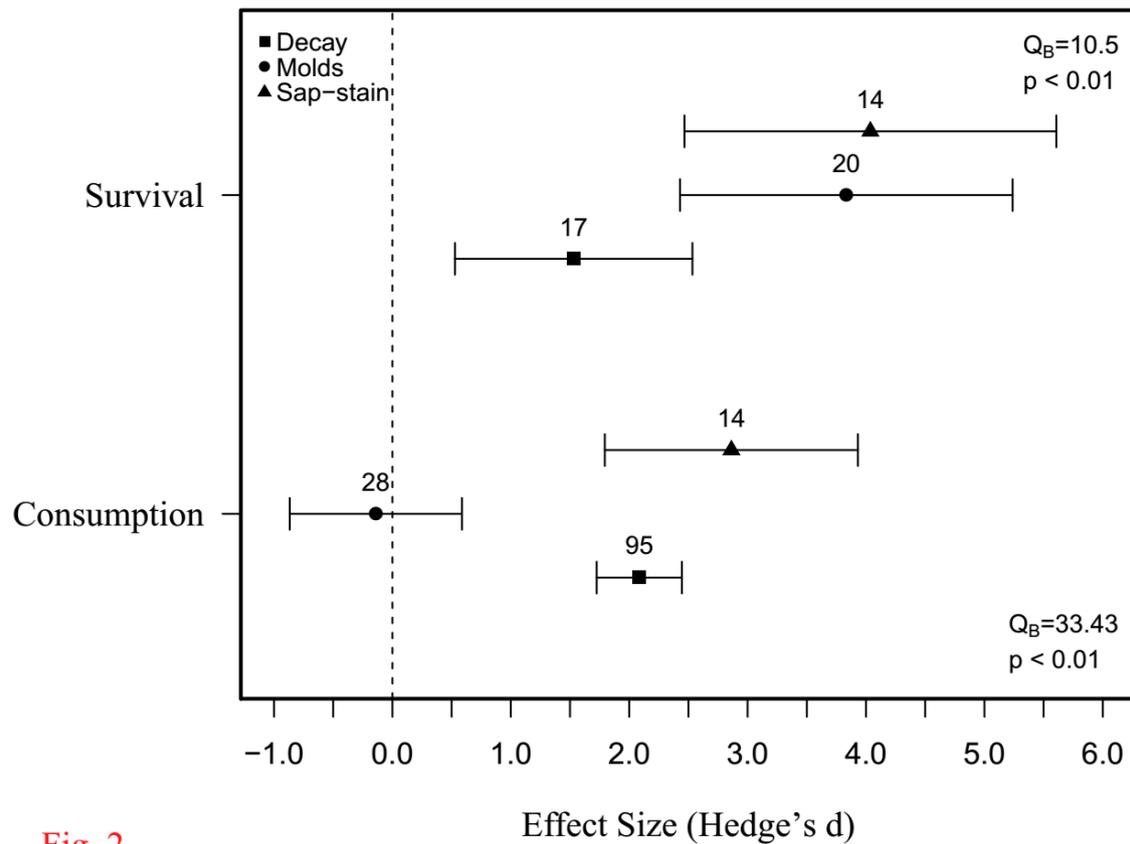


Fig. 2 Effects of the type of wood-inhabiting fungi on the foraging behaviors and survivorship of termites. The cumulative effect size is reported for each effect measured with its 95% confidence intervals, and effects are significant if confidence intervals do not overlap with zero. Superscript numbers indicate the number of independent comparisons for each effect.

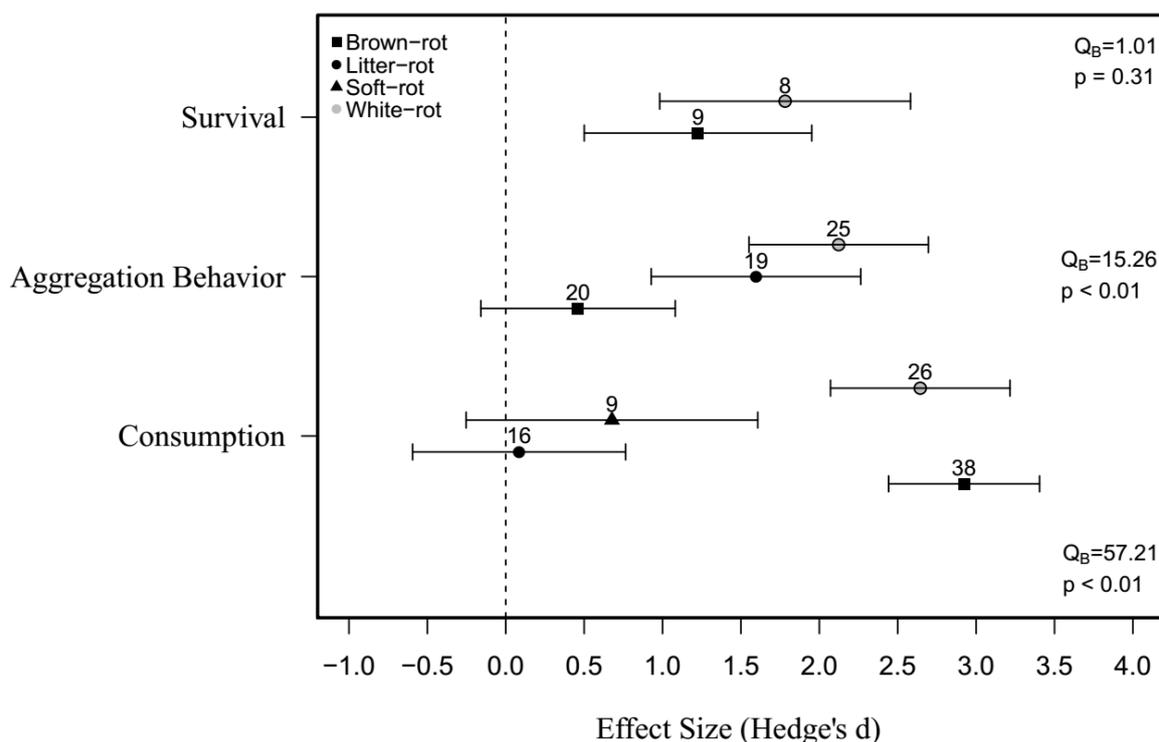


Fig. 3 Effects of the type of wood-rotting fungi on the foraging behaviors and survivorship of termites. The cumulative effect size is reported for each effect measured with its 95% confidence intervals, and effects are significant if confidence intervals do not overlap with zero. Superscript numbers indicate the number of independent comparisons for each effect.

Discussion

This meta-analysis found strong positive effects of wood-inhabiting fungi on the foraging behavior and survivorship of termites. Here, for the first time, we quantitatively confirmed the generality of these effects and determined some of their sources of variation. Several patterns and trends emerged from this study. Firstly, we found an overall positive effect of these fungi on the foraging behavior and survivorship of termites, reinforcing the role of wood-inhabiting fungi as potential facilitators of termites. However, we also show that not all fungi types cause the same effects on termite foraging behavior, as we observed significant differences amongst groups. Secondly, the evidence presented here revealed that brown-rot fungus does not always elicit positive responses

in termites. These fungi are commonly used as a positive control in comparative tests of fungi in relation to foraging behavior and termite survival because they are well documented as being preferred by subterranean termites, which also prefer decayed wood over sound wood (Cornelius et al. 2002; Cornelius et al. 2012).

We observed that molds did not elicit positive responses in termites, as previously expected. The presence of molds in wood did not improve the consumption of termites, likely because most of these fungi commonly grow on other materials and only a few are specialized for growing in wood (Robbins and Morrel 2006), showing only superficial growth. This superficial growth acts as a physical barrier against termites, preventing them from feeding directly on the wood (Heintschel et al. 2007). These molds have a great effect on decay fungi, however, since it has been determined in a laboratory setting that the presence of these types of fungi inhibits the growth of the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* (Jayashima and Henderson 2007). As already empirically tested, the effect of molds on degrading wood is insignificant when compared to that of decay fungus, thus resulting in these fungi not changing the palatability of wood to termites (Heintschel et al. 2007; Jayashima and Henderson 2007).

When we examined decay and sap-stain fungi (ophiostomatoid fungi), we showed that they elicited positive responses in both wood consumption and termite survivorship. Unlike decay fungi, sap-stain fungi are exclusively associated with bark beetles (*Dendroctonus* and *Ips* spp.), which install such fungi in wood (Little et al. 2012a). This indicates that an even more complex ecological interaction may exist between ophiostomatoid fungi, carried by root-feeding bark beetles, and subterranean termites (Riggins et al. 2014). We do know that decay fungi affect the physical structure of wood (cellulose and lignin), allowing termites to better metabolize cellulose since it is partially digested, whereas sap-stain fungi affect the cellular content of wood (Desch and

Dinwoodie 1996). The mechanisms by which termites are attracted to wood infected with sap-stain fungi remain unknown (Little et al. 2012a, b, 2013; Riggins et al. 2014).

White-rot fungi were also found to induce positive responses concerning termite survivorship, aggregation behavior and consumption, placing this fungal group as a priority for use in the biological control of termites. This is possibly because white-rot fungi degrade the three major components of the plant cell wall, lignin, cellulose and hemicellulose, whereas brown-rot fungi remove the hemicellulose and cellulose with only minor modification to the lignin, making the resources more available for termites (Geib et al. 2008). We suggest an increase in the amount of research regarding this group in order to better understand these interactions. For instance, how these fungi influence trail-following behavior or if there is a production of homologous compounds that might elicit such a response in termites is yet to be investigated. White-rot fungi represent approximately 90% of the diversity of decay fungi (Gilbertson 1980) and are commonly found associated with angiosperms in hot and wet regions around the globe (Hatakka and Hammel 2010; Stokland et al. 2012).

Another important result shown by our data is the fact that there were opposing responses for both consumption and aggregation behavior in termites in relation to brown-rot and litter-rot fungi. Aggregation behavior is a pattern found among most termites, characterized by high recruitment when a valuable resource is found (Haifig et al. 2015). Thus, it was expected that consumption and aggregation would be correlated, as aggregation pheromones produced by termites are also considered to be feeding stimulants (Costa-Leonardo et al. 2009). The results found for brown-rot fungi, a group which within our data collection was dominated by the species *Gloeophyllum trabeum* (71%), showed positive effects on consumption but non-significant effects on aggregation behavior, indicating that the decaying process being carried out by these fungi

(depolymerizing the cellulose from the wood) likely makes intake easier and consumption faster (Erwin et al. 2008). We know that some brown-rot fungi produce chemical compounds homologous to trail pheromones, which provoke trail-following behaviors in termites (Matsumura et al. 1968). It is possible that there are chemical compounds in litter-rot fungi that increase aggregation behavior over the resource. Parkinson et al. (1979), for example, demonstrated that the colonization of leaf litter by an unidentified saprobic basidiomycete was enhanced by the presence of a collembolan, *Onychiurus subtenuis*, improving the decomposition of litter (Osono 2007).

This work showed that the presence of fungi in substrate improves the quality of resources consumed by termites. The negative effects found in the literature are likely time-related (Grace et al. 1992) and this is corroborated by the large fail-safe number value, showing the robustness of the current study's results. These results are important for the development of new technologies that can make use of these positive interactions as alternatives for termite biocontrol. For example, the use of wood blocks impregnated with pesticides and decomposed by fungi that increase aggregation behavior and consumption would be helpful for the efficiency of control (Esenther and Beal 1978; Jones 1993).

In conclusion, the presence of fungi in wood substrate used by termites positively affects both the foraging behaviors and survivorship of these insects. Nevertheless, depending on the type of fungus and the parameter evaluated in termites, this effect can be null, but not negative, suggesting that there are more mutualistic interactions than antagonistic interactions between these groups.

Acknowledgments We thank Marina Beirão, Gabriela Duarte, Rony Peterson, Lisiex Fuzessy, Yana Reis, Ricardo Solar, Lucas Paolucci and Luiz Eduardo Macedo-Reis for discussions, suggestions and for insightful comments on an earlier version of the manuscript. We extend a special thanks to Hans Kelstrup and Flavio Camarota for comments on the text and English review. This work was supported by the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Graduation Program in Ecology, Conservation and Wildlife Management (ECMVS – UFMG).

References

- Amburgey TL (1979) Review and checklist of the literature on interactions between wood-inhabiting fungi and subterranean termite: 1960-1978. *Sociobiology* 4:279-296.
- Grace JK, Su NY (2001) Evidence supporting the use of termite baiting systems for long-term structural protection (Isoptera). *Sociobiology* 37:301-310.
- Amburgey TL, Beal RH (1977) White rot inhibits termite attack. *Sociobiology* 3:35-38.
- Cohen J (1992) A power primer. *Psychol Bull* 112: 155-159.
- Cornelius ML, Daigle DJ, Connick Jr. WJ, Williams KS, Lovisa MP (2003) Responses of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) to wood blocks inoculated with lignin-degrading fungi. *Sociobiology* 41:513-525.
- Cornelius ML, Bland JM, Daigle DJ, Williams KS, Lovisa MP, Connick Jr WJ, Lax AR (2004) Effect of a lignin-degrading fungus on feeding preferences of formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) for different commercial lumber. *J Econ Entomol* 97:1025-1035. doi: [10.1603/0022-0493\(2004\)097\[1025:EOALFO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2004)097[1025:EOALFO]2.0.CO;2)
- Cornelius ML, Daigle DJ, Connick Jr WJ, Parker A, Wunch K (2002) Responses of *Coptotermes formosanus* and *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) to three types of wood rot fungi cultured on different substrates. *J Econ Entomol* 95:121-128. doi: 10.1603/0022-0493-95.1.121
- Cornelius ML, Williams KS, Lovisa MP, DeLucca II A (2012) Aggregation and feeding behavior of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) on wood decayed by three species of wood rot fungi. *Sociobiology* 59:667-679. doi: [10.13102/sociobiology.v59i3.541](https://doi.org/10.13102/sociobiology.v59i3.541)
- Costa-Leonardo AM, Casarin FE, Lima JT (2009) Chemical communication in Isoptera. *Neotrop Entomol* 38:1-6. doi: 10.1590/S1519-566X2009000100001
- Desch HE, Dinwoodie JM (1996) *Timber: structure, properties, conversion and use* (7th ed.). Macmillan Press, London.
- Erwin ST, Hwang WJ, Takeuchi M, Itoh T, Imamura Y (2008) Anatomical characterization of decayed wood in standing light red meranti and identification of the fungi isolated from the decayed area. *J Wood Sci* 54:233-241. doi: 10.1007/s10086-008-0947-7
- Esenther GR, Beal RH (1978) Insecticidal baits on field plot perimeters suppress *Reticulitermes*. *J Econ Entomol* 71:604-607.
- Gazal V, Bailez O, Viana-Bailez AM, Aguiar-Menezes EL, Menezes EB (2012) Decayed wood affecting the attraction of the pest arboretum termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) to resource foods. *Sociobiology* 59:287-295. doi: 10.13102/sociobiology.v59i1.684
- Geib SM, Filley, TR, Hatcher PG, Hoover K, Carlson JE, Jimenez-Gasco MM et al (2008) Lignin degradation in wood-feeding insects. *P Natl Acad Sci USA* 105:12932-12937. doi: 10.1073/pnas.0805257105
- Getty, GM, Haverty MI (1998) Consumption of sound and decayed Ponderosa Pine and Douglas-Fir by *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae) from Northern California. *J Econ Entomol* 91:650-654.
- Gilbertson RL (1980) Wood-rotting fungi of North America. *Mycologia* 72:1-49. doi: 10.2307/3759417
- Grace JK (1991) Semiochemical mediation and manipulation of *Reticulitermes* behavior (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 19:147-162.

- Grace JK, Wilcox WW (1988) Isolation ant trail-following bioassay of decay fungus associated with *Reticulitermes hesperus* Banks (Isoptera: Rhinotermitidae). Pan-Pac Entomol 64:243-249.
- Grace JK, Goodell BS, Jones WE, Vikas C, Jellison J (1992) Evidence for inhibition of termite (Isoptera: Rhinotermitidae) feeding by extracellular metabolites of a wood decay fungus. Proceedings of the Hawaiian Entomological Society 31:249-252.
- Gurevitch J, Hedges LV (1999) Statistical issues in ecological meta-analysis. Ecology 80:1142–1149.
- Gurevitch J, Hedges LV (2001) Meta-analysis: combining the results of independent experiments, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.
- Haifig I, Jost C, Fourcassié V, Zana Y, Costa-Leonard, AM (2015) Dynamics of foraging trails in the Neotropical termite *Velocitermes heteropterus* (Isoptera: Termitidae). Behav Process 118:123–129. doi: 10.1016/j.beproc.2015.06.010
- Hatakka A, Hammel KE (2010) Fungal biodegradation of lignocelluloses. In: Esser K, Hofrichter M (eds) The Mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research, Industrial applications, Springer, Berlin, pp 319-340.
- Heintschel BP, Kenerley CM, Gold RE (2007) Effects of *Trichoderma virens* fungus on the feeding behaviors of subterranean termite (*Reticulitermes virginicus*) Isoptera: Rhinotermitidae. Sociobiology 50:223-244.
- Jayasimha P, Henderson G (2007a) Suppression of growth of a brown rot fungus, *Gloeophyllum trabeum*, by Formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). Ann Entomol Soc Am 100:506-511. doi: [10.1603/0013-8746\(2007\)100\[506:SOGOAB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2007)100[506:SOGOAB]2.0.CO;2)
- Jayasimha P, Henderson G (2007b) Fungi isolated from integument and guts of *Coptotermes formosanus* and their antagonistic effect on *Gloeophyllum trabeum*. Ann Entomol Soc Am 100:703-710. doi: [10.1603/0013-8746\(2007\)100\[703:FIFIAG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2007)100[703:FIFIAG]2.0.CO;2)
- Jones SC (1993) Effect of a decay fungus on subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) response to bait toxicant treated wood. Proceedings of the First International Conference on Urban Pests 1:199-206.
- Kamaluddin NN, Nakagawa-Izumi A, Nishizawa S, Fukunaga A, Doi S, Yoshimura T., Horisawa F (2016) Evidence of subterranean termite feeding deterrent produced by brown rot fungus *Fibroporia radiculosa* (Peck) Parmasto 1968 (Polyporales, Fomitopsidaceae). Insects 7:41
- Kirker GT, Wagner TL, Diehl SV (2012) Relationship between wood-inhabiting fungi and *Reticulitermes* spp. in four forest habitats of northeastern Mississippi. Int Biodeter Biodegr 72:18-25. doi: [10.1016/j.ibiod.2012.04.011](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.011)
- Lenz M, Ruyooka DBA, Howick CD (1980) The effect of brown and white rot fungi on wood consumption and survival of *Coptotermes lacteus* (Froggatt) (Isoptera: Rhinotermitidae) in a laboratory bioassay. J Appl Entomol 89:344-362. doi: 10.1111/j.1439-0418.1980.tb03476.x
- Little NS, Riggins JJ, Schultz TP, Londo AJ, Ulyshen MD (2012a) Feeding preference of native subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae: *Reticulitermes*) for wood containing bark beetle pheromones and blue-stain fungi. J Insect Behav 25:197-206. doi: 10.1007/s10905-011-9293-5
- Little NS, Blount NA, Londo AJ, Kitchens SC, Schultz TP, McConnell TE, Riggins JJ (2012b) Preference of Formosan subterranean termites for blue-stained southern yellow pine sapwood. J Econ Entomol 105:1640-1644.

- Little NS, Schultz TP, Diehl SV, Nicholas DD, Londo AJ, Musser FR, Riggins JJ (2013) Field evaluations of subterranean termite preference for sap-stain inoculated wood. *J Insect Behav* 26:649–659. doi: 10.1007/s10905-013-9380-x
- Matsumura F, Coppel HC, Tai A (1968) Isolation and identification of termite trail-following pheromone. *Nature* 219:963-964. doi: 10.1038/219963a0
- Mengersen K, Jennions MD, Schmid CH (2013) Statistical models for the meta-analysis of nonindependent data. In: Koricheva J, Gurevitch J, Mengersen K (eds) *Handbook of Meta-Analysis in Ecology and Evolution*, Princeton University Press, Princeton and Oxford, pp. 255-283.
- Moein SI, Rust MK (1992) The effect of wood degradation by fungi on the feeding and survival of the West Indian drywood Termite, *Cryptotermes brevis* (Isoptera: Kalotermitidae). *Sociobiology* 20:29-39.
- Osono T (2007) Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecol Res* 22:955-974. doi: 10.1007/s11284-007-0390-z
- Parkinson D, Visser S, Whittaker JB (1979) Effects of collembolan grazing on fungal colonization of leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry* 11:529-535. doi: [10.1016/0038-0717\(79\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(79)90013-0)
- Peralta RCG, Menezes EB, Carvalho AG, Aguiar-Menezes EL (2003) Feeding preference of subterranean termites for forest species associated or not a wood-decaying fungi. *Floresta e Ambiente* 10:58-63.
- Peralta RCG, Menezes EB, Carvalho AG, Aguiar-Menezes EL (2004) Wood consumption of forest species by subterranean termites (Isoptera) under field conditions. *Revista Árvore* 28:283-289.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Riggins JJ, Little NS, Eckhardt LG (2014) Correlation between infection by ophiostomatoid fungi and the presence of subterranean termites in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) roots. *Agricultural and Forest Entomology* 16:260-264. doi: 10.1111/afe.12053
- Robbins C, Morrel J (2006) Mold, housing and wood. Western Wood Products Association. Portland, Oregon.
- Rojas MG, Morales-Ramos JA (2001) Bait matrix for delivery of chitin synthesis inhibitors to the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Econ Entomol* 94:506-510. doi: [10.1603/0022-0493-94.2.506](https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.2.506)
- Rosenberg MS, Adams DC, Gurevitch J (2000) MetaWin: statistical software for meta-analysis ver. 2.1.3.4. Sinauer Associates, Sunderland.
- Rosenthal R (1979) The 'file drawer problem' and tolerance for null results. *Psychol Bull* 86:638-641.
- Ruyooka DBA, Edwards CBH (1981) Effect of fungal-termite associations on the natural resistance of selected eucalypt timbers under laboratory and fields conditions. *Mater Organismen* 15:263-285.
- Senanayake PD, Mohotti K, Paranagama PA (2015) Bioactive constituents of wood rot extract of tea, *Camellia sinensis* L.O. Kuntze against alates of low country live wood termite *Glyptotermes dilatatus* Bugnion and Popoff (Isoptera: Kalotermitidae). *SpringerPlus* 4:1. doi: [10.1186/s40064-015-1513-6](https://doi.org/10.1186/s40064-015-1513-6)
- Stokland JN, Siitonen J, Jonsson BG (2012) *Biodiversity in dead wood*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Su NY, Scheffrahn RH (1993) Laboratory evaluation of two chitin synthesis inhibitors, hexaflumuron and diflubenzuron, as bait toxicants against Formosan and eastern

- subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). J Econ Entomol 86:1453-1457.
doi: 10.1093/jee/86.5.1453
- Su NY (2005) Directional change in tunneling of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in response to decayed wood attractants. J Econ Entomol 98:471-475. doi: [10.1603/0022-0493-98.2.471](https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.2.471)
- Viechtbauer, W. (2010) Conducting meta-analyses in R with the metafor package. Journal of Statistical Software 36:1-48. URL: <http://www.jstatsoft.org/v36/i03/>.
- Waller DA, La Fage JP (1987) Seasonal patterns in foraging groups of *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae). Sociobiology 13:173-181.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidenciamos que fatores ambientais, associados a gradientes altitudinais, não afetam a composição química do perfil cuticular de uma espécie de cupim amplamente distribuída na Serra do Cipó (Capítulo 1). Como não observamos os efeitos altitudinais na composição do perfil químico de *Nasutitermes cf. coxipoensis*, acreditamos que os efeitos genéticos são mais importantes para a formação do perfil cuticular e para a capacidade de reconhecimento intra-específico *N. cf. coxipoensis*. A partir desses resultados, juntamente com o efeito significativo da relação entre distância geográfica e dissimilaridade química, sugerimos que os processos genéticos devem ser preponderantes para a definição da composição química da cutícula que, dessa forma, define o reconhecimento entre colônias.

Além das contribuições em relação às interações intra-específicas, os resultados aqui apresentados são mais uma evidência de que o estresse ambiental causado pela elevação é um modulador de coabitação. Esses resultados aumentam o nosso conhecimento sobre os processos adjacentes ao processo de invasão e colonização que envolvem a associação entre térmitas e seus coabitantes.

Finalmente, a partir de uma meta-análise, conseguimos elucidar uma importante questão ecológica sobre os efeitos dos fungos da madeira nos comportamentos alimentares e sobrevivência de cupins. Até então, existia uma grande incerteza dos reais efeitos desses fungos sobre os cupins. Com as ferramentas meta-analíticas, mostramos que os fungos possuem efeitos positivos ou neutros sobre os cupins, além de indicar quais grupos de fungos e tipos de fungos decompositores agem sobre as espécies de cupins. Esses resultados colocam um ponto de partida para o desenvolvimento de aplicações mais direcionadas desses fungos no controle biológicos de certos cupins

pragas, bem como para compreender se as distribuições das espécies de cupins têm relação com a presença de determinados tipos de fungos.