

UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PAISAGEM, AMBIENTE E ORDENAMENTO

**Deteção no solo de alimento pelas térmitas
subterrâneas *Reticulitermes grassei* (Clément, 1978)**

Marta Sofia Ramos Duarte

Orientação:

Doutora Lina Nunes - Laboratório Nacional de Engenharia Civil

Doutor Pedro Anastácio - Universidade de Évora

Mestrado em Qualidade e Gestão do Ambiente

Especialização em Ecologia e Gestão Ambiental

Dissertação

Évora, 2014

Esta dissertação inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri

Agradecimentos

À Dra. Lina Nunes e ao Professor Pedro Anastácio agradeço a orientação, o apoio, a disponibilidade e a partilha de ideias.

Ao Laboratório Nacional de Engenharia Civil pelo enquadramento institucional e pelo acesso aos meios necessários para efetuar este estudo.

Aos colegas do LNEC, e em especial à Sónia Duarte por todo o apoio ao longo de todo o estudo e no trabalho de laboratório, na partilha de ideias e pela amizade constante.

Às amigas Alice Ribeiro e Liliana Marques por me ouvirem mesmo nos dias mais complicados e ao Francisco Fernandes por todo o apoio ao longo de toda a dissertação.

Ao José Rui por tudo.

Aos meus pais e irmãos, a família é essencial em todas as etapas e esta não é exceção. Obrigada por todo o apoio, desde sempre.

A todos aqueles que possam ter ficado esquecidos, obrigada!

Deteção no solo de alimento pelas térmitas subterrâneas *Reticulitermes grassei* (Clément, 1978)

Resumo: As térmitas subterrâneas estão entre os insetos mais abundantes, sendo também ecológica e economicamente importantes. No entanto, muitas dúvidas continuam a existir sobre a forma como se movimentam no solo e como procuram os recursos alimentares. Alguns componentes químicos libertados pela madeira em diferentes estados de decomposição podem funcionar como indicadores da existência de alimento disponível. Este estudo realizou-se com o objetivo de testar as preferências alimentares das térmitas *Reticulitermes grassei* por madeira degradada por fungos de podridão branca e castanha e por produtos produzidos durante a degradação. Teve ainda como objetivo testar a possibilidade de as térmitas utilizarem as substâncias libertadas pela madeira para encontrarem alimento no solo.

As térmitas foram atraídas pela madeira degradada, dependendo esta atração do nível de degradação do alimento, tendo sido também atraídas por alguns dos produtos da degradação testados como a sacarose. As térmitas demonstraram ainda uma provável utilização dos elementos libertados pela madeira degradada para se guiarem no solo para detetar o alimento.

Palavras-chave: *Reticulitermes grassei*; procura de alimento; fungos de podridão; degradação da madeira; açúcares; lixiviação.

Food detection in the soil by subterranean termites *Reticulitermes grassei* (Clément, 1978)

Abstract: Subterranean termites are among the most abundant insects and are ecologically and economically important. However, many questions exist about the way they move in the soil and how they find food resources. Some chemicals released by wood in different decay levels may function as cues for the presence of food resources. The main objective of this study was to test food preferences of subterranean termites *Reticulitermes grassei* for white and brown rot degraded wood and by degradation substances. Another objective was to test if termites could use substances leached by wood to find food on the soil.

Termites were attracted by decayed wood, this attraction was dependent on the decay level and they have also been attracted by some of the degradation products tested, like sucrose. Termites seem to be able to use the substances released by decayed wood to guide them in the ground and to detect food.

Keywords: *Reticulitermes grassei*; foraging behavior; rot fungi; decayed wood; sugars, leaching.

Índice

Capítulo 1

Introdução geral.....	1
1.1 O que são térmitas?.....	2
1.2 As térmitas e os ecossistemas.....	4
1.3 Térmitas como praga.....	5
1.3.1 Detecção.....	5
1.3.2 Controlo tradicional.....	6
1.3.3 Outras formas de controlo.....	7
1.4 A espécie <i>Reticulitermes grassei</i>	8
1.5 Objetivo.....	9
1.6 Bibliografia.....	10

Capítulo 2

Atração das térmitas subterrâneas <i>Reticulitermes grassei</i> (Clément) por madeira degradada por fungos de podridão.....	14
2.1 Introdução.....	15
2.2 Materiais e Métodos.....	16
Térmitas.....	16
Atrativos.....	17
Obtenção da madeira degradada.....	17
Obtenção dos extratos aquosos a frio.....	18
Ensaio de toxicidade.....	18
Ensaio de escolha.....	20
Análise de dados.....	21
2.3 Resultados.....	22
Cortiça, Pinho e Casca de Pinho.....	22
Ensaio de toxicidade.....	22
<i>Postia placenta</i>	26

<i>Gloeophyllum trabeum</i>	31
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	35
2.4 Discussão	39
2.5 Bibliografia	43

Capítulo 3

Atração das térmitas subterrâneas <i>Reticulitermes grassei</i> (Clément, 1978) por substâncias libertadas durante o processo de degradação da madeira por fungos de podridão	45
3.1 Introdução.....	46
3.2 Materiais e métodos.....	47
Térmitas.....	47
Soluções aquosas	47
Ensaio de toxicidade.....	47
Ensaio de escolha.....	48
Análise de dados	48
3.3 Resultados.....	49
Ensaio de toxicidade	49
Observações diárias dos ensaios de escolha	49
Perdas de massa.....	52
3.4 Discussão	53
3.5 Bibliografia.....	55

Capítulo 4

Procura de alimento no solo, a diferentes distâncias, pelas térmitas subterrâneas <i>Reticulitermes grassei</i> (Clément)	57
4.1 Introdução.....	58
4.2 Matérias e métodos	59
Térmitas.....	59
Ensaio de procura de alimento	60
Análise de dados	62
4.3 Resultados.....	62

Ensaio de escolha a diferentes distâncias.....	62
Ensaio de escolha entre sacarose e extrato de pinho.....	67
4.4 Discussão.....	68
4.5 Bibliografia.....	70
Capítulo 5	
Conclusões.....	72

Índice de figuras

Figura 1. 1 - Ciclo de vida das térmitas <i>Reticulitermes spp.</i> (Adaptado de Kobayashi <i>et al.</i> , 2013).....	4
Figura 1. 2 - Madeiras atacadas por térmitas subterrâneas.....	6
Figura 1. 3 - Esquema representativo de um sistema de controlo. Combinação de barreiras no solo com sistemas de monitorização/armadilhas com isco e tratamentos locais. Foi detetada uma infestação no interior do edifício exigindo um tratamento local. A barreira visou impedir a entrada de térmitas subterrâneas nas estruturas. O acompanhamento do sistema de armadilhagem deve permitir o controlo da população. (Nunes e Nobre, 2001).....	7
Figura 1. 4 - Térmitas da espécie <i>Reticulitermes grassei</i>	9
Figura 2. 1 - Aspeto dos ensaios de toxicidade dos papéis de filtro tratados às térmitas subterrâneas, no final dos 21 dias de exposição.	19
Figura 2. 2 - Esquema de ensaio de escolha.....	20
Figura 2. 3 - Aspecto de ensaios de escolha entre papéis impregnados com substâncias, com térmitas.....	20
Figura 2. 4 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de <i>Kaplan-Meier</i> das térmitas expostas aos extratos com tratamento de: a) Cortiça; b) Pinho e c) Casca de pinho (atrativos) em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (sem tratamento). <i>P</i> calculado pelo teste de <i>Log Rank</i> . Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.	23
Figura 2. 5 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) Cortiça; b) Pinho; e c) Casca de pinho e respetivos controlos (água).	24
Figura 2. 6 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre o mesmo extrato dos diferentes alimentos: a) Cortiça; b) Pinho; e c) Casca de pinho.	24
Figura 2. 7 – Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (cortiça, pinho e casca de pinho) e b) entre o mesmo tipo de extrato (cortiça, pinho e casca de pinho).	25
Figura 2. 8 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de <i>Kaplan-Meier</i> das térmitas expostas aos extratos de madeira degradada por: a) <i>P. placenta</i> 1 perda de massa de 21,59%; b) <i>P. placenta</i> 2 perda de massa de 31,79%; c) <i>P. placenta</i> 3, perda de massa de 38,29% e; d) <i>P. placenta</i> 4, perda de massa de 48,06% em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (água destilada). <i>P</i> calculado pelo teste de <i>Log Rank</i> . Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.	27
Figura 2. 9 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) <i>P. placenta</i> 1 perda de massa de 21,59%; b) <i>P. placenta</i> 2 perda de massa de 31,79%; c) <i>P. placenta</i> 3, perda de massa de 38,29% e d) <i>P. placenta</i> 4, perda de massa de 48,06% e respetivos controlos (água).	28

- Figura 2. 10 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre o mesmo extrato dos diferentes alimentos: a) *P. placenta* 1 perda de massa de 21,59%; b) *P. placenta* 2 perda de massa de 31,79%; c) *P. placenta* 3, perda de massa de 38,29% e; d) *P. placenta* 4, perda de massa de 48,06%.....29
- Figura 2. 11 – Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (*P. placenta* 1, *P. placenta* 2, *P. placenta* 3 e *P. placenta* 4) e b) entre o mesmo tipo de extrato (*P. placenta* 1, *P. placenta* 2, *P. placenta* 3 e *P. placenta* 4).....30
- Figura 2.12 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de *Kaplan-Meier* das térmitas expostas aos extratos de: a) *G. trabeum* 1 perda de massa de 9.31%; b) *G. trabeum* 2 perda de massa de 14.69%; c) *G. trabeum* 3, perda de massa de 24.21% e d) *G. trabeum* 4, perda de massa de 35.69% em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (água destilada). *P* calculado pelo teste de *Log Rank*. Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.31
- Figura 2. 13 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) *G. trabeum* 1 perda de massa de 9.31%; b) *G. trabeum* 2 perda de massa de 14.69%; c) *G. trabeum* 3, perda de massa de 24.21% e d) *G. trabeum* 4, perda de massa de 35.69% e respetivos controlos (água).32
- Figura 2. 14 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre o mesmo extrato dos diferentes alimentos: a) *G. trabeum* 1 perda de massa de 9.31%; b) *G. trabeum* 2 perda de massa de 14.69%; c) *G. trabeum* 3, perda de massa de 24.21% e d) *G. trabeum* 4, perda de massa de 35.69%.....33
- Figura 2. 15 - Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (*G. trabeum* 1, *G. trabeum* 2, *G. trabeum* 3 e *G. trabeum* 4) e b) entre o mesmo tipo de extrato (*G. trabeum* 1, *G. trabeum* 2, *G. trabeum* 3 e *G. trabeum* 4).....34
- Figura 2. 16 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de *Kaplan-Meier* das térmitas expostas aos extratos de: a) *P. sanguineus* 1 perda de massa de 8.32%; b) *P. sanguineus* 2 perda de massa de 14.23%; c) *P. sanguineus* 3, perda de massa de 18.44% e; d) *P. sanguineus* 4, perda de massa de 25.60% em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (água destilada). *P* calculado pelo teste de *Log Rank*. Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.....36
- Figura 2. 17 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) *P. sanguineus* 1 perda de massa de 8.32%; b) *P. sanguineus* 2 perda de massa de 14.23%; c) *P. sanguineus* 3, perda de massa de 18.44% e; d) *P. sanguineus* 4, perda de massa de 25.60% e respetivos controlos (água).37
- Figura 2. 18 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre o mesmo extrato dos diferentes alimentos: a) *P. sanguineus* 1 perda de massa de 8.32%; b) *P. sanguineus* 2 perda de massa de 14.23%; c) *P. sanguineus* 3, perda de massa de 18.44% e d) *P. sanguineus* 4, perda de massa de 25.60%.38
- Figura 2. 19 – Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (*P. sanguineus*1, *P. sanguineus* 2, *P.*

<i>sanguineus</i> 3 e <i>P. sanguineus</i> 4) e b) entre o mesmo tipo de extrato (<i>P. sanguineus</i> 1, <i>P. sanguineus</i> 2, <i>P. sanguineus</i> 3 e <i>P. sanguineus</i> 4).	39
Figura 3. 1 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de <i>Kaplan-Meier</i> das térmitas expostas às soluções aquosas de: a) glicose a 2%; b) sacarose a 2%; c) xilose a 2% e; d) carbonato de potássio a 0.05% em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (água destilada). <i>P</i> calculado pelo teste de <i>Log Rank</i> . Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.....	50
Figura 3. 2 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) glicose a 2% b) sacarose a 2% c) xilose a 2 % e d) carbonato de potássio a 0.05% e respetivos controlos (água).	51
Figura 3. 3 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre papéis com a mesma solução aquosa: a) glicose a 2% b) sacarose a 2% c) xilose a 2 % e d) carbonato de potássio a 0.05%.....	52
Figura 3. 4 – Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (glicose, sacarose, xilose e c. potássio) e b) entre o mesmo tipo de extrato.	53
Figura 4. 1 - Esquema de ensaio de procura de alimento pelas térmitas.....	60
Figura 4. 2 - Esquema da parte superior do ensaio de procura de alimento pelas térmitas. .	61
Figura 4. 3 - Ensaio de procura de alimento.	61
Figura 4. 4 - Perdas de massa (%) dos papéis de filtro utilizados em ensaios com diferentes atrativos e respetivos controlos (extrato de pinho) colocados a distâncias diferentes, 40 e 80 mm.	63
Figura 4. 5 - Perdas de massa (%) dos provetes de pinho associados aos papéis de filtro utilizados em ensaios com diferentes atrativos e respetivos controlos (extrato de pinho) colocados a distâncias diferentes, 40 e 80 mm.	63
Figura 4. 6 - Perdas de massa (%) dos papéis de filtro, e dos respetivos provetes, utilizados em ensaios com a substância atrativa, sacarose a 80 mm de distância e o respetivo controlo (extrato de pinho) a 40 mm. <i>p</i> calculado pela comparação, entre as perdas de massa dos papéis de filtro impregnados com sacarose e com extrato de pinho, e das perdas de massa dos provetes associados a estes papéis de filtro, através do teste estatístico <i>T</i> de <i>student</i> . .	68

Índice de tabelas

Tabela 2. 1 - Perdas de massa (%) dos provetes utilizados para fazer os extratos.	19
Tabela 2. 2 - Comparação, através do teste estatístico de <i>Friedman</i> , do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios com e sem escolha.....	25
Tabela 2. 3 - Resultados do teste estatístico <i>T</i> de <i>student</i> , para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (pinho, cortiça, pinho e casca de pinho) e os respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.....	26
Tabela 2. 4 - Comparação, através do teste estatístico de <i>Friedman</i> , do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios de escolha e sem escolha.	28
Tabela 2. 5 - Resultados do teste estatístico <i>T</i> de <i>student</i> , para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (<i>P. placenta</i> 1, <i>P. placenta</i> 2, <i>P. placenta</i> 3 e <i>P. placenta</i> 4) e os respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.....	30
Tabela 2. 6 - Comparação, através do teste estatístico de <i>Friedman</i> , do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios de escolha e sem escolha.	33
Tabela 2. 7 - Resultados do teste estatístico <i>T</i> de <i>student</i> , para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (<i>G. trabeum</i> 1, <i>G. trabeum</i> 2, <i>G. trabeum</i> 3 e <i>G. trabeum</i> 4) e os respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.....	35
Tabela 2. 8 - Comparação, através do teste estatístico de <i>Friedman</i> , do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios de escolha e sem escolha.	37
Tabela 2. 9 - Resultados do teste estatístico <i>T</i> de <i>student</i> , para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (<i>P. sanguineus</i> 1, <i>P. sanguineus</i> 2, <i>P. sanguineus</i> 3 e <i>P. sanguineus</i> 4) e os respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.	39
Tabela 3. 1 - Comparação, através do teste estatístico de <i>Friedman</i> , do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios de escolha e sem escolha.	51
Tabela 3. 2 - Resultados do teste estatístico <i>T</i> de <i>student</i> para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (glicose, sacarose, xilose e c. potássio) e os	

respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.....	53
Tabela 4. 1 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa de papéis de filtro com extrato de <i>G. trabeum</i> e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.	64
Tabela 4. 2 - Resultados da ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa dos provetes associados aos papéis de filtro com extrato de <i>G. trabeum</i> e de extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.	65
Tabela 4. 3 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa de papéis de filtro com sacarose a 2% e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.	65
Tabela 4. 4 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa dos provetes associados aos papéis de filtro com sacarose a 2% e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.	66
Tabela 4. 5 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa de papéis de filtro com extrato de <i>P. sanguineus</i> e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.	67
Tabela 4. 6 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa dos provetes associados aos papéis de filtro com extrato de <i>P. sanguineus</i> e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.	67

Capítulo 1

Introdução geral

1.1 O que são térmitas?

As térmitas constituem uma das cerca de 30 Ordens de insetos, a ordem Isoptera, do grego “iso”, que significa igual e “ptera”, referente a asas, tendo as asas anteriores e posteriores o mesmo tamanho. No entanto, investigadores têm argumentado recentemente que as térmitas pertencem à mesma ordem das baratas, a ordem Blattodea e à família Termitidae, pertencendo esta ordem à superordem Dictyoptera (Inward *et al.* 2007; Beccaloni e Eggleton, 2013). A morfologia destes insetos é relativamente simples, não sofrendo metamorfose durante o seu desenvolvimento, mas em contrapartida possuem um comportamento social bastante complexo (Kambhampati e Eggleton, 2000).

Existem cerca de 3000 espécies de térmitas no mundo (Rust e Su, 2012). Estas são normalmente divididas em térmitas superiores e inferiores, contendo as superiores cerca de 80% das espécies de térmitas existentes e as inferiores as restantes. As térmitas subterrâneas (família Rhinotermitidae) pertencem ao grupo das térmitas inferiores (Vargo e Husseneder, 2009). As térmitas subterrâneas são o grupo de térmitas com uma distribuição mais ampla, podendo ocorrer em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo especialmente abundantes nas regiões temperadas (Bignell e Eggleton, 2000; Eggleton, 2000).

As térmitas são insetos sociais e polimórficos, vivendo em grupos familiares de grandes dimensões, tendo os seus indivíduos várias formas morfológicas ou castas, com divisão de tarefas entre reprodutores (rei, rainha e aladas), obreiras e soldados (Kambhampati e Eggleton, 2000). A rainha e o rei são geralmente os únicos com gónadas sexuais ativas na colónia, tendo a função reprodutiva. As aladas são reprodutoras com a função de dispersão da colónia. Cada espécie produz um grupo de aladas numa determinada altura do ano. Depois de voarem e procurarem um novo local para constituírem o ninho, perdem as asas e acasalam, dando-se assim início a uma nova colónia (Kambhampati e Eggleton, 2000).

As obreiras são estéreis sendo a casta mais numerosa nas colónias de térmitas subterrâneas, são o seu suporte pois desempenham diversas tarefas essenciais, tais como: procura de alimento e de água, construção e reparação da estrutura da colónia e alimentação dos restantes elementos pertencentes à colónia através do processo de trofalaxia (Lainé e Wright, 2003). A trofalaxia consiste na troca de fluidos do aparelho digestivo entre membros da colónia, podendo ser estomodeal ou proctodeal. A estomodeal consiste na troca de saliva e de alimentos regurgitados e a proctodeal na transferência de fluidos contendo produtos das digestão e simbiontes (McMahan, 1969). As obreiras

pertencentes às térmitas subterrâneas têm peças bucais adaptadas à mastigação e possuem simbiontes (protistas flagelados e bactérias) nos seus intestinos que contribuem para a digestão eficiente da madeira, entre outras funções (Lainé e Wright, 2003). Os soldados têm a tarefa de defesa da colónia, particularmente do rei e da rainha, podendo também acompanhar as obreiras na procura de alimento (Roisin, 2000; Eggleton, 2011).

Em regra as colónias das térmitas subterrâneas são fundadas por pares reprodutores monogâmicos que se cruzam após o voo de dispersão. Estes voos ocorrem em resposta às condições climáticas durante períodos específicos do ano e de cada espécie (Kutnik *et al.*, 2004). A dispersão pode ser de apenas alguns metros até 1 km ou mais (Kutnik *et al.*, 2004). Após o voo de dispersão os indivíduos perdem as asas e iniciam o processo de procura de parceiros. Em algumas espécies do género *Reticulitermes* este processo é facilitado por uma hormona emitida pelas fêmeas (Vargo e Husseneder, 2009). Depois o casal procura um local adequado para construir o ninho, geralmente perto de uma fonte de alimento (Vargo e Husseneder, 2009). Após a constituição do ninho inicia-se a formação da colónia. No caso de um dos elementos do par reprodutor morrer, pode ser substituído por um reprodutor secundário, que se desenvolve no interior da colónia a partir de obreiras ou de ninfas. O número de reprodutores secundários dentro de uma colónia pode variar, podendo a colónia ter várias gerações resultantes de endogamia (Vargo e Husseneder, 2009).

A fêmea reprodutora põe ovos que se desenvolvem em larvas totipotentes, ou seja, têm a capacidade de se transformar em soldados, obreiras ou ninfas, conforme a época do ano, o alimento disponível e as feromonas emitidas pelo resto da colónia. As obreiras têm a capacidade de se transformar em soldados ou em ergatóides (reprodutores secundários), no caso de haver esse estímulo por parte da colónia (Figura 1.1). As ninfas transformam-se em nifóides (reprodutores secundários) ou em aladas, desenvolvendo-se aproximadamente dois anos após a fundação da colónia e em alturas específicas do ano (Lainé e Wright, 2003).

As térmitas subterrâneas vivem em ambientes desprovidos de luz, no interior da madeira, no solo ou em túneis por elas construídos a partir de partículas terrosas e dos seus dejectos cimentados com secreções salivares. A comunicação entre os indivíduos da colónia pode ser sensorial ou química. Uma das formas de comunicação química é através de feromonas. Estas substâncias têm influência em quase todo o tipo de comportamento das térmitas, por exemplo na defesa, na construção do ninho e até na forma como procuram alimento. A comunicação sensorial dá-se quando os indivíduos se organizam de forma a permitir o contacto sensorial e químico, contribuindo assim para a remoção de detritos do solo, bactérias, fungos e parasitas da sua cutícula (Stuart, 1969; Traniello *et al.* 2000).

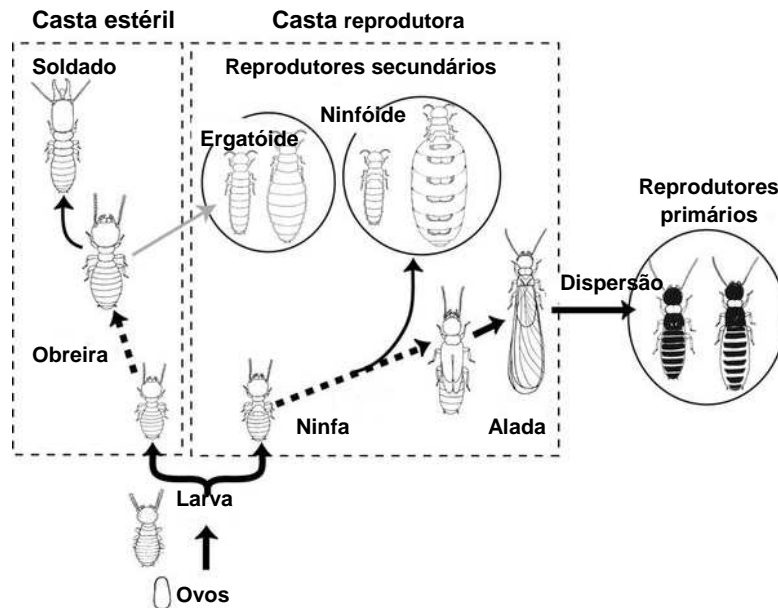


Figura 1. 1 - Ciclo de vida das térmitas *Reticulitermes* spp. (Adaptado de Kobayashi *et al.*, 2013).

1.2 As térmitas e os ecossistemas

As térmitas desempenham papéis muito importantes nos ecossistemas onde vivem, podendo influenciá-los de forma positiva ou negativa. Um dos seus papéis mais importantes é na degradação de matéria orgânica, levando à reciclagem do carbono e o seu sequestro para o solo, contribuindo também para a reciclagem de outros nutrientes (Bignell e Eggleton, 2000; Jouquet *et al.*, 2011).

Ao fazerem o seu ninho e escavarem túneis no solo durante o processo de procura de alimento, as térmitas subterrâneas contribuem para o arejamento do solo e para a mistura de matéria orgânica com a mineral, levando à formação de complexos organominerais, bem como para a infiltração de água no solo. A presença das térmitas num ecossistema contribui ainda para a mineralização do carbono, para a estabilização de complexos orgânicos e para a fixação de nitrogénio, fatores relevantes para o crescimento das plantas e a manutenção do equilíbrio dinâmico do ecossistema (Bignell e Eggleton, 2000; Jouquet *et al.*, 2011).

Alguns géneros de térmitas alimentam-se de herbáceas, podendo desta forma competir por alimento com outros herbívoros, sendo também fonte de gases com efeito de estufa. Outras espécies, também devido à sua forma de alimentação podem estabelecer relações simbióticas com outros organismos como bactérias e protozoários (Bignell e

Eggleton, 2000; Jouquet *et al.*, 2011). Apesar do seu papel fundamental nos ecossistemas naturais, em meio urbano são geralmente consideradas como praga.

1.3 Térmitas como praga

Das cerca de 3000 espécies de térmitas no Mundo apenas uma pequena minoria (6,1%) são consideradas uma praga, e destas apenas 2,8% causam danos em estruturas de madeira (Rust e Su, 2012). As térmitas subterrâneas, nomeadamente as do género *Reticulitermes*, estão incluídas nesse grupo, sendo consideradas como praga em meio urbano (Su e Scheffrahn, 2000). As térmitas subterrâneas podem também ser consideradas pragas de algumas culturas florestais ou agrícolas, por exemplo, no Brasil são consideradas uma praga para culturas como o eucalipto e a cana-de-açúcar (Batista *et al.*, 2004).

1.3.1 Detecção

O primeiro problema no controlo das térmitas é a sua deteção. As térmitas subterrâneas alimentam-se no interior da madeira, o que dificulta a sua deteção visual, pois normalmente são apenas detetadas numa fase avançada do ataque. Uma das formas de deteção é a visualização de túneis característicos junto ao solo, nas paredes de edifícios e/ou a presença de partículas fecais e de asas ou aladas durante a época do voo de dispersão. No entanto, a forma mais eficaz de detetar um ataque por térmitas subterrâneas é avaliar o aspeto da madeira danificada, que normalmente está associada a zonas com humidade mais elevada (Figura 1.2) (Nunes e Nobre, 2001).



Figura 1. 2 - Madeiras atacadas por térmitas subterrâneas.

1.3.2 Controlo tradicional

O controlo de térmitas subterrâneas envolve métodos de prevenção ou, no caso de estes falharem, métodos de desinfestação (Culliney e Grace, 2000), sendo este último bastante difícil tendo em conta o tamanho e o comportamento das colónias de térmitas. Existem diversas técnicas de controlo de térmitas subterrâneas como por exemplo as barreiras químicas, que são instaladas através de inseticidas colocados no solo à volta do edifício a proteger e a impregnação ou injeção de compostos nocivos para os insectos na madeira usada na construção. As barreiras físicas que podem ser instaladas são por vezes constituídas por aço inoxidável ou por outras matérias não atractivas e impedindo estas a passagem das térmitas para a madeira. Pode também fazer-se o controlo da colónia através de armadilhas de solo ou colocadas no interior da estrutura atacada por térmitas (Su e Scheffrahn, 2000). Em situações em que a infestação já se encontra num estado avançado por vezes torna-se necessário recorrer a métodos mais agressivos, como a aplicação de inseticida na superfície ou no interior da madeira infestada. Em último caso pode-se optar por substituir a madeira infestada por madeira sã tratada (Su e Scheffrahn, 2000).

No passado, o uso de inseticidas organoclorados foi bastante eficaz no controlo de térmitas, no entanto, devido à sua persistência, estabilidade no solo e estabilidade em relação à radiação ultravioleta da luz solar estes criaram diversos problemas ambientais e em alguns casos bio-ampliação nas cadeias tróficas, causando perturbações na flora, na fauna e na saúde pública (Nunes e Nobre, 2001). Outros inseticidas como os fenilpirazoles, que apesar de terem uma baixa persistência ambiental e pouco risco para os humanos, são facilmente absorvidos pelas partículas sedimentares, podendo afetar o desenvolvimento larvar de alguns peixes e acumular-se nos tecidos de algumas larvas de insectos (San Miguel *et al.*, 2008; Beggel *et al.*, 2012).

Uma abordagem em termos de gestão integrada de pragas veio substituir o uso intensivo de pesticidas no controlo das térmitas, envolvendo a necessidade de um maior conhecimento da ecologia e do comportamento destes insectos, bem como o uso de métodos de controlo biológica e quimicamente mais seguros, e o privilégio de métodos de intervenção preventivos sobre as medidas curativas (Nunes e Nobre, 2001). O sistema de armadilhas com pesticidas é bastante utilizado, geralmente depois de serem detetadas as térmitas subterrâneas, podendo demorar algum tempo até que as armadilhas sejam encontradas pelas obreiras (Potter *et al.*, 2001). O uso de armadilhas de solo permite a utilização de pequenas quantidades de inseticida, constituindo um método mais específico e

ecológico do que a injeção de inseticida no solo. No entanto, de forma a este método ser eficaz, as térmitas devem conseguir encontrar as armadilhas com o isco, alimentar-se e transmitir o inseticida ao resto da colónia. Comercialmente existem diversos tipos de armadilhas para térmitas subterrâneas, mas todos têm como objetivo a gestão populacional das colónias. Esta gestão é, em regra, feita através da distribuição de uma substância tóxica ou inibidora dentro de um alimento (de base celulósica) (Grace *et al.*, 1996), como por exemplo a madeira não tratada (Sentricon® Colony Elimination System) ou o cartão (FirstLine® System, Spectracide Terminate™). A estratégia baseia-se na procura de alimento por parte das obreiras, que se vão alimentar de uma substância com inseticida e partilhá-la, por trofalaxia, com o resto da colónia (Potter, 1997; Su e Scheffrahn, 1996), levando à morte da mesma. O inseticida utilizado não deve ser repelente e não deve ter uma ação imediata de forma a evitar o abandono da armadilha por parte das térmitas. Para aumentar a eficácia da gestão das colónias de térmitas subterrâneas é necessário um planeamento a longo prazo. É ainda necessária a aplicação de uma estratégia de controlo integrado de pragas envolvendo medidas preventivas e/ou curativas, tendo em conta a especificidade da situação e os antecedentes da infestação por térmitas (Figura 1.3) (Nunes e Nobre, 2001).



Figura 1.3 - Esquema representativo de um sistema de controlo. Combinação de barreiras no solo com sistemas de monitorização/armadilhas com isco e tratamentos locais. Foi detetada uma infestação no interior do edifício exigindo um tratamento local. A barreira visou impedir a entrada de térmitas subterrâneas nas estruturas. O acompanhamento do sistema de armadilhagem deve permitir o controlo da população. (Nunes e Nobre, 2001).

1.3.3 Outras formas de controlo

Atualmente estão a ser investigados métodos mais eficientes para atrair as térmitas subterrâneas para as armadilhas com base num maior conhecimento sobre a sua biologia. As térmitas podem ser atraídas de várias formas. Entre elas incluem-se químicos libertados pela madeira, de feromonas, ou de fontes de CO₂. O CO₂ pode ser utilizado pelas térmitas

para localizarem o alimento, podendo eventualmente servir como um indicador da existência de madeira húmida para as térmitas (Bernklau *et al.*, 2005; Broadbent *et al.*, 2006). O fungo *Gloeophyllum trabeum* é capaz de sintetizar uma substância que atrai as térmitas através de um composto rico em carbono, o (Z,Z,E) – 3,6,8 – dodecatrieno - 1 – ol (Matsumura *et al.*, 1976), esta substância é uma feromona presente em térmitas do género *Reticulitermes*, que tem sido considerada como o principal composto utilizado pelas espécies pertencentes a este género de térmitas como pista para descobrir alimento (Wobst *et al.*, 1999).

No entanto, subsistem ainda muitas questões quanto à forma como as térmitas localizam o alimento no solo. O processo de procura parece ser inicialmente quase aleatório (Nobre *et al.* 2007; Lee e Su, 2011) mas não se pode excluir que as térmitas se guiem por sinais existentes no solo, tais como gradientes químicos lixiviados pela madeira. Podem também ser guiadas por gradientes de sacarose ou de ureia libertados pela madeira em decomposição (Waller *et al.*, 1999) ou por cationes lixiviados para o solo, como por exemplo o Potássio (K) (Botch e Judd, 2011).

1.4 A espécie *Reticulitermes grassei*

O género *Reticulitermes* tem uma distribuição holártica (Eggleton, 2000) e é o principal género de térmitas subterrâneas presente no sul da Europa. Em Portugal as térmitas pertencentes a este género ocorrem naturalmente por todo o país, sendo reconhecido como uma praga da madeira em construção (Nunes, 2008). Este género é representado em Portugal continental apenas pela espécie *Reticulitermes grassei* (Clément, 1978) (Nobre *et al.*, 2006; Austin *et al.*, 2012).

A espécie *R. grassei* (térmita subterrânea) ou *Reticulitermes lucifugus grassei* (Clément *et al.*, 2001) é considerada como pertencentes ao grupo das térmitas inferiores. As térmitas pertencentes a esta espécie constroem galerias simples, com ausência de ninhos bem definidos, têm baixa complexidade social, e alimentam-se apenas de madeira e não de outras fontes de celulose. Ocorrem em latitudes mais temperadas e possuem protozoários flagelados e bactérias nos seus intestinos (essenciais para a digestão da celulose) (Myles *et al.*, 2007). Como esta espécie se alimenta de recursos celulósicos encontra-se maioritariamente nas raízes, nos cepos, nos trocos caídos e no solo, sempre que se verificam condições favoráveis ao seu desenvolvimento. A sua distribuição é de Norte a Sul de Portugal continental e nos Açores (Nunes, 2008; Austin *et al.*, 2012). Encontrando-se também na costa atlântica e Sul de França e em Espanha (Kutnik *et al.*, 2004; Deheer *et al.*,

2005). Esta espécie é considerada autóctone na Europa Mediterrânea, tendo sido descrita pela primeira vez em 1792 (Grassé, 1986). A primeira referência encontrada em Portugal continental remota ao início do século XX (Seabra, 1907), tendo o seu número de observações aumentado nos últimos anos (Nobre e Nunes, 2001).



Figura 1. 4 - Térmitas da espécie *Reticulitermes grassei*.

Admite-se que a espécie *R. grassei* surgiu na Península Ibérica após a última Era Glaciar (13000 a.C.). Após a Era Glaciar a população que se encontrava refugiada no Sul da Península Ibérica dispersou-se possivelmente para o Norte, Este e Oeste da Península, seguindo a costa Mediterrânea e Atlântica. Desta dispersão poderão ter divergido duas populações, que se estabeleceram em regiões climáticas muito distintas, uma húmida e temperada, no lado Ocidental, e outra quente e seca, no lado Oriental. Desta separação poderão ter surgido diferenças genéticas que levaram à origem das duas espécies distintas existentes nas regiões referidas, a *Reticulitermes grassei* e a *Reticulitermes banyulensis* (Clément, 1984).

1.5 Objetivo

Um dos objetivos centrais desta investigação foi a identificação dos iscos que são passíveis de atrair as térmitas subterrâneas *Reticulitermes grassei* (Clément 1978), dentro de um grupo de iscos pré-selecionados, em ambiente de laboratório. Após a identificação dos iscos mais atrativos, propôs-se igualmente verificar de que forma as térmitas se guiam para encontrar o alimento no solo. Foi testada a possibilidade das mesmas utilizarem substâncias lixiviadas da madeira para o solo como sinais para localizarem o alimento, em ambiente de laboratório.

Os resultados deste estudo poderão contribuir para um melhor conhecimento da ecologia alimentar da espécie estudada e desta forma contribuir para a otimização das armadilhas utilizadas para o controlo de térmitas em meio urbano. O que permitirá uma utilização mais eficiente e conscienciosa das substâncias nocivas utilizadas para controlo das térmitas e libertadas no meio ambiente.

1.6 Bibliografia

- Austin, W., Szalanski, L., Myles, G., Borges V., Nunes, L. & Scheffrahn, H. (2012). "First record of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) from Terceira Island (Azores, Portugal) ". Florida Entomologist Society. 95 (1): 196-198;
- Batista-Pereira, L., Santos, M., Correa, A., Fernandes, J., Arab, A., Costa-Leonardo, A., Dietrich, C., Pereira, D. & Bueno, O. (2004). "Cuticular hydrocarbons of *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae): analyses and electrophysiological studies". Zeitschrift fur Naturforschung. 59:135-139;
- Beccaloni, G., & Eggleton, P. (2013). "Order Blattodea". In Zhang, Z.-Q. (eds.). *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness* (Addenda 2013). Zootaxa. 3703 (1): 46 - 48;
- Beggel, S., Werner, I., Connon, R. & Geist, J. (2012). "Impacts of the phenylpyrazole insecticide fipronil on larval fish: time-series gene transcription responses in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following short-term exposure". Science of the Total Environment. 426: 160–165;
- Bernklau, E., Fromm, E., Judd, T. & Bjostad, L. (2005). "Attraction of subterranean termites (Isoptera) to carbon dioxide". Journal of Economic Entomology. 98 (2):476 – 484;
- Bignell, D. & Eggleton, P. (2000). "Termites in ecosystems". In: Abe T., Bignell D., Higashi M. (eds). "*Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*". Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. Pp 389 - 408;
- Botch, P. & Judd, T. (2011). "Effects of soil cations on the foraging behavior of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae)". Journal of Economic Entomology. 104 (2): 425-435;
- Broadbent, S., Farr, M., Bernklau, J., Siderhurst M., James, M. & Bjostad, B. (2006). "Field attraction of termites to a carbon dioxide-generating bait in Australia (Isoptera)". Sociobiology. 48 (3): 771-779;
- Clément, J.-L. (1984). "Diagnostic alleles of species in *Reticulitermes*". Experientia 40: 283–285.
- Clément, J.-L., Bagnères, A.-G., Uva, P., Wilfert, L., Quintana, A., Reinhard, J. & Dronneti, S. (2001). "Biosystematics of *Reticulitermes* termites in Europe: morphological, chemical and molecular data". Insectes Sociaux. 48: 202–215.
- Culliney, W. & Grace, K. (2000). "Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae), with special reference to *Coptotermes formosanus*". Bulletin of Entomological Research. 90: 9 - 21;

- DeHeer, C., Kutnik, M., Vargo, E., & Bagnères, A-G. (2005). "The breeding system and population structure of the termite *Reticulitermes grassei* in Southwestern France". *Heredity*. 95: 405 – 415;
- Eggleton P. (2000). "Global patterns of termite distribution". In: Abe T., Bignell D., Higashi M. (eds). "*Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*". Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. Pp 25–51;
- Eggleton, P. (2011). "An Introduction to termites: Biology, taxonomy and functional morphology". In: Bignell, D., Roisin, Y., Lo, N. (eds). "*Biology of Termites: A Modern Synthesis*". Springer Netherlands. Pp 1 – 26;
- Grace, J., Tome, C., Shelton, T., Oshiro, R. & Yates, J. (1996). "Baiting studies and considerations with *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) control in Hawaii". *Sociobiology*. 28: 511- 520;
- Grassé, P. (1986). "Systématique et répartition géographique des termites". In "Termitologia, Vol. 3". Masson, Paris. Pp 492 – 634;
- Jouquet, P., Traoré, S., Choosai, C., Hartmann, C. & Bignell, D. (2001). "Influence of termites on ecosystem functioning. Ecosystem services provided by termites". *European Journal of Soil Biology*. 47: 215 – 222;
- Inward, D., Beccaloni, G., & Eggleton, P. (2007). "Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches". *Biology Letters*. 3: 331–335;
- Kambhampati, S. & Eggleton, P. (2000). "Taxonomy and phylogeny of termites". In: Abe T., Bignell D., Higashi M. (eds). "*Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*". Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. Pp 1 – 25;
- Kobayashi, K., Hasegawa, E., Yamamoto, Y., Kawatsu, K., Vargo, E., Yoshimura, J., & Matsumura, K. (2013). "Sex ratio biases in termites provide evidence for kin selection". *Nature Communication* 4. Pp. 2048;
- Kutnik, M., Uva, P., Brinkworth, L., & Bagnères, A. (2004). "Phylogeography of two European *Reticulitermes* (Isoptera) species: the Iberian refugium". *Molecular Ecology*. 13: 3099–3113;
- Lainé, L., & Wright, D. (2003). "The life cycle of *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae): what do we know?". *Bulletin of Entomological Research*. 93: 267 – 378;
- Lee, S-H. & Su, N-Y. (2011). "Territory size distribution of Formosan subterranean termites in urban landscape: Comparison between experimental and simulated results". *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 14: 1-6;
- Matsumura, E., Nishimoto, K., Ikeda, T. & Coppel, H. (1976). "Influence of carbon sources on the production of termite trail-following substance by *Gloeophyllum trabeum*". *Journal of Chemical Ecology*. 2(3):299-305;
- McMahan, E.A. (1969). "Feeding relationships and radio-isotope techniques". In: K. Krishna e F. Weesner, (eds.). *Biology of Termites* vol. 1. Academic Press, New York, Londres. Pp. 387–406;
- Myles, T., Borges, P., Ferreira, M., Guerreiro, O., Borges, A., & Rodrigues, C. (2007). "Filogenia, biogeografia e ecologia das térmitas dos açores". In: Borges, P. e Myles, T. (eds). "*Térmitas dos Açores*". Principia. Pp 15 – 28;

- Nobre, T. & Nunes, L. (2001). "Preliminary assessment of the termite distribution in Portugal". *Silva Lusitana*, 9: 217 - 224;
- Nobre, T., Nunes, L., Eggleton, P. & Bignell, D. (2006). "Distribution and genetic variation of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Portugal". *Heredity* 96(5): 403-409;
- Nobre, T., Nunes, L. & Bignell, D. (2007). "Tunnel geometry of the subterranean termite *Reticulitermes grassei* (Isoptera: Rhinotermitidae) in response to sand bulk density and the presence of food". *Insect Science*. 14: 511-518;
- Nunes, L. (2008). "Termite infestation risk in Portuguese historic buildings". Cost Action IE0601 "*Wood Science for Conservation of Cultural Heritage*". Braga, Portugal, 5 a 7 de novembro de 2008. Online <http://www.woodculther.org/>;
- Nunes, L. & Nobre, T. (2001). "Strategies of subterranean termite control in buildings". In: Lourenço, P., Roca, P. (eds). "*Historical Constructions*". Guimarães.
- Potter, M. (1997). "Termite baits: a status report. *Pest Control Technology*". 25: 24-26, 28, 30, 35-37, 97, 105-106, 110;
- Potter, M., Eliason, E., Davis, K. & Bessin R. (2001). "Managing subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in the Midwest with a hexaflumuron bait and placement considerations around structures". *Sociobiology*. 38: 565-584;
- Roisin, Y. (2000). "Diversity and evolution of caste patterns". In: Abe T., Bignell D., Higashi M. (eds). "*Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*". Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands. Pp 95 – 121;
- Rust, M., & Su, N-Y. (2012). "Managing social insects of urban importance". *Annual Review of Entomology*. 57:355–75;
- San Miguel, A.; Raveton, M.; Lempérière, G. & Ravel, P., (2008). "Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola)". *Soil Biology & Biochemistry* .40: 2351–2357;
- Seabra, F. (1907). "Quelques observations sur le Calotermes Flavicornis (Fab) et le termes Lucifugus Rossi". In "*Boletim da Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais*". 1 : 122 – 123 ;
- Stuart, A. (1969). "Social behavior and communication". In: K. Krishna and F. Weesner (eds). "*Biology of termites Vol. 1*". Academic Press. New York. Pp. 193 – 232;
- Su, N.-Y., & Scheffrahn, R. (1996). "A review of the evaluation criteria for bait-toxicant efficacy against field colonies of subterranean termites (Isoptera)". *Sociobiology*. 28: 521-530;
- Su, N.-Y. & Scheffrahn, R. (2000). "Termites as pests of buildings". In : Abe T., Bignell D., Higashi M. (eds). "*Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*". Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands. Pp. 437-453;
- Traniello, J. & Leuthold, R. (2000). "Behavior and ecology of foraging in termites". In: Abe T., Bignell D., Higashi M. (eds). "*Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*". Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands. Pp. 141 -168;
- Vargo, E., & Husseneder, C. (2009). "Biology of subterranean termites: Insights from molecular studies of *Reticulitermes* and *Coptotermes*". *Annual Review of Entomology*. 54: 379 – 403;
- Waller, D., Morlino, S., & Matkins, N. (1999). "Factors affecting termite recruitment to baits in laboratory and field studies". In: Robinson, W., Rettich, F. & Rambo, G. (eds.).

"*Proceedings of the Third International Conference on Urban Pests*", 19-22 July 1999. Czech University of Agriculture, Prague, Czech Republic. Pp. 597-600;

Wobst, B., Farine, J.-P., Ginies, C., Sémon, E., Robert, A., Bonnard, O., Connétable S. & Bordereau, C. (1999). "(Z,Z,E)-3,6,8-dodecatrien1-ol, a major component of the trail-following pheromone in two sympatric termite species *Reticulitermes lucifugus grassei* Clément and *R. santonensis* Feytaud". *Journal of Chemical Ecology*. 25: 1305–1318.

Capítulo 2

Atração das térmitas subterrâneas *Reticulitermes grassei* (Clément) por madeira degradada por fungos de podridão

2.1 Introdução

As térmitas subterrâneas são responsáveis por grande parte da degradação da madeira e de outras fontes de celulose existentes nos ecossistemas terrestres, tendo a atividade destas um papel fulcral no ciclo de nutrientes no ecossistema (Schaefer e Whitford, 1981). A seleção de alimento pelas térmitas pode ser influenciada por fatores como as preferências de cada espécie, as características de cada tipo de madeira (tais como o tipo de extratos libertados pela madeira ou o seu teor em água) e se o alimento se encontra atacado por outros organismos como insetos ou fungos (Getty e Haverty, 1998). Em particular, a madeira degradada por fungos de podridão pode ser vantajosa em termos de recurso alimentar para as térmitas. A ação dos fungos de podridão pode promover o aumento de nutrientes disponíveis, o azoto e certas vitaminas, bem como a quebra de substâncias tóxicas da madeira, facilitando a digestão de celulose pelas térmitas (Waller e La Fage, 1987). Segundo Becker (1976) as colónias das térmitas *Reticulitermes lucifugus* são cinco vezes maiores quando encontradas em madeira degradada por fungos do que em madeira sã. Este autor evidenciou também que a mortalidade das térmitas quando se alimentam de madeira podre é menor do que quando se alimentam de madeira não degradada. No entanto, não são só as térmitas que beneficiam com esta associação. Os fungos também são beneficiados, as térmitas podem transportar os esporos e as hifas destes para novas áreas (Hendee, 1934). Por outro lado, os fungos também podem ser prejudiciais às térmitas visto terem capacidade de sintetizar substâncias tóxicas para as térmitas ou de se tornarem seus parasitas (Becker, 1976). Também as térmitas podem ser nefastas para os fungos, tendo a capacidade de inibir o seu desenvolvimento e evitar que os seus esporos se espalhem (Jayasimha e Henderson, 2007). Desta forma as térmitas subterrâneas podem preferir madeira degradada por algumas espécies de fungos (os que lhe são benéficos) ou evitar a madeira degradada por outros (Becker, 1976). A interação entre térmitas e fungos pode ser muito diversificada, incluindo relações de mutualismo, parasitismo ou simbiose, no entanto, as relações complexas entre térmitas e fungos são ainda, em grande parte, desconhecidas (Lefèvre, 2000).

Vários estudos têm demonstrado as preferências das térmitas subterrâneas por determinadas espécies de madeira, no entanto, as alterações provocadas pela degradação por determinados fungos de podridão (Filo Basidiomycota) podem alterar as suas escolhas alimentares (Su e Tamashiro, 1986; Morales-Ramos e Rojas, 2001). Os fungos de podridão castanha parecem atrair as térmitas de forma diferente da dos fungos de podridão branca (Cornelius *et al.*, 2002). Ambos os tipos de fungos de podridão alteram a constituição da madeira tornando-a mais ou menos apetecível às térmitas, o que poderá depender também

do grau de degradação provocada pelo fungo. Os fungos de podridão castanha são capazes de degradar as frações polissacáridas, tendo a capacidade de usar a hemicelulose e a celulose das paredes celulares das células para as desmitilar e oxidar (Green e Highley, 1997). Algumas espécies de fungos de podridão castanha, para além de providenciarem benefícios nutricionais para as térmitas, produzem substâncias químicas capazes de atuar como sinais para as térmitas seguirem e encontrarem o alimento. Exemplo disso é o composto (Z, Z, E) – 3, 6, 8 – dodecatrieno – 1 – ol produzido pelo fungo *Gloeophyllum trabeum* (Matsumura *et al.*, 1976). Os fungos de podridão branca são considerados mais eficientes na degradação da madeira sendo capazes de degradar os três componentes da parede celular vegetal, a celulose, a hemicelulose e a lenhina, mas enquanto alguns degradam todos os compostos outros degradam seletivamente algumas zonas da parede celular (Goodell *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009). Estas diferenças no mecanismo de degradação pelas diferentes espécies de fungos de podridão branca podem provocar diferentes respostas nas diversas espécies de térmitas subterrâneas. Os resultados de estudos sobre as interações entre térmitas e os fungos de podridão branca têm sido contraditórios, podendo estes ser atractivos ou repelentes para as térmitas (Waller *et al.*, 1987; Grace *et al.*, 1992).

Este estudo teve como objetivo verificar a resposta das térmitas subterrâneas *Reticulitermes grassei* (Clément) aos extratos aquosos de provetes de pinho bravo (pinho) (*Pinus pinaster* Ait.) com quatro níveis de degradação provocada por duas espécies de fungos de podridão castanha, *Gloeophyllum trabeum* (Persoon: Fries) e *Postia placenta* ((Fr.) M.J. Larsen & Lombard) e uma espécie de podridão branca, *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr.) Murrill. A resposta desta espécie de térmita aos extratos aquosos de madeira de pinho sã, da casca da mesma árvore e da casca de sobreiro, cortiça (*Quercus suber* L.) foi também investigada.

2.2 Materiais e Métodos

Térmitas

As térmitas subterrâneas, *Reticulitermes grassei*, foram recolhidas de troncos caídos de uma área florestal mista na Herdade da Apostiça, Sesimbra, Portugal, com as coordenadas N 38°32.436' W 009°07.848' a 18 m de elevação. E foram mantidas numa sala

condicionada (24 ± 1 °C; $> 80\%$ HR), em caixas de Petri com papel de filtro humedecido, tendo sido utilizadas nos ensaios, em média, uma semana após a sua coleta.

Obtenção da madeira degradada

As espécies de fungos utilizadas - *Gloeophyllum trabeum*, *Postia placenta* e *Pycnoporus sanguineus* – pertencem à coleção do Núcleo de Comportamento de Estruturas (NCE) do Laboratório Nacional de Engenharia Civil (LNEC).

A madeira foi degradada de acordo com o procedimento descrito na norma EN-113 (1996). O meio de crescimento dos fungos utilizado foi o malte (40 g de extrato de malte, 20 g de ágar e 1 L de água destilada). Introduziu-se o meio em frascos de Kolle, para cada fungo foram feitos dez replicados, taparam-se os frascos com algodão hidrófilo esterilizado e estes foram introduzidos na autoclave durante 20 minutos a 120°C. Posteriormente fez-se a repicagem dos fungos para os respetivos frascos. Estes foram colocados numa câmara condicionada (22 ± 2 °C; $70\% \pm 5\%$ HR) até os fungos cobrirem a totalidade da superfície do meio de crescimento, estando assim preparados para a colocação dos provetes de pinho bravo. Para cada fungo utilizaram-se 20 provetes, disponíveis no NCE do LNEC, com dimensões de 50 x 25 x 10 mm. Os provetes foram numerados, pesados e esterilizados por vapor. De seguida introduziram-se os provetes nos devidos frascos em meio estéril (dois provetes por frasco) e deixaram-se os frascos numa câmara condicionada (22 ± 2 °C; $70\% \pm 5\%$ HR). Por baixo de cada provete foi colocado um suporte de metal, esterilizado, para evitar o contacto direto com o meio de modo a não absorver a humidade existente nesse meio. Metade dos provetes esteve sujeito à ação dos fungos durante 8 semanas e outra metade durante 16 semanas.

No final os provetes foram limpos, pesados e colocados numa sala condicionada (20 ± 1 °C, $65\% \pm 5\%$ HR), onde ficaram durante 10 a 15 dias até a sua massa estabilizar. Considerou-se que o seu peso estava estabilizado quando a massa apresentava uma variação inferior a 1% no intervalo de 1 hora. Dois provetes de cada ensaio foram secos na estufa a 103 ± 2 °C durante 24 horas, de forma a ser possível determinar o seu teor em água (NP 614, 1973) e a respectiva perda de massa.

Atrativos

Os potenciais atrativos foram obtidos por imersão em água fria de:

- Madeira de pinho bravo (pinho) (*Pinus pinaster* Ait.);

- Casca de sobreiro, cortiça, (*Quercus suber* L.);
- Casca de pinho bravo (*Pinus pinaster* Ait.);
- Pinho bravo com quatro níveis de degradação provocada por:
 - Fungo de podridão castanha *Gloeophyllum trabeum* (Persoon: Fries);
 - Fungo de podridão castanha *Postia placenta* ((Fr.) Larsen e Lombard);
 - Fungo de podridão branca *Pycnoporus sanguineus* ((L.: Fr.) Murril).

Obtenção dos extratos aquosos a frio

Os extratos foram obtidos colocando dois provetes de madeira de pinho e de cortiça com 50 x 25 x 10 mm e 3 provetes de casca de pinho com 50 x 30 x 1.5 ± 5 mm em água destilada à temperatura ambiente e em frascos previamente esterilizados durante 24 horas. O volume de água utilizado foi duas vezes o produto do volume dos provetes com o número de provetes utilizado em cada extração.

No caso dos provetes degradados pelos fungos de podridão estes foram divididos em 4 níveis de degradação, nos 1º e 2º nível os provetes foram submetidos a 8 semanas de exposição ao fungo e 3º e 4º nível os provetes foram submetidos a 16 semanas de exposição. De cada nível foram selecionados dois provetes, uma vez que o volume de extrato obtido por dois provetes seria suficiente para a montagem dos ensaios, e aplicado o mesmo método de extracção aquosa a frio referido anteriormente (Tabela 2.1)

Foram adicionados 0,075 ml destes extratos a metades de papéis de filtro Macherey-Nagel com um diâmetro de 42,5 mm, pesados previamente e numerados, e deixados a secar durante pelo menos 60 minutos, o mesmo foi feito para a água destilada (controlo). O volume foi definido pela capacidade máxima de absorção dos papéis de filtro.

Ensaio de toxicidade

A verificação da toxicidade direta dos diferentes extratos foi realizada por meio de ensaios sem escolha, sendo as térmitas expostas diretamente aos papéis de filtro tratados com os extratos obtidos.

Para cada possível atrativo foram realizadas dez réplicas, tendo-se também testado a água destilada como controlo. Os ensaios foram feitos em caixa de Petri com um diâmetro

de 60 mm e em cada caixa foi colocado metade de um papel de filtro com o atrativo e 10 térmitas, durante 21 dias e foram mantidos numa sala condicionada ($24 \pm 1^\circ \text{C}$, $> 80\% \text{HR}$). Foi também colado um papel de filtro humedecido na tampa de cada caixa para manter a humidade relativa dentro da caixa de Petri (Figura 2.1) (Nunes *et al.*, 2004). Os ensaios foram monitorizados e registadas diariamente as mortes ocorridas. Também foi mantida a humidade elevada dos papéis colados nas tampas das caixas de Petri.

Tabela 2. 1 - Perdas de massa (%) dos provetes utilizados para fazer os extratos.

Tipo de degradação	Fungo	Média das perdas de massa dos provetes (%)
Podridão castanha	<i>P. placenta</i> 1	21.59
	<i>P. placenta</i> 2	31.79
	<i>P. placenta</i> 3	38.29
	<i>P. placenta</i> 4	48.06
	<i>G. trabeum</i> 1	9.31
	<i>G. trabeum</i> 2	14.69
	<i>G. trabeum</i> 3	24.21
	<i>G. trabeum</i> 4	35.69
Podridão branca	<i>P. sanguineus</i> 1	8.32
	<i>P. sanguineus</i> 2	14.23
	<i>P. sanguineus</i> 3	18.44
	<i>P. sanguineus</i> 4	25.60



Figura 2. 1 - Aspeto dos ensaios de toxicidade dos papéis de filtro tratados às térmitas subterrâneas, no final dos 21 dias de exposição.

Ensaio de escolha

Os ensaios foram realizados em caixas de Petri com um diâmetro de 90 mm. Cada caixa de Petri continha 10 g de areia de Fontainebleau humedecida (4:1 v/v) separada em duas partes aproximadamente iguais, deixando um corredor sem areia entre elas (Figura 2.2 e 2.3). Cada metade continha uma lamela de vidro e uma metade de papel de filtro com o produto em ensaio por cima desta (Figura 2.2 e 2.3). Em cada caixa foram colocadas 10 obreiras da espécie de térmitas *R. grassei*.

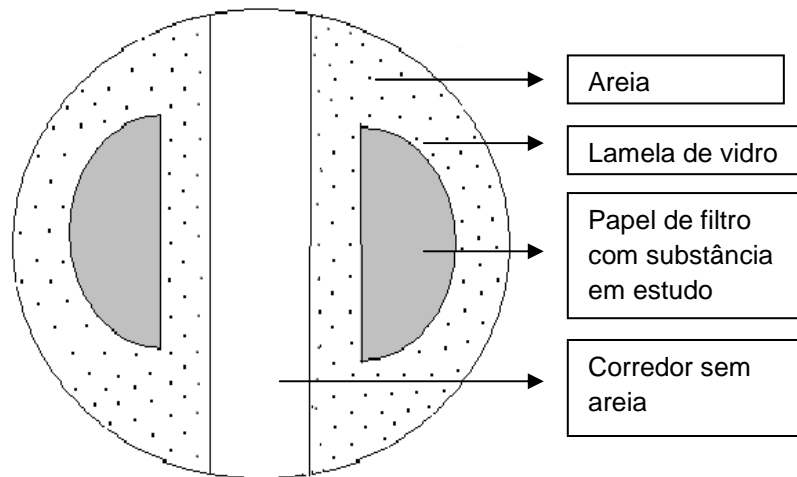


Figura 2. 2 - Esquema de ensaio de escolha.

Com base no protocolo experimental de Kutnik *et al.* (2011), foram executadas 10 réplicas de cada ensaio de escolha entre papel com extrato e papel com água destilada, e 10 réplicas de ensaios sem escolha, com o mesmo extrato em ambas as metades. Os ensaios tiveram a duração de 14 dias e foram mantidos numa sala condicionada (24 ± 1 ° C, > 80% HR). Os ensaios foram monitorizados diariamente tendo sido registado o número de térmitas que se encontravam em cada local do ensaio.

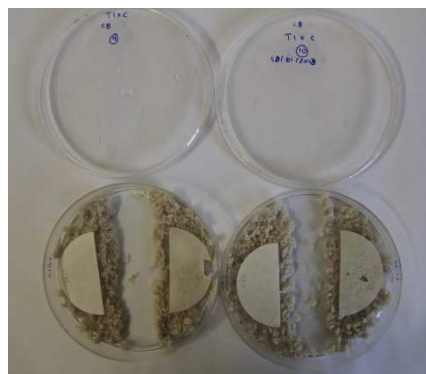


Figura 2. 3 - Aspecto de ensaios de escolha entre papéis impregnados com substâncias, com térmitas.

Foram realizadas cinco réplicas de ensaios semelhantes aos ensaios sem escolha com os papéis de filtro com extrato de fungos mas sem térmitas, durante o mesmo número de dias e com as mesmas condições, com o objetivo de saber qual a perda de massa que deve ser associada aos fungos.

Análise de dados

Na análise estatística foi usado o *software* IBM® SPSS® Statistics vs.21 (IBM Corporation, New York, USA). Usou-se em todos os testes um alfa de 0.05 para a rejeição da hipótese nula.

Nos ensaios de toxicidade foram comparados o número de mortes que se registaram diariamente nos ensaios com os atrativos com as ocorridas nos ensaios controle. Para tal recorreu-se à análise de Kaplan-Meier para estimar e comparar as suas curvas de sobrevivência. As curvas de sobrevivência representam a probabilidade cumulativa de um indivíduo sobreviver em qualquer momento posterior à data de início, desta forma o modelo de Kaplan Meier baseia-se na estimativa das probabilidades condicionais, da taxa de sobrevivência em cada ponto no tempo (Rich *et. al*, 2010). A comparação da distribuição entre as duas curvas de sobrevivência foi feita pelo teste de *Log Rank (Mantel-Cox)*, este segue uma distribuição Qui-quadrado com 1 grau de liberdade. Também foi verificada a existência de diferenças de toxicidade entre os diferentes extratos através de um teste Qui-quadrado aplicado a uma tabela de contingência.

Nos ensaios de escolha e sem escolha, como foi referido anteriormente, foram registados diariamente o número de térmitas que se observaram em uma das três zonas dos ensaios: 1) zona com papel com atrativo; 2) zona com papel controle, ou também com atrativo, e; 3) corredor entre estas zonas. Para verificar se existiam diferenças significativas entre o número de térmitas que se observaram em cada uma destas zonas recorreu-se ao teste não paramétrico de *Friedman*, que permitiu a comparação do número de térmitas encontradas em cada uma das zonas ao longo do tempo. Os dados são o resultado de uma mesma amostra (dependentes) em momentos distintos.

No final de cada ensaio de escolha e sem escolha secaram-se os papéis de filtro a $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas e foram calculadas as percentagens de perdas de massa destes papéis. À perda de massa dos papéis de filtro com extrato de fungos, utilizados nos ensaios de escolha e sem escolha, foi subtraída a perda de massa associada aos fungos, tendo-se estimado a perda de massa causada pelas térmitas.

As preferências alimentares das térmitas foram quantificadas pelo consumo dos papéis de filtro com os diferentes extratos e com água destilada utilizados nos ensaios de escolha. As diferenças de consumo foram analisadas pela comparação das perdas de massa dos papéis utilizados nos ensaios de escolha recorrendo ao teste estatístico *T* de *student* para amostras emparelhadas. A normalidade da distribuição das variâncias foi testada pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e a homogeneidade destas foi verificada pelo teste de *Levene*.

2.3 Resultados

Cortiça, Pinho e Casca de Pinho

Ensaio de toxicidade

Verificou-se que durante o tempo do ensaio - 21 dias - a taxa de sobrevivência foi decrescendo gradualmente ao longo do ensaio, sendo esta diminuição não significativa nos casos do pinho (com uma sobrevivência de 82%) e da casca de pinho (87%) quando comparada com a taxa de sobrevivência do ensaio controlo com água destilada (86%). No caso da cortiça a taxa de sobrevivência foi significativamente menor que a do ensaio controlo ($X^2=4.805$, g.l.=1, $p=0.028$), tendo a mortalidade chegado aos 29% (Figura 2.4).

Através de um teste de Qui-quadrado foi feita a comparação das taxas de sobrevivência dos diferentes extratos, tendo-se verificado que existiram diferenças significativas entre os extratos ($X^2=8.375$, g.l.=1, $p=0.015$), tendo sido o extrato de cortiça o que obteve uma menor taxa de sobrevivência.

Observações diárias

Nos ensaios de escolha foi possível verificar uma tendência das térmitas pela zona dos ensaios com os papéis impregnados com extrato de cortiça (56% das térmitas) e de casca de pinho (49%), mas no caso do extrato de pinho começou por haver uma tendência (71%) que foi decrescendo ao longo do ensaio (Figura 2.5). Através dos resultados do teste de *Friedman* verificaram-se diferenças significativas quanto à localização preferencial das térmitas em cada zona do ensaio para todos os extratos utilizados (Tabela 2.2).

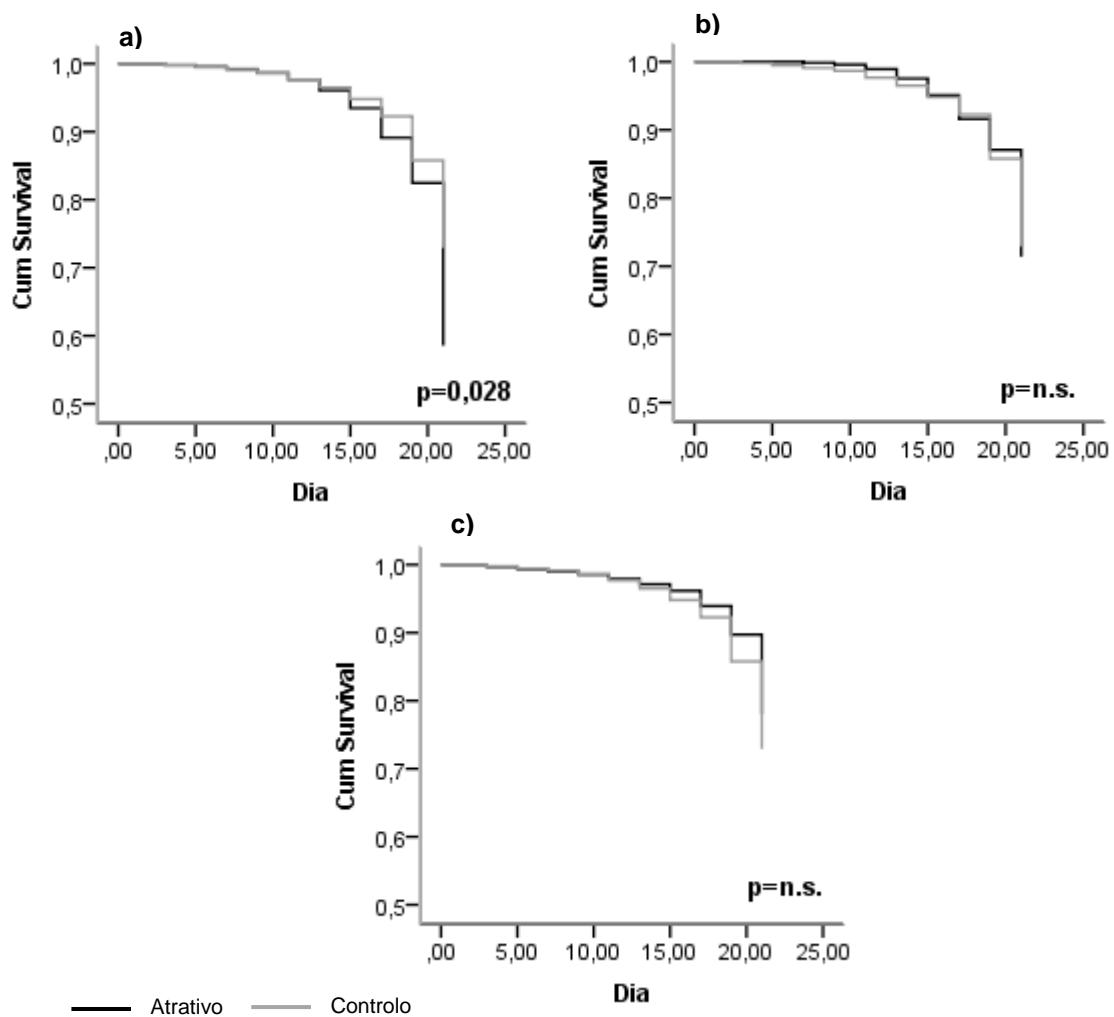


Figura 2. 4 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de *Kaplan-Meier* das térmitas expostas aos extratos com tratamento de: a) Cortiça; b) Pinho e c) Casca de pinho (atrativos) em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (sem tratamento). *P* calculado pelo teste de *Log Rank*. Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.

Nos ensaios de escolha entre extratos iguais foi observada alguma preferência das térmitas por uma das zonas do ensaio, nos casos da cortiça e da madeira de pinho (Figura 2.6 a) e b)) tendo uma das zonas dos ensaios com extrato de cortiça 60% das térmitas e dos ensaios com extrato de pinho 46%. No caso dos ensaios com extrato de casca de pinho as térmitas distribuíram-se por todo o ensaio, com valores perto dos 30% de térmitas em todas as zonas do ensaio (Figura 2.6 c)). Apesar disso, através do teste de *Friedman* verificaram-se diferenças significativas, em todos os ensaios, relativamente ao número de térmitas observado em cada zona do ensaio (Tabela 2.2).

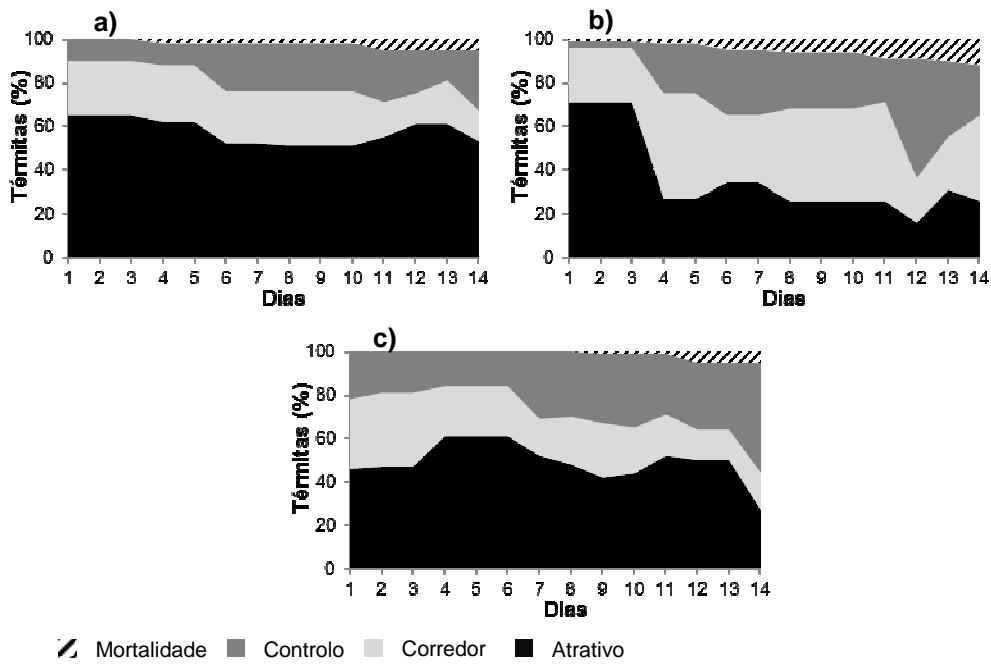


Figura 2. 5 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) Cortiça; b) Pinho; e c) Casca de pinho e respetivos controlos (água).

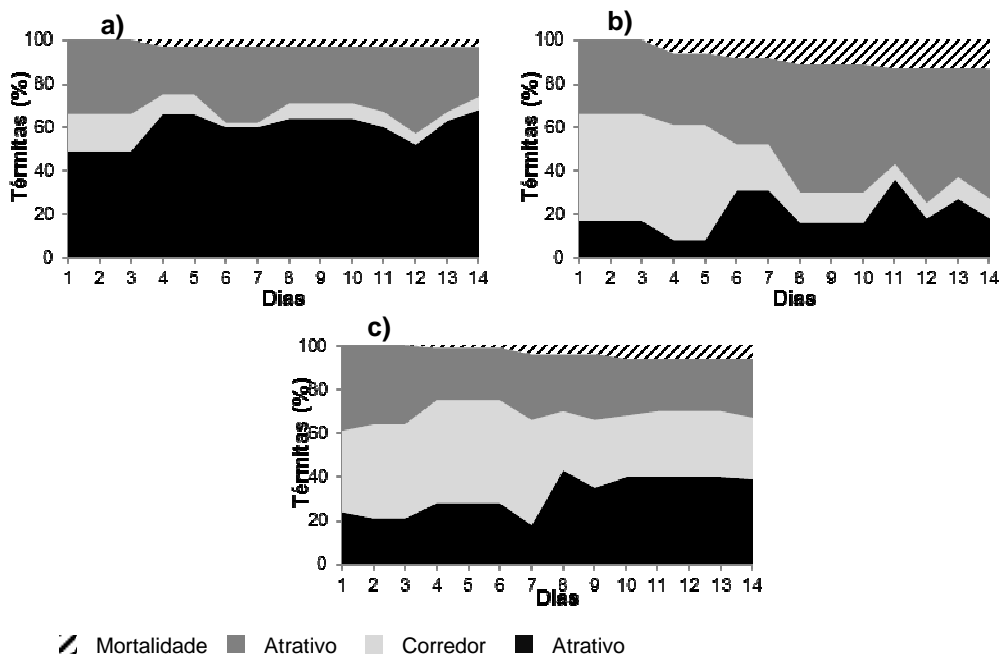


Figura 2. 6 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre o mesmo extrato dos diferentes alimentos: a) Cortiça; b) Pinho; e c) Casca de pinho.

Tabela 2. 2 - Comparação, através do teste estatístico de *Friedman*, do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios com e sem escolha

Atrativo	Qui-quadrado	g.l.	<i>p</i>
Cortiça vs. Controlo	23.256	2	<0.001*
Pinho vs. Controlo	8.641	2	0.013*
Casca de pinho vs. Controlo	18.428	2	<0.001*
Cortiça vs. Cortiça	28.000	2	<0.001*
Pinho vs. Pinho	8.714	2	0.013*
Casca pinho vs. Casca pinho	9.000	2	0.011*

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (Teste de *Friedman*)

Perdas de massa

Relativamente às perdas de massa dos papéis tratados/controlo utilizados verificou-se que no caso dos ensaios com extrato de pinho e de cortiça não variaram muito relativamente aos respetivos controlos, tendo tido valores de perda de massa próximos dos 8% em todos os papéis. Nesta situação não ocorreram diferenças significativas, através do teste *T* de *student* (Tabela 2.3). No caso dos ensaios com extrato de casca de pinho os valores de perda de massa dos papéis controlos foram superiores (13%) aos dos papéis tratados (Figura 2.7 a)), tendo estas diferenças sido significativas (Tabela 2.3).

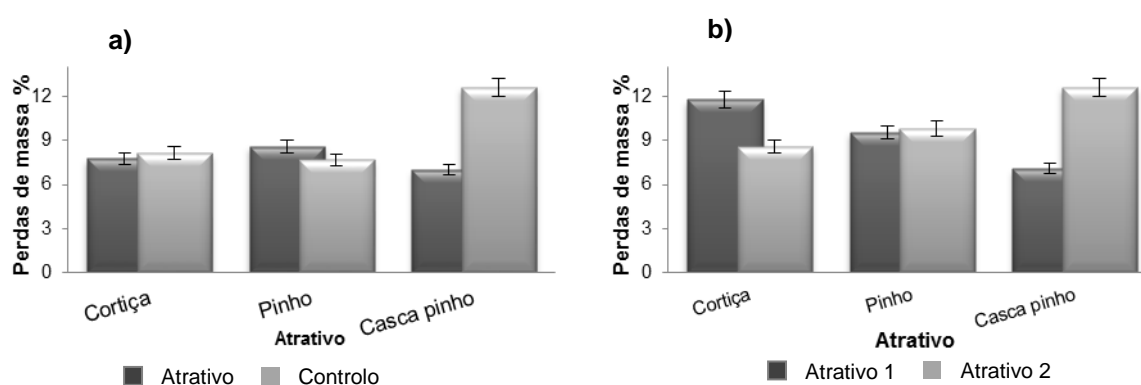


Figura 2. 7 – Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (cortiça, pinho e casca de pinho) e b) entre o mesmo tipo de extrato (cortiça, pinho e casca de pinho).

Nos ensaios sem escolha, no caso dos ensaios com extrato de pinho as perdas de massa foram semelhantes (9%) e apesar de se ter denotado uma maior perda de massa em alguns papéis com extrato de cortiça (12%) e de casca de pinho (13%), através da análise *T*

de *student* verificou-se que estas diferenças não foram significativas (Figura 2.7 b) e Tabela 2.3).

Tabela 2. 3 - Resultados do teste estatístico *T* de *student*, para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (pinho, cortiça, pinho e casca de pinho) e os respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.

Atrativo	Média	Desvio padrão	t	g.l.	p
Cortiça vs. Controlo	-0.371	6.011	-0.195	9	n.s.
Pinho vs. Controlo	0.935	5.948	0.497	9	n.s.
Casca de pinho vs. Controlo	-5.564	6.511	-2.703	9	0.024*
Cortiça vs. Cortiça	3.225	6.562	1.554	9	n.s.
Pinho vs. Pinho	-0.259	5.343	-0.153	9	n.s.
Casca pinho vs. Casca pinho	-0.906	7.760	-0.369	9	n.s.

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (*T* de *student*)

Postia placenta

Ensaio de toxicidade

Através dos ensaios de toxicidade foi possível observar que a taxa de sobrevivência foi diminuindo ao longo do tempo de ensaio, tendo, no caso do extrato de *P. placenta* 4, chegado aos 80%. Pelas curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* verificou-se que quando comparada a taxa de sobrevivência das térmitas expostas aos papéis impregnados com os vários extratos do fungo *P. placenta* com a dos ensaios controlo, não se verificaram diferenças significativas (Figura 2.8).

Através de um teste de Qui-quadrado foi feita a comparação das taxas de sobrevivência das térmitas expostas aos diferentes extratos do fungo de podridão castanha, não se tendo verificado diferenças significativas entre nenhum deles.

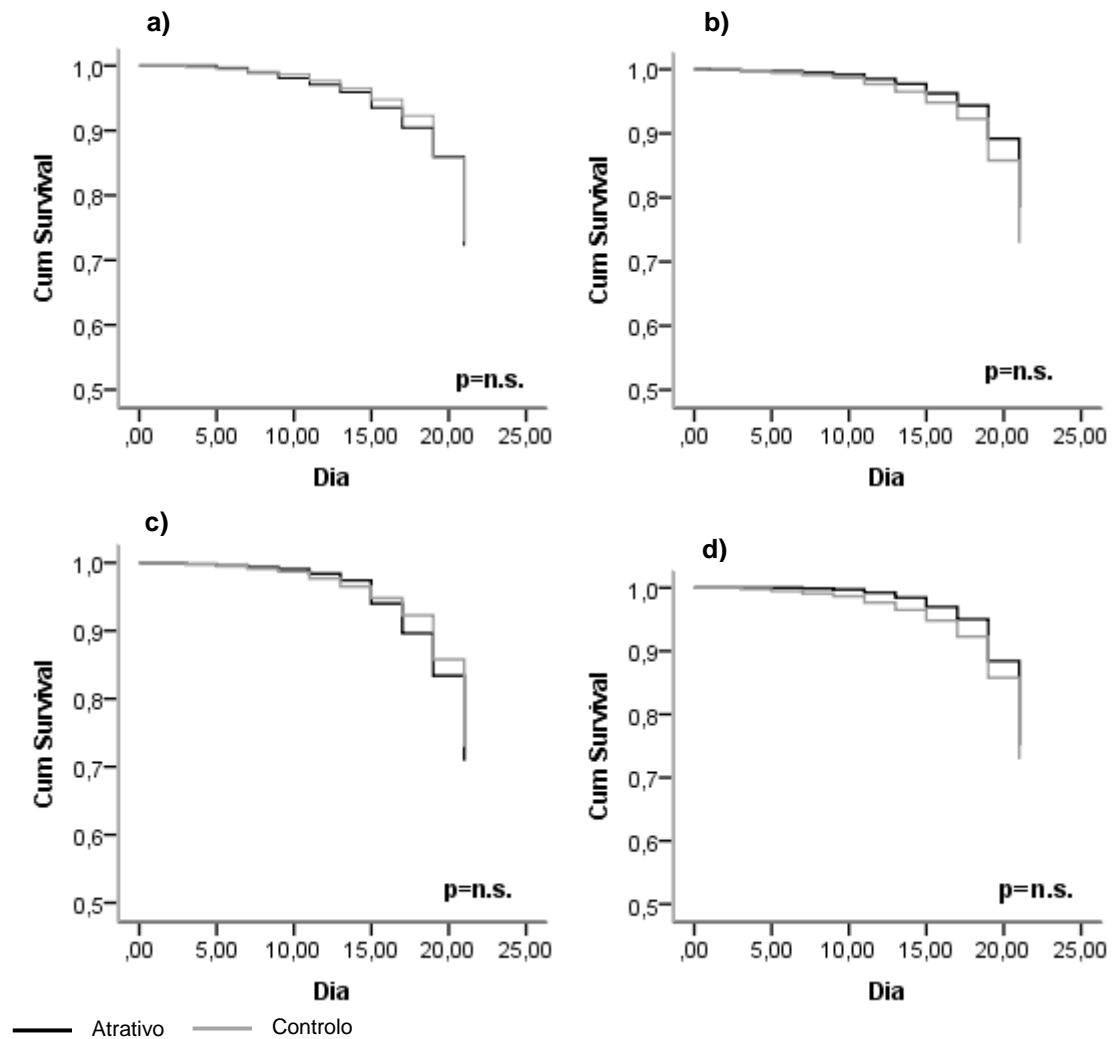


Figura 2. 8 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de *Kaplan-Meier* das térmitas expostas aos extratos de madeira degradada por: a) *P. placenta* 1 perda de massa de 21,59%; b) *P. placenta* 2 perda de massa de 31,79%; c) *P. placenta* 3, perda de massa de 38,29% e; d) *P. placenta* 4, perda de massa de 48,06% em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (água destilada). *P* calculado pelo teste de *Log Rank*. Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.

Observações diárias

Através da observação diária da distribuição espacial das térmitas ao longo do ensaio de escolha, entre papéis de filtro com os diferentes extratos do fungo *P. placenta* e água destilada, verificou-se que as térmitas pareceram demonstrar uma tendência pela zona com os papéis impregnados com os diferentes extratos do fungo *P. placenta*, pois cerca de 40 a 50% das térmitas eram usualmente detetadas nessa zona (Figura 2.9). Através da análise comparativa de *Friedman* verificaram-se de fato diferenças significativas na distribuição das térmitas pelas diferentes zonas do ensaio (Tabela 2.4).

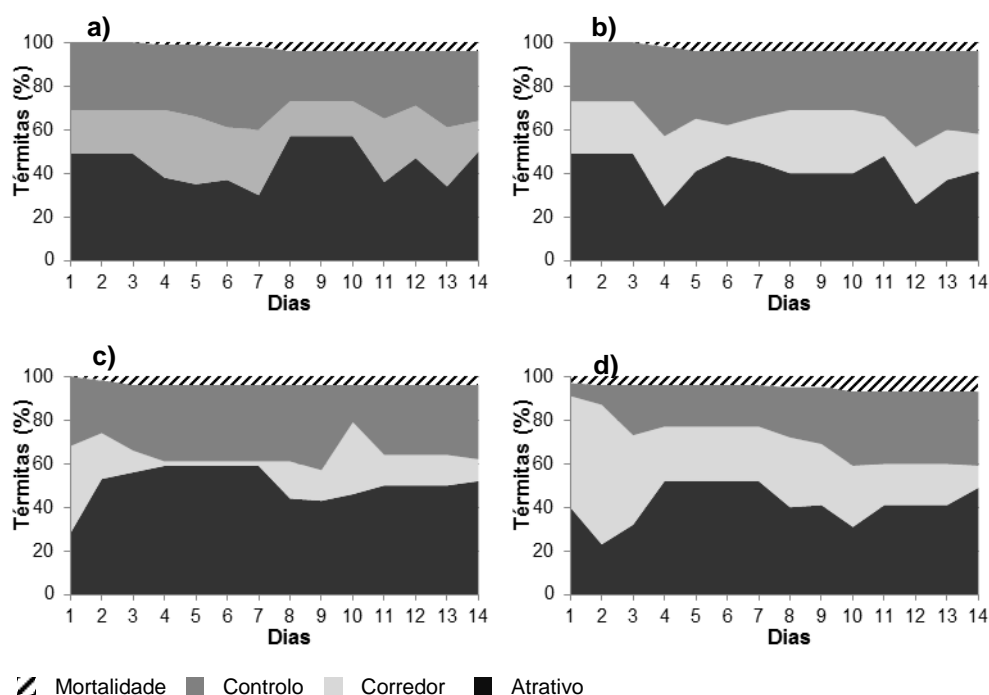


Figura 2. 9 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) *P. placenta* 1 perda de massa de 21,59%; b) *P. placenta* 2 perda de massa de 31,79%; c) *P. placenta* 3, perda de massa de 38,29% e d) *P. placenta* 4, perda de massa de 48,06% e respetivos controlos (água).

Nos ensaios de escolha entre papéis impregnados com o mesmo tipo de extrato as térmitas não demonstraram uma preferência evidente por nenhuma das zonas do ensaio, tendo-se verificado uma percentagem significativamente maior de térmitas (entre 30 e os 40%) nas zonas com papéis de filtro (do que nos corredores (Figura 2.10). Estas diferenças foram consideradas significativas pela comparação feita através do teste de *Friedman* (Tabela 2.4).

Tabela 2. 4 - Comparação, através do teste estatístico de *Friedman*, do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios de escolha e sem escolha.

Atrativo	Qui-quadrado	g.l.	P
<i>P. placenta</i> 1 vs. Controlo	20.703	2	<0.001*
<i>P. placenta</i> 2 vs. Controlo	14.654	2	<0.001*
<i>P. placenta</i> 3 vs. Controlo	19.000	2	<0.001*
<i>P. placenta</i> 4 vs. Controlo	12.000	2	0.002*
<i>P. placenta</i> 1 vs. <i>P. placenta</i> 1	13.285	2	<0.001*
<i>P. placenta</i> 2 vs. <i>P. placenta</i> 2	21.000	2	<0.001*
<i>P. placenta</i> 3 vs. <i>P. placenta</i> 3	15.857	2	<0.001*
<i>P. placenta</i> 4 vs. <i>P. placenta</i> 4	13.000	2	0.001*

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (Teste de *Friedman*)

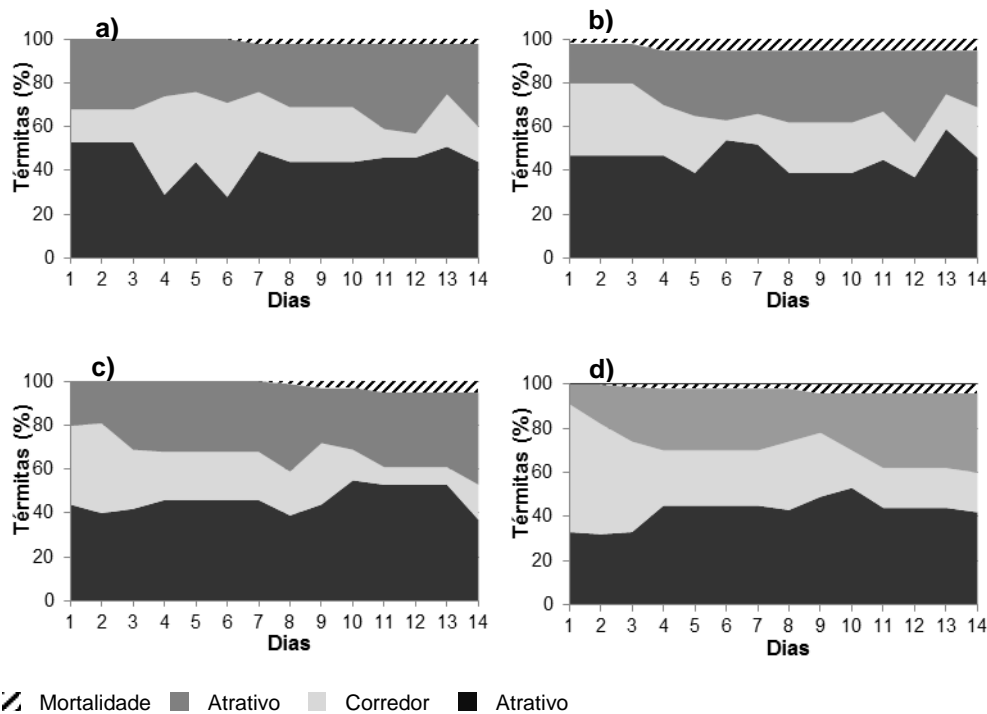


Figura 2.10 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre o mesmo extrato dos diferentes alimentos: a) *P. placenta* 1 perda de massa de 21,59%; b) *P. placenta* 2 perda de massa de 31,79%; c) *P. placenta* 3, perda de massa de 38,29% e; d) *P. placenta* 4, perda de massa de 48,06%.

Perdas de massa

Com a comparação das médias das perdas de massa entre os papéis impregnados com extrato de fungo e o controlo foi possível verificar algumas diferenças quanto ao comportamento das térmitas. No caso dos ensaios de escolha, as térmitas consumiram uma quantidade mais elevada de papéis impregnados com os extratos do fungo (11% perda de massa) relativamente aos controlos (3% perda de massa). A exceção foi o extrato proveniente dos provetes com menor grau de degradação provocada pelo fungo *P. placenta* (*P. placenta* 1). Neste ensaio as térmitas não demonstraram preferências, tendo os valores médios de perda de massa sido muito semelhantes, ou seja perto de 6% em ambos os papéis impregnados com fungo ou controlo (Figura 2.11 a)). Através do teste *T de student* observou-se que apenas nos casos em que foram utilizados extratos provenientes dos provetes mais degradados (*P. placenta* 3 e 4) se verificaram diferenças significativas ($t=5.474$, g.l.= 9, $p < 0.001$ e $t= 4.513$, g.l.= 9, $p=0.001$) entre as perdas de massa dos papéis com extrato utilizados e respetivos controlos (Tabela 2.5).

No caso dos ensaios de escolha entre papéis impregnados com o mesmo extrato, verificou-se uma tendência para as térmitas se alimentarem preferencialmente num dos papéis disponíveis impregnados com *P. placenta* 2, nos quais se registou uma média de

perda de massa de 5% comparativamente com 1% no outro papel impregnado com a mesma substância, no mesmo ensaio. Verificou-se também um maior consumo de ambos os papéis nos casos em que estes continham os extratos de *P. placenta* 3 e 4, com valores de perdas de massa de 4 a 8% (Figura 2.11 b)), apesar de não se terem identificado diferenças significativas nas perdas de massa dos papéis utilizados nestes ensaios (Tabela 2.5).

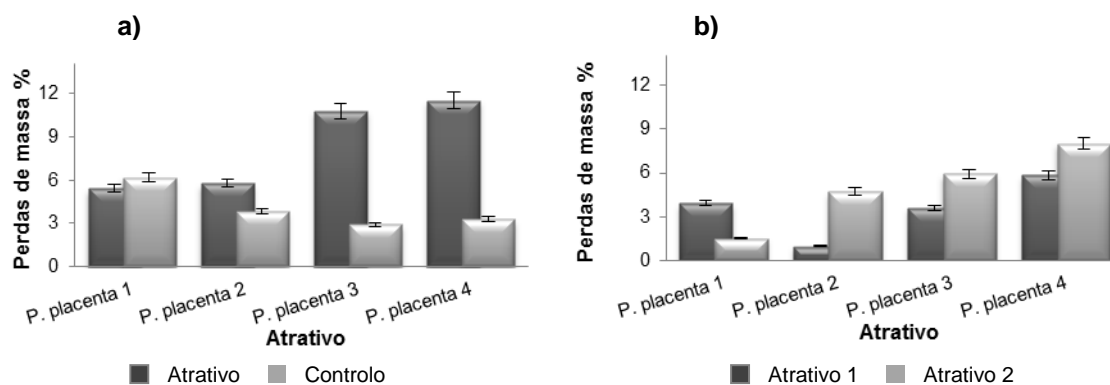


Figura 2. 11 – Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (*P. placenta* 1, *P. placenta* 2, *P. placenta* 3 e *P. placenta* 4) e b) entre o mesmo tipo de extrato (*P. placenta* 1, *P. placenta* 2, *P. placenta* 3 e *P. placenta* 4).

Tabela 2. 5 - Resultados do teste estatístico *T* de *student*, para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (*P. placenta* 1, *P. placenta* 2, *P. placenta* 3 e *P. placenta* 4) e os respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.

Atrativo	Média	Desvio padrão	<i>t</i>	g.l.	<i>p</i>
<i>P. placenta</i> 1 vs. Controlo	-0.863	6.758	-0.404	9	n.s
<i>P. placenta</i> 2 vs. Controlo	1.518	4.981	0.964	9	n.s
<i>P. placenta</i> 3 vs. Controlo	7.744	4.474	5.474	9	<0.001*
<i>P. placenta</i> 4 vs. Controlo	8.306	5.821	4.513	9	0.001*
<i>P. placenta</i> 1 vs. <i>P. placenta</i> 1	2.095	6.049	1.095	9	n.s
<i>P. placenta</i> 2 vs. <i>P. placenta</i> 2	-2.410	4.507	-1.691	9	n.s
<i>P. placenta</i> 3 vs. <i>P. placenta</i> 3	-1.951	6.758	-0.913	9	n.s
<i>P. placenta</i> 4 vs. <i>P. placenta</i> 4	-1.952	9.745	-0.633	9	n.s

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (*T* de *student*)

Gloeophyllum trabeum

Ensaio de toxicidade

Nos ensaios de toxicidade com os extratos de *G. trabeum* a taxa de sobrevivência das térmitas foi diminuindo ao longo do tempo de ensaio, tendo no caso dos ensaios com extrato de *G. trabeum* 1 chegado apenas aos 75%. Através das curvas de sobrevivência de

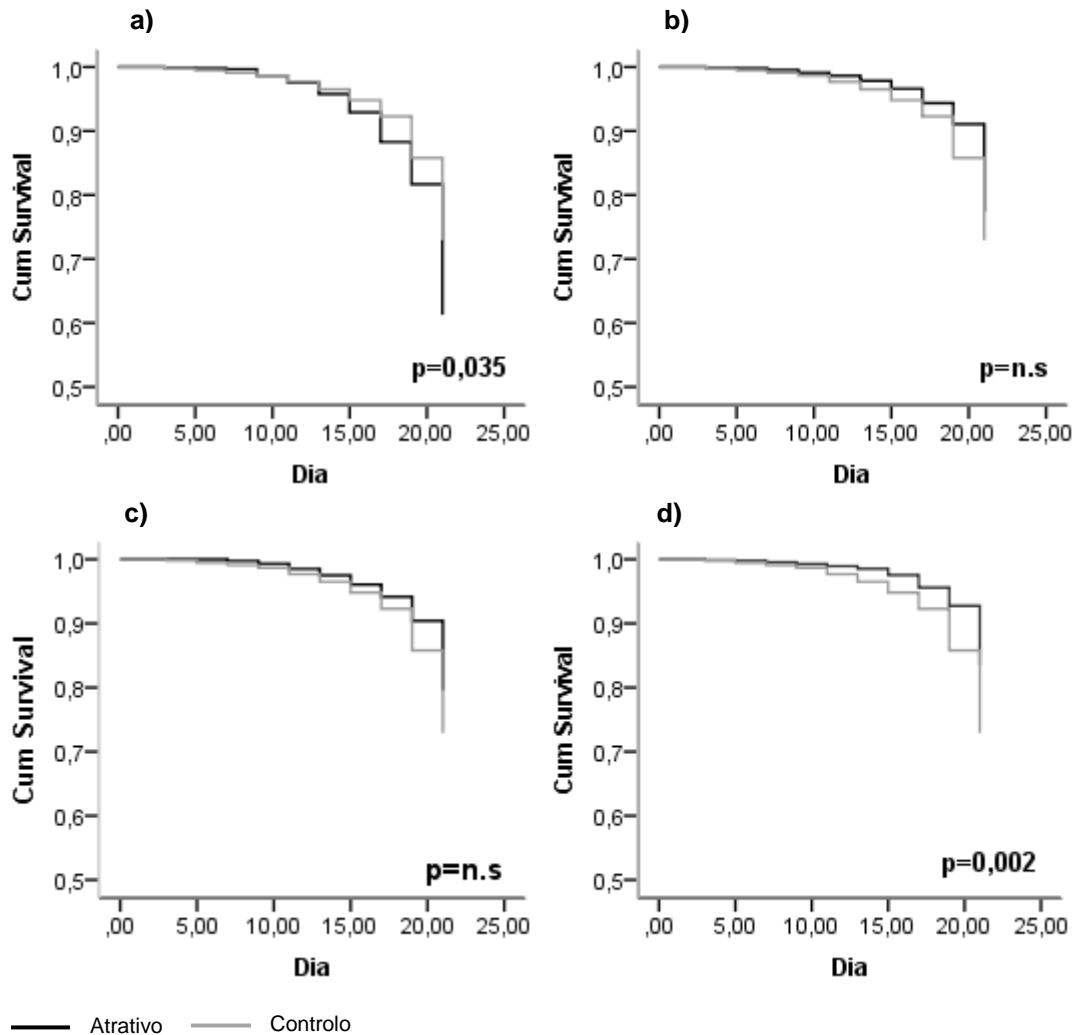


Figura 2.12 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de *Kaplan-Meier* das térmitas expostas aos extratos de: a) *G. trabeum* 1 perda de massa de 9.31%; b) *G. trabeum* 2 perda de massa de 14.69%; c) *G. trabeum* 3, perda de massa de 24.21% e d) *G. trabeum* 4, perda de massa de 35.69% em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (água destilada). *P* calculado pelo teste de *Log Rank*. Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.

Kaplan-Meier verificou-se que a variação da taxa de sobrevivência das térmitas expostas a taxa de sobrevivência foi significativamente inferior ($X^2=4.433$, g.l.=1, $p=0.035$) à taxa

verificada nos ensaios controlo. Com o extrato de *G. trabeum* 4 ocorreu o inverso, sendo a taxa de sobrevivência (90%) a este extrato significativamente superior à taxa verificada nos ensaios controlo (84%) ($X^2=9.903$, g.l.= 1, $p=0.002$) (Figura 2.12).

Foram comparadas as taxas de sobrevivência das térmitas aos diferentes extratos pelo teste de Qui-quadrado tendo-se verificado que existiram diferenças significativas ($p=0.017$) na sobrevivência a cada extrato, tendo sido o extrato de *G. trabeum* 1 o que obteve uma taxa de sobrevivência mais baixa nesta análise.

Observações diárias

Nos ensaios de escolha entre papéis com extrato de *G. trabeum* e controlo não foi possível verificar nenhuma preferência por parte das térmitas, denotando-se uma predominância destas no corredor do ensaio. Foram aliás observadas, em algumas monitorizações, mais de 60% das térmitas nesta zona dos ensaios (Figura 2.13). Pelo teste de *Friedman* verificou-se que estas diferenças na distribuição das térmitas foram significativas (Tabela 2.6).

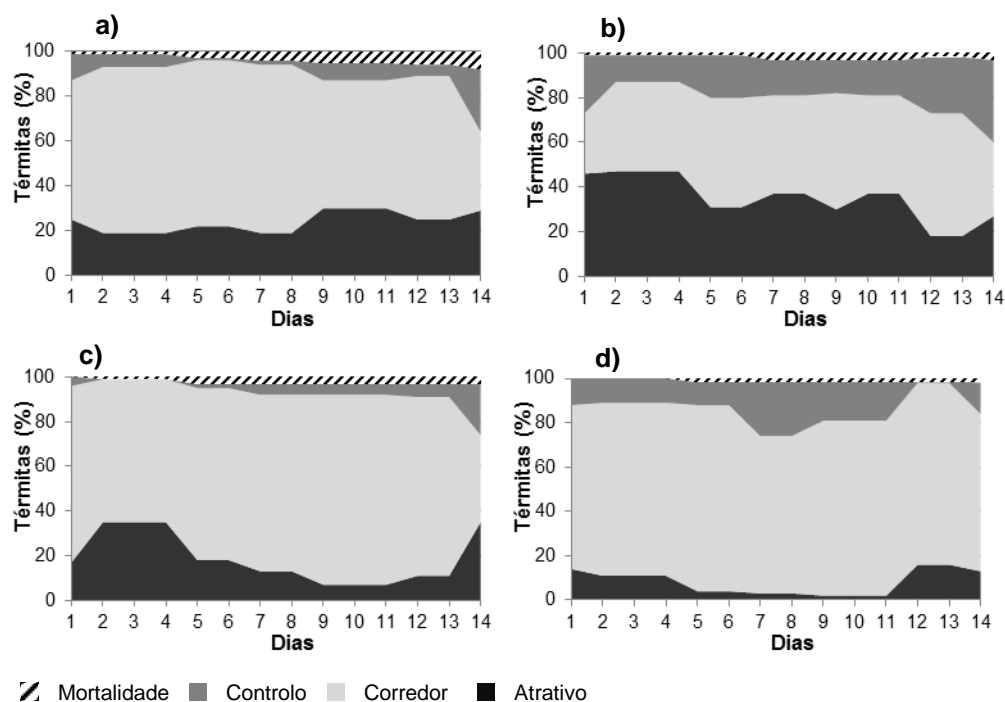


Figura 2. 13 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) *G. trabeum* 1 perda de massa de 9.31%; b) *G. trabeum* 2 perda de massa de 14.69%; c) *G. trabeum* 3, perda de massa de 24.21% e d) *G. trabeum* 4, perda de massa de 35.69% e respetivos controlos (água).

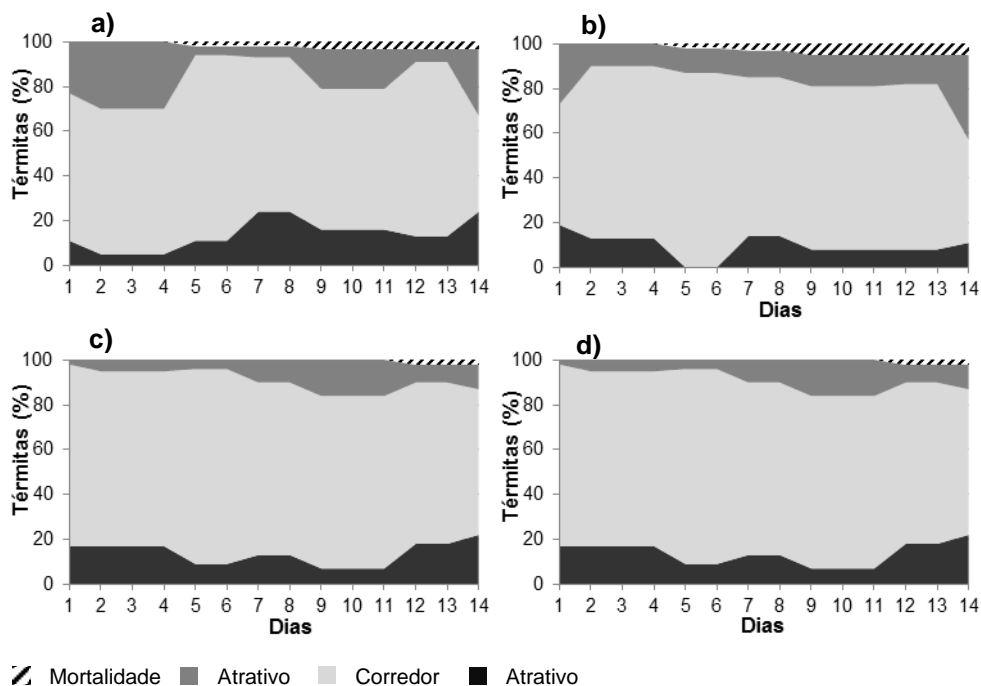


Figura 2. 14 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre o mesmo extrato dos diferentes alimentos: a) *G. trabeum* 1 perda de massa de 9.31%; b) *G. trabeum* 2 perda de massa de 14.69%; c) *G. trabeum* 3, perda de massa de 24.21% e d) *G. trabeum* 4, perda de massa de 35.69%.

Nos ensaio de escolha entre papéis impregnados com o mesmo extrato de *G. trabeum* ocorreu o mesmo que nos ensaios de escolha entre papéis impregnados e controlo, pois as térmitas não demonstraram nenhuma distribuição preferencial pelas zonas com os papéis impregnados, mas sim uma preferência significativa pela zona do corredor entre os papéis de filtro (entre 50 e 77% das térmitas) (Figura 2.14).

Tabela 2. 6 - Comparação, através do teste estatístico de *Friedman*, do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios de escolha e sem escolha.

Atrativo	Qui-quadrado	g.l.	<i>p</i>
<i>G. trabeum</i> 1 vs. Controlo	21.143	2	<0.001*
<i>G. trabeum</i> 2 vs. Controlo	13.000	2	<0.001*
<i>G. trabeum</i> 3 vs. Controlo	28.000	2	<0.001*
<i>G. trabeum</i> 4 vs. Controlo	23.132	2	0.002*
<i>G. trabeum</i> 1 vs. <i>G. trabeum</i> 1	28.000	2	<0.001*
<i>G. trabeum</i> 2 vs. <i>G. trabeum</i> 2	21.571	2	<0.001*
<i>G. trabeum</i> 3 vs. <i>G. trabeum</i> 3	23.285	2	<0.001*
<i>G. trabeum</i> 4 vs. <i>G. trabeum</i> 4	23.285	2	<0.001*

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (Teste de *Friedman*)

Perdas de massa

Pela comparação dos valores médios de perda de massa entre os papéis impregnados com extratos de madeira degradada por fungos e respetivos controlos foi possível verificar diferenças na escolha feita pelas térmitas para todos os extratos utilizados, sendo estas diferenças mais evidentes nos casos em que os papéis continham extratos provenientes dos provetes menos degradados, com perdas de massa de 9.65% comparativamente com 4% nos papéis controlo (Figura 2.15 a)). Estas diferenças foram confirmadas recorrendo ao teste estatístico *T* de *student* em que a perda de massa dos papéis impregnados com os extratos do fungo foi significativamente mais elevada do que a perda de massa registada nos papéis controlo, impregnados com água destilada. No entanto, os ensaios em que foi utilizado o extrato da madeira mais degradada foram exceção (*G. trabeum* 4) não se tendo verificado diferenças entre o consumo dos papéis impregnados com este extrato e os controlos. As diferenças nos valores de perdas de massa foram mais significativas ($t=4.621$, $g.l.=9$, $p < 0.001$) nos ensaios onde foram utilizados extratos provenientes da madeira menos degradada (*G. trabeum* 1) (Tabela 2.7).

Na comparação dos valores médios de perda de massa dos papéis impregnados com o mesmo extrato utilizados nos ensaios de escolha entre o mesmo tipo de alimento, não se verificou nenhuma diferença significativa (Tabela 2.7). Verificou-se um consumo mais elevado dos papéis impregnados com extrato de *G. trabeum* 2, com consumos de 7 a 9% dos papéis relativamente ao consumo dos papéis com os restantes extratos (Figura 2.15 b)).

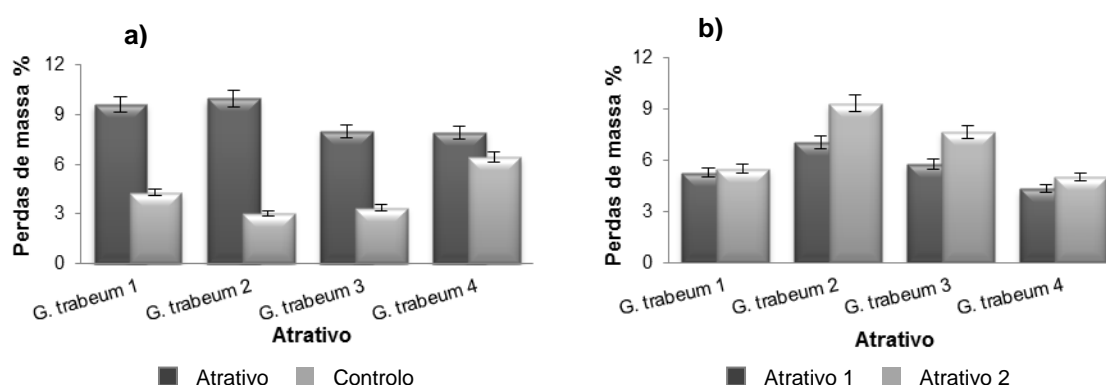


Figura 2. 15 - Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (*G. trabeum* 1, *G. trabeum* 2, *G. trabeum* 3 e *G. trabeum* 4) e b) entre o mesmo tipo de extrato (*G. trabeum* 1, *G. trabeum* 2, *G. trabeum* 3 e *G. trabeum* 4).

Tabela 2. 7 - Resultados do teste estatístico *T* de *student*, para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (*G. trabeum* 1, *G. trabeum* 2, *G. trabeum* 3 e *G. trabeum* 4) e os respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.

Atrativo	Média	Desvio padrão	<i>t</i>	g.l.	<i>p</i>
<i>G. trabeum</i> 1 vs. Controlo	5.335	3.651	4.621	9	0,001*
<i>G. trabeum</i> 2 vs. Controlo	6.867	5.578	3.893	9	0,004*
<i>G. trabeum</i> 3 vs. Controlo	4.336	3.921	3.497	9	0,007*
<i>G. trabeum</i> 4 vs. Controlo	1.364	7.592	0.568	9	n.s
<i>G. trabeum</i> 1 vs. <i>G. trabeum</i> 1	-0.416	6.533	-0.202	9	n.s.
<i>G. trabeum</i> 2 vs. <i>G. trabeum</i> 2	-2.291	5.707	-1.269	9	n.s.
<i>G. trabeum</i> 3 vs. <i>G. trabeum</i> 3	-1.746	5.214	-1.059	9	n.s.
<i>G. trabeum</i> 4 vs. <i>G. trabeum</i> 4	-0.501	6.869	-0.231	9	n.s.

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (*T* de *student*)

Pycnopus sanguineus

Ensaio de toxicidade

Nos ensaios de toxicidade verificou-se que a taxa de sobrevivência foi diminuindo ao longo dos 21 dias dos ensaios, tendo atingido os 78%. No entanto quando comparada através das curvas de sobrevivência estimadas pela análise *Kaplan-Meier*, com a sobrevivência ocorrida nos ensaios controlo com água destilada (84%), não ocorreram diferenças significativas (Figura 2.16). Também foi comparada a toxicidade dos extratos através do teste de Qui-quadrado, tendo-se verificado que não houve diferenças significativas entre eles em termos de taxa de sobrevivência das térmitas expostas aos quatro extratos utilizados.

Observações diárias

Os ensaios de escolha foram monitorizados diariamente tendo-se realizado a contagem das térmitas que se encontravam em cada divisão do ensaio. Através desta monitorização foi possível verificar que as térmitas se distribuíram por todo o ensaio, tendo sido observadas mais frequentemente (60%) nos corredores, ou seja, nos espaços entre a areia colocada por

baixo de cada um dos papéis de filtro impregnados, exceto nos ensaios com *P. sanguineus* 1 onde as térmitas foram observadas mais frequentemente na zona do ensaio que continha os papéis impregnados com o extrato (53% das térmitas) (Figura 2.17). Verificaram-se para todos os ensaios diferenças significativas no número de térmitas observadas em cada zona de ensaio, esta comparação foi feita através da análise de *Friedman* (Tabela 2.8).

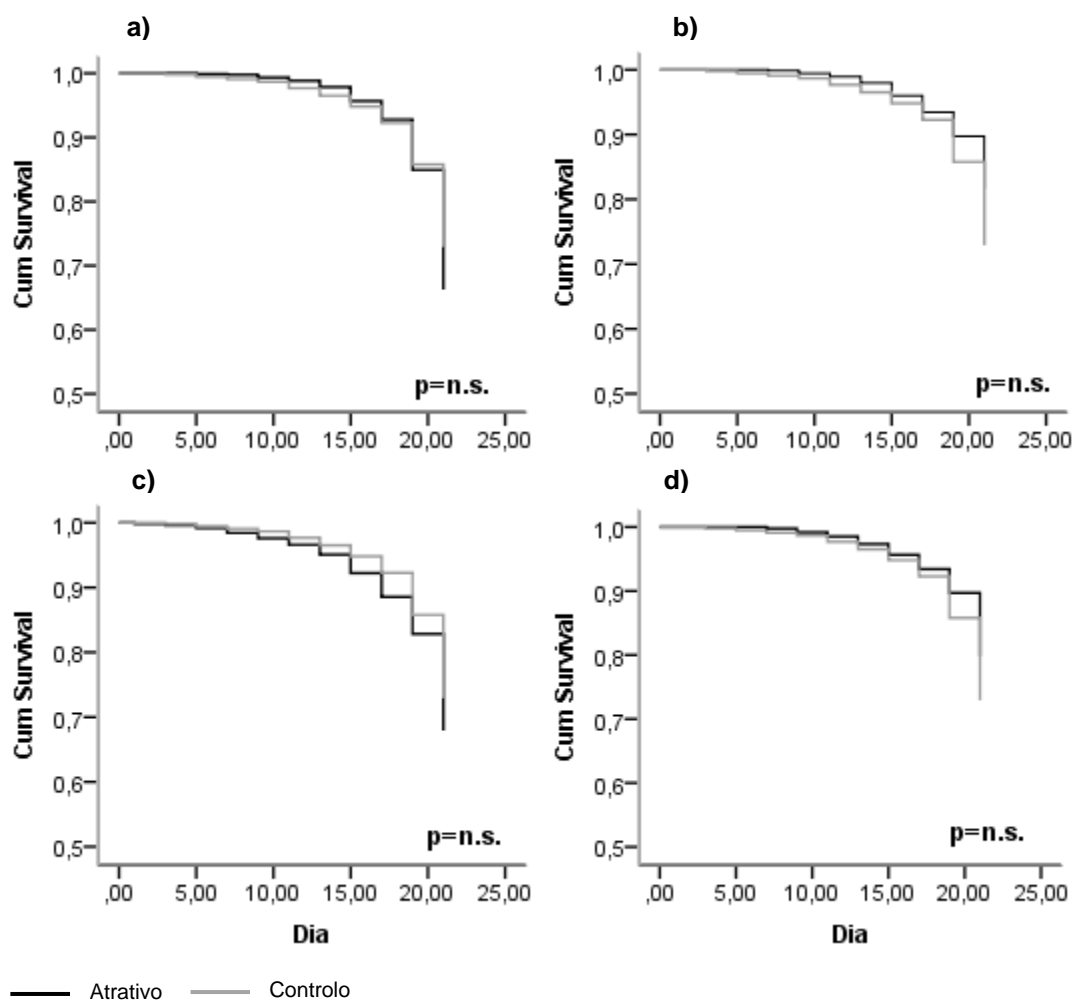


Figura 2. 16 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de *Kaplan-Meier* das térmitas expostas aos extratos de: a) *P. sanguineus* 1 perda de massa de 8.32%; b) *P. sanguineus* 2 perda de massa de 14.23%; c) *P. sanguineus* 3, perda de massa de 18.44% e; d) *P. sanguineus* 4, perda de massa de 25.60% em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (água destilada). *P* calculado pelo teste de *Log Rank*. Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.

Nos ensaios onde se encontrava o mesmo extrato em ambos os papéis de filtro não se evidenciou nenhuma preferência por parte das térmitas em relação às zonas com

papel de filtro, no entanto, as térmitas foram frequentemente (40 a 60%) observadas nos corredores (Figura 2.18). Segundo a análise de *Friedman* as diferenças na distribuição das térmitas pelos ensaios foram significativas em todos os ensaios com os extratos do fungo *P. sanguineus* analisados (Tabela 2.8).

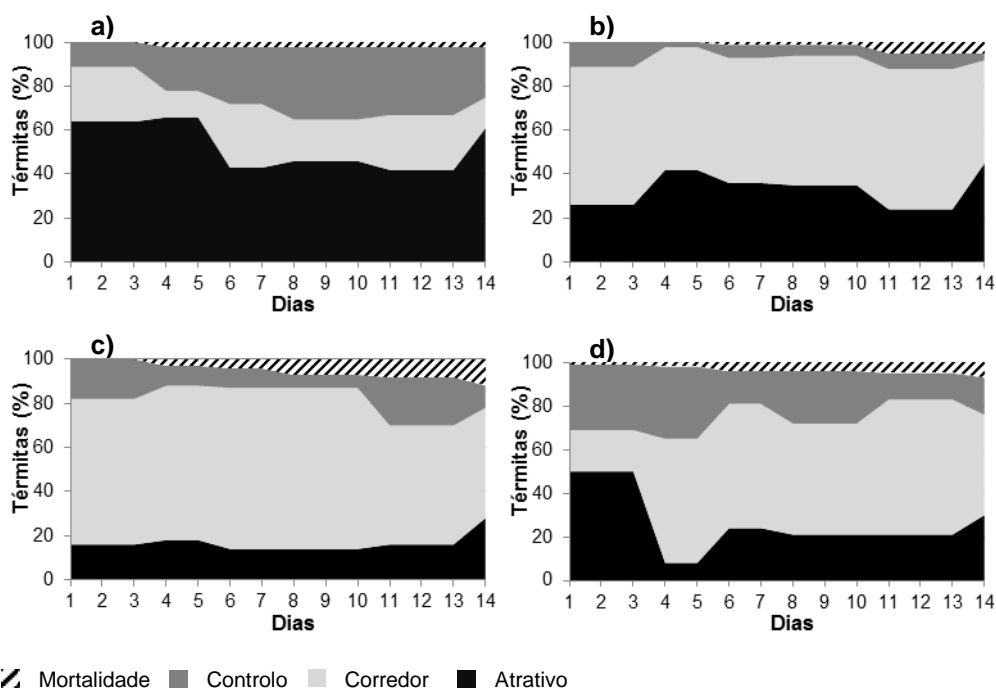


Figura 2. 17 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) *P. sanguineus* 1 perda de massa de 8.32%; b) *P. sanguineus* 2 perda de massa de 14.23%; c) *P. sanguineus* 3, perda de massa de 18.44% e; d) *P. sanguineus* 4, perda de massa de 25.60% e respetivos controlos (água).

Tabela 2. 8 - Comparação, através do teste estatístico de *Friedman*, do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios de escolha e sem escolha.

Atrativo	Qui-quadrado	g.l.	P
<i>P. sanguineus</i> 1 vs. Controlo	21.571	2	<0.001*
<i>P. sanguineus</i> 2 vs. Controlo	28	2	<0.001*
<i>P. sanguineus</i> 3 vs. Controlo	21.142	2	<0.001*
<i>P. sanguineus</i> 4 vs. Controlo	7.428	2	<0.001*
<i>P. sanguineus</i> 1 vs. <i>P. sanguineus</i> 1	21.571	2	<0.001*
<i>P. sanguineus</i> 2 vs. <i>P. sanguineus</i> 2	21.142	2	<0.001*
<i>P. sanguineus</i> 3 vs. <i>P. sanguineus</i> 3	16.714	2	<0.001*
<i>P. sanguineus</i> 4 vs. <i>P. sanguineus</i> 4	21.142	2	<0.001*

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (Teste de *Friedman*)

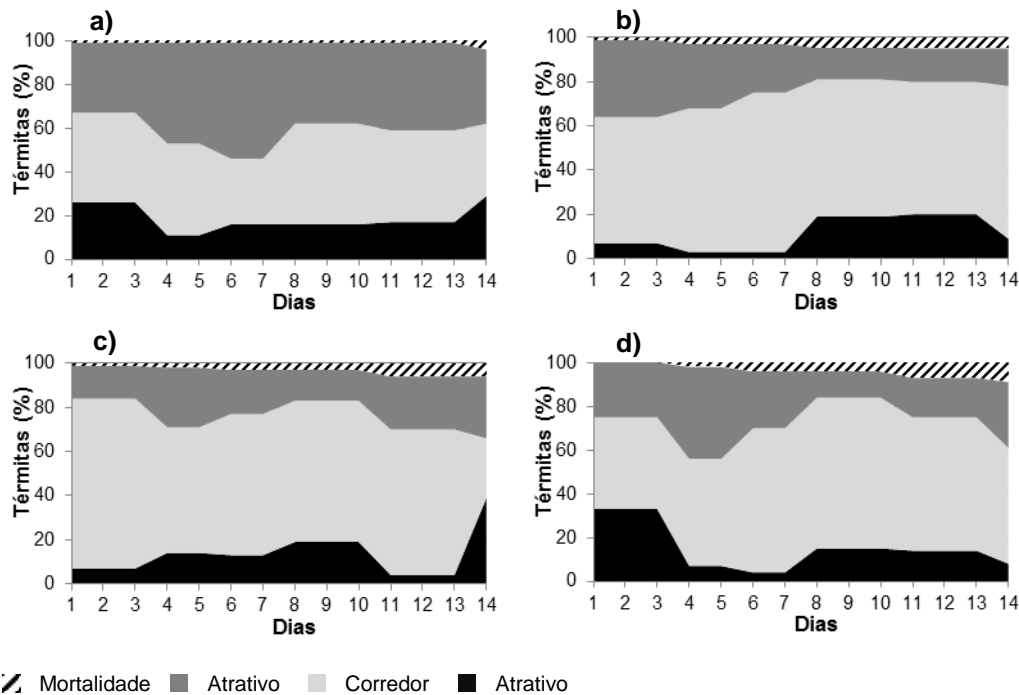


Figura 2. 18 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre o mesmo extrato dos diferentes alimentos: a) *P. sanguineus* 1 perda de massa de 8.32%; b) *P. sanguineus* 2 perda de massa de 14.23%; c) *P. sanguineus* 3, perda de massa de 18.44% e d) *P. sanguineus* 4, perda de massa de 25.60%.

Perdas de massa

Foi comparada a perda de massa dos papéis com os diferentes extratos utilizados. Verificou-se que, no caso dos ensaios de escolha, as térmitas demonstraram preferência pelos papéis impregnados com os diferentes extratos do fungo *P. sanguineus*, com valores superiores a 7% de perdas de massa. Este comportamento foi mais evidente nos casos em que o extrato utilizado foi retirado dos provetes mais degradados (*P. sanguineus* 3 e 4) com perdas de massa de 6 e 8% dos papéis impregnados (Figura 2.19 a)). Verificaram-se diferenças significativas em todos os ensaios quanto à preferência das térmitas, que consumiram em maior quantidade os papéis com o extrato do fungo sendo estas diferenças mais significativas nos casos em que os papéis continham os extratos *P. sanguineus* 3 e 4 ($t=5.568$, g.l.=9, $p < 0.001$ e $t=6.840$, g.l.=9, $p < 0.001$) (Tabela 2.9). Nos ensaios sem escolha, em que eram oferecidos dois papéis de filtro impregnados com o mesmo extrato, verificou-se uma maior perda de massa nos que se encontravam numa das zonas do ensaio com os papéis impregnados (Figura 2.19 b)), no entanto, estas diferenças não foram consideradas significativas (Tabela 2.9). Foi também verificado um maior consumo de papéis impregnados com os extratos de *P. sanguineus* 4 (até 6%) por parte das térmitas subterrâneas (Figura 2.19 b)).

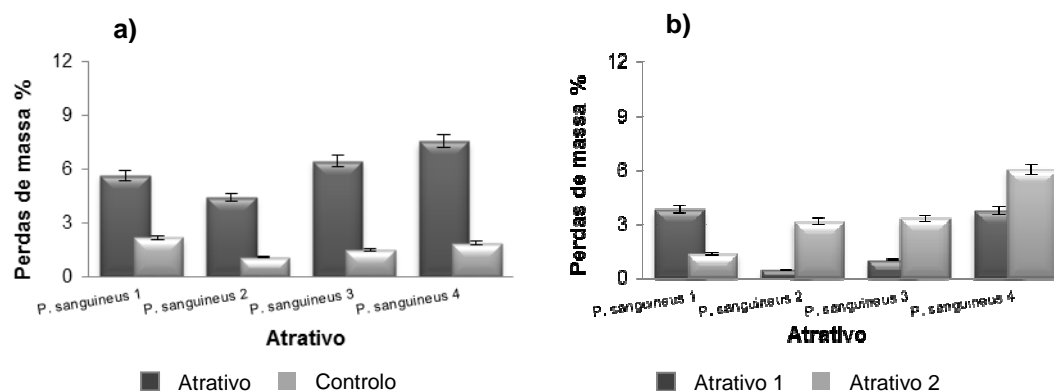


Figura 2. 19 – Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (*P. sanguineus*1, *P. sanguineus* 2, *P. sanguineus* 3 e *P. sanguineus* 4) e b) entre o mesmo tipo de extrato (*P. sanguineus*1, *P. sanguineus* 2, *P. sanguineus* 3 e *P. sanguineus* 4).

Tabela 2. 9 - Resultados do teste estatístico *T* de *student*, para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (*P. sanguineus*1, *P. sanguineus* 2, *P. sanguineus* 3 e *P. sanguineus* 4) e os respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.

Atrativo	Média	Desvio padrão	<i>t</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>
<i>P. sanguineus</i> 1 vs. Controlo	3.476	3.277	3.355	9	0,008*
<i>P. sanguineus</i> 2 vs. Controlo	3.234	2.643	3.870	9	0,004*
<i>P. sanguineus</i> 3 vs. Controlo	4.743	2.694	5.568	9	<0,001*
<i>P. sanguineus</i> 4 vs. Controlo	5.597	2.588	6.840	9	<0,001*
<i>P. sanguineus</i> 1 vs. <i>P. sanguineus</i> 1	1.331	4.509	0.934	9	n.s.
<i>P. sanguineus</i> 2 vs. <i>P. sanguineus</i> 2	-2.095	3.077	-2.152	9	n.s.
<i>P. sanguineus</i> 3 vs. <i>P. sanguineus</i> 3	-1.813	2.562	-2.237	9	n.s.
<i>P. sanguineus</i> 4 vs. <i>P. sanguineus</i> 4	-2.288	3.748	-1.930	9	n.s.

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (*T* de *student*)

2.4 Discussão

Nas observações diárias verificou-se que a predominância da localização das térmitas dependeu do alimento disponibilizado. No entanto verificou-se que em todos os ensaios, quer nos ensaios com ou sem escolha, e para todos os extratos utilizados, ocorreram diferenças significativas na distribuição espacial das térmitas. Na maioria das

situações estas diferenças ocorreram porque as térmitas se encontravam predominantemente nos corredores entre a areia.

Estes resultados foram posteriormente esclarecidos recorrendo à comparação das perdas de massa dos papéis utilizados com os diferentes extratos, onde as térmitas demonstraram que escolheram os papéis com o extrato que mais lhes agradou. Ou seja, aparentemente as térmitas apesar de terem sido mais observadas nos corredores, deslocaram-se para o papel de filtro mais atrativo quando se pretendiam alimentar no lugar de se instalarem na metade do ensaio com o alimento mais atrativo. Este fato poderá ter ocorrido devido às caixas de Petri serem de pequena dimensão, ou seja, a distância entre as térmitas e o alimento não seria suficiente para justificar a instalação das térmitas num local específico do ensaio de modo a estarem mais próximas do alimento. O fato de não se verificar um consumo preferencial por parte das térmitas sobre um dos papéis impregnados nos ensaios sem escolha, ou seja, papéis impregnados com o mesmo tipo de extrato, demonstra que as térmitas podem fazer uma escolha pela atratividade do alimento disponível e não devido à disposição do alimento.

Aparentemente os extratos de pinho, casca de pinho e cortiça não foram mais atrativos para as térmitas do que a água destilada em papel de filtro, pois possivelmente estes extratos não continham qualquer substância que os tornasse mais atrativos do que a celulose já existente no papel de filtro. No caso dos ensaios com casca de pinho as térmitas pareceram preferir o papel com água destilada ao papel com extrato de casca de pinho, podendo este conter substâncias que levem as térmitas a evitar a sua utilização como fonte de alimento. Este resultado poderá ter ocorrido devido à possibilidade de as cascas de pinho utilizadas estarem contaminadas com fungos que poderão ter tornado este extrato menos atrativo para as térmitas. No entanto, quando as térmitas não tinham outra opção de alimento alimentaram-se do papel com este extrato, demonstrando que não lhe causa repulsa ou mortalidade acrescida quando comparado com o controlo, sendo-lhes apenas menos atrativo. Quanto à toxicidade apenas o extrato de cortiça demonstrou ter significativamente menos sobreviventes que a água. Apesar de as térmitas não terem demonstrado preferência pela madeira de pinho em relação ao controlo, preferiram madeira de pinho degradada pelos três fungos de podridão testados.

O fungo de podridão castanha *P. placenta* demonstrou causar atração às térmitas subterrâneas *R. grassei*. Nas observações feitas diariamente denotou-se uma certa prevalência das térmitas na zona dos ensaios que continha papel de filtro com os extratos do fungo. Este fungo também mostrou não ser tóxico para as térmitas, seja qual for o grau de degradação, tendo a mortalidade ocorrida sido muito semelhante à ocorrida nos ensaios

controle. Pela comparação das perdas de massa entre papéis de filtro impregnados com o extrato do fungo e controle, confirmou-se a tendência verificada nas monitorizações diárias, pois as térmitas alimentaram-se preferencialmente sobre os papéis impregnados com extrato de *P. placenta*. No entanto, esta preferência apenas foi significativa nos papéis que continham extratos provenientes dos provetes mais degradados, *P. placenta* 3 e 4. Os resultados concordam com os obtidos por Getty e Haverty (1998), que demonstraram que o consumo de madeira pelas térmitas é maior quando esta está degradada pelo fungo *P. placenta*.

As térmitas demonstraram também preferência por se alimentarem sobre papéis impregnados com o outro fungo de podridão castanha testado, o *G. trabeum*. Apesar de nas observações feitas diariamente não se ter denotado qualquer tendência, pela comparação das perdas de massa dos papéis de filtro verificou-se que estas preferiram os papéis com extrato do fungo aos papéis com água. Esta atração foi mais visível quando os papéis continham extrato proveniente de madeira pouco degradada por este fungo, o que sugere que as térmitas são mais atraídas pelos primeiros estados de degradação provocada por este fungo. O extrato mais atrativo (*G. trabeum* 1) foi também o que obteve uma menor taxa de sobrevivência das térmitas e o menos atrativo o que obteve uma maior sobrevivência, podendo-se pressupor que um maior consumo dos papéis com extrato deste fungo pode levar a um aumento da mortalidade das térmitas. A atração das térmitas do género *Reticulitermes* pelo fungo *G. trabeum* já tinha sido comprovada em outros trabalhos (Matsumura *et al.*, 1976, Grace 1989, Cornelius *et al.*, 2002).

Waller *et al.* (1987) provou que as térmitas subterrâneas podem evitar certas espécies de fungos de podridão branca e podem ser atraídas por outras. Cornelius *et al.* (2002) também indicou que as térmitas subterrâneas podem ser atraídas por este tipo de fungos de podridão. Da mesma forma que no fungo *G. trabeum*, também no caso do fungo de podridão branca *P. sanguineus* as térmitas foram mais vezes observadas no corredor entre a areia nos ensaios. Mas também neste caso quando se fez a comparação das perdas de massa dos papéis de filtro utilizados se verificou que as térmitas tiveram preferência pelos papéis com todos os extratos utilizados deste fungo. Tendo tido maior preferência pelos extratos provenientes de madeira mais degradada. Nenhum dos extratos foi tóxico para as térmitas.

Verificou-se que, para todos os extratos de fungos testados, as térmitas consumiram maior quantidade de papel de filtro impregnado com estes extratos, tendo sido este consumo maior ou menor de acordo com o do nível de degradação provocada pelos fungos na madeira. Cornelius *et al.* (2002) demonstrou que as térmitas *Coptotermes formosanus*

Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae) são muito afetadas pelos fungos de podridão branca em termos de padrões de escolha de alimento, tendo as térmitas sido fortemente atraídas por madeira moderadamente degradada, e não por madeira sã ou madeira demasiado degradada. Isto pode ser devido aos fungos libertarem substâncias químicas diferentes consoante o grau de ataque destes na madeira, e possivelmente por a degradação provocada pelos fungos tornar a madeira nutricionalmente mais atractiva (Waller *et al.*, 1987).

O fungo *G. trabeum* é capaz de sintetizar o composto (Z, Z, E) – 3, 6, 8 – dodecatrieno – 1 – ol que atua como sinal para as térmitas seguirem para encontrar alimento (Matsumura *et al.*, 1976). Mas segundo o nosso estudo, quando o nível de degradação causada por este fungo é maior deixa de ser tão atrativo para as térmitas, o que pode indicar que a libertação deste composto depende do nível de degradação da madeira ou que podem existir outros fatores que alteram o nível de atração das térmitas por este fungo. Existem outras espécies de fungos de podridão com capacidade de atrair as térmitas mesmo sem sintetizarem esta feromona, ou seja, existem outras espécies de fungos que possivelmente produzem substâncias químicas que atuam como sinais para as térmitas procurarem alimento. Isto poderá significar que as térmitas não respondem à simples presença dos fungos, mas aparentemente respondem aos químicos produzidos durante a degradação da madeira, durante a metabolização da celulose ou, no caso dos fungos de podridão branca, da lenhina.

Segundo Su (2005) as térmitas subterrâneas podem localizar o alimento através de gradientes químicos libertados para o solo pela madeira degradada, podendo estes serem solúveis em água. Como o estado de degradação em que se encontra a madeira vai alterando a atratividade desta às térmitas, a utilização de madeira degradada nas armadilhas torna-se inviável, visto ser difícil manter a madeira sempre no mesmo estado de degradação. O uso das substâncias químicas libertadas pela madeira degradada pode ser mais eficiente e mais facilmente controlável. Seria então necessário investigar quais os compostos libertados pela madeira durante a sua decomposição passíveis de servirem como sinais para as térmitas encontrarem alimento. Devendo dar-se prioridade ao estudo dos compostos libertados pela madeira degradada pelo fungo *P. sanguineus* devido ao pouco conhecimento sobre a relação entre este fungo e as térmitas subterrâneas, e ao fato de todos os níveis de degradação causados por esta espécie neste estudo terem sido atractivos para as térmitas estudadas.

2.5 Bibliografia

- Becker, G. (1976). "Termites and fungi". *Material und Organismen Beiheft*. 3: 465-478;
- Carvalho, W., Canilha, L., Ferraz, A., & Milagres, A. (2009). "Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira". *Quimica Nova*. 32(8): 2191-2195;
- Cornelius, M., Daigle, D., Connick, W., 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". *Journal of Economic Entomology*. 95(1): 121-128;
- EN-113 (1996). "Wood Preservatives – Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes – Determination of the toxic values". CEN Secretariat. Brussels, Belgium;
- Getty, G. & Haverty, M. (1998). "Consumption of sound and decayed ponderosa pine and douglas-fir by *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae) from Northern California". *Journal of Economic Entomology*. 91(3): 650 – 654;
- Goodell, B., Qian, Y. & Jellison, J. (2008). "Fungal decay of wood: soft rot – brown rot – white rot". Development of commercial wood preservatives efficacy, environment and health issues. Washington, DC. American Chemical Society. 982: 9-31;
- Grace, J. (1989). "Habituation in termite orientation response to fungal semiochemicals". *Sociobiology*. 16(2): 175-182;
- Grace, J., Goodell, B., Jones, W., Chandhoke, V., & Jellison, J. (1992). "Evidence for inhibition of termite (Isoptera: Rhinotermitidae) feeding by extracellular metabolites of a wood decay fungus". *Proceedings, Hawaiian Entomological Society*. 31: 249-252;
- Green III, F., & Highley, L. (1997). "Mechanism of brown rot decay: paradigm or paradox". *International Biodegradation & Biodegradation*. 39 (2-3): 113-124.
- Hendee, E. (1934). "The association of termites and fungi". In: Kofoid, C. (ed.), "*Termites and termite control*". University of California Press, Berkeley, California. Pp. 101-107;
- Kutnik, M. e Paulmier, I. (FCBA); Hertel, H e Plarre, R. (BAM); Munne, O. (Cidemco); Thévenon, M. (CIRAD); Nunes, L. (LNEC) e Gaju, M. (Universidade Cordoba). (2011). "Curative performance standard for termites". Dados não publicados.
- Jayasimha, P. & Henderson, G. (2007). "Suppression of growth of a brown rot fungus, *Gloeophyllum trabeum*, by formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae)". *Annals of the Entomological Society of America*. 100 (4): 506-511;
- Lefèvre, C. (2000). "Symbiosis with fungi". In: Abe T., Bignell D., Higashi M. (eds). "*Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*". Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands, Pp 289 - 306;
- Matsumura, E., Nishimoto, K., Ikeda, T., & Coppel, H. (1976). "Influence of carbon sources on the production of termite trail-following substance by *Gloeophyllum trabeum*". *Journal of Chemical Ecology*. 2(3): 299-305;
- Morales, J. & Rojas, M. (2001). "Nutritional ecology of the formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae): Feeding response to commercial wood species". *Journal of Economic Entomology*. 94 (2): 516-523;

- NP 614, (1973). "Madeiras – Determinação do teor em água", Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica, Portugal;
- Nunes, L., Nobre, T., Gigante, B., & Silva, A. (2004). "Toxicity of pine resin derivatives to subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae)". *Management of Environmental Quality: An International Journal*. 15 (5): 521 – 528;
- Rich, J., D., Neely, J., Paniello, R., Voelker, C., Nussenbaum, D., e Wang, E. (2010). "A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves". *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 143: 331-336;
- Schaefer, D., Whitford, W. (1981). "Nutrient cycling by subterranean termite *Gnathamitermes tubiformans* in a Chihuahuan Desert ecosystem". *Oecologia*. 48: 277-283;
- Su, N.-Y. (2005). "Directional change in tunneling of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in response to decayed wood attractants". *Journal of Economic Entomology*. 98 (2): 471-475;
- Su, N.-Y. & Tamashiro, M. (1986). "Wood-consumption rate and survival of the formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) when fed one of six woods used commercially in Hawaii". *Proceedings, Hawaiian Entomological Society*. 28: 109-113;
- Waller, D., La Fage, J., Gilbertson, R., & Blackwell, M. (1987). "Wood-decay fungi associated with subterranean termites (Rhinotermitidae) in Louisiana". *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 89(3): 417-424.

Capítulo 3

**Atração das térmitas subterrâneas *Reticulitermes grassei*
(Clément, 1978) por substâncias libertadas durante o
processo de degradação da madeira por fungos de
podridão**

3.1 Introdução

Diversos estudos têm vindo a confirmar a preferência das térmitas subterrâneas por madeira degradada por fungos de podridão (Matsumura *et al.*, 1976; Waller *et al.*, 1987; Grace, 1989; Cornelius *et al.*, 2002), no entanto, a forma como as térmitas encontram a madeira degradada no solo permanece relativamente desconhecida. Segundo Su (2005) as térmitas subterrâneas podem localizar o alimento no solo através de gradientes de concentração de químicos, eventualmente solúveis em água, libertados pela madeira degradada para o solo. A biodegradação da madeira inicia-se com a penetração das hifas fúngica através do lúmen da célula vegetal. Para se estabelecer, o fungo promove uma intensa secreção de metabólitos extracelulares, especialmente enzimas, que levam à conversão dos componentes complexos da parede celular (celulose, hemicelulose e lenhina) em compostos mais simples.

Os fungos de podridão castanha degradam, através da ação de enzimas, apenas a celulose e a hemicelulose (Green e Highley, 1997), enquanto os fungos de podridão branca degradam os três constituintes principais da parede celular, a celulose, a hemicelulose e a lenhina (Kirk e Cullen, 1998). Estes componentes são decompostos em vários outros compostos mais simples. A celulose pode ser decomposta em glicose, a hemicelulose em xilose, manose, galactose ou outros açúcares, e a lenhina em álcoois p-hidro-cinâmicos precursores (Goodell *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009). Outros componentes que podem ser encontrados na madeira degradada são os catiões como o potássio, o cálcio ou o magnésio. Estes catiões são encontrados em grandes quantidades quando a madeira é degradada por fungos de podridão (Jellison *et al.*, 1997). Poucos estudos têm sido feitos sobre a influência das substâncias libertadas pela madeira degradada sobre as térmitas subterrâneas, tendo a maioria incidido sobre o efeito dos nutrientes na procura de alimento pelas térmitas, verificando-se que as térmitas são mais influenciadas por uns nutrientes do que por outros. A espécie de térmitas também é um fator preponderante no efeito que as substâncias libertadas pela madeira têm no comportamento de procura de alimento (Saran e Rust, 2005; Haifig *et al.*, 2008).

Haifig *et al.* (2008) demonstrou que as térmitas da espécie *Heterotermes tenuis* (Hagen) são muito influenciadas por soluções de ureia mas pouco por soluções de sacarose, ao contrário do resultados obtidos por Waller *et al.* (1999), em que as térmitas *Reticulitermes spp.* foram fortemente atraídas por soluções de sacarose. Segundo Saran e Rust (2005) as térmitas *Reticulitermes spp.* apresentaram um aumento do consumo quando o alimento foi tratado com xilose, ribose, maltose ou frutose.

O objetivo deste estudo foi comprovar que as térmitas subterrâneas *Reticulitermes grassei* (Clément) são atraídas por certas substâncias libertadas pela madeira decomposta por fungos de podridão. As substâncias estudadas foram os açúcares glicose, sacarose e xilose e o catião Potássio fornecido sob a forma de carbonato de potássio.

3.2 Materiais e métodos

Térmitas

As térmitas subterrâneas, *Reticulitermes grassei*, foram recolhidas de troncos caídos de uma área florestal mista na Herdade da Apostiça, Sesimbra, Portugal, com as coordenadas N 38°32.436' W 009°07.848' a 18 m de elevação. E foram mantidas numa sala condicionada (24 ± 1 ° C; > 80% HR), em caixas de Petri com papel de filtro humedecido, tendo sido utilizadas nos ensaios, em média, uma semana após a sua coleta.

Soluções aquosas

As substâncias químicas utilizadas como potencial atrativo foram os açúcares: sacarose ($C_{12}H_{22}O_5$), xilose ($C_5H_{10}O_5$) e glicose ($C_6H_{12}O_6$), dissolvidos em água destilada até se obter uma solução de 2%, e o sal carbonato de potássio (K_2CO_3) também dissolvido em água destilada até se ter obtido uma solução de 0.05%.

Foram adicionados 0,075 ml de cada uma das soluções referidas em metades de papéis de filtro Macherey-Nagel com um diâmetro de 42,5 mm, previamente pesados e numerados, e deixados a secar durante pelo menos 60 minutos, o mesmo foi feito com água destilada (controlo). O volume foi definido pela capacidade máxima de absorção dos papéis de filtro.

Ensaio de toxicidade

Estes ensaios foram realizados de forma semelhante à descrita no Capítulo 2 e figura 2.1.

Ensaio de escolha

Estes ensaios foram realizados de forma semelhante à descrita no Capítulo 2 e figuras 2.2 e 2.3.

Análise de dados

Na análise estatística foi usado o *software* IBM® SPSS® Statistics vs.21 (IBM Corporation, New York, USA). Usou-se em todos os testes um alfa de 0.05 para a rejeição da hipótese nula.

Nos ensaios de toxicidade foram comparados o número de mortes que se registaram diariamente nos ensaios com os atrativos com as ocorridas nos ensaios controle. Para tal recorreu-se à análise de Kaplan-Meier para estimar e comparar as suas curvas de sobrevivência. As curvas de sobrevivência representam a probabilidade cumulativa de um indivíduo sobreviver em qualquer momento posterior à data de início. Desta forma o modelo de Kaplan Meier baseia-se na estimativa das probabilidades condicionais da taxa de sobrevivência em cada ponto no tempo (Rich *et. al*, 2010). A comparação da distribuição entre as duas curvas de sobrevivência foi feita pelo teste de *Log Rank (Mantel-Cox)*, este segue uma distribuição Qui-quadrado com 1 grau de liberdade. Também foi verificada a existência de diferenças de toxicidade entre os diferentes extratos através de um teste Qui-quadrado aplicado a uma tabela de contingência.

Nos ensaios de escolha e sem escolha foram registados diariamente o número de térmitas que se observaram em uma das três zonas dos ensaios: 1) zona com papel com possível atrativo; 2) zona com papel controle, ou também com atrativo, e; 3) corredor entre estas zonas. Para verificar se existiam diferenças significativas entre o número de térmitas que se observaram em cada uma destas zonas recorreu-se ao teste não paramétrico de *Friedman*, que permitiu a comparação do número de térmitas encontradas em cada uma das zonas ao longo do tempo. Os dados são o resultado de uma mesma amostra (dependentes) em momentos distintos.

No final de cada ensaio de escolha secaram-se os papéis de filtro a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas, de forma a calcular o seu teor em água (NP – 614, 1973) e, posteriormente, as percentagens de perdas de massa destes papéis. As preferências alimentares das térmitas foram quantificadas pelo consumo dos papéis de filtro com as

diferentes soluções e com água destilada utilizados nos ensaios de escolha. As diferenças de consumo foram analisadas pela comparação da média das perdas de massa dos papéis utilizados nos ensaios de escolha recorrendo ao teste estatístico *T* de *student* para amostras emparelhadas. A normalidade da distribuição das variâncias foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de *Levene*.

3.3 Resultados

Ensaio de toxicidade

Nos ensaios de toxicidade verificou-se um aumento do número de térmitas mortas ao longo dos 21 dias dos ensaios, tendo atingido, no caso dos ensaios com sacarose, os 41% e no caso do carbonato de potássio os 14%. No entanto, quando comparada a taxa de sobrevivência, através das curvas de sobrevivência estimadas pela análise *Kaplan-Meier* com a sobrevivência ocorrida nos ensaios controlo com água destilada (84%), verificou-se que no caso da glicose e da xilose a sobrevivência ocorrida nos ensaios controlo foi superior à ocorrida nestes ensaios (97 e 94% respetivamente), tendo esta diferença sido significativa ($X^2=37.911$, g.l.=1, $p < 0.001$ e $X^2=29.575$, g.l.=1, $p < 0.001$) (Figura 3.1). No caso da sacarose ocorreu o inverso, tendo-se verificado que a mortalidade nestes ensaios foi significativamente superior à ocorrida nos ensaios controlo ($X^2=53.097$, g.l.=1, $p < 0.001$). Com o sal carbonato de potássio não ocorreram diferenças significativas (Figura 3.1).

Também foi comparada a toxicidade dos atrativos utilizados através do teste de Qui-quadrado, tendo-se verificado que houve diferenças de toxicidade entre os quatro atrativos utilizados ($X^2=66.815$, g.l.=2, $p < 0.001$), tendo sido a sacarose o elemento estudado com menos sobreviventes.

Observações diárias dos ensaios de escolha

Nas observações feitas diariamente aos ensaios de escolha, entre papel com solução aquosa e com controlo (água destilada), foi possível verificar que as térmitas foram mais observadas na zona dos ensaios que continham o papel com os produtos em estudo, com valores entre os 38 e os 50% de térmitas observadas junto dos papéis impregnados (Figura 3.2). Pelo teste de *Friedman* demonstrou-se que estas diferenças foram

significativas para os açúcares sacarose e xilose e para o sal carbonato de potássio, mas não foram significativas para o açúcar glicose (Tabela 3.1).

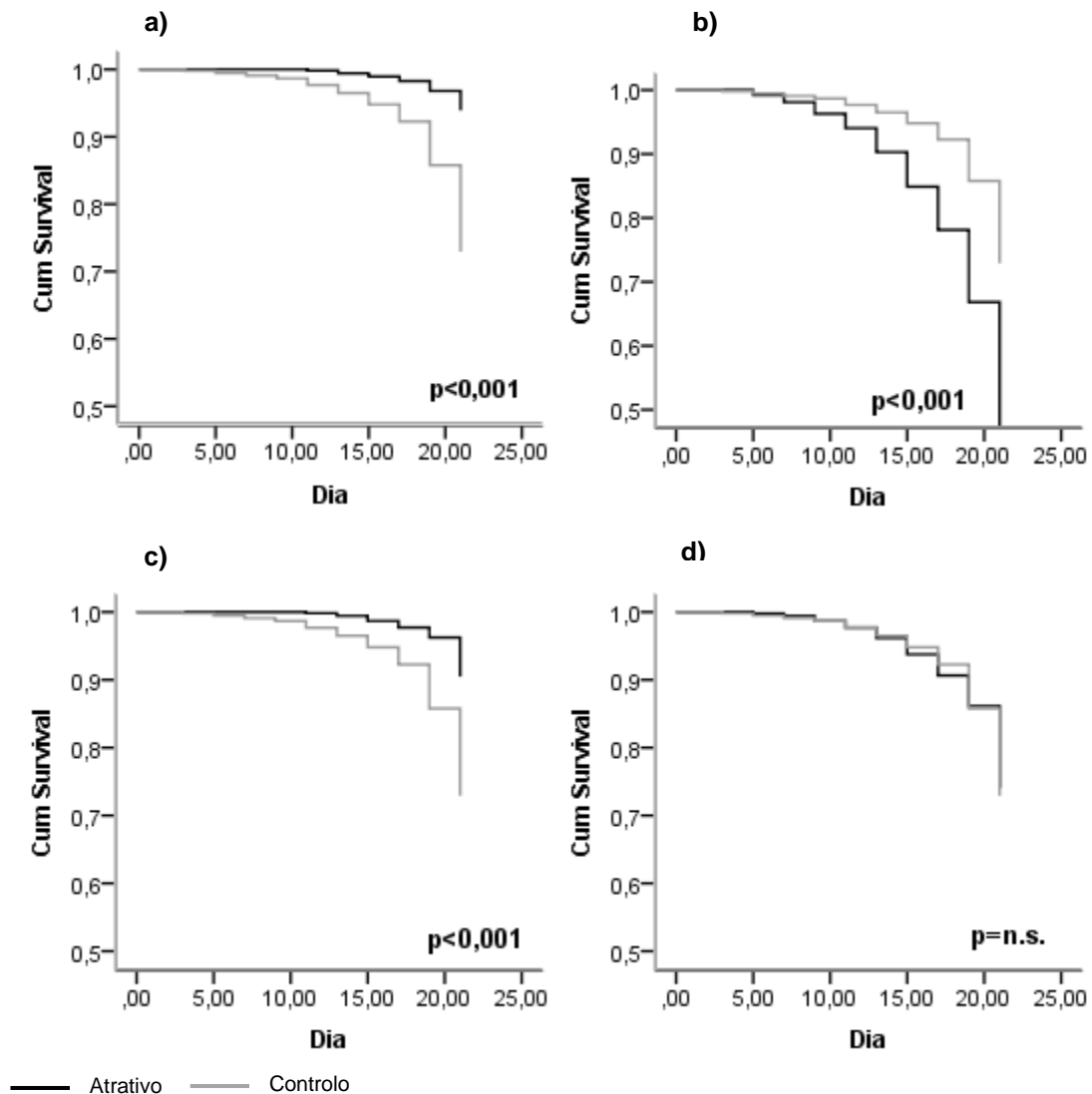


Figura 3. 1 - Curvas de sobrevivência estimadas pela análise de *Kaplan-Meier* das térmitas expostas às soluções aquosas de: a) glicose a 2%; b) sacarose a 2%; c) xilose a 2% e; d) carbonato de potássio a 0,05% em comparação com a curva de sobrevivência dos ensaios controlo (água destilada). *P* calculado pelo teste de *Log Rank*. Eixo y representa a estimativa da sobrevivência ao longo do tempo de exposição.

Nos ensaios que continuam o mesmo alimento nas duas zonas dos ensaios, verificou-se que para a glicose as térmitas se dividiram pelos dois lados dos ensaios (perto de 40% das térmitas em cada lado), tendo sido observadas menos vezes nos corredores (20%) (Figura 3.3). A comparação através do teste de *Friedman* comprovou que estas diferenças eram significativas (Tabela 3.1). No caso da sacarose, as térmitas foram observadas mais frequentemente numa das zonas dos ensaios e no corredor entre cada zona (valores perto de 40%), sendo estas diferenças significativas (*Friedman*) (Tabela 3.1). Nos ensaios com

xilose, as térmitas foram maioritariamente observadas nos corredores entre os atrativos dos ensaios (44% das térmitas) (Figura 3.3 c)), tendo sido estas diferenças significativas (*Friedman*) (Tabela 3.1). Com o atrativo carbonato de potássio em ambas as zonas dos ensaios, as térmitas dividiram-se por todo o ensaio, tendo sido observadas em igual número quer junto dos atrativos quer nos corredores entre eles (Figura 3.3 d)). Quando comparados estes valores através do teste de *Friedman* não se verificaram diferenças significativas (Tabela 3.1).

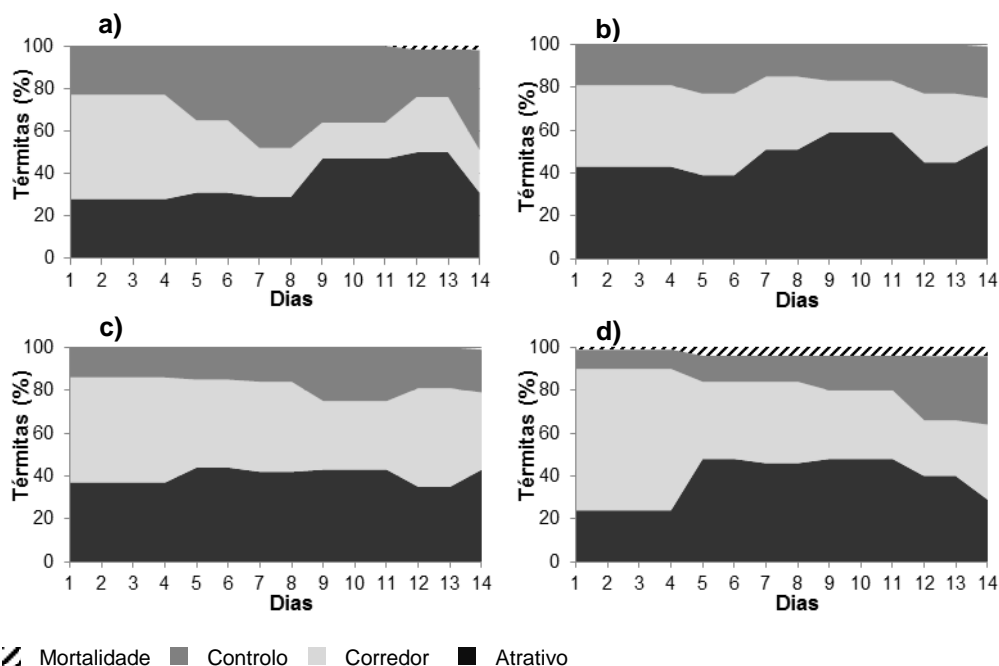


Figura 3. 2 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre os diferentes possíveis atrativos: a) glicose a 2% b) sacarose a 2% c) xilose a 2 % e d) carbonato de potássio a 0.05% e respetivos controlos (água).

Tabela 3. 1 - Comparação, através do teste estatístico de *Friedman*, do número de térmitas observado diariamente em cada uma das posições dos ensaios de escolha e sem escolha.

Atrativo	Qui-quadrado	<i>g.l.</i>	<i>p</i>
Glicose vs. Controlo	1	2	n.s.
Sacarose vs. Controlo	26.142	2	<0.001*
Xilose vs. Controlo	21.777	2	<0.001*
C. potássio vs. Controlo	13.857	2	<0.001*
Glicose vs. Glicose	16.444	2	<0.001*
Sacarose vs. Sacarose	21.142	2	<0.001*
Xilose vs. Xilose	9.320	2	0.009*
C. potássio vs. C. potássio	6.142	2	n.s.

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (Teste de *Friedman*)

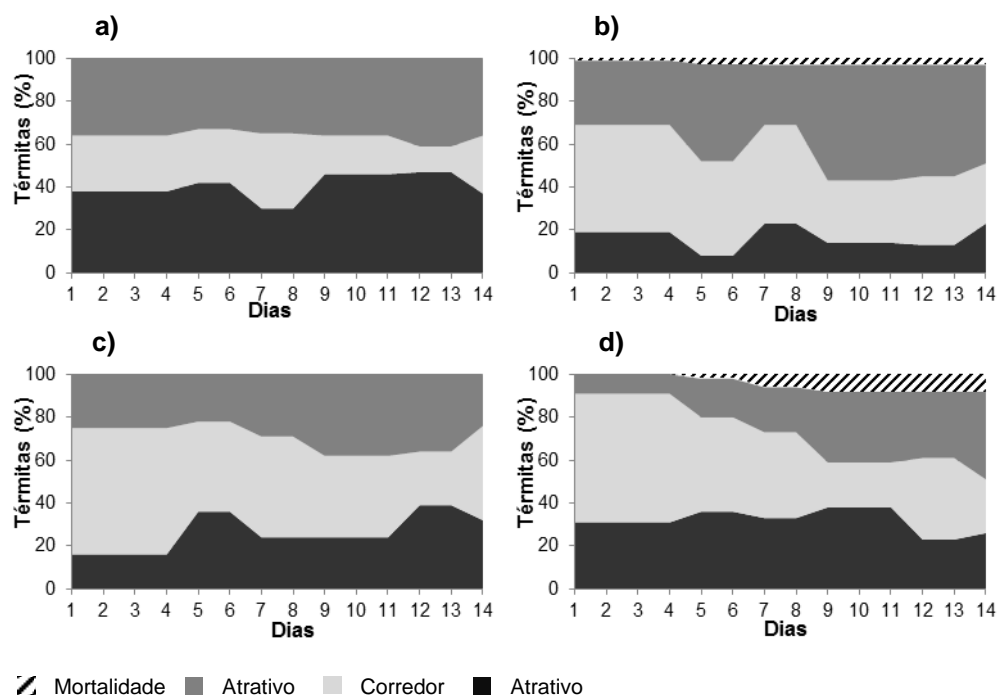


Figura 3.3 - Distribuição espacial das térmitas nos ensaios de escolha entre papéis com a mesma solução aquosa: a) glicose a 2% b) sacarose a 2% c) xilose a 2 % e d) carbonato de potássio a 0.05%.

Perdas de massa

Com a comparação das perdas de massa dos papéis de filtro impregnados com os atrativos, e respetivos controlos (água destilada), utilizados nos ensaios de escolha, verificou-se que o consumo das térmitas foi significativamente maior (valores entre 7 e os 12%) nos papéis com as soluções de todos os açúcares utilizados do que nos controlos (valores entre 1 e 4%) (Figura 3.4 a). A sacarose foi o atrativo com maior diferença de perda de massa comparativamente com o respetivo controlo ($t=6.429$, g.l.=9, $p < 0.001$) (Tabela 3.2). No caso dos papéis com o sal carbonato de potássio ocorreu o inverso, tendo o consumo dos papéis com água destilada (controlo) sido significativamente maior (13%) que o dos papéis com o atrativo (2%) (Figura 3.4 a)).

Nos ensaios sem escolha com a comparação das perdas de massa dos papéis de filtro utilizados de ambos os lados, não se verificaram diferenças significativas no consumo por parte das térmitas, que nunca atingiu valores superiores a 7% (Figura 3.4 b) e Tabela 3.2).

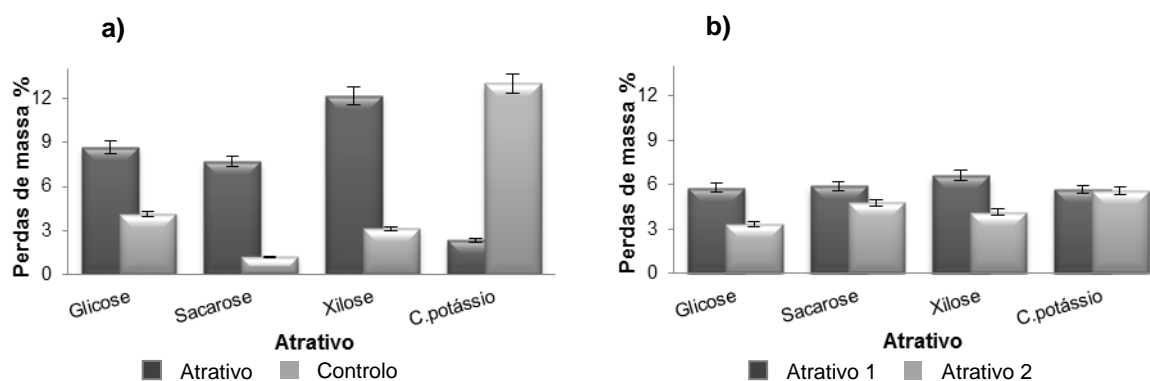


Figura 3. 4 – Valores médios de perda de massa (%) dos papéis impregnados nos ensaios de escolha entre: a) o controlo com água e o extrato (glicose, sacarose, xilose e c. potássio) e b) entre o mesmo tipo de extrato.

Tabela 3. 2 - Resultados do teste estatístico *T* de *student* para comparação dos valores de perda de massa dos papéis impregnados utilizados em ensaios de escolha entre papéis impregnados com os diferentes extratos (glicose, sacarose, xilose e c. potássio) e os respetivos controlos e em ensaio sem escolha, com papéis impregnados com o mesmo extrato em ambas as zonas dos ensaios.

Atrativo	Média	Desvio padrão	<i>t</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>
Glicose vs. Controlo	2.432	6.289	2.995	9	0.015*
Sacarose vs. Controlo	1.137	5.630	6.429	9	<0,001*
Xilose vs. Controlo	2.483	5.174	4.903	9	0,001*
C. potássio vs. Controlo	0.103	7.065	-7.365	9	<0,001*
Glicose vs. Glicose	2.432	6.289	1.223	9	n.s.
Sacarose vs. Sacarose	1.137	5.630	0.639	9	n.s.
Xilose vs. Xilose	2.483	5.174	1.518	9	n.s.
C. potássio vs. C. potássio	0.103	7.065	0.046	9	n.s.

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (*T* de *student*)

3.4 Discussão

Como foi referido na introdução deste capítulo, um conjunto de substâncias, incluindo as ensaiadas neste trabalho, já foram testadas com outras espécies de térmitas subterrâneas (Waller *et al.*, 1999; Saran e Rust, 2005 e Haifig *et al.*, 2008), demonstrando que as preferências alimentares das térmitas dependem e variam de acordo com a espécie em estudo. Neste estudo demonstrou-se que a espécie estudada, *R. grassei*, é afetada e parece ter capacidade de detetar os açúcares presentes nos papéis impregnados com as

soluções de açúcar. Apesar de, nas observações diárias efetuadas aos ensaios de escolha, as térmitas não terem demonstrado uma preferência evidente por nenhum dos açúcares testados, ao comparar as perdas de massa dos papéis utilizados verificou-se que estas preferiram alimentar-se dos papéis com as diferentes soluções de açúcares. Num estudo semelhante efetuado por Waller e Curtis (2003) observou-se um aumento do consumo de papel de filtro, quando este continha soluções de 0.01 e 0.03 g/ml de sacarose e de glicose e de 0.03 g/ml de xilose, pelas térmitas *Reticulitermes flavipes* e *R. virginicus*. Neste estudo o açúcar mais atrativo foi a sacarose, ao contrário do demonstrado por Haifig *et al.* (2008) onde este açúcar não influenciou a taxa de consumo do papel de filtro pelas térmitas *Heterotermes tenuis* (Hagen) (Isoptera: Rhinotermitidae), mostrando mais uma vez que a preferência alimentar depende da espécie de térmita subterrânea estudada.

As térmitas não foram atraídas pelos papéis com o catião potássio, embora Botch e Judd (2011) afirmem que as térmitas *Reticulitermes flavipes* foram atraídas por soluções de carbonato de potássio a 0.024%. Neste estudo foi usada uma concentração de carbonato de potássio de 0.05%, concentração esta superior à utilizada no estudo efetuado por Botch e Judd (2011), podendo ser esta a causa para a espécie estudada, *R. grassei*, não ter sido atraída por este sal. No entanto, nos ensaios em que se expôs as térmitas ao mesmo tipo de extrato alimentaram-se dos papéis que continham esta solução, demonstrando que esta não as repele, sendo apenas menos atrativa que o papel de filtro com água destilada.

Nos ensaios sem escolha (mesmo alimento nos dois lados) com as soluções de açúcar as térmitas não tiveram preferência por nenhum dos lados, como seria de esperar, demonstrando que quando tinham escolha foram atraídas pelo alimento e não por fatores externos. Nos ensaios de toxicidade verificou-se que nas soluções ensaiadas só a solução de sacarose obteve menos sobreviventes nas térmitas estudadas. Apesar de ter sido a mais atrativa, esta foi também a que causou maior mortalidade. No entanto, nos ensaios de escolha com esta solução a mortalidade foi muito baixa, tendo ocorrido apenas uma morte durante os 14 dias do ensaio e apenas três mortes nos ensaios sem escolha. Ou seja, o aumento do tempo de contacto com esta solução parece diminuir a taxa de sobrevivência das térmitas.

Na natureza a concentração de alguns nutrientes de uma fonte de alimento pode variar dependendo do seu nível de degradação. Como resultado um recurso alimentar pode por vezes ser atrativo para algumas espécies e outras vezes poderá repelir as mesmas espécies. Este estudo demonstrou que alguns produtos do processo de deterioração da madeira causada pelos fungos de podridão, e libertados pela madeira por lixiviação, são passíveis de causar atração nas térmitas subterrâneas *R. grassei*. Estes produtos podem

funcionar como sinal para as térmitas descobrirem novos recursos alimentares no solo, uma vez que estas demonstraram preferência (estatisticamente confirmada) pelos papéis com soluções de açúcares que podem ser libertados pela madeira degradada. Os açúcares testados podem apresentar-se assim como potenciais candidatos a ser utilizados para atrair as térmitas subterrâneas nas estações de monitorização, reduzindo o tempo que as térmitas demoram para as encontrar, aumentando a eficácia no controlo das térmitas.

3.5 Bibliografia

- Botch, P., & Judd, T. (2011). "Effects of soil cations on the foraging behavior of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae)". *Journal of Economic Entomology*. 104(2): 425-435;
- Carvalho, W., Canilha, L., Ferraz, A., & Milagres, A. (2009). "Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira". *Química Nova*. 32(8): 2191-2195;
- Cornelius, M., Daigle, D., Connick, W., 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". *Journal of Economic Entomology*. 95(1): 121-128;
- Goodell, B., Qian, Y. & Jellison, J. (2008). "Fungal decay of wood: soft Rot – brown rot – white rot". *Development of commercial wood preservatives efficacy, environment and health issues*. Washington, DC. American Chemical Society. 982: 9-31;
- Grace, J. (1989). "Habituation in termite orientation response to fungal semiochemicals". *Sociobiology*. 16(2): 175-182;
- Green III, F., & Highley, L. (1997). "Mechanism of brown rot decay: paradigm or paradox". *International Biodeterioration & Biodegradation*. 39: 113-124;
- Haifig, I., Costa-Leonardo, A., & Marchetti, F. (2008). "Effects of nutrients on feeding activities of the pest termite *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae)". *Journal of Applied Entomology*. 132: 497-501;
- Jellison, J., Connolly, J., Goodell, B., Doyle, B., Illman, B., Fekete, F., & Ostrofsky, A. (1997). "The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi". *International Biodeterioration & Biodegradation*. 39(2-3): 165-179;
- Kirk, T. & Cullen, D. (1998). "Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi". In: Young, R., e Akhtar, M. (eds.) "Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry". TAPPI Press, Atlanta. Pp. 273–308;
- Matsumura, E., Nishimoto, K., Ikeda, T., & Coppel, H. (1976). "Influence of carbon sources on the production of termite trail-following substance by *Gloeophyllum trabeum*". *Journal of Chemical Ecology*. 2 (3): 299-305;

- NP 614, (1973). "Madeiras – Determinação do teor em água", Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica, Portugal;
- Rich, J., D., Neely, J., Paniello, R., Voelker, C., Nussenbaum, D., e Wang, E. (2010). "A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves". *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 143: 331-336;
- Saran, R. & Rust, M. (2005). "Feeding, uptake, and utilization of carbohydrates by Western subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae)". *Journal Economic of Entomology*. 98(4): 1284-1293;
- Su, N.-Y. (2005). "Directional change in tunneling of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in response to decayed wood attractants". *Journal of Economic Entomology*. 98 (2): 471-475;
- Waller, D. & Curtis, D. (2003). "Effects of sugar-treated food on preference and nitrogen fixation in *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Reticulitermes virginicus* (Banks) (Isoptera: Rhinotermitidae)". *Annals of the Entomological Society of America*. 96:81–85;
- Waller, D., La Fage, J., Gilbertson, R., & Blackwell, M. (1987). "Wood-decay fungi associated with subterranean termites (Rhinotermitidae) in Louisiana". *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 89 (3): 417-424;
- Waller, D., Morlino, S. & Matkins, N. (1999). "Factors affecting termite recruitment to bait in laboratory and field studies". In: Robinson, W., Rettich, F., & Rambo, G. (eds.). "*Proceedings of the Third International Conference on Urban Pests, 19-22 July 1999*". Czech University of Agriculture, Prague, Czech Republic. Pp. 597-600.

Capítulo 4

**Procura de alimento no solo, a diferentes distâncias, pelas
térmitas subterrâneas *Reticulitermes grassei* (Clément)**

4.1 Introdução

Apesar das térmitas subterrâneas serem dos insetos mais importantes, tanto a nível ecológico como económico, pouca ênfase tem sido colocada na recolha de dados sobre o seu comportamento durante a procura de alimento.

A localização do alimento é dos fatores mais importantes no estudo do comportamento forrageiro das térmitas. Como em todos os animais, a estratégia de busca de alimento relata a eficiência na alocação da energia para a sua aquisição (Su e Bardunias, 2005). O comportamento forrageiro das térmitas subterrâneas tem como primeira fase a procura de recursos alimentares, envolvendo para isso a exploração do substrato e a formação de túneis (Grace e Campora, 2005), sendo a geometria da rede destes feita da forma mais eficiente para a circulação das térmitas e procura de alimentos (Lee e Su, 2010). Cada obreira apenas remove individualmente uma parte do solo no extremo de cada túnel. No entanto, o trabalho conjunto das várias obreiras forma um padrão geométrico previsível que pode ser caracterizado por um modelo fractal (Puche e Su, 2001^a; Nobre *et al.*, 2007). A segunda fase de forrageamento apenas tem início quando o alimento é encontrado. Nesta fase o resto da colónia é informada e são recrutadas mais obreiras para a exploração do novo recurso alimentar. Este recrutamento é efetuado através da libertação de feromonas através de glândulas externas das obreiras (Costa-Leonardo *et al.*, 2009). A exploração e procura dos recursos é nas térmitas subterrâneas da espécie *Reticulitermes santonensis*, Feytaud feita exclusivamente pelas obreiras, aparecendo os soldados apenas quando o alimento é encontrado (Reinhard *et al.*, 1997).

Puche e Su (2001b) demonstraram que as térmitas subterrâneas procuram alimento de forma aleatória, não dirigindo os seus túneis para um alimento específico, neste caso madeira sã. Robson *et al.* (1995) foram dos primeiros a indicar que a geometria dos túneis não é feita de forma aleatória. Estes demonstraram que os ramos dos túneis que emanam de um ponto central foram distribuídos de forma a maximizar os ângulos entre eles. No entanto, não encontrou nenhuma preferência significativa na direção inicial dos sistemas de ramificação, ou seja, os túneis não eram aleatórios em relação uns aos outros dentro de uma rede individual mas a direção inicial do túnel foi aleatória. Vários estudos indicam que as térmitas subterrâneas podem utilizar a informação química presente no solo e moverem-se no sentido desta de forma a otimizar a procura de alimento (Waller *et al.*, 1999; Reinhard e Kaib, 2001). Ainda assim, esta informação pode não ser suficiente, devendo-se considerar outras variáveis bióticas e abióticas inerentes ao solo, como a temperatura e a humidade (Reinhard e Kaib, 2001). Thorne *et al.* (2004) sugere que a exploração do solo feita pelas

térmitas pode ser influenciada por vários fatores como o tipo de solo, a presença de predadores e de obstáculos (por exemplo pedras) ou até mesmo pela falta de alimentos

Campora e Grace (2001) e Puche e Su (2001b) indicaram que a presença de alimento no solo não tem impacto na distribuição dos túneis das térmitas subterrâneas *Coptotermes formosanus*, Shiraki. Porém existe um aumento do número de túneis com a melhoria das condições de humidade (Su e Poche, 2003). Tal como a humidade podem existir outros fatores que alteram a construção dos túneis como por exemplo atrativos libertados pela madeira degradada que, possivelmente, podem ajudar as térmitas a direcionar os túneis para o alimento (Su, 2005). Reinhard *et al.*, (1997) verificou que as térmitas subterrâneas detetam madeira mesmo a uma certa distância, provavelmente devido a substâncias voláteis libertadas por esta. Certas substâncias podem ser libertadas pela madeira por lixiviação. A lixiviação é considerada como a remoção descendente de materiais solúveis pela água para o solo (EPA, 2002).

O objetivo deste capítulo foi testar a possibilidade das térmitas subterrâneas *Reticulitermes grassei* (Clément) utilizarem substâncias lixiviadas pela madeira degradada por fungos de podridão, *Gloeophyllum trabeum* (Persoon: Fries) e *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr.) Murrill, e ainda por um produto da degradação da madeira, a sacarose, situadas a diferentes distâncias, como sinais para localizarem o alimento no solo, em ambiente de laboratório.

4.2 Matérias e métodos

Térmitas

As térmitas subterrâneas, *Reticulitermes grassei*, foram recolhidas de troncos caídos de uma área florestal mista na Herdade da Apostiça, Sesimbra, Portugal, com as coordenadas N 38°32.436' W 009°07.848' a 18 m de elevação. E foram mantidas numa sala condicionada (24 ± 1 ° C;> 80% HR), em caixas de Petri com papel de filtro humedecido, tendo sido utilizadas nos ensaios, em média, uma semana após a sua coleta.

Ensaio de procura de alimento

Para a realização destes ensaios foram necessárias 15 caixas quadradas com 180 mm de largura e 50 mm de altura. Colocou-se em cada caixa 250 g de areia de Fontainebleau humedecida (4:1 v/v), com um provete de madeira de pinho bravo (*Pinus pinaster*) com 25 x 10 x 10 mm de altura, no centro de cada caixa. Junto da madeira foram colocadas 250 obreiras da espécie *R. grassei*, com soldados e ninfas na mesma proporção que existia na colónia de onde foram retiradas as obreiras (baseado na norma NP - EN 117). Ao fim de uma semana e após as térmitas se terem instalado junto ao provete, foi montado o resto do ensaio.

Foram colocados quatro provetes, de madeira de pinho bravo (*P. pinaster*) com 25 x 10 x 10 mm de altura, a 40 mm de distância do provete central; foram ainda colocados quatro provetes a 80 mm de distância do provete central. Por cima destes provetes foi colocada uma rede de plástico com espaçamento de 10 mm, com a mesma área da caixa (180 x 180 mm). Em cima da rede, e do local onde se encontravam os provetes, foram colocados papéis de filtro Macherey-Nagel com um diâmetro de 42,5 mm, com as substâncias atrativas (Figura 4.1).

Em cada caixa foram colocados dois papéis de filtro com extrato de pinho (controlo) a 40 mm de distância e dois a 80 mm de distância do provete central. O mesmo foi feito com papéis de filtro com o atrativo a testar (Figura 4.2). Depois de colocados os papéis de filtro nos respectivos locais estes foram borrifados com água para que as substâncias existentes neles escorressem para o provete de madeira e areia envolvente. Todos os provetes e papéis de filtro utilizados foram previamente pesados.

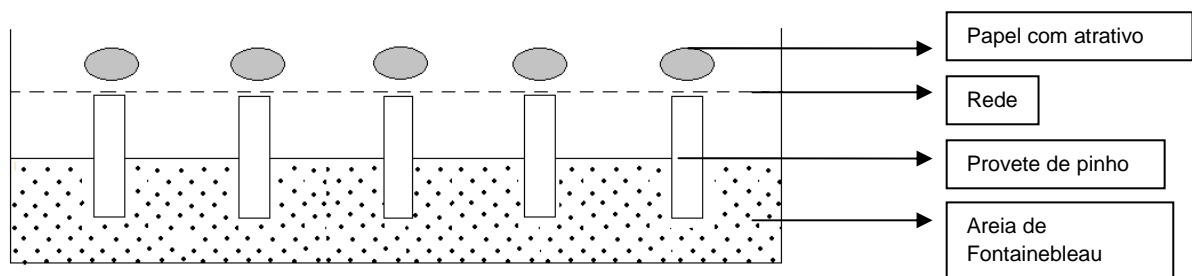


Figura 4. 1 - Esquema de ensaio de procura de alimento pelas térmitas.

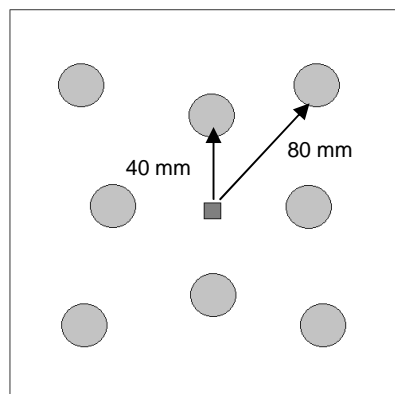


Figura 4. 2 - Esquema da parte superior do ensaio de procura de alimento pelas térmitas.

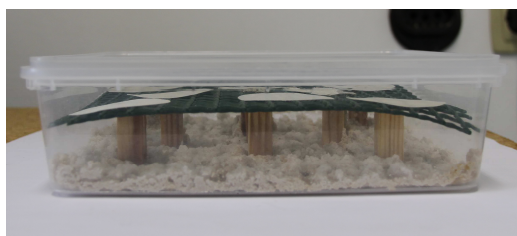


Figura 4. 3 - Ensaio de procura de alimento.

As substâncias atrativas testadas foram:

- Solução de sacarose ($C_{12}H_{22}O_5$) a 2%;
- Extrato de pinho degradado por *Gloeophyllum trabeum* (Persoon: Fries);
- Extrato de pinho degradado por *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr.) Murrill.

Foi adicionado 0,15 ml destas substâncias aos papéis e deixados a secar durante pelo menos 60 minutos. O mesmo foi feito com o extrato de pinho bravo (pinho) (*Pinus pinaster* Ait) não degradado (controlo). Os extratos utilizados foram os descritos no capítulo 2 deste trabalho, tendo-se utilizado o extrato *G. trabeum* 1 (proveniente de provetes com perda de massa de 9.31%) e o *P. sanguineus* 4 (proveniente de provetes com perda de massa de 25.60%) por terem sido estes os que causaram maior atração nas térmitas, dentro dos extratos utilizados de cada fungo.

Foram feitas cinco réplicas para cada substância atrativa e o ensaio teve a duração de 8 semanas, durante as quais os ensaios foram mantidos numa sala condicionada (24 ± 1 ° C, > 80% HR). Ao fim das 8 semanas foram contadas as térmitas vivas em cada caixa e

secaram-se os papéis de filtro e os provetes utilizados, a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas, de forma a poder calcular o seu teor em água (NP 614, 1973) e as suas perdas de massa.

Após a conclusão destes ensaios e para confirmar os resultados obtidos foi feito um ensaio semelhante aos anteriores mas com a diferença de que à distância de 40 mm do centro apenas se colocaram papéis com extrato de pinho e a 80 mm do centro apenas papéis com solução de sacarose. Foram feitas cinco réplicas deste ensaio, com a duração de 8 semanas.

Análise de dados

Para a análise estatística recorreu-se ao *software* IBM® SPSS® Statistics vs.21 (IBM Corporation, New York, USA). Usou-se em todos os testes um alfa de 0.05 para a rejeição da hipótese nula. Foi utilizada uma ANOVA de medidas repetidas para detetar diferenças no consumo de papel pelas térmitas quando este se encontrava a diferentes distâncias e com diferentes atrativos. O mesmo foi feito para os provetes. Para ser possível utilizar esta análise foi necessário retirar os *outliers* existentes, detetados pelos gráficos *Boxplot* do SPSS para cada variável. A normalidade das variáveis foi testada pelo teste de *Shapiro-Wilk*.

Para os ensaios onde apenas foram utilizados papéis de filtro com extrato de pinho a uma menor distância do centro e papéis com solução de sacarose a uma maior distancia, foi utilizado o teste estatístico *T* de *student* emparelhado para comparar a perda de massa dos papéis impregnado com extrato de pinho da perda de massa dos papéis impregnados com solução de sacarose. Para este caso também foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* para testar a normalidade da distribuição das variáveis, e a homogeneidade destas foi verificada pela análise de Levene. A mesma análise foi feita para comparar as perdas de massa dos provetes utilizados.

4.3 Resultados

Ensaio de escolha a diferentes distâncias

Através da análise das perdas de massa dos papéis de filtro impregnados com as diferentes substâncias e colocados a diferentes distâncias do local onde as térmitas se instalaram inicialmente (proвете central), denotaram-se diferenças ao nível da distância, quanto ao consumo dos papéis impregnados por parte das térmitas, pois os papéis mais

próximos (40 mm) foram mais consumidos do que os que se encontravam a uma maior distância (80 mm) do provete central (Figura 4.4).

Quanto às diferentes substâncias atrativas, verificaram-se perdas de massa mais elevadas nos papéis impregnados com a substância atrativa do que nos papéis impregnados com extrato de pinho (controlo) Esta diferença foi mais evidente no caso dos papéis impregnados com sacarose e com extrato de *P. sanguineus* quando estes se encontravam a 40 mm de distância do provete central (Figura 4.4).

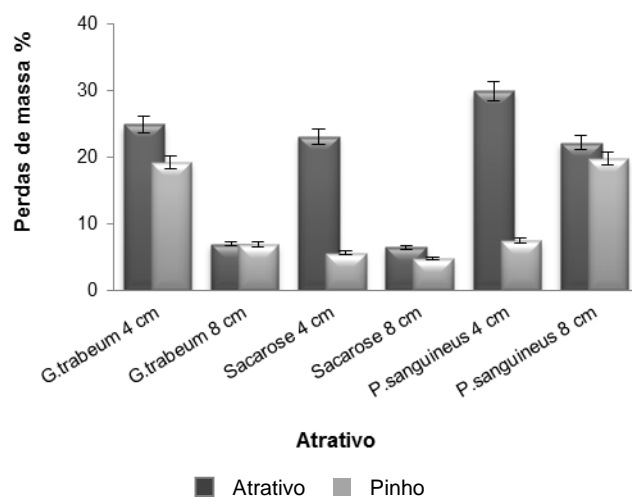


Figura 4. 4 - Perdas de massa (%) dos papéis de filtro utilizados em ensaios com diferentes atrativos e respetivos controlos (extrato de pinho) colocados a distâncias diferentes, 40 e 80 mm.

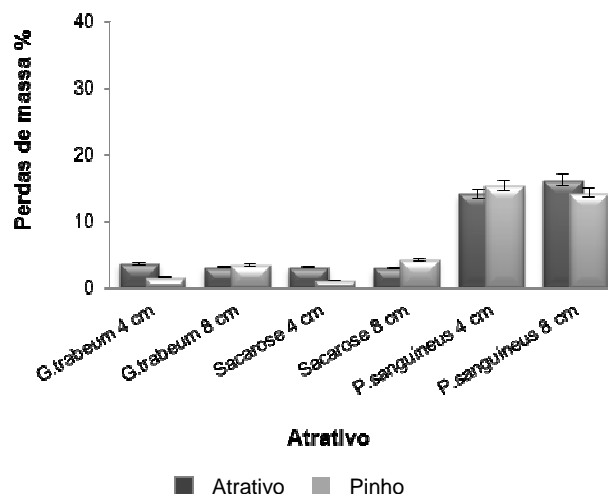


Figura 4. 5 - Perdas de massa (%) dos provetes de pinho associados aos papéis de filtro utilizados em ensaios com diferentes atrativos e respetivos controlos (extrato de pinho) colocados a distâncias diferentes, 40 e 80 mm.

Pela análise das perdas de massa dos provetes associados aos papéis de filtro com as diferentes substâncias atrativas, verificou-se que estas foram sempre muito semelhantes entre atrativos e controlos (pinho). As perdas de massa atingidas foram relativamente baixas (<4.5%), exceto no caso dos ensaios com *P. sanguineus* em que a perda de massa dos provetes foi superior a 14% em todos os casos destes ensaios. Nos ensaios com *P. sanguineus* os provetes associados aos papéis de filtro com extrato de pinho, localizados a 40 mm de distância dos provetes centrais, tiveram inclusivamente uma perda de massa (15%) superior à dos papéis de filtro a eles associados (7.44%) (Figura 4.5).

G. trabeum

No caso dos ensaios com o extrato da madeira degradada por *G. trabeum* não ocorreram diferenças significativas entre as perdas de massa dos papéis impregnados com esta substância e com controlo (pinho). No entanto, detetaram-se diferenças significativas nas perdas de massa dos papéis que se encontravam a 40 mm de distância das térmitas (22%) dos que estavam a 80 mm (7%). Também não houve interação significativa entre os dois fatores analisados (distancia ao provete central e tipo de alimento) (Tabela 4.1).

Tabela 4. 1 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa de papéis de filtro com extrato de *G. trabeum* e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.

Variável	g.l.	MS	F	p
Alimento	1	2.691	0.006	n.s.
Erro	7	426.353		
Distância	1	1743.156	18.848	0.003*
Erro	7	92.485		
Distância x Alimento	1	1.001	0.002	n.s.
Erro	7	410.406		

Nota: Valores de p marcados com * representam diferenças significativas (ANOVA)

Quando comparamos as perdas de massa dos provetes, associados aos papéis de filtro com extrato de *G. trabeum* e controlo, verificamos que não ocorreram diferenças significativas entre provetes com papéis com substâncias diferentes nem entre provetes colocados a distâncias diferentes (Tabela 4.2).

Tabela 4. 2 - Resultados da ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa dos provetes associados aos papéis de filtro com extrato de *G. trabeum* e de extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.

Variável	g.l.	MS	F	p
Alimento	1	0.359	0.093	n.s
Erro	4	3.862		
Distância	1	2.178	0.896	n.s
Erro	4	2.430		
Distância x Alimento	1	1.040	1.338	n.s
Erro	4	0.777		

Sacarose

No caso dos ensaios com solução de sacarose verificaram-se diferenças significativas entre as perdas de massa dos papéis impregnados com solução de sacarose (valor médio de 15%) e as dos papéis controlo (extrato de pinho) (valor médio de 5%) ($F=7.813$; g.l.=1; $p=0.031$). No entanto, as perdas de massa dos papéis que se encontravam a distâncias diferentes não apresentaram diferenças significativas. A interação entre o fator tipo de alimento e distância a que se encontravam das térmitas, também não foi significativa (Tabela 4.3).

Tabela 4. 3 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa de papéis de filtro com sacarose a 2% e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.

Variável	g.l.	MS	F	p
Alimento	1	1118.008	7.813	0.031*
Erro	6	143.089		
Distância	1	504.476	3.930	n.s
Erro	6	128.371		
Distância x Alimento	1	733.696	5.312	n.s
Erro	6	138.125		

Nota: Valores de *p* marcados com * representam diferenças significativas (ANOVA)

Pela análise das perdas de massa dos provetes, associados aos papéis com solução de sacarose e respetivos controlos, verificou-se que não ocorreram diferenças significativas quando estes estavam associados a papéis com as diferentes substâncias. No entanto,

verificaram-se diferenças significativas quando os provetes se encontravam a distâncias diferentes ($F=0.031$; g.l.=1; $p=0.031$), tendo os provetes que distavam 40 mm do provete central apresentado uma média de perda de massa de 2 % e os que se encontravam a 80 mm de 4%. Não se verificaram diferenças significativas na interação entre a distância e o tipo de alimento (Figura 4.5 e Tabela 4.4).

Tabela 4. 4 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa dos provetes associados aos papéis de filtro com sacarose a 2% e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.

Variável	g.l.	MS	F	p
Alimento	1	0.015	0.005	n.s
Erro	7	3.053		
Distância	1	2.959	7.278	0.031*
Erro	7	0.407		
Distância x Alimento	1	12.513	1.710	n.s
Erro	7	7.317		

Nota: Valores de p marcados com * representam diferenças significativas (ANOVA)

P. sanguineus

Nos ensaios com o extrato de madeira degradada pelo fungo *P. sanguineus* as perdas de massa dos papéis impregnados com este extrato (26%) foram significativamente diferentes ($F=11.202$; g.l.=1; $p=0.044$) das perdas dos papéis com extrato de pinho (14%). No entanto, não ocorreram diferenças significativas nas perdas de massa dos papéis colocados a distâncias diferentes do local onde as térmitas se encontravam instaladas. Não se verificou interação significativa entre a distância e o tipo de alimento, tendo sido a diferença das perdas de massa entre os dois alimentos independente da distância a que estes se encontravam (Tabela 4.5).

Quando comparadas as perdas de massa dos provetes associados aos papéis de filtro com extrato de *P. sanguineus* e respetivos controlos, verificou-se que não ocorreram diferenças significativas quando estes estavam associados a papéis com extratos diferentes, e nem quando se encontravam a distâncias diferentes. Também não ocorreu interação significativa entre o tipo de alimento e a distância a que este se encontrava (Tabela 4.6).

Tabela 4. 5 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa de papéis de filtro com extrato de *P. sanguineus* e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.

Variável	g.l.	MS	F	p
Alimento	1	3303.950	11.202	0.044*
Erro	3	294.933		
Distância	1	291.385	2.194	n.s.
Erro	3	132.837		
Distância x Alimento	1	376.748	3.144	n.s.
Erro	3	119.848		

Nota: Valores de p marcados com * representam diferenças significativas (ANOVA)

Tabela 4. 6 - Resultados de uma ANOVA de medidas repetidas comparando as perdas de massa dos provetes associados aos papéis de filtro com extrato de *P. sanguineus* e com extrato de pinho colocados a distâncias de 40 ou 80 mm das térmitas.

Variável	g.l.	MS	F	p
Alimento	1	0.189	0.025	n.s.
Erro	8	7.448		
Distância	1	0.058	0.007	n.s.
Erro	8	8.589		
Distância x Alimento	1	20.445	5.105	n.s.
Erro	8	4.005		

Ensaio de escolha entre sacarose e extrato de pinho

Nos ensaios em que apenas se colocaram papéis de filtro com extrato de pinho (controlo) a 40 mm de distância do centro e papéis com solução de sacarose a 80 mm, as perdas de massa dos papéis com sacarose (30%) foram muito superiores às dos papéis com extrato de pinho (9%). A diferença entre os dois valores foi muito significativa (teste estatístico *T* de *student*, $t = -5.806$, g.l. = 19, $p < 0.001$) (Figura 4.6). Pela comparação das perdas de massa dos provetes associados a estes papéis de filtro verificou-se que os provetes associados aos papéis com extrato de pinho tiveram maior perda de massa. No entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 4.6).

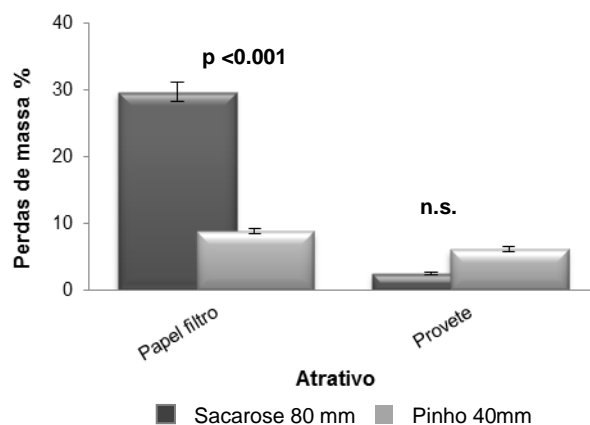


Figura 4. 6 - Perdas de massa (%) dos papéis de filtro, e dos respectivos provetes, utilizados em ensaios com a substância atrativa, sacarose a 80 mm de distância e o respetivo controlo (extrato de pinho) a 40 mm. p calculado pela comparação, entre as perdas de massa dos papéis de filtro impregnados com sacarose e com extrato de pinho, e das perdas de massa dos provetes associados a estes papéis de filtro, através do teste estatístico *T* de *student*.

4.4 Discussão

Nestes ensaios foi possível verificar que certas substâncias podem influenciar a procura e seleção de alimento feita pelas térmitas subterrâneas *R. grassei*. O tipo de alimento pareceu influenciar mais as térmitas que a distância a que este se encontra, exceto no caso dos ensaios onde foi utilizado o extrato do fungo *G. trabeum* onde as térmitas se alimentaram mais do alimento que se encontrava a menor distância, independentemente da substância que continha. Quer nos ensaios com solução de sacarose, quer nos ensaios com extrato do fungo *P. sanguineus* as térmitas consumiram em maior quantidade os papéis que se encontravam mais próximos e impregnados com a substância atrativa, possivelmente devido aos sinais libertados por lixiviação dos papéis impregnados serem mais fortes quando se encontram mais perto da sua origem, ou seja, serem mais concentrados. Quando o alimento se encontrava a maiores distâncias as térmitas seguiram os sinais existentes na areia até ao alimento pelo qual demonstraram preferência, provando assim que não procuraram alimento de forma aleatória quando na presença de substâncias atrativas. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Traniello e Leuthold (2000) e por Robson *et al.* (1995), que indicaram que as térmitas subterrâneas procuram alimento de forma seletiva. Em todos os ensaios as térmitas consumiram uma maior quantidade de papéis de filtro do que dos provetes a eles associados, tendo possivelmente utilizado os provetes apenas como uma ponte para chegar aos papéis com as substâncias atrativas.

Puche e Su (2001b) demonstraram que as térmitas *Reticulitermes flavipes* foram incapazes de localizar madeira no solo a uma distância de 25 mm e que estas encontraram o alimento por acaso, nesse trabalho a madeira utilizada foi madeira sã em contacto com a areia. No entanto, num estudo semelhante efetuado por Su (2005), no qual foi colocada madeira degradada no lugar de madeira sã, as térmitas foram atraídas pela madeira degradada, concluindo que a madeira degradada tinha libertado alguma substância atrativa solúvel em água (Su, 2005). Os resultados do nosso estudo são consistentes com os de Su (2005), verificando-se que os extratos de madeira de pinho degradada pelo fungo *P. sanguineus* foram consumidos em maior quantidade, logo foram mais atrativos, do que os extratos de madeira de pinho não degradada. Este fato demonstrou que existem diferenças químicas importantes entre a madeira sã e a madeira degradada por fungos de podridão que podem tornar a madeira mais atrativa para as térmitas subterrâneas.

Nos ensaios em que os papéis impregnados com solução de sacarose se encontravam a uma maior distância do local onde as térmitas inicialmente se instalaram (proвете central) verificou-se que as térmitas consumiram em maior quantidade o papel impregnado com sacarose, mesmo quando localizado a uma maior distância do que os controlos, este fato poderá indicar que, possivelmente, as térmitas seguiram sinais existentes na areia, neste caso a solução de sacarose lixiviada do papel para o proвете e para a areia, para encontrar o alimento pretendido. Os resultados sugerem assim que a sacarose é um atrativo, podendo fazer parte do conjunto de substâncias químicas capazes de indicar às térmitas onde se encontra o alimento. Waller *et al.* (1999) também verificou que as térmitas são capazes de detetar substâncias químicas no solo, tais como a sacarose e a ureia a 1%, e moverem-se na direção delas.

No meio natural o alimento pode ser um fator determinante para muitas espécies, podendo, neste caso, a madeira degradada ser um fator condicionante para as térmitas. A utilização de os mesmos recursos por colónias diferentes tem sido observada em *Reticulitermes spp.* conforme a humidade e a temperatura do solo (Houseman *et al.*, 2001; Nobre *et al.*, 2008). Existem também outros insetos que se alimentam de madeira (Hamula, 1996), com os quais as térmitas têm que competir por alimento. Outro fator condicionante ao acesso ao alimento por parte das térmitas é a colonização dos recursos por potenciais predadores de térmitas, como as formigas (Buczowski e Bennet, 2007). Existem então vários fatores bióticos e abióticos (temperatura e humidade) que as térmitas têm que enfrentar durante a procura de alimento, sendo essencial que esta seja feita de forma rápida e eficaz de maneira a otimizar a colonização da madeira morta. Deste modo a utilização de sinais, como os produtos libertados pela madeira degradada por lixiviação, podem ajudar as térmitas a detetar o alimento no solo de uma forma mais eficiente e rápida.

No campo muitos outros fatores podem interferir nas escolhas alimentares das térmitas subterrâneas, tais como a presença de predadores, a humidade existente no solo, a existência de inúmeras substâncias químicas e a presença de muitas alternativas alimentares (Waller *et al.*, 1999), sendo aconselhável efetuar estes ensaios em meio natural para confirmar os resultados obtidos.

4.5 Bibliografia

- Buczowski, G., & Bennett, G. (2007). "Protein marking reveals predation on termites by the woodland ant, *Aphaenogaster rudis*". *Insectes Sociaux*. 54: 219 – 224;
- Campora, C. & Grace, J. (2001). "Tunnel orientation and search pattern sequence of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae)". *Journal of Economic Entomology*. 94 (5): 1193 -1199;
- Costa-Leonardo, A., Casarin, F., & Lima, J. (2009). "Chemical Communication in Isoptera". *Neotropical Entomology*. 38(1):001-006;
- EPA (United States Environmental Protection Agency) (2002). " Permeation and Leaching". Office of Ground Water and Drinking Water Standards and Risk Management Division. http://www.epa.gov/safewater/disinfection/tcr/regulation_revisions.html;
- Grace, J. & Campora, C. (2005). "Food location and discrimination by subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae)". *In*: Lee, C.-Y. & Robinson W (eds.), "*Proceedings of the Fifth International Conference on Urban Pests*", Executive Committee of the International Conference on Urban Pests, Singapura. Pp. 437-441;
- Hamula, J. (1996). "Relationship of wood – Feeding insects and coarse wood debries". *In*: McMinn, J., Athns, G., & Crossley, D. (eds). "*Coarse woody debris in southern forests: effects on biodiversity*". University of Georgia. Pp. 53 – 65;
- Houseman, R., Gold, R. & Pawson, B. (2001). "Resource partitioning in two sympatric species of subterranean termites, *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes hageni* (Isoptera: Rhinotermitidae)". *Environmental Entomology*. 30 (4): 673 – 685;
- Lee, S-H. & Su, N-Y. (2010). " Simulation study on the tunnel networks of subterranean termites and the foraging behavior". *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 13: 83 – 90;
- NP 614 (1973). "Madeiras – Determinação do teor em água", Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica, Portugal;
- NP – EN 117 (1992). "Produtos preservadores de madeira", Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica, Portugal;
- Nobre, T., Nunes, L. & Bignell, D. (2007). "Tunnel geometry of the subterranean termite *Reticulitermes grassei* (Isoptera: Rhinotermitidae) in response to sand bulk density and the presence of food". *Insect Science*. 14: 511-518;

- Nobre, T., Nunes, L. & Bignell, D. (2008). "Colony interactions in *Reticulitermes grassei* population assessed by molecular genetic methods". *Insectes Sociaux*. 55: 66 – 73;
- Puche, H. & Su, N.-Y. (2001a). "Application of fractal analysis for tunnel systems of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) under laboratory conditions". *Environment Entomology*. 30 (3): 545-549;
- Puche, H., & N.-Y. Su. (2001b). "Tunnel formation by *Reticulitermes flavipes* and *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) in response to wood in sand". *Journal of Economic Entomology* 94 (6): 1398 – 1404;
- Reinhard, J., Hertel, H. & Kaib, M. (1997). "Systematic search for food in the subterranean termite *Reticulitermes santonensis* De Feytaud (Isoptera, Rhinotermitidae)". *Insectes Sociaux*. 44: 147-158;
- Reinhard, J. & Kaib, M. (2001). "Trail communication during foraging and recruitment in the subterranean termite *Reticulitermes santonensis* De Feytaud (Isoptera: Rhinotermitidae)". *Journal of Insect Behavior*. 14 (2): 157–171;
- Robson, S., Lesniak, M., Kothandapani, R., Traniello, J. & Thorne, B. (1995). "Nonrandom search geometry in subterranean termites". *Naturwissenschaften*. 82: 526-528;
- Su, N.-Y. (2005). "Directional change in tunneling of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in response to decayed wood attractants". *Journal of Economic Entomology*. 98 (2): 471-475;
- Su, N. Y. & Bardunias, P. (2005). "Foraging behavior of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae): food discovery and movement of termites within established galleries". *In: Lee, C.-Y. & Robinson, W. (eds). "Proceedings of the Fifth International Conference on Urban Pests"*. Malaysia. Pp. 443 – 445;
- Su, N.-Y. & Puche, H. (2003). "Tunneling activity of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in sand with moisture gradients". *Journal of Economic Entomology*. 96 (1): 88 -93;
- Thorne, B., Traniello, J., Lenz, M. & Kard, B. (2004). "Search and destroy: Termite foraging behavior and what it means about effective termite IPM". *Pest Control Technology*. Pp. 44-48.
- Traniello, J., & Leuthold, R. (2000). "Behavior and ecology of foraging in termites" *In: Abe T., Bignell D., Higashi M. (eds). "Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology"*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands. Pp. 141 – 168;
- Waller, D., Morlino, S. & Matkins, N. (1999). "Factors affecting termite recruitment to bait in laboratory and field studies". *In: Robinson, W., Rettich, F., & Rambo, G. (eds.), "Proceedings of the Third International Conference on Urban Pests"*, 19-22 July 1999. Czech University of Agriculture, Prague, Czech Republic. Pp. 597-600.

Capítulo 5

Conclusões

Um dos objetivos iniciais deste estudo foi apurar as preferências alimentares da espécie de térmita subterrânea *Reticulitermes grassei* (Clément), tendo-se verificado que as térmitas são seletivas na escolha de alimento, demonstrando maior preferência por algumas das substâncias testadas e menos por outras.

Ao testar a preferência alimentar das térmitas por extratos de madeira degradada por diferentes espécies de fungos de podridão (podridão branca (*P. sanguineus*) e podridão castanha (*G. trabeum* e *P. placenta*)), verificou-se que as térmitas demonstraram preferência por estes em oposição à madeira sã. No entanto esta preferência foi diferente de acordo com o nível de degradação em que a madeira se encontrava. Os diferentes níveis de atração que o mesmo fungo pode causar nas térmitas poderão dever-se à variação das substâncias libertadas pela madeira consoante o seu grau de degradação. Ao testar diferentes substâncias que podem ser libertadas pela madeira degradada, concluiu-se que as térmitas foram atraídas por todas elas com exceção para o potássio. Neste caso a concentração utilizada poderá não ter sido a mais adequada. Estes resultados demonstraram que as térmitas subterrâneas da espécie *R. grassei* possivelmente utilizam as substâncias libertadas durante a degradação da madeira para selecionar o alimento que lhes é mais apetecível.

O último objetivo desta investigação foi testar a possibilidade das térmitas subterrâneas utilizarem as substâncias lixiviadas pela madeira para encontrarem o alimento no solo, tendo-se para isso utilizado três das substâncias mais atrativas utilizadas nos ensaios anteriores, extratos de madeira degradada por *G. trabeum* e por *P. sanguineus*, e solução de sacarose. Nestes ensaios, verificou-se que as térmitas poderão ser seletivas na procura de alimento. Nos ensaios com o fungo *P. sanguineus* e com solução de sacarose, as térmitas demonstraram que podem seguir as substâncias libertadas dos papéis de filtro para a areia para encontrarem o alimento mesmo nas situações em que este se encontrava mais distante.

Como a preferência das térmitas varia de acordo com o nível de degradação a que a madeira se encontra, torna-se mais eficiente a colocação de madeira impregnada com açúcares como a sacarose para atrair as térmitas para as armadilhas do que a utilização de madeira degradada. Como as térmitas possivelmente alteram o seu comportamento na procura de alimento quando encontram sinais existentes no solo (por ex. as substâncias lixiviadas da madeira degradada) a utilização de atrativos nas armadilhas torna-se mais eficiente do que a utilização de madeira sã, mesmo quando existem outras fontes de alimento, desde que a substância utilizada seja mais atrativa. Sendo possível localizar as térmitas no solo, deixará de ser necessária a utilização de termicidas em grande escala,

podendo estes ser aplicados apenas nos locais onde são necessários e nas quantidades estritamente necessárias, diminuindo desta forma a quantidade libertada para o meio ambiente. No entanto, a utilização da sacarose nas armadilhas para térmitas pode gerar problemas que não foram testados neste estudo. As formigas podem afastar as térmitas e também podem ser atraídas pela sacarose, a qual pode igualmente ser utilizada em armadilhas para controlo de formigas (Lee, 2008).

Com estes ensaios foi possível investigar e desvendar alguns dos elementos da ecologia alimentar das térmitas subterrâneas (*Reticulitermes grassei*) e desta forma, contribuir de uma forma mais sustentável para a prevenção e controlo desta espécie nos locais onde é considerada como praga. No entanto torna-se necessário a realização de mais repetições destes ensaios em laboratório assim como testar outras substâncias potencialmente atrativas para as térmitas. Também se torna necessário fazer a análise química dos elementos presentes nos extratos de madeira degradada pelos fungos de podridão mais atrativos, como por exemplo o fungo *P. sanguineus*, nos diferentes estádios de decomposição, e dentro destes testar quais os que possivelmente atraem mais as térmitas. No caso dos ensaios de procura de alimento, estes devem ser otimizados e realizadas mais réplicas de forma a ser possível obter dados mais robustos e utilizar uma análise estatística também mais fiável, sugerindo-se que sejam feitos em caixas maiores e sejam feitos ensaios controlo, apenas com extrato de pinho quer a menor quer a maior distância. A realização destes ensaios em meio natural torna-se também fundamental pois podem haver outros fatores, diferentes dos testados nesta investigação, com capacidade para influenciar a forma como as térmitas escolhem e procuram o alimento no solo.

Bibliografia

Lee, C-Y. (2008). "Sucrose bait base preference of selected urban pest ants (Hymenoptera: Formicidae)". In: Robinson, W. & Bajomi, D. (eds). "*Proceedings of the sixth International Conference of Urban Pests*". Hungary. Pp. 59 – 63.