

**DANIELA FARIA FLORENCIO**

**COEXISTÊNCIA DE ESPÉCIES DE CUPINS EM  
CUPINZEIROS VIA DIFERENCIAÇÃO NO USO DOS  
RECURSOS ALIMENTARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F632c  
2010

Florencio, Daniela Faria, 1978-

Coexistência de espécies de cupins em cupunzeiros via  
diferenciação no uso dos recursos alimentares / Daniela  
Faria Florencio. – Viçosa, MG, 2010.  
xv, 133f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Og Francisco Fonseca de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 73-82.

1. Térmita - Ecologia. 2. Térmita - Populações.
  3. Térmita - Comportamento. 4. Isótopos estáveis.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.736

**DANIELA FARIA FLORENCIO**

**COEXISTÊNCIA DE ESPÉCIES DE CUPINS EM  
CUPINZEIROS VIA DIFERENCIAÇÃO NO USO DOS  
RECURSOS ALIMENTARES**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do Pro-  
grama de Pós-Graduação em Entomologia,  
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA: 21 de setembro de 2010.

---

Prof. Simon Luke Elliot  
(Coorientador)

---

Prof. Ricardo Ildefonso de  
Campos

---

Prof. Júlio Neil Cassa Louzada

---

Prof. Carlos Frankl Sperber

---

Prof. Og Francisco Fonseca de Souza  
(Orientador)

Aos meus pais,  
pela dedicação e apoio durante toda a minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade oferecida. A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Entomologia. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao professor Og Francisco de Souza, por me orientar, com suas críticas e sugestões, que contribuíram para o meu crescimento profissional.

A dona Paula e a Miriam pela eficiência e dedicação.

Aos membros das bancas de qualificação e desta tese Ana, Carlos, Júlio, Ricardo, Simon e Zhé pela disponibilidade e sugestões.

Ao João Milagres, do Laboratório de Isótopos Estáveis, por tirar algumas dúvidas e me ajudar no processamento dos cupins.

Ao Mauro Ferreira, da Silvicultura, pela liofilização das amostras.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Termitologia: Alessandra, Ana, Andrea, Cassiano, Fernanda, Luis, Marcela, Paulo, Rodrigo e Teresa pela amizade e apoio constante. Em especial, aos “termitóides” pelo trabalho em equipe, não somente no campo, mas em todas as etapas deste trabalho!!

A Ana por me incentivar sempre. Por se tornar uma grande amiga e importante co-orientadora.

Aos amigos da Entomologia e de Viçosa que tornaram este período agradável: Bob, Carla, Clau, Daniel, Fefo, Livia, Leandro, Lú, Marcelo, Moreno, Roberta, Sabina, Sabrina, Silma, Sílvia, Tatis, Thaís, Vivian, entre outros.

À república “Oreia Seca” (Clara, Marli, Débora, Ale, Jú, Nati, Elis, Zé Carlos, Adriana, Carol, Carla, Fê, Eloá) por ser um lar para mim!

Ao Fefo por me dar apoio inicial a minha chegada à Viçosa.

Aos professores da graduação e da pós que contribuíram para a minha formação. Em especial, aos professores Evôneo, Luciane e Elena!!

Aos meus pais, por sempre valorizar a educação. Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhado, tias e primos por entender a minha ausência e por me apoiar sempre.

Ao meu namorado Giordano pelo incentivo e por me acompanhar durante todo esse período. E a sua família por continuar me apoiando.

Aos amigos distantes, mas nunca ausentes. Aos novos amigos que me receberam e que me incentivaram durante estes quatro anos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS . . . . .	vii
LISTA DE TABELAS . . . . .	x
RESUMO . . . . .	xii
ABSTRACT . . . . .	xiv
<b>1 Introdução Geral</b>	<b>1</b>
<b>2 Assembly rules explain coexistence between builder and invader termite species in termitaria</b>	<b>7</b>
2.1 Abstract . . . . .	8
2.2 Introduction . . . . .	9
2.3 Material & Methods . . . . .	13
2.3.1 Study site . . . . .	14
2.3.2 Sampling . . . . .	14
2.3.3 Stable isotopic analyses of the termites . . . . .	16
2.3.4 Data analyses . . . . .	17
2.4 Results . . . . .	19
2.4.1 Termite species in termitaria . . . . .	19
2.4.2 Stable isotopic values of the termites . . . . .	20
2.4.3 Coexistence among termite species in the termitarium	20
2.5 Discussion . . . . .	33
<b>3 Importância do consumo do carbono e do nitrogênio para as espécies de cupins coexistentes em cupinzeiro</b>	<b>37</b>
3.1 Resumo . . . . .	38
3.2 Introdução . . . . .	40
3.3 Material & Métodos . . . . .	43
3.3.1 Raciocínio Experimental . . . . .	43
3.3.2 Área de estudo . . . . .	44
3.3.3 Coleta de dados . . . . .	45
3.3.4 Análise isotópica dos cupins . . . . .	46
3.3.5 Determinação da amplitude e da sobreposição alimentar	46
3.3.6 Análise estatística . . . . .	47
3.4 Resultados . . . . .	49

	vi
3.5 Discussão . . . . .	57
<b>4 How to preserve termite samples in the field for carbon and nitrogen stable isotopes studies?</b>	<b>61</b>
4.1 Letters to the Editor . . . . .	62
<b>5 Conclusões</b>	<b>72</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	73
ANEXOS . . . . .	83

## LISTA DE FIGURAS

	Página	
1.1	Mecanismos que podem determinar a coexistência ou a exclusão de inquilinos em cupinzeiros. . . . .	3
2.1	Alternative hypotheses for resource partitioning between builder and invader termite species coexisting inside termitaria. (a) Complete overlap (null hypothesis) and (b) Complete differentiation. Each graph represents a termitarium with one builder and two invader termite species in coexistence. The circles delimitate the resource axes utilisation of each species. Coinciding circles denote resource use overlap. (a) Termitarium builder and invader termite species coexist using the same feeding resources. (b) Termitarium builder and invader termite species coexist consuming distinct resources. Figure adapted from Peterson & Holt (2003). . . . .	12
2.2	Two-dimensional representation of resource used, plotting by axis $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ and $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ of termite species coexistent in termitaria of the builder <i>Constrictotermes cyphergaster</i> . Each graph represents a termitarium with their builder and invader termite species. Each point corresponds to the absolute isotopic value of a group with about 10 workers. Also the border delimitate workers replicate that species. The red border demarcate resource use by workers of builder species. Each symbol represents resource used by individuals of one species. Abbreviations: Im, <i>Inquilinitermes microcerus</i> ; Hl, <i>Heterotermes longiceps</i> and Cc, <i>C. cyphergaster</i> . . . . .	28

- 2.4 Resource utilisation breadth of  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) and  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) by *Constrictotermes cyphergaster* and *Velocitermes heteropterus* colonies with different number of invaders in the termitarium. Each point on the graph represents the food resources used by each builder colony in a termitarium. (a)  $\delta^{13}\text{C}$  utilisation. Number of invader species ( $F_{1,16}=0.0163$ ;  $P=0.9001$ ) and builder species identity ( $F_{1,16}=0.0528$ ;  $P=0.8211$ ) do not explain resource utilisation in  $\delta^{13}\text{C}$ . (b)  $\delta^{15}\text{N}$  utilisation. Number of invader species ( $F_{1,16}=0.4679$ ;  $P=0.5044$ ) and builder species identity ( $F_{1,16}=0.0718$ ;  $P=0.7922$ ) do not explain resource utilisation in  $\delta^{15}\text{N}$ . . . . . 31
- 2.5 (a) Represents a distinct colonies of builder species *Constrictotermes cyphergaster*; (b) represent distinct colonies of *Inquilinitermes microcerus* found in termitarium built by *C. cyphergaster*; (c) represent distinct colonies of builder species *Velocitermes heteropterus*; (d) represent invader species found in termitarium built by *V. heteropterus*. The dashed delimitate the potential position of each species in the bidimensional resource axis ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ). The potential position is a sum of all the positions occupied by a termite species among termitaria. Red lines demarcate builder species. Invader species are represent by remaining colours. The abbreviations designate: Cc, *C. cyphergaster*; Im, *Inquilinitermes microcerus*; Vh, *V. heteropterus*; Lb, *Labiotermes brevilabius*; N, *Neocapritermes* sp.; Ae, *Armitermes euamignathus* and A1, *Anoplotermes* sp.. . . . . 32
- 3.1 Representação das amplitudes e da sobreposição alimentar das espécies de cupins construtora e inquilina coexistentes em um cupinzeiro. A amplitude alimentar dos cupins de cada espécie corresponde ao intervalo entre o valor mínimo e máximo de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) ou de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰). A sobreposição corresponde à proporção da amplitude de cada espécie que coincide com a de outra espécie. A sobreposição alimentar total de cada espécie é a proporção total que sofre sobreposição com as amplitudes de outras espécies. . . . . 47

- 3.2 Proporção de sobreposição alimentar no uso do  $\delta^{13}\text{C}$  e do  $\delta^{15}\text{N}$  sofrida pelos construtores e inquilinos coabitantes de cupinzeiros. A sobreposição sofrida pelos construtores foi semelhante no uso do  $\delta^{13}\text{C}$  e do  $\delta^{15}\text{N}$  ( $F_{1,10}=1,01$ ,  $P=0,338$ ) Os inquilinos sofreram maior sobreposição do  $\delta^{13}\text{C}$  do que do  $\delta^{15}\text{N}$  ( $F_{1,10}=8,66$ ,  $P=0,015$ ). . . . . 56
- 3.3 Relação entre capacidade competitiva e uso do  $\delta^{15}\text{N}$  pelos construtores e inquilinos coabitantes de cupinzeiros. **B**: construtor e **I**: inquilino. . . . . 59

## LISTA DE TABELAS

	Página
2.1	Termite (morpho) species and respective family and subfamily of cohabitants of termitaria in Sete Lagoas city, Minas Gerais, Brazil. 22
2.2	Termite (morpho) species and respective feeding group of cohabitant in termitarium, in Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil. Feeding groups follow Mathews (1977), Gontijo & Domingos (1991), Constantino (1992), DeSouza & Brown (1994), Donovan et al. (2001), Carrijo et al. (2009) and is presented in columns headed by respective authority, to facilitate comparison of opinions. In the absence of definition at species level, definition follows the most referred group for the respective genus. . . . . 25
3.1	Espécies (morfo-espécies), respectivas famílias e subfamílias de cupins coexistentes em cupinzeiros, município de Sete Lagoas, MG, Brasil. . . . . 51
3.2	Amplitude alimentar no uso do $\delta^{13}\text{C}$ e do $\delta^{15}\text{N}$ pelos cupins construtores e inquilinos coabitantes de cupinzeiros. Cupinzeiros de 1 a 4 foram construídos por <i>Constrictotermes cyphergaster</i> e de 5 a 11 foram construídos por <i>Velocitermes heteropterus</i> . Abreviações: A1, <i>Anoplotermes</i> sp.1; A2, <i>Anoplotermes</i> sp.2; A3, <i>Anoplotermes</i> sp.3; Ae, <i>Armitermes euamignathus</i> ; Cc, <i>C. cyphergaster</i> ; G1, <i>Grigiotermes</i> sp.1; G2, <i>Grigiotermes</i> sp.2; Hl, <i>Heterotermes longiceps</i> ; Im, <i>Inquilinitermes microcerus</i> ; Lb, <i>Labiotermes brevilabius</i> ; Ne, <i>Neocapritermes</i> sp.; Pa, <i>Procornitermes araujoi</i> ; St, <i>Spinitermes trispinosus</i> ; e Vh, <i>V. heteropterus</i> . . 52

3.3	Valores mínimos, máximos e média da amplitude alimentar e da proporção de sobreposição no uso do $\delta^{13}\text{C}$ e do $\delta^{15}\text{N}$ sofrida pelos cupins construtores e inquilinos coabitantes de cupinzeiros, município de Sete Lagoas, MG, Brasil, para as espécies construtoras ( <i>Constrictotermes cyphergaster</i> ou <i>Velocitermes heteropterus</i> ) e suas inquilinas. . . . .	55
4.1	Mean $\pm$ standard deviation (SD) for $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{15}\text{N}$ isotopic signals of termite samples subjected to differing processing techniques. . .	67
4.2	Carbon and nitrogen content (mean $\pm$ standard deviation) of termite samples subjected to differing processing techniques. . .	67
4.3	Models and contrasts used to inspect the effects of processing techniques (x variable) on the $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{15}\text{N}$ isotopic signals and C/N ratio of termite samples (y variables). Treatment levels are: Fresh= freshly processed, NaCl= preserved in NaCl solution and Ethanol= preserved in 80% ethanol. Contrasts were performed between the full model (m1) and a model in which the concerned treatment levels were amalgamated into a single level. Amalgamation is indicated by the symbol $\&$ . The termite mounds were included as a blocking factor. Models with Normal error distribution. NS= $p>0.05$ and *= $p<0.05$ . . . . .	68

## RESUMO

FLORENCIO, Daniela Faria, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010. **Coexistência de espécies de cupins em cupinzeiros via diferenciação no uso dos recursos alimentares.** Orientador: Og Francisco Fonseca de Souza. Co-orientadores: Ana Paula Albano Araújo e Simon Luke Elliot.

O inquilinismo, coexistência de diferentes espécies de cupins em cupinzeiros, é um fenômeno muito comum na natureza. Apesar da sua importância, existem poucos estudos que visam entender os mecanismos que possibilitam a coexistência das inúmeras espécies de cupins no interior dos cupinzeiros. Neste caso, existe uma espécie que funda e constrói o cupinzeiro (construtora) e as espécies que invadem e se estabelecem (inquilinas). Com o intuito de preencher parte desta lacuna, analisamos a coexistência de espécies de cupins em cupinzeiros, à luz das teorias de coexistência mediada pela diferenciação no uso dos recursos alimentares. Para tanto, foram testadas as seguintes hipóteses: *i*) cupins construtores e inquilinos coexistentes em cupinzeiros diferem no uso dos recursos alimentares; *ii*) a presença e o número de inquilinos não interferem no uso dos recursos pela colônia construtora; e *iii*) a sobreposição entre construtores e inquilinos no uso do nitrogênio (recurso em menor disponibilidade) é menor do que do carbono (recurso em maior disponibilidade). Adicionalmente, para viabilizar posteriores trabalhos envolvendo análises isotópicas de carbono e de nitrogênio, foram investigadas algumas técnicas de preservação de cupins. Nossos resultados mostraram que, construtores e inquilinos de um mesmo cupinzeiro diferem, bidimensionalmente, no uso dos recursos alimentares (carbono e nitrogênio). A entrada de inquilinos não modifica o uso de recursos alimentares pela colônia construtora. Ao contrário do esperado, construtores apresentaram semelhante

sobreposição no uso do carbono e do nitrogênio. No entanto, como previsto, inquilinos tiveram menor sobreposição no nitrogênio. Verificamos que os cupins podem ser preservados em álcool ou em solução de NaCl por até 49 dias sem alterações nos sinais isotópicos de carbono e de nitrogênio. Assim, o presente trabalho contribui para o entendimento da coexistência de cupins em cupinzeiros, auxilia na compreensão da estruturação das comunidades destes insetos e viabiliza estudos envolvendo isótopos estáveis dos cupins .

## ABSTRACT

FLORENCIO, Daniela Faria, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010. **Coexistence among termite species in termitaria by feeding use differences.** Adviser: Og Francisco Fonseca de Souza. Co-advisers: Ana Paula Albano Araújo and Simon Luke Elliot.

The coexistence among several termite species within a single termitarium is a common natural event. However, the mechanisms that allow this coexistence are not known. Inside a termitarium there is a builder species that is responsible for the termitarium foundation and building and there are other termite species that invade and establish themselves in the termitarium. The aim of thesis was to evaluate termite species coexistence inside termitaria by resource partitioning. Therefore, we tested the following hypotheses: *i*) builder and invader coexist in termitaria due to differentiation in resource use, *ii*) presence and number of invader species does not interfere with builder resource use and *iii*) overlap in nitrogen use (resource in low availability) is smaller than in carbon use (resource in high availability). Additionally, to enable further works using stable isotopes, we investigated suitable preservation techniques for termite samples that could easily be used in field assays. Our results show that builder and invader species that coexist in the same termitaria differ in their resources use when analysed in two-dimensional resource space (carbon and nitrogen). Invader do not change the feeding resources in use by the colony builder. In only one dimension, builders had not overlap in the use of carbon and nitrogen. However, as expected by our hypothesis, invaders had less overlap in nitrogen than in carbon. We also noted that termites can be preserved in alcohol or in NaCl solution up to 49 days without changes in the isotopic signals of carbon and nitrogen. This

work contributes to the understanding of the coexistence of termite species in termitaria and community structures of termite species and enables studies involving stable isotopes of termites.

# Capítulo 1

## Introdução Geral

Os cupins, apesar de menos visíveis e atrativos do que os grandes mamíferos, são determinantes para o funcionamento dos ecossistemas terrestres tropicais, uma vez que modificam o ambiente permitindo aumento na riqueza e abundância de outros organismos. Este aumento na biodiversidade pode ser observado tanto no ambiente externo aos arredores dos ninhos (Dangerfield et al., 1998; Pringle et al., 2010), como no interior dos ninhos dos cupins (Redford, 1984; Costa et al., 2009).

As construções feitas pelos cupins, também denominadas ninhos, cupinzeiros ou termitaria, servem de abrigo e proteção para inúmeras espécies tais como microrganismos, plantas, insetos, anfíbios, répteis e mamíferos (Redford, 1984; Grassé, 1986). Dentre estes habitantes destacam-se os inquilinos, espécies de cupins que vivem em cupinzeiros construídos por outros Isoptera. O inquilinismo pode ser optativo (os inquilinos tem a capacidade de construir seus cupinzeiros) ou obrigatório (jamais constroem o próprio cupinzeiro) (Bouillon, 1970). Vários trabalhos têm relatado esta interação entre as espécies de cupins (ver Noirot (1970); Mathews (1977); Redford (1984); Grassé (1986); Lacher-Jr et al. (1986); Domingos & Gontijo (1996); Eggleton & Bignell (1997); Florencio et al. (2002); Cunha et al.

(2003); Costa et al. (2009)), entretanto, eles se limitam a registros da ocorrência de espécies em cupinzeiros e são raros os trabalhos publicados que buscam explicar os mecanismos envolvidos neste processo (Costa, 2002; Cunha et al., 2003).

Dos poucos estudos que testam os mecanismos envolvidos no inquilinismo, sabe-se que a presença e o número de espécies inquilinas em cupinzeiros estão relacionados com: (i) o tamanho do cupinzeiro (Costa (2002); Cunha et al. (2003); Marins *et al.* (*em preparação*)), (ii) a falha no sistema de defesa da colônia construtora (Cristaldo, 2010) e (iii) as interações com a colônia construtora (Costa (2002); Marins et al. *em preparação*). Desta forma, a colônia construtora possivelmente pode impedir a entrada de alguns inquilinos nos cupinzeiros. Porém, dentre estes estudos pouco se sabe sobre como ocorre o estabelecimento e a coexistência de várias espécies de cupins em um mesmo cupinzeiro.

Por outro lado, há um extenso corpo teórico abordando a coexistência de espécies em sistemas naturais (mas não em cupinzeiros) e vários mecanismos têm sido propostos para explicá-la. Dentre tais explicações destacam-se aquelas que preveem que a coexistência de espécies seria facilitada por uma utilização diferencial de recursos, evocando processos competitivos associados à teoria de nicho (Tilman, 1982; Chase & Leibold, 2003; Mayfield & Levine, 2010). Não se deve desconsiderar, entretanto, a coexistência mediada por outras interações (mutualismo, comensalismo, amensalismo, ou mesmo por predação e parasitismo), ou mecanismos mais sutis como a coexistência mediada pelo predador em comum (Holt et al., 1994). Há ainda a possibilidade de que as diferenças tróficas entre espécies co-ocorrentes sejam irrelevantes para sua coexistência (teoria neutra de Hubbell, 2001), sem a intervenção de mecanismos externos para viabilizar

a coexistência, exceto dispersão e acaso.

Assim, o objetivo desta tese foi analisar a coexistência de espécies de cupins em cupinzeiros, à luz da teoria de coexistência mediada pela diferenciação no uso dos recursos. Para isto, elaboramos hipóteses que buscam explicar a coexistência de diferentes espécies de cupins em um mesmo cupinzeiro (Figura 1.1), como descrito a seguir.

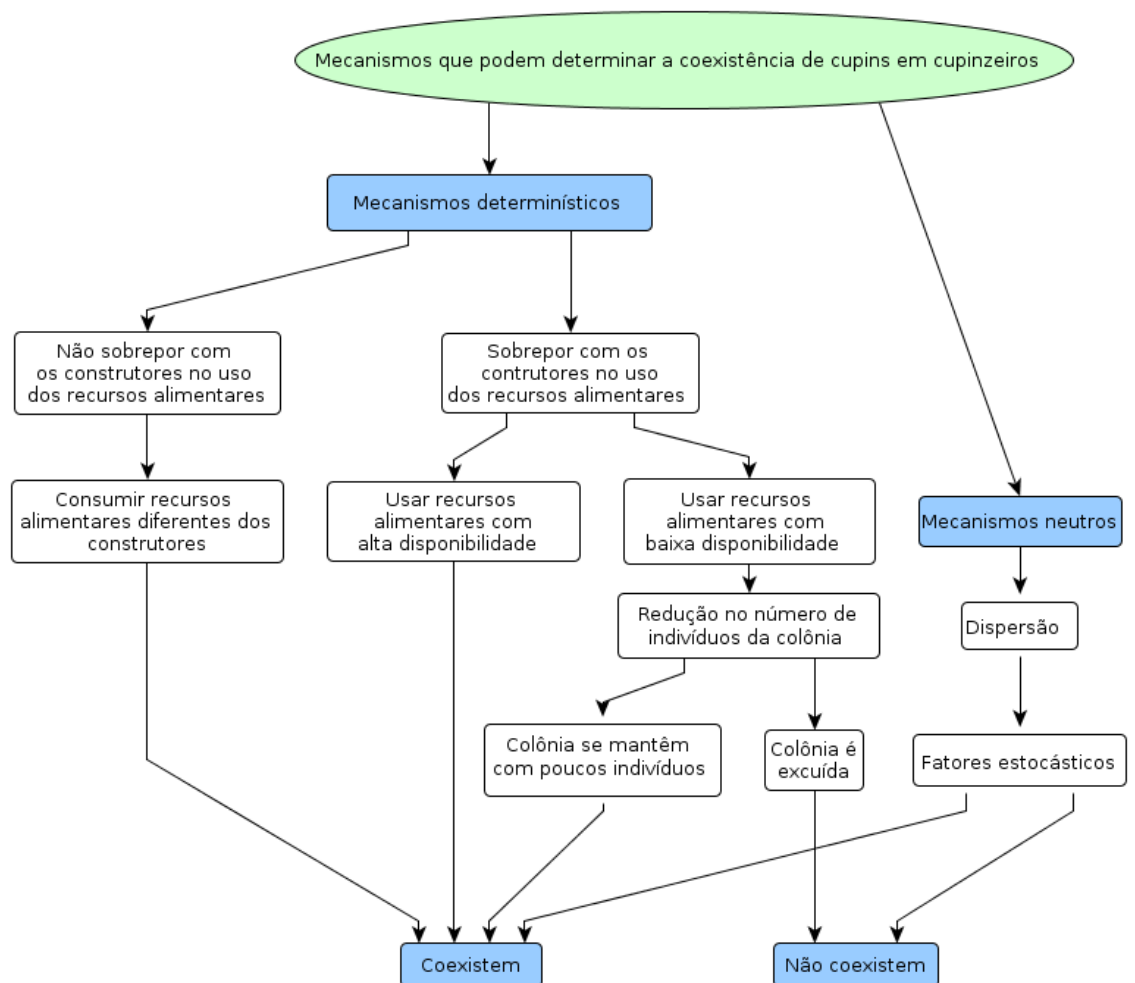


Figura 1.1: Mecanismos que podem determinar a coexistência ou a exclusão de inquilinos em cupinzeiros.

Teoricamente as espécies podem coexistir em decorrência de (*i*) processos neutros (Hubbell, 2001) ou (*ii*) determinísticos (Tilman, 1982; Mayfield & Levine, 2010) (Figura 1.1). Na coexistência via processos neutros os inquilinos de todas as espécies são limitados apenas pela dispersão, ou seja, se eles conseguirem chegar no cupinzeiro todos terão a mesma chance de coexistir ou de serem extintos localmente. Isso porque, o modelo neutro assume que a identidade das espécies não influencia na coexistência, ou seja, que nenhuma espécie tem vantagem ou desvantagem competitiva. Dessa forma, a exclusão competitiva não ocorre.

Por sua vez, a coexistência de espécies pode ocorrer por mecanismos determinísticos, em que a identidade e as características das espécies envolvidas têm forte influência. O estudo do uso dos recursos pelas espécies coexistentes pode ser utilizado para testar a existência destes mecanismos. Assim, podemos levantar a hipótese de que inquilinos que utilizam recursos distintos dos construtores têm mais chance de estabelecimento nos cupinzeiros. Isto poderia ocorrer porque os cupins consomem recursos diferentes ao longo de um gradiente de humificação (Donovan et al., 2001; Davies, 2002). Além disso, os inquilinos teriam vantagem utilizando recursos diferenciais porque podem ser competidores mais fracos, visto que os construtores dos cupinzeiros podem ocupar diversas regiões do cupinzeiro e frequentemente têm maior número de indivíduos. Desta maneira, levando-se em conta o uso de recursos alimentares pelas espécies envolvidas, a entrada e o estabelecimento dos inquilinos nos cupinzeiros pode ocorrer em diferentes cenários (Figura 1.1).

Os inquilinos que entram nos cupinzeiros podem sobrepor no uso dos recursos alimentares com os construtores, ou seja, usar recursos semelhantes. Se estes recursos alimentares forem essenciais e estiverem

com baixa disponibilidade no ambiente poderá ocorrer redução do número de indivíduos da colônia inquilina. Essa redução do número de indivíduos da colônia pode ser drástica e resultar na exclusão da população ou ainda, tornar a população mais susceptível aos eventos estocásticos e, assim construtores e inquilinos não coexistiriam de forma estável nos cupinzeiros. Em outros casos, a perda de indivíduos também pode ser menos drástica e a colônia pode se manter com poucos indivíduos e assim, construtores e inquilinos podem coexistir em cupinzeiros.

Ainda existe a possibilidade dos inquilinos se sobreporem seu uso dos recursos com os construtores em situações em que a oferta de recursos é alta. Nesse caso, a coexistência nos cupinzeiros ocorre porque nestas condições possivelmente, não haverá restrições para o estabelecimento e permanência da colônia inquilina e ao mesmo tempo, não haverá restrição alimentar para o construtor.

Por sua vez, os inquilinos que entram nos cupinzeiros podem não sobrepôr sua utilização dos recursos alimentares com os construtores. A diferenciação no uso destes recursos pode aumentar as chances de estabelecimento e de coexistência com a colônia construtora. Neste caso, a coexistência torna-se possível uma vez que a colônia inquilina não sofrerá restrições dos recursos alimentares e, conseqüentemente não estará sujeita a perda de indivíduos.

Esta tese foi desenvolvida com base nestes mecanismos e está dividida em cinco capítulos. Aqui apresentamos uma introdução geral. O capítulo 2 consiste no artigo “Assembly rules explain coexistence between builder and invader termite species in termitaria”, que mostra que os cupins construtores e inquilinos se diferenciam, bidimensionalmente, quanto ao uso dos recursos alimentares. Além disso, verificamos também que a presença de

inquilinos não afeta o uso dos recursos alimentares pela colônia construtora. A partir destes resultados questionamos se a diferenciação observada entre construtores e inquilinos ocorre em relação ao uso do carbono, do nitrogênio ou de ambos. Assim, no capítulo 3, o artigo “Importância do consumo do carbono e do nitrogênio para as espécies de cupins coexistentes em cupinzeiros” respondemos à esta pergunta mostrando que os inquilinos apresentam maior sobreposição do carbono do que do nitrogênio. Ao desenvolver este trabalho nos deparamos com dificuldades durante a coleta e o processamento do material, o que inspirou o desenvolvimento do próximo artigo. Assim, o capítulo 4 apresenta o artigo “How to preserve termite samples in the field for carbon and nitrogen stable isotopes studies?”, no qual verificamos que durante a amostragem não há necessidades de congelar os cupins para evitar alterações isotópicas. Os cupins podem simplesmente ser preservados em álcool ou em solução de NaCl por até 49 dias. No capítulo 5 apresentamos uma conclusão geral, sintetizando os principais resultados obtidos.

Capítulo **2**

Assembly rules explain coexistence  
between builder and invader termite  
species in termitaria

Daniela F. Florencio, Cassiano S. Rosa, Alessandra Marins, Paulo F.

Cristaldo, Ana P. A. Araújo, Ivo R. Silva & Og DeSouza

## 2.1 Abstract

Insights into assembly rules can help us to understand the coexistence among termite species in termitaria. Thus, in the present study we check whether builder and invader termite species coexistence in the same termitarium can be explained by feeding resource use. Our null hypothesis is that builder and invader termite species in a termitarium do not differ in resource use. The alternative hypothesis is that coexisting termite species minimise overlap. To test this, we analysed the partition of feeding habits of each termite species coexisting in the same termitarium, to check if there was any overlap, either in terms of detritus source or humification degree of the material consumed. In order to do so, we analysed the carbon and nitrogen stable isotopic composition of termite workers' bodies to reveal their feeding habits. We did find no overlap in resource used by termitarium builders and their associated invading termite species. These patterns can be generated by differences in costs and competitive ability between invader and builder. Thus, the coexistence among builder and invader termite species in termitaria can be explained by niche theory assembly rules. The results of this paper provide subsidy for the understanding of the mechanism responsible for coexistence among termite species in a termitarium.

**Key words:** Dispersal, Niche, Resource Partitioning, Cohabitation, Stable isotopes.

## 2.2 Introduction

The coexistence among several termite (Insecta: Isoptera) species within a single termitarium is a common natural event (Redford, 1984; Lacher-Jr et al., 1986; Domingos & Gontijo, 1996; Eggleton & Big-nell, 1997). What is remarkable about this is that a single species builds its termitaria which is later invaded by other termite species. The termitaria construction presents high costs to the termitarium builder (Noirot & Dar-lington, 2000) and there is no record that invading termite species contribute to minimise such costs. On the contrary, invaders seem to enhance costs by feeding on termitarium walls, builder's stored food, or by foraging in the same habitats used by the termitarium builder (Noirot, 1970; Mathews, 1977; Miura & Matsumoto, 1997; Noirot & Darlington, 2000). Thus, coe-xistence among termite species in a single termitarium is an intriguing fact, because nature selection should favour mechanisms of invader expulsion by termitarium builders.

Termitaria are conspicuous constructions built with availa-ble resources in the environment in the form of regurgitated soil, saliva and faecal material (Noirot, 1970). Inside termitaria the termites store food, maintain temperature and moisture appropriate for their colonies (Korb, 2003) and have a specialized defence against predation (Noirot & Darling- ton, 2000). Termite species that invade termitaria, can sometimes, building their own termitarium (Mathews, 1977; Redford, 1984), but the use of a termitaria of other species to establish their colonies requires lower invest-

ment. Moreover, there are invaders that cannot build their own termitaria (Mathews, 1977) and depend on inhabiting the termitaria of other species. Invaders have benefit from this coexistence and possibly need to develop strategies to avoid expulsion by the builder species.

Despite the commonness of termite cohabitation in termitaria, the mechanisms that promote this coexistence are not elucidated (Redford, 1984; Eggleton & Bignell, 1997; Costa, 2002). There are, many theoretical explanations for species coexistence in other context that can be used to explore termite species coexistence in termitaria. Such explanations are based in both dispersal and niche assembly rules, along with ecological drift (Hubbell, 2001). Dispersal assembly rules predict that local community is a result of regional propagule numbers, stochastic forces and are independent of species traits, which is called neutral theory (Hubbell, 2001). Neutral theory postulates that coexistence does not rely on species differences, but that similar species would coexist by chance and dispersal limitation (Hubbell, 2001). An alternative explanation for species coexistence is based on niche assembly rules and it predicts that species can coexist if they avoid niche overlapping with each other (Tilman, 1982; Chase & Leibold, 2003). If there is no overlap in the niche of two species, their competitive ability is unimportant for their coexistence (Mayfield & Levine, 2010). Recalling that termitaria can hold a large set of species, it is plausible that the above explanations can also be applied to termite cohabitation in termitaria.

Thus, in the present study we aimed to understand builder and invader termite species coexistence in the same termitarium testing the ideas mentioned above. Our null hypothesis is that termite species in a termitarium do not differ in resource use (see details in Fig. 2.1a). The alternative hypothesis is that coexisting termite species avoid overlap in

resource use (see details in Fig. 2.1b). A suitable strategy to test such ideas would be partitioning feeding resources, because of the relative flexibility of termite feeding habits. That is, termite species are able to feed on a wide range of materials, from sound wood to humified organic matter (Eggleton, 2000). Species, then, may feed on different portions of such a gradient and tolerate some overlap between themselves (Bourguignon et al., 2009). Moreover, we investigated whether the presence of intruders interfere in the range of resources used by the builders' colony. In order to test that, we analysed the feeding habits of each termite species coexisting in the same termitarium in distinct species number and checked if there was any overlap, either in terms of detritus source or humification degree of the consumed material. To do so we analysed the carbon and nitrogen stable isotopic composition of termite workers' bodies, similarly as Bourguignon et al. (2009) and Tayasu et al. (1997). Carbon stable isotopes were used to reveal the detritus source of the consumed plant material (C3 or C4 plants) (Spain & Reddell, 1996), whereas nitrogen stable isotopes revealed the humification degree of such a material (Tayasu, 1998).

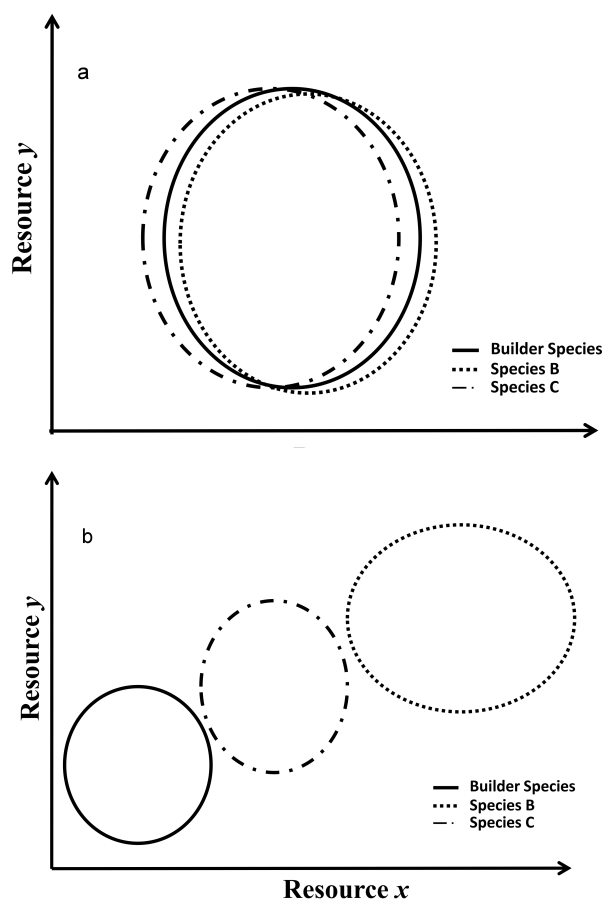


Figure 2.1: Alternative hypotheses for resource partitioning between builder and invader termite species coexisting inside termitaria. (a) Complete overlap (null hypothesis) and (b) Complete differentiation. Each graph represents a termitarium with one builder and two invader termite species in coexistence. The circles delimitate the resource axes utilisation of each species. Coinciding circles denote resource use overlap. (a) Termitarium builder and invader termite species coexist using the same feeding resources. (b) Termitarium builder and invader termite species coexist consuming distinct resources. Figure adapted from Peterson & Holt (2003).

## 2.3 Material & Methods

### Term definitions

In this paper the term “termitarium” refer to the physical epigeal structure built by termites. “Colony” designates a biological structure, that includes reproductive individuals, workers, soldiers, nymphs (semi-mature young), and eggs. Moreover, we use the terms coexistence and cohabitation as synonyms, referring to the occurrence of colonies of different species in the same termitarium. We used stable isotopes to determine the resource range consumed by termites because the isotopic composition of the body of an animal is similar to the food consumed and assimilated during its life (DeNiro & Epstein, 1978; Eggers & Jones, 2000). Carbon stable isotopes distinguish dietary preferences of termites between woody and herbaceous material. That is because woody plants, where C3 photosynthetic pathway is more frequently used, have a different isotopic ratio from grasses, which use C4 photosynthetic pathway (Spain & Reddell, 1996). Moreover, the nitrogen stable isotopes of termites indicate the humification level of cellulose that was eaten (Tayasu et al., 1997, 2002b) because  $\delta^{15}\text{N}$  in forest soil is negatively correlated to particle size, reflecting a gradual  $\delta^{15}\text{N}$  enrichment in the decomposition process (Nadelhoffer & Fry, 1994). Consequently, the stable isotopes of carbon and nitrogen might be used as surrogates for resource use by termites and, thus, to test our hypotheses.

### 2.3.1 Study site

This study was carried out in Brazilian Savanas (*cerrado*), in Sete Lagoas city (19°27'57"S, 44°14'48"W), with altitude varying from 800 to 900 m above the sea level, in the state of Minas Gerais, South-eastern Brazil. The climate is Aw-equatorial savanna type, with dry winter, according to the classification of Köppen (Kottek et al., 2006). The total accumulated precipitation in 2008 was of 1607 mm<sup>3</sup> and the mean monthly temperature was from 12.7°C to 28.9°C (Agritempo, 2009). Fire occurs naturally in *cerrado* areas, thus the organisms in these sites tolerate or depend on fire to survive (Coutinho, 1990). On site there is a ordinary occurrence of termitaria, which are often inhabited by invader species (Domingos & Gontijo, 1996).

### 2.3.2 Sampling

The experiments consisted of measuring the feeding habits of species coexisting in termitaria. Feeding habits were measured in order to check whether termite species in a termitarium do not differ in resource use or minimise overlap. Additionally, we investigated whether the presence of intruders interfere in the range of resources used by the builders' colony. For doing so, we sampled 18 termitaria in the field, with the presence or absence of invader species, and analysed the carbon and nitrogen stable isotopic composition of the body of ten individuals of all species found in the termitaria. Each one of the 18 termitaria, were selected according to the following criteria: termitarium that were epigeic, without a hypogean portion, easily removed from the soil and presenting no signs of damage. Beside, the termitarium walls should be soft enough to be broken into small pieces and have its insides searched completely. The termitaria were completely remo-

ved, put into plastic bags, enumerated, labelled and taken to the laboratory. Sampling took place from the 24 to the 28-July-2008, during daylight, from 7:30 a.m. to 4:00 p.m.. Vegetation and landscape are similar around all sampled termitaria.

In the laboratory, the entire termitaria were completely and carefully inspected to remove all termite species with entomologic soft forceps. Termites were grouped in morpho-species to differentiate individuals from distinct colonies. For each species present in a termitarium, two samples were separated: one for the identifications, and another for isotopic analyses. When not enough individual were found, we only separated one sample for the identification.

Specimens used for identification were preserved in 80% alcohol, labelled, and subsequently identified to species (or morpho-species) level, following Mathews (1977) and specific literature referred by Constantino (2002). Identifications were confirmed through comparison with the collection of the Termites Section of the Entomological Museum of the Federal of Viçosa (MEUV), where voucher specimens were deposited.

For each termite species collected, we determined if it was the builder or an invader species. The builder species was determined first in the field and in lab by comparing physical characteristics from the collected termitarium with those found in the literature (Araujo, 1970; Mathews, 1977). These characteristics were: size, geometric form, composition (soil or carton), wall texture and wall hardness. The precise identification of the builder was possible because each termite species built a notoriously distinct termitarium. These differences among the species' termitarium allowed us to be sure of the species responsible for the termitarium construction.

### 2.3.3 Stable isotopic analyses of the termites

In order to determine feeding habits we used only workers for stable isotope analyses, because these are the individuals that forage and feed other castes in the colony (Lee & Wood, 1971). This procedure also contributed to eliminate any possible intercaste difference effect on isotopic values (Bourguignon et al., 2009).

The termite workers of each species in the termitarium were, when possible, sampled in 10 replicates of 10 to 20 individuals each, so as to obtain 1,5  $\mu\text{g}$  of material for isotopic analysis. Each sample was put into a glass with distilled water, and immediately frozen until they could be processed. Distilled water was removed by freeze-drying, so as to prevent decomposition process, and maintain the original values of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ .

The samples were freeze-dried for about 48 h, macerated with a mortar and pestle, and sieved through  $< 100$  mesh. Carbon and nitrogen isotope ratios of each sample were measured by using an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, ANCA-GSL 20-20, SerCon, UK), of the Laboratory of Stables Isotopes, Soil Department, Federal University of Viçosa (UFV).

The natural abundance of carbon  $^{13}\text{C}$  and nitrogen  $^{15}\text{N}$  was expressed in per thousand ( $\text{‰}$ ) deviation from standards, with the following equation:

$$\delta X = \frac{R_S - R_I}{R_I} * 1000 \quad (2.1)$$

where  $R_S$  denotes the sample isotopic ratios in the sample by carbon  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  or nitrogen  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $R_I$  is the International Standard. The standard for carbon and nitrogen are Belemnite of the Pee Dee Formation in South Carolina, USA (PDB), and the nitrogen is the atmospheric nitrogen (air),

respectively. The isotope ratio R is the ratio from “heavy” ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) to “light” ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ), typically, from rare to abundant isotope relative to an internationally accepted standard. The analytical precision of the measurements is estimated to be  $\pm 0.1\%$  for carbon and  $\pm 0.2\%$  for nitrogen.

### 2.3.4 Data analyses

For analysing whether builder and invader termite species coexistent in a termitarium overlap or not in the use of feeding resource, we constructed eleven graphics using the range of resources used by the species (builder and invader) in each termitarium. We plotted bidimensional graphs (x-axis  $\delta^{13}\text{C}\%$  and y-axis  $\delta^{15}\text{N}\%$ ) with the isotopic values of both termite builder and invader. Thus, each graph permitted to check if termite species that coexist in a termitarium overlapped in usage of feeding resource (see details in Fig. 2.1).

The range of total resource used for each species (builder and invader species) in each termitarium was bidimensionally defined through binding the extreme values of the used  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ . Next, the dots (values of each group of analysed individuals) were delimited by a margin in order to define the resource use amplitude for each species in the termitaria. The marginal overlap of resource chain used by distinct species was considered to be an indicative that the species within the same termitarium use similar resources. Non-overlapping margins showed that species used different resources.

To test if number of invader species (x-variable) interfere in the range of total resource ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ , y-variables) used by builder colonies, we adjusted Generalized Linear Models (GLM). We include identity of the colony builder in the model to check the influence of the builder

species biology on the interaction with their invaders. In this analysis we used the same 11 termitaria with invaders from the previously analysis plus 7 termitaria without invaders. Those termitaria were collected using the same procedure in section 2.3.2.

The analyses were carried out using Normal errors distribution, and were performed under R (R Development Core Team, 2009), followed by residual analyses to verify suitability of error distribution and adequacy of the models employed. Full models were built by including all explanatory variables (number of invader species and builder species identity) and their possible interactions. Model simplification was achieved by extracting non-significant terms ( $P > 0.05$ ) from the model according to their respective complexity, starting from the most complex one. When two non-significant terms presented the same complexity, the one explaining less deviance was extracted first. Each term deletion was followed by an ANOVA with F test of the simplified model, in order to recalculate the deviance explained by remaining terms.

The determination of potential used resource, for building and invaders species was also done. This was done taking into account the sum of all groups of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  for each species in the different sampled termitaria. Those values were plotted similarly to the one quoted above.

## 2.4 Results

### 2.4.1 Termite species in termitaria

The sampled termitaria were built by two termite species: *Constrictotermes cyphergaster* and *Velocitermes heteropterus*. Ten termitaria were built by *C. cyphergaster*, from which four had the builder's colony alone and six of them had only one invader species per termitarium (Tab. 2.1). Furthermore, eight termitaria were built by *V. heteropterus*, which contained from one to six invader species per termitarium (Tab. 2.1).

Termites that build arboreal termitaria can be found as epigeic builders during some stage of development (Noirot & Darlington, 2000). Although *C. cyphergaster* is known as an arboreal species, we collected only epigeic termitaria built by *C. cyphergaster*. These termitaria were regular structures of wood carton and soil, of fine texture and formed by thin walled chambers. The shape of such a termitarium was ovoid or pear shaped. The termitaria of this species were often inhabited by obligatory invaders *Inquilinitermes microcerus* as found by Araujo (1970) and Mathews (1977) and by occasional invaders *Heterotermes longiceps* (Tab. 2.1).

The termitaria of *Velocitermes* were pyramidal, very soft, crumbly. In this work we found several occasional invader termite species coexistent in these termitaria (Tab. 2.1).

### 2.4.2 Stable isotopic values of the termites

The range of isotopic composition of termite species in the termitaria built by *C. cyphergaster* ranged from -30.20 to -22.84‰  $\delta^{13}\text{C}$  and, from 0.27 to 13.68‰  $\delta^{15}\text{N}$  (Fig. 2.2). In the termitaria built by *V. heteropterus* the range of isotopic values was from -25.78 to -15.86‰  $\delta^{13}\text{C}$  and, from 1.62 to 19.47‰  $\delta^{15}\text{N}$  (Fig. 2.3).

Workers of some invader species that coexisted in termitaria of *C. cyphergaster* and *V. heteropterus* could not be analysed isotopically due to their low biomass and number of individuals (<20). As a result, the isotopic analyses ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) among termite species in coexistence in termitaria was done for two to four species per termitarium (Tab. 2.1).

The feeding resources consumed by termites defined through the isotope analyses agreed with the definition of feeding groups found in the literature (Tab. 2.2). Termites included in distinct feeding groups had distinct isotope values (Tab. 2.2; Fig. 2.3e) while, termites included in the same feeding group showed similar isotopic values (Tab. 2.2; Fig. 2.3c).

### 2.4.3 Coexistence among termite species in the termitarium

Invader species showed distinct positions in bidimensional resource space from builder species and there was no overlap among them (Figs. 2.2 and 2.3). On the other hand, among invader species, we found differentiation in five termitaria (Figs 2.3a, 2.3d, 2.3e, 2.3f and 2.3g) and overlap in two termitaria (Figs 2.3b and 2.3c) on the bidimensional resource axis.

The colony builder's variation in resource, for both *C. cyphergaster* and *V. heteropterus*, was not explained by the number of invader species inside it's termitaria ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $F_{1,16} = 0.0163$ ,  $P=0.9001$ ;  $\delta^{15}\text{N}$ ,

$F_{1,16}=0.4679$ ,  $P=0.5044$ ; Fig. 2.4). Moreover, the colony builder's identity did also not explain the variation in resource use ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $F_{1,16}=0.0528$ ,  $P=0.8211$ ;  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $F_{1,16}=0.0718$ ,  $P=0.7922$ ; Fig. 2.4).

The isotopic values of the termite species changed along the studied termitaria. These changes were observed in the builders and in the invaders found in termitaria of *C. cyphergaster* and in *V. heteropterus*. Thus, the potential resource used, that means, the sum of all used position in each termitarium was always wider than the range of used resource in each termitarium (Fig. 2.5).

Tabela 2.1: Termite (morpho) species and respective family and subfamily of cohabitants of termitaria in Sete Lagoas city, Minas Gerais, Brazil.

Species or morpho-species	Termitaria													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>RHINOTERMITIDAE</b>														
<b>Heterotermitinae</b>														
<i>Heterotermes longiceps</i> (Snyder)	c					b			b					
<i>Heterotermes tenuis</i> (Hagen)														
<b>TERMITIDAE</b>														
<b>Apicotermitinae</b>														
<i>Anoplotermes</i> sp.1						c	c							
<i>Anoplotermes</i> sp.2						c								
<i>Anoplotermes</i> sp.3										c				
<i>Grigiotermes</i> sp.1							c							
<i>Grigiotermes</i> sp.2									c					
<i>Grigiotermes</i> sp.3						b								
<b>Syntermitinae</b>														
<i>Armitermes euamignathus</i> Silvestri								c			c			
<i>Cyranotermes timuassu</i> Araujo												b		

Continue on next page



Tabela 2.1: Continuation

- 
- a) Termitaria builder species.
  - b) Invader species found in the termitaria, but with low biomass that did not allow isotopic analyses.
  - c) Invader species in which stable isotopes were analysed.
-

Tabela 2.2: Termite (morpho) species and respective feeding group of cohabitant in termitarium, in Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil. Feeding groups follow Mathews (1977), Gontijo & Domingos (1991), Constantino (1992), DeSouza & Brown (1994), Donovan et al. (2001), Carrijo et al. (2009) and is presented in columns headed by respective authority, to facilitate comparison of opinions. In the absence of definition at species level, definition follows the most referred group for the respective genus.

Species or morpho-species	Mathews	Gontijo & Domingos	Constantino	DeSouza	Donovan	Carrijo
<b>RHINOTERMITIDAE</b>						
<b>Heterotermittinae</b>						
<i>Heterotermes longiceps</i>	wood	-	-	-	-	-
<i>Heterotermes tenuis</i>	wood/debris	-	wood	wood	-	wood
<b>TERMITIDAE</b>						
<b>Apicotermittinae</b>						
<i>Anoplotermes</i> spp.	humus	wood, soil	humus, soil	soil	soil	humus
<i>Grigiotermes</i> spp.	humus	organic material	debris wood	humus	-	humus
<b>Syntermittinae</b>						
<i>Armitermes nathus</i>	-	wood	-	-	-	intermediate

Continue on next page

Tabela 2.2: Continuation

<i>Cyranotermes timuassu</i>	humus	soil and organic material	-	-	-
<i>Labiotermes brevilabius</i>	humus	humus	-	-	-
<i>Procornitermes araujoii</i>	grass/litter	-	-	-	-
<b>Nasutitermitinae</b>					
<i>Constrictotermes cyphergaster</i>	wood	-	-	-	-
<i>Nasutitermes coripoensis</i>	litter/wood	wood	litter/wood	wood	wood
<i>Nasutitermes</i> spp.	litter/wood	wood	litter/wood	wood	wood
<i>Subulitermes</i> sp.	humus	humus	soil	-	-
<i>Velocitermes heteropterus</i>	litter	-	-	-	grass/litter
<b>Termitinae</b>					
<i>Inquilinitermes microceus</i>	uncertainly	-	-	-	-
<i>Neocapritermes</i> sp.	-	-	intermediate	-	-
<i>Orthognatotermes</i> sp.	humus	soil	humus	-	-

Continue on next page

Tabela 2.2: Continuation

		organic material	
<i>Spinitermes trispinosus</i>	-	humus rotten wood	-
<i>Termes</i> sp.	wood	humus wood	intermediate - intermediate

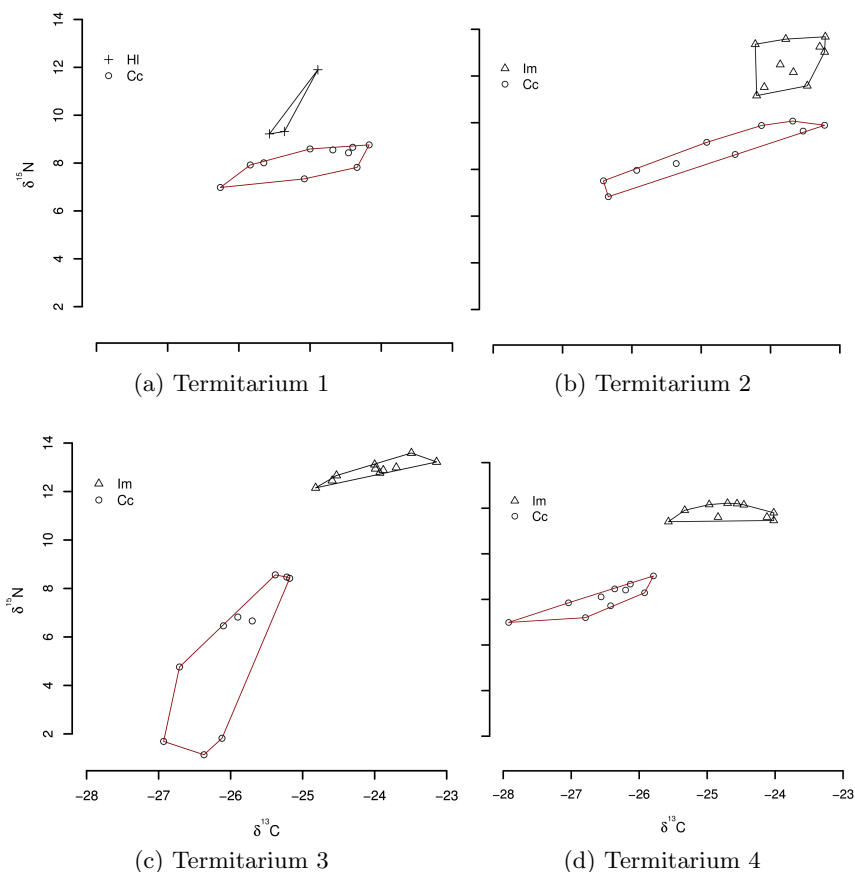
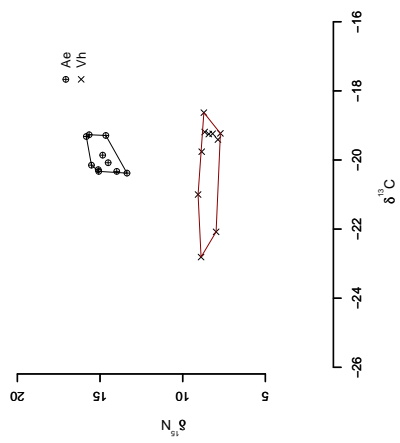
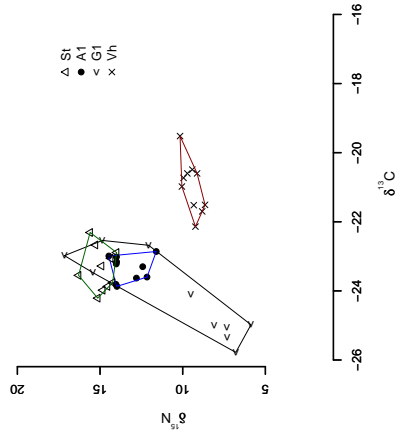


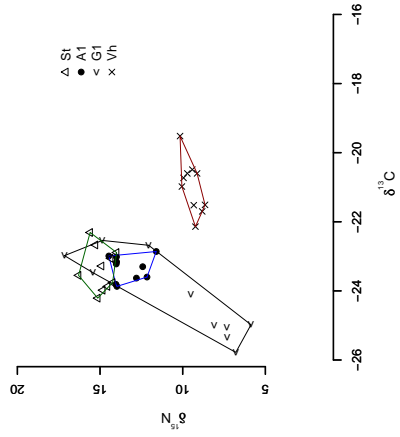
Figure 2.2: Two-dimensional representation of resource used, plotting by axis  $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and  $\delta^{15}\text{N}$ (‰) of termite species coexistent in termitaria of the builder *Constrictotermes cyphergaster*. Each graph represents a termitarium with their builder and invader termite species. Each point corresponds to the absolute isotopic value of a group with about 10 workers. Also the border delimitate workers replicate that species. The red border demarcate resource use by workers of builder species. Each symbol represents resource used by individuals of one species. Abbreviations: Im, *Inquilinitermes microcerus*; Hl, *Heterotermes longiceps* and Cc, *C. cyphergaster*.



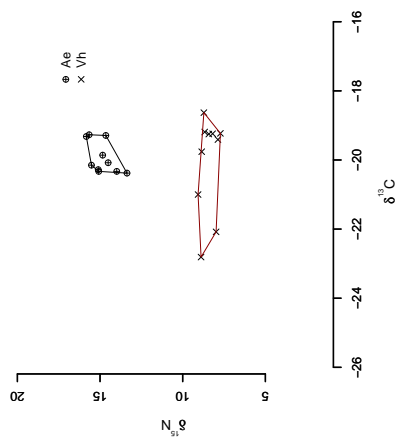
(a) Termitarium 5



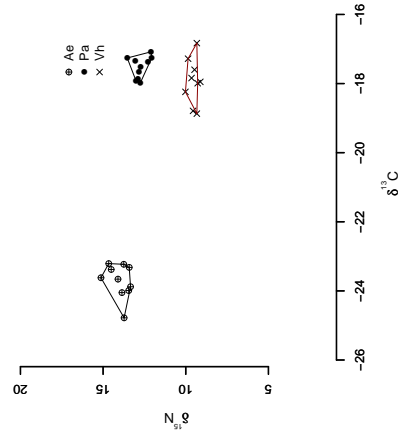
(b) Termitarium 6



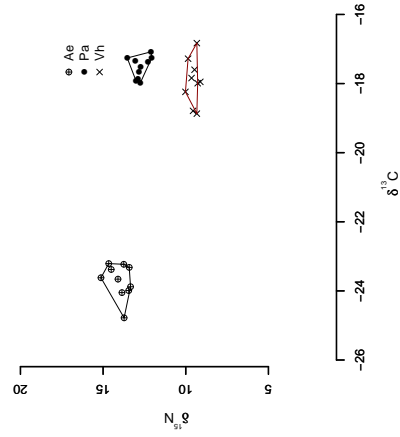
(c) Termitarium 7



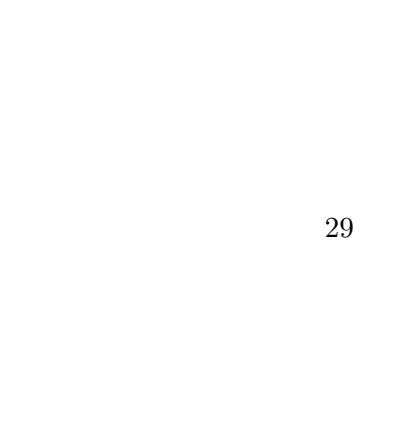
(d) Termitarium 8



(e) Termitarium 9



(f) Termitarium 10



(g) Termitarium 11

Figura 2.3: Two-dimensional representation of resource used, plotting by axis  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of termite species coexistent in termitaria of the builder *Velocitermes heteropterus*. Each graph represents a termitarium with their builder and invader termite species. Each point corresponds to the absolute isotopic value of a group with about 10 workers. Also the border delimitate workers replicate that species. The red border demarcate resource use by workers of builder species. Each symbol represents resource used by individuals of one species. Abbreviations: N, *Neocapritermes* sp.; Lb, *Labiotermes brevilabius*; A1, *Anoplotermes* sp.1; A2, *Anoplotermes* sp.2; A3, *Anoplotermes* sp.3; St, *Spinitermes trispinosus*; G1, *Grigiotermes* sp.1; G2, *Grigiotermes* sp.2; Ae, *Armitermes euamignathus*; Pa, *Procornitermes araujoi* and Vh, *V. heteropterus*.

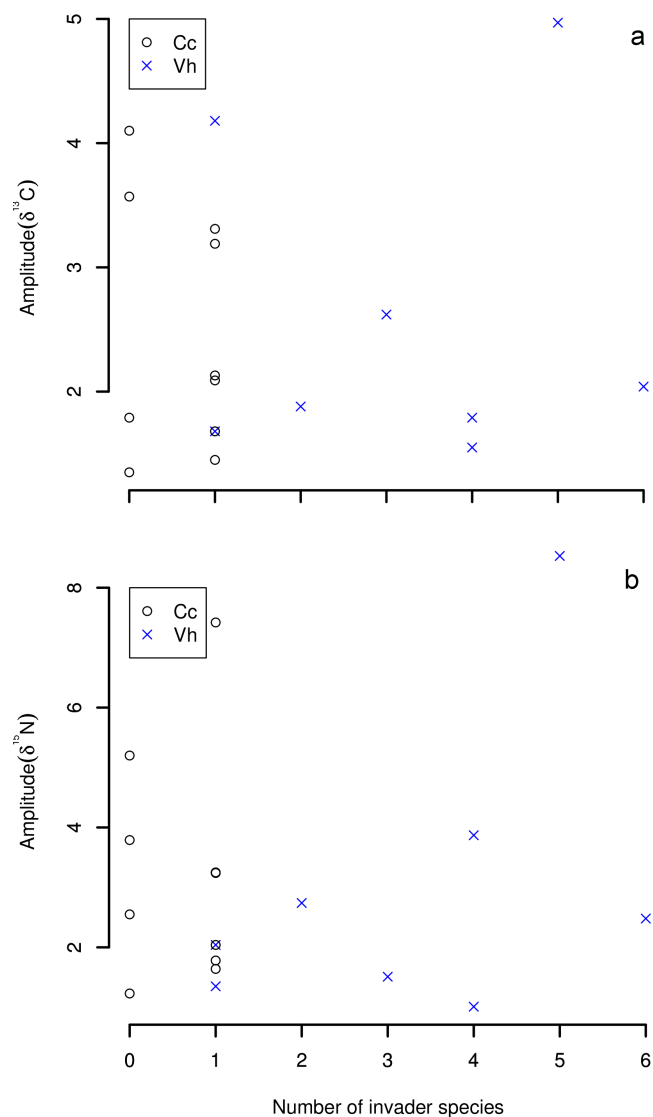


Figure 2.4: Resource utilisation breadth of  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) and  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) by *Constrictotermes cyphergaster* and *Velocitermes heteropterus* colonies with different number of invaders in the termitarium. Each point on the graph represents the food resources used by each builder colony in a termitarium. (a)  $\delta^{13}\text{C}$  utilisation. Number of invader species ( $F_{1,16}=0.0163$ ;  $P=0.9001$ ) and builder species identity ( $F_{1,16}=0.0528$ ;  $P=0.8211$ ) do not explain resource utilisation in  $\delta^{13}\text{C}$ . (b)  $\delta^{15}\text{N}$  utilisation. Number of invader species ( $F_{1,16}=0.4679$ ;  $P=0.5044$ ) and builder species identity ( $F_{1,16}=0.0718$ ;  $P=0.7922$ ) do not explain resource utilisation in  $\delta^{15}\text{N}$ .

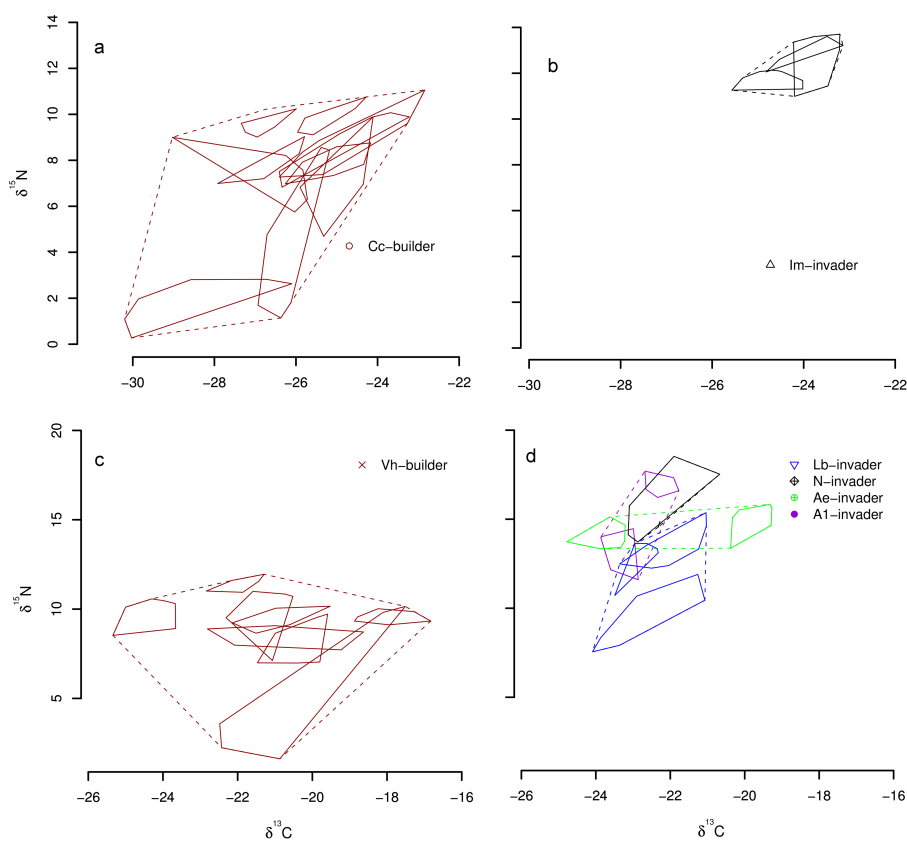


Figure 2.5: (a) Represents a distinct colonies of builder species *Constrictotermes cyphergaster*; (b) represent distinct colonies of *Inquilinitermes microcerus* found in termitarium built by *C. cyphergaster*; (c) represent distinct colonies of builder species *Velocitermes heteropterus*; (d) represent invader species found in termitarium built by *V. heteropterus*. The dashed delineate the potential position of each species in the bidimensional resource axis ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ). The potential position is a sum of all the positions occupied by a termite species among termitaria. Red lines demarcate builder species. Invader species are represented by remaining colours. The abbreviations designate: Cc, *C. cyphergaster*; Im, *Inquilinitermes microcerus*; Vh, *V. heteropterus*; Lb, *Labiotermes brevilabius*; N, *Neocapritermes* sp.; Ae, *Armitermes euamignathus* and A1, *Anoplotermes* sp..

## 2.5 Discussion

We found no overlap in resource used by termitarium builders with that used by their associated invading termite species (Fig. 2.2 and 2.3). Therefore, invader species probably use distinct resources from the builder species. Number of invading species does not change the range of resources ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) used by the builder colonies (Fig. 2.4). Moreover, the resource range that the builder would be able to occupy in all sampled termitaria was wider than what was realized in each termitarium (Fig. 2.5). That is, the builder seems to shorten its resource use in each termitarium. Accordingly, the invader presents precisely the same pattern: wider ranges for all termitaria summed up and shorter ranges for specific termitaria (Fig. 2.5b and 2.5d).

It seems, therefore, that invaders are avoiding builders in terms of resource usage. Interestingly, when it comes to invaders coexisting in a single termitarium, they can overlap each other in their resource use (Fig. 2.3b and 2.3c), despite not overlapping with the builder's. It seems, therefore, that niche assembly rules may be applied to builder and invader termite species coexistence in termitaria.

A suitable explanation for the niche differentiation between builder and invaders, is related to competitive ability. According to this theory, when two species have distinct competitive ability, only the species with niche differentiation are able to coexist (Mayfield & Levine, 2010). This differentiation is probably performed by invader species, because builder spe-

cies can be superior in their competitive ability, since builder individuals can be found in different places in the termitarium and have three times more individuals than invaders (personal observation). Thus, as a result of competitive ability differences, it is possible that only invader species that use different resources from the builder, are able to coexist in the termitarium.

Other suitable interpretation of such patterns would be that they were generated by differences in costs faced by both invaders and builders. That is, costs faced by invaders are prone to be smaller than those faced by builders, simply because these later ones have to build the termitarium. Hence, it is plausible that invaders would tend to avoid conflicts with the builder, doing so by adjusting their resource use as they enter the termitarium. Similarly, the builder should oppose invasions by species feeding on similar resources as a strategy to not increment its costs. On the other hand, the strategies adopted by invaders to coexist with each other seem to be dictated by a distinct set of rules, and this could also be explained in terms of cost management. Since builders have invested energy in building their termitaria, dealing with invaders seems necessary in order to secure the investment. Invaders, however, do not invest much (because they do not build) and then dealing with other invaders would seem a waste of energy. Therefore, it is according to expectations to find overlap in resource use between invaders.

We found evidence for an adjustment in resources use in response to cohabitation, since despite some species being able to potentially use the same resources, they avoid it when in the same termitarium. The builder species, *C. cyphergaster* and *V. heteropterus*, apparently do not change their resource use when invaders are present (Fig. 2.4). The resources use variation found by the builder species are probably due to other

environmental factors such as local resource availability. Contrastingly, the invaders species probably adjust their resource use to avoid overlap with builder species. Probably, only invader species that do not overlap the builder resources range are able to succeed. On the other hand, the coexistence among invaders that does not prevent resource use can overlap. This resource sharing may be mediated by spacial segregation among invaders. While the builder species are usually abundant and widespread throughout the termitarium so that they may meet any invader in their termitarium, invaders are restricted to small portions of the termitarium. Thus, when an invader enters into the termitarium, it was higher probability of meeting builders than other invaders. Spacial segregation is known to enhance coexistence among competing species, such as the predatory mites *Typhlodromalus aripo* and *Typhlodromalus manihoti* on cassava plant (Magalhães et al., 2003). These two predators can coexist on the same plant, even though they feed on the same herbivorous mite, when they occupy distinct places of the plant (Magalhães et al., 2003).

The corollary of such ideas would be that in the absence of the builder, more invading species should be able to occupy the termitarium than when the builder is present. In fact, this is a pattern long known for termite cohabitation. Redford (1984, table 2) and Eggleton & Bignell (1997, table 2) present data evidencing that termitaria that were abandoned by the builder hold more termite species than termitaria where the builder is present. A similar pattern is presented by Costa (2002). Thus, probably the builder reduces the establishment of invader species coexisting in the termitaria.

Concluding, we found evidences that termitaria co-occupation by different termite species is mediated by interactive proces-

ses between cohabitants. Invaders change their resource use, so as to avoid overlap with builders, while builders apparently do not respond to invaders presence.

Capítulo **3**

Importância do consumo do  
carbono e do nitrogênio para as  
espécies de cupins coexistentes em  
cupinzeiro

Daniela F. Florencio, Cassiano S. Rosa, Alessandra Marins, Paulo F.

Cristaldo, Ana P. A. Araújo, Ivo R. Silva & Og DeSouza

### 3.1 Resumo

Os cupins são organismos essenciais para os ecossistemas uma vez que, como decompositores, disponibilizam recursos e condições favoráveis a várias espécies, contribuindo assim para o aumento da biodiversidade local. Dentre as espécies favorecidas encontram-se várias espécies de cupins que podem habitar ninhos de outros cupins, coexistindo com estas espécies. No entanto, pouca atenção têm sido dada para os mecanismos que possibilitam a coexistência das inúmeras espécies de cupins. Considerando-se as teorias de coexistência, podemos esperar que a utilização dos recursos alimentares pode influenciar a coexistência das espécies de cupins. Neste trabalho, testamos a hipótese de que construtores e inquilinos sofrem menor sobreposição no uso do nitrogênio (recurso com menor disponibilidade) do que do carbono (recurso com maior disponibilidade). Para isto, foram avaliados 11 cupinzeiros com a presença de inquilinos e construtores. Como um indicativo dos recursos alimentares consumidos pelos cupins analisamos a proporção isotópica do  $\delta^{13}\text{C}$  e do  $\delta^{15}\text{N}$  no corpo dos operários das espécies coabitantes. Estes valores isotópicos possibilitaram estimar a amplitude alimentar (intervalos entre os valores máximos e os mínimos de  $\delta^{13}\text{C}$  e de  $\delta^{15}\text{N}$ ) e a ocorrência de sobreposição entre os pares de espécies (construtor×inquilinos) presentes em cada cupinzeiro. Nossos resultados mostraram que os construtores são intolerantes à sobreposição alimentar do inquilinos, uma vez que, em todos os cupinzeiros avaliados, os construtores apresentaram baixa sobreposição na utilização do carbono e do nitrogênio. Por sua vez, os inquilinos toleraram dos construtores menor sobreposição no consumo do nitrogênio do que do carbono, possivelmente como resposta à menor disponibilidade deste recurso no ambiente. Assim, a coexistência entre construtores e inquilinos em cupinzeiro parece ocorrer via ajustes na utilização do carbono e do nitrogênio.

**Key words:** Isoptera, Sobreposição, Amplitude alimentar, Dinâmica de

Nicho, Isótopos Estáveis.

### 3.2 Introdução

Diversos estudos apontam os cupins como organismos essenciais para a ciclagem de nutrientes (Black & Okwakol, 1997; DeSouza et al., 2009) via consumo de celulose (Davies, 2002) ou carcaça de animais mortos (Freyman et al., 2007), além de promoverem a descompactação do solo (Barros et al., 2001) devido à construção de túneis subterrâneos. Outro importante aspecto é a construção de cupinzeiros que podem ser utilizados como abrigo, refúgio e até mesmo para nidificação por outras espécies (Redford, 1984). Todas essas características conferem aos cupins um papel central nos ecossistemas terrestres tropicais, contribuindo significativamente para o aumento da biodiversidade local (Pringle et al., 2010; Fox-Dobbs et al., 2010). Diversos organismos se beneficiam da presença de cupinzeiros, inclusive algumas espécies de cupins que são inquilinos oportunistas ou obrigatórios (nunca constroem seus próprios cupinzeiros) (Bouillon, 1970). Apesar da importância dos cupins nesses ecossistemas pouca atenção têm sido dada aos mecanismos que possibilitam a coexistência das inúmeras espécies de cupins.

Para outros organismos, existe um grande conhecimento relacionado com a coexistência de espécies. Teoricamente, as espécies podem coexistir pelas diferenças no uso dos recursos (Abrams, 1983; Tilman, 1982; Chase & Leibold, 2003), ou equivalência nas capacidades competitivas (Mayfield & Levine, 2010). Essas teorias preveem que espécies que utilizam os mesmos recursos podem coexistir se possuírem semelhantes ca-

pacidades competitivas. Caso contrário, a espécie mais forte competitivamente excluirá a mais fraca. Além disso, a capacidade competitiva pode ter pouca importância quando as espécies se diferenciam na utilização dos recursos (Mayfield & Levine, 2010) uma vez que, espécies similares quanto à utilização de recursos competem mais fortemente (Fargione & Tilman, 2005a,b). Desta forma, a diferenciação na utilização de recursos ou a similaridade na capacidade competitiva entre as espécies pode minimizar as interações negativas promovendo assim o aumento da diversidade local.

As interações interespecíficas também podem ser influenciadas pela disponibilidade de recursos, porque espera-se as interações competitivas sejam reduzidas em locais com abundância de recursos (Cornell & Lawton, 1992). Ao contrário, a restrição de recursos pode dificultar ou inibir a coexistência de espécies, por aumentar a exclusão competitiva. Assim, adaptações diferenciais dos organismos à distribuição e disponibilidade de recursos no ambiente têm importante papel na coexistência das espécies em muitos sistemas ecológicos (Wisheu, 1998; Bernhardt-Römermann et al., 2010).

Os cupins podem coexistir em um mesmo fragmento florestal ou ainda, numa menor escala, em um mesmo cupinzeiro. A coexistência de diversas espécies de cupins em cupinzeiros é um fenômeno muito comum e bem relatado na literatura (ver: Redford, 1984; Domingos & Gontijo, 1996; Constantino, 2005). Neste caso, existe uma espécie construtora, que fundou e construiu o cupinzeiro e as espécies inquilinas, que invadiram e se estabeleceram nos cupinzeiros de outras espécies. Além disso, como os cupinzeiros são ambientes com fronteiras bem delimitadas e protegidas, as chances potenciais de interações entre estas espécies (construtor  $\times$  inquilinos) podem ser bem elevadas.

Considerando-se as teorias de coexistência, podemos esperar que a utilização dos recursos pode influenciar a coexistência de espécies de cupins. Os recursos carbono e nitrogênio estão em distinta disponibilidade no ambiente e podem ser considerados essenciais para quaisquer organismo, inclusive para os cupins. Isto porque, para os cupins o carbono é a principal fonte de energia e o nitrogênio é fundamental para a síntese dos ácidos nucleicos e de proteínas (La Fage & Nutting, 1978). A disponibilidade destes recursos é distinta: enquanto o carbono é abundante, o nitrogênio disponível para assimilação é restrito na maioria dos ecossistemas terrestres (Vitousek & Howarth, 1991). Assim, avaliar o uso destes recursos pelos construtores e inquilinos de cupinzeiros pode nos auxiliar a entender os mecanismos mediadores desta coexistência.

No Capítulo 2 verificamos que construtores e inquilinos se diferenciam bidimensionalmente quanto ao uso do carbono e do nitrogênio. No entanto, não ficou claro se a diferenciação ocorreu no uso do carbono, do nitrogênio ou de ambos. Aqui, testaremos a hipótese de que os construtores e inquilinos têm menor sobreposição no uso do nitrogênio (recurso com menor disponibilidade no ambiente) do que na utilização do carbono (recurso com maior disponibilidade no ambiente). Assim, a coexistência de cupins em cupinzeiros seria possível porque os construtores e inquilinos se diferenciam no consumo do recurso com menor disponibilidade, enquanto que a sobreposição no uso do recurso mais abundante pode é tolerada. Para isto, foram amostrados cupinzeiros com a presença de construtores e inquilinos e quantificado o uso do carbono e do nitrogênio por estes cupins.

### 3.3 Material & Métodos

#### 3.3.1 Raciocínio Experimental

Neste trabalho, testamos se a diferenciação entre construtores e inquilinos é promovida pelo uso do carbono, do nitrogênio ou de ambos os recursos. Para isto, avaliamos o uso destes recursos pelos cupins coabitantes de um mesmo cupinzeiro, a ocorrência de sobreposição entre os pares de espécies e o nível de sobreposição no uso destes recursos sofrida pelos construtores e inquilinos. A sobreposição foi avaliada entre pares de espécies presentes em cada cupinzeiro, para cada uma das seguintes categorias: (i) a sobreposição apresentada pelo construtor e (ii) a sobreposição apresentada pelos inquilinos. Para avaliar a sobreposição, amostramos cupinzeiros epígeos sem partes subterrâneas, para que pudessem ser removidos por completo e, assim, incluir toda a fauna coabitante. Foram considerados apenas os cupinzeiros que abrigavam indivíduos de pelo menos duas espécies. Como um indicativo dos recursos alimentares consumidos pelos cupins analisamos os isótopos de  $\delta^{13}\text{C}$  e de  $\delta^{15}\text{N}$  do corpo dos operários das espécies presentes nos cupinzeiros. Estes isótopos indicam os recursos utilizados pelos cupins (Tayasu et al., 1997; Bourguignon et al., 2009). Isso é possível porque a composição isotópica do corpo de um organismo é semelhante à dos recursos consumidos e assimilados durante a sua vida (DeNiro & Epstein, 1978; Eggers & Jones, 2000). Assim, esta técnica pode nos auxiliar a mensurar com mais precisão os recursos utilizados por um indivíduo (Bearhop

et al., 2004; Syvaranta & Jones, 2008), permitindo fazer inferências sobre diferenças interespecíficas quanto à partilha de recursos (Bootsma et al., 1996; Genner et al., 1999). Além disso, utilizamos a casta dos operários por esta ser a casta responsável pelo forrageamento e coleta de recursos para a colônia (Wood, 1978).

A avaliação dos valores isotópicos das espécies coabitantes de um mesmo cupinzeiro possibilitaram estimar a amplitude alimentar, calculando-se os intervalos entre os valores máximos e os mínimos (ver item 3.3.4) da composição de  $\delta^{13}\text{C}$  e de  $\delta^{15}\text{N}$  do corpo dos operários. Com isso, podemos registrar se a amplitude utilizada por uma espécie coincidiu com a de outra espécie coabitante, ou seja, se as espécies sofreram sobreposição no uso destes recursos. A análise da sobreposição foi realizada comparando-se a amplitude utilizada pela espécie construtora e sua(s) respectiva(s) espécie(s) inquilina(s) presentes no cupinzeiro.

### 3.3.2 Área de estudo

As coletas foram realizadas em julho de 2008, em fragmentos do cerrado, localizado no município de Sete Lagoas (19°27'57"S, 44°14'48"W), estado de Minas Gerais, Brasil. A altitude local é de 762 m acima do nível do mar. O clima, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo Aw-savana equatorial com inverno seco (Kottek et al., 2006). No ano de estudo, a precipitação total acumulada foi de 1607 mm<sup>3</sup> e a temperatura média mensal variou de 12.7°C a 28.9°C (Agritempo, 2009).

Na área estudada há grande ocorrência de cupinzeiros, os quais são frequentemente invadidos por cupins de outras espécies (Domingos & Gontijo, 1996). O ambiente é protegido de alterações antrópicas e sofre queimadas naturais esporadicamente. Por sua vez, os cupinzeiros e as

colônias amostradas estavam saudáveis e sem sinais de danos recentes.

### 3.3.3 Coleta de dados

Foram coletados arbitrariamente 11 cupinzeiros inteiros com inquilinos e construtores. Cada cupinzeiro foi removido por completo, colocado em saco plástico, enumerado e etiquetado com os dados locais. No laboratório, os cupinzeiros foram quebrados em fragmentos menores para completa procura e coleta dos cupins com pinças entomológicas. Os cupins foram agrupados em morfo-espécies para separar os indivíduos das diferentes colônias presentes em cada cupinzeiro. Para cada morfo-espécie coexistente no ninho foram separadas duas amostras: uma para identificação das espécies (ou morfo-espécies) e outra para análise isotópica (veja item 3.3.4).

Para a identificação foram coletados os operários e os soldados. As amostras foram preservadas em frascos contendo álcool 80%, rotuladas e posteriormente, identificadas em espécies (ou morfo-espécies) seguindo Mathews (1977); Constantino (2002) e através de comparação com amostras da seção de Isoptera do Museu de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (MEUV), onde o material foi depositado.

De cada cupinzeiro coletado anotamos a espécie construtora. Isto foi possível porque cada espécie de cupim tem um cupinzeiro típico. Utilizamos as características físicas: forma geométrica, dimensão, composição (solo ou material cartonado), textura e dureza da parede para a identificação da espécie construtora. Posteriormente, confirmamos a impressão inicial com as descrições encontradas na literatura (Araujo, 1970; Mathews, 1977).

### 3.3.4 Análise isotópica dos cupins

Para cada morfo-espécie encontrada dentro do cupinzeiro foram separados, sempre que possível, dez grupos (com aproximadamente 10 operários cada) para a análise dos isótopos estáveis de carbono e de nitrogênio. Esses cupins foram acondicionados em frascos contendo água destilada e congelados para evitar alterações nos sinais isotópicos. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 48 horas, maceradas e peneiradas (mesh=100). A razão isotópica ( $\delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}$ ) de cada amostra (1,5  $\mu\text{g}$ ) foi determinada em espectrômetro de massa de razão isotópica (ANCA-GSL 20-20, SerCon, UK), do Laboratório de Isótopos Estáveis do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

A abundância natural de  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  foi expressa por mil (‰) pela fórmula:

$$\delta X = \frac{R_A - R_{PI}}{R_{PI}} * 1000 \quad (3.1)$$

onde  $\delta X$  é a razão do isótopo raro para o isótopo abundante relativo a um Padrão Internacional.  $R_A$  é a razão isotópica entre os isótopos de estáveis de carbono  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ou nitrogênio  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  da amostra.  $R_{PI}$  é a razão isotópica do Padrão Internacional. O padrão para carbono é a rocha calcária (PDB) da formação Peedee do Grand Canyon nos Estados Unidos e o do nitrogênio é o nitrogênio atmosférico.

### 3.3.5 Determinação da amplitude e da sobreposição alimentar

A amplitude alimentar, ou seja, a faixa de recursos alimentares utilizada pelos indivíduos de cada espécie (morfo-espécie) de cupins coexistentes nos cupinzeiros, foi estimada calculando-se os intervalos en-

tre os valores mínimos e máximos de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  (Fig. 3.1) do corpo dos operários.

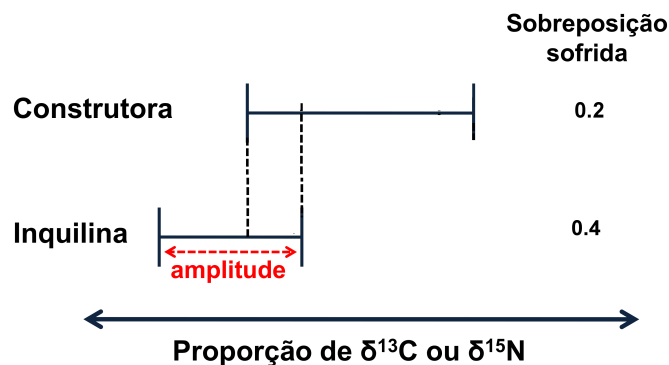


Figura 3.1: Representação das amplitudes e da sobreposição alimentar das espécies de cupins construtora e inquilina coexistentes em um cupinzeiro. A amplitude alimentar dos cupins de cada espécie corresponde ao intervalo entre o valor mínimo e máximo de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) ou de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰). A sobreposição corresponde à proporção da amplitude de cada espécie que coincide com a de outra espécie. A sobreposição alimentar total de cada espécie é a proporção total que sofre sobreposição com as amplitudes de outras espécies.

A sobreposição alimentar foi considerada como sendo o intervalo em que a amplitude alimentar de  $\delta^{13}\text{C}$  ou de  $\delta^{15}\text{N}$  de uma espécie coincidiu com a de outra espécie presente no mesmo cupinzeiro. A proporção de sobreposição alimentar foi considerada o valor da sobreposição dividido pela amplitude e foi calculada para cada par de espécie (Fig. 3.1).

### 3.3.6 Análise estatística

Foram feitas análises de variância (ANOVA) aninhada para testar se a diferenciação no uso dos recursos alimentares entre construtores e inquilinos foi promovida pelo uso diferencial do carbono, do nitrogênio ou ambos. Esta análise possibilitou incluir o aninhamento existente dos coabitantes (construtor e inquilinos) dentro de cada cupinzeiro.

Assim, testamos se proporção de sobreposição alimentar apresentada pelos construtores (variável  $y$ ) ocorre no consumo do carbono, do nitrogênio ou de ambos (variável  $x$ ). Também avaliamos se a proporção de sobreposição alimentar apresentada pelos inquilinos (variável  $y$ ) é diferente entre o consumo do carbono e do nitrogênio (variáveis  $x$ ).

As variáveis respostas  $y$  foram transformadas em arco-seno conforme Crawley (2007) para estabilizar a variância dos dados de proporção (ver exemplo em Panis et al. (2005)).

As coletas incluíam cupinzeiros construídos por diferentes espécies, por isso os modelos completos também testaram a influência da espécie construtora na sobreposição entre construtores e inquilinos coexistentes. Os modelos completos incluíam as variáveis explicativas e suas interações ( $asin(sobreposição/amplitude) \sim Recurso * EspConstrutora + Error(cupinzeiro/Recurso)$ ). Foi avaliado separadamente a sobreposição apresentada pelos construtores e pelos inquilinos.

A simplificação dos modelos procedeu-se através da retirada dos termos não significativos ( $P < 0,05$ ) do modelo, sendo extraídos primeiro os termos mais complexos e, posteriormente os de menor complexidade. Quando dois termos de mesma complexidade foram não significativos foi extraído primeiro o de menor deviance. As análises foram realizadas através do programa R (R Development Core Team, 2009) com distribuição de erros Normal.

### 3.4 Resultados

Dentre os 11 cupinzeiros, quatro foram construídos por *Constrictotermes cyphergaster* e continham uma única espécie inquilina por cupinzeiro (Tab. 3.1). Os outros sete cupinzeiros foram construídos por *Velocitermes heteropterus* e continham de uma a seis espécies inquilinas (Tab. 3.1). Algumas espécies inquilinas coexistentes nos cupinzeiros de *V. heteropterus* não puderam ser avaliadas isotopicamente devido à sua reduzida biomassa (<20 indivíduos presentes no cupinzeiro). Assim, a coabitação analisada variou de uma a quatro espécies inquilinas (Tab. 3.1).

*Neocapritermes* sp. foi a espécie avaliada com as menores amplitudes alimentares (0,04‰ em  $\delta^{13}\text{C}$  e 0,31‰ em  $\delta^{15}\text{N}$ , cupinzeiro 5, Tab. 3.2 e 3.3). Por sua vez, as espécies com as maiores amplitudes alimentares foram *V. heteropterus* (4,97‰ em  $\delta^{13}\text{C}$ , cupinzeiro 6) e *Grigiotermes* sp.1 (11,28‰ em  $\delta^{15}\text{N}$ , cupinzeiro 7, Tab. 3.2 e 3.3).

A proporção média de sobreposição sofrida por *C. cyphergaster* foi de 0,16 no consumo do  $\delta^{13}\text{C}$  e de 0 do  $\delta^{15}\text{N}$  (Tab. 3.2 e 3.3). Seus inquilinos apresentaram proporção de sobreposição média de 0,50 no consumo do  $\delta^{13}\text{C}$  e de 0 do  $\delta^{15}\text{N}$  (Tab. 3.2 e 3.3).

*V. heteropterus* teve a proporção de sobreposição média de 0,20 no consumo do  $\delta^{13}\text{C}$  e de 0,09 do  $\delta^{15}\text{N}$  (Tab. 3.2 e 3.3). Por sua vez, os inquilinos de *V. heteropterus* mostraram sobreposição na proporção média de 0,37 no consumo do  $\delta^{13}\text{C}$  e de 0,05 do  $\delta^{15}\text{N}$  (Tab. 3.2 e 3.3).

Os construtores *C. cyphergaster* e *V. heteropterus* apresen-

taram sobreposição semelhante no uso dos recursos alimentares ( $F_{1,9}=1,09$ ,  $P=0,32$ ). Já os inquilinos de *C. cyphergaster* e de *V. heteropterus* mostraram sobreposição semelhante no uso dos recursos alimentares ( $F_{1,9}=0,18$ ,  $P=0,68$ ).

Os construtores apresentaram sobreposição alimentar semelhante quanto ao uso do  $\delta^{13}\text{C}$  e do  $\delta^{15}\text{N}$  ( $F_{1,10}=1,01$ ,  $P=0,34$ , Tab. 3.2, Fig. 3.2a). Por sua vez, os inquilinos apresentaram ( $F_{1,10}=8,66$ ,  $P=0,01$ , Tab. 3.2, Fig. 3.2b) maior sobreposição alimentar no uso do  $\delta^{13}\text{C}$  do que no uso do  $\delta^{15}\text{N}$ .

Tabela 3.1: Espécies (morfo-espécies), respectivas famílias e subfamílias de cupins coexistentes em cupinzeiros, município de Sete Lagoas, MG, Brasil.

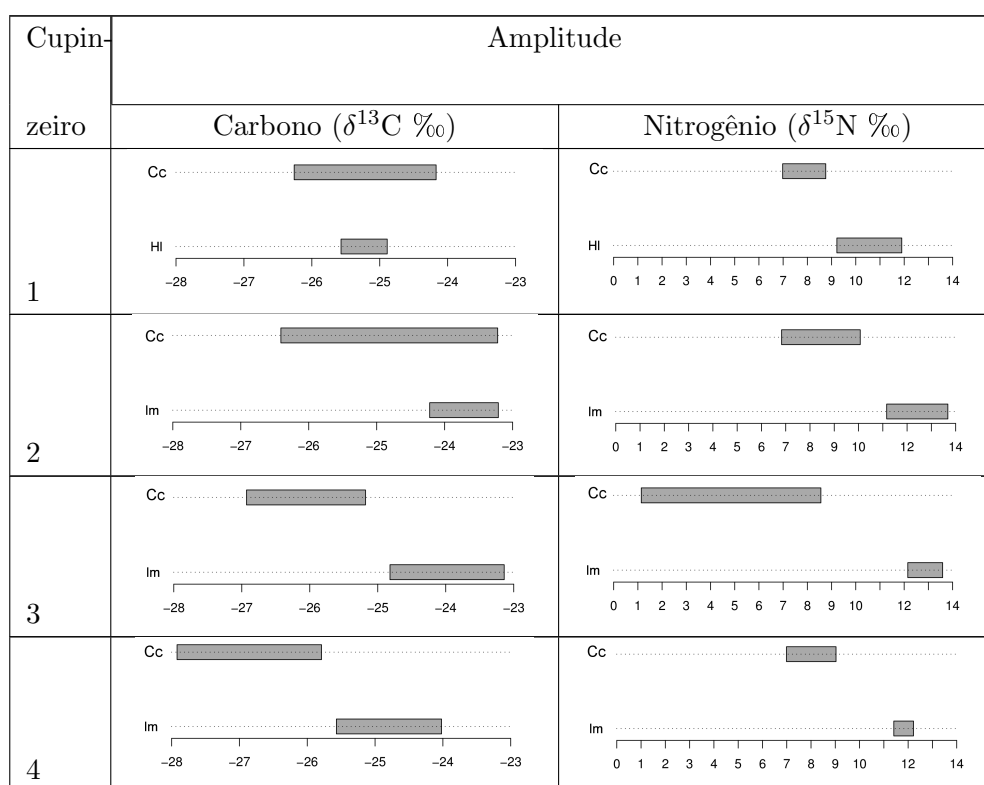
Espécies ou morfo-espécies	Cupinzeiro										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>RHINOTERMITIDAE</b>											
<b>Heterotermitinae</b>											
<i>Heterotermes longiceps</i> (Snyder)	c					b			b		
<i>Heterotermes tenuis</i> (Hagen)											
<b>TERMITIDAE</b>											
<b>Apicotermatinae</b>											
<i>Anoplotermes</i> sp.1						c	c				
<i>Anoplotermes</i> sp.2						c					
<i>Anoplotermes</i> sp.3										c	
<i>Grigiotermes</i> sp.1							c				
<i>Grigiotermes</i> sp.2									c		
<i>Grigiotermes</i> sp.3						b					
<b>Syntermitinae</b>											
<i>Armitermes euamignathus</i> Silvestri								c			c
<i>Cyranotermes timuassu</i> Araujo											b
<i>Labiotermes brevilabius</i> Emerson & Banks					c	c				c	
<i>Procornitermes araujoii</i> Emerson											c
<b>Nasutitermitinae</b>											
<i>Constrictotermes cyphergaster</i> (Silvestri)	a	a	a	a							
<i>Nasutitermes coripoensis</i> (Holmgren)									b		
<i>Nasutitermes</i> sp.1									b		
<i>Nasutitermes</i> sp.2											b
<i>Subulitermes</i> sp. (Holmgren)										b	
<i>Velocitermes heteropterus</i> (Silvestri)					a	a	a	a	a	a	a
<b>Termitinae</b>											
<i>Inquilinitermes microcerus</i> (Silvestri)		c	c	c							
<i>Neocapritermes</i> sp. Holmgren					c					c	
<i>Orthognatotermes</i> sp. Holmgren											b
<i>Spinitermes trispinosus</i> (Bagen & Bates)							c				b
Número de espécies (morfo-espécies) coexistentes	2	2	2	2	3	6	4	2	5	5	7

a) Espécie construtora do cupinzeiro

b) Espécie inquilina que foi encontrada no ninho, mas não foi possível fazer a análise isotópica devido a sua baixa biomassa.

c) Espécie inquilina que foi analisada isotopicamente.

Tabela 3.2: Amplitude alimentar no uso do  $\delta^{13}\text{C}$  e do  $\delta^{15}\text{N}$  pelos cupins construtores e inquilinos coabitantes de cupinzeiros. Cupinzeiros de 1 a 4 foram construídos por *Constrictotermes cyphergaster* e de 5 a 11 foram construídos por *Velocitermes heteropterus*. Abreviações: A1, *Anoplotermes* sp.1; A2, *Anoplotermes* sp.2; A3, *Anoplotermes* sp.3; Ae, *Armitermes euamignathus*; Cc, *C. cyphergaster*; G1, *Grigiotermes* sp.1; G2, *Grigiotermes* sp.2; Hl, *Heterotermes longiceps*; Im, *Inquilinitermes microcerus*; Lb, *Labiotermes brevilabius*; Ne, *Neocapritermes* sp.; Pa, *Procornitermes araujoii*; St, *Spinitermes trispinosus*; e Vh, *V. heteropterus*.



Continua na próxima página

Tabela 3.2: Continuação

Cupin- zeiro	Amplitude	
	Carbono ( $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ )	Nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N} \text{‰}$ )
5		
6		
7		
8		
9		

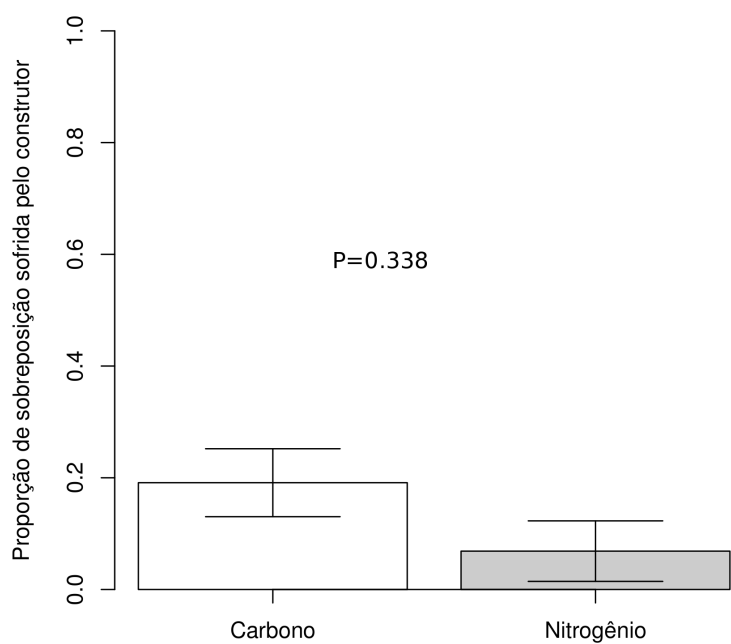
Continua na próxima página

Tabela 3.2: Continuação

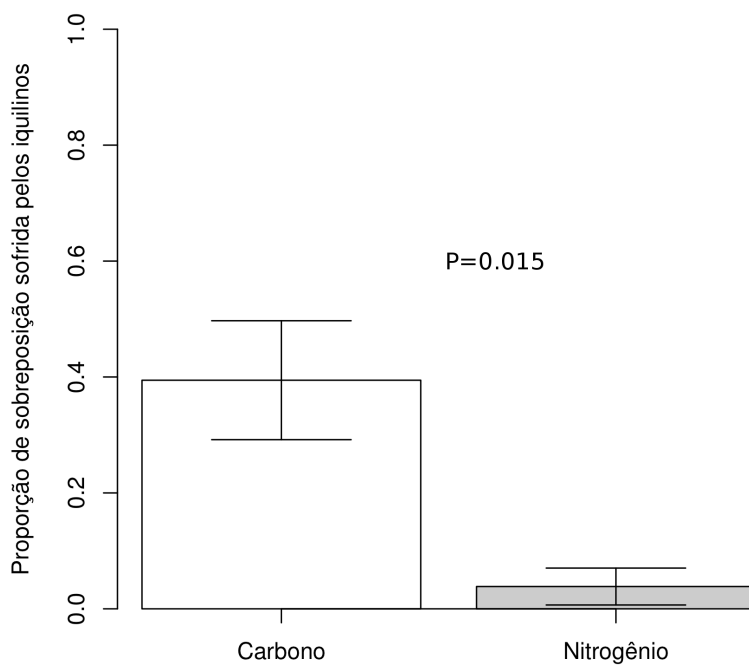
Cupin-zeiro	Amplitude	
	Carbono ( $\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$ )	Nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N} \text{ ‰}$ )
10	Vh	Vh
	Ne	Ne
	Lb	Lb
	A3	A3
11	Vh	Vh
	Pa	Pa
	Ae	Ae

Tabela 3.3: Valores mínimos, máximos e média da amplitude alimentar e da proporção de sobreposição no uso do  $\delta^{13}\text{C}$  e do  $\delta^{15}\text{N}$  sofrida pelos cupins construtores e inquilinos coabitantes de cupinzeiros, município de Sete Lagoas, MG, Brasil, para as espécies construtoras (*Constrictotermes cyphergaster* ou *Velocitermes heteropterus*) e suas inquilinas.

Coabitante	Amplitude (‰)						Proporção de Sobreposição Sofrida					
	$\delta^{13}\text{C}$			$\delta^{15}\text{N}$			$\delta^{13}\text{C}$			$\delta^{15}\text{N}$		
	Min.	Max.	Média	Min.	Max.	Média	Min.	Max.	Média	Min.	Max.	Média
<i>Constrictotermes cyphergaster</i>	1,75	3,19	2,29	1,78	7,42	3,62	0	0,32	0,16	0	0	0
Inquilinos de <i>C. cyphergaster</i>	0,68	1,68	1,23	0,81	2,68	1,86	0	1,00	0,50	0	0	0
<i>Velocitermes heteropterus</i>	1,55	4,97	2,71	1,01	8,53	3,07	0	0,92	0,20	0	1,00	0,09
Inquilinos de <i>V. heteropterus</i>	0,04	3,24	1,58	0,31	11,28	3,12	0	1,00	0,37	0	0,60	0,05



(a) Sofrida pelos construtores



(b) Sofrida pelos inquilinos

Figura 3.2: Proporção de sobreposição alimentar no uso do  $\delta^{13}\text{C}$  e do  $\delta^{15}\text{N}$  sofrida pelos construtores e inquilinos coabitantes de cupinzeiros. A sobreposição sofrida pelos construtores foi semelhante no uso do  $\delta^{13}\text{C}$  e do  $\delta^{15}\text{N}$  ( $F_{1,10}=1,01$ ,  $P=0,338$ ). Os inquilinos sofreram maior sobreposição do  $\delta^{13}\text{C}$  do que do  $\delta^{15}\text{N}$  ( $F_{1,10}=8,66$ ,  $P=0,015$ ).

### 3.5 Discussão

Nossos resultados mostram que a diferenciação no uso dos recursos alimentares entre construtores e inquilinos em cupinzeiros foi promovida pelo uso diferencial do carbono e do nitrogênio. Isto porque os construtores apresentaram baixa sobreposição do carbono ( $\bar{x}=0,19$ ) e do nitrogênio ( $\bar{x}=0,06$ ) (Fig. 3.2a). Enquanto, os inquilinos apresentaram maior sobreposição do carbono ( $\bar{x}=0,39$ ) do que do nitrogênio ( $\bar{x}=0,04$ ) (Fig. 3.2b).

Ao contrário da nossa hipótese, os construtores possivelmente são intolerantes a qualquer tipo de sobreposição, uma vez que todos os inquilinos encontrados apresentaram baixa sobreposição na utilização do carbono e do nitrogênio com a espécie construtora. Os cupins da colônia construtora possivelmente podem controlar a entrada de qualquer organismo que tentar invadir o cupinzeiro (Cristaldo (2010); Marins et al. *em preparação*). Isto é possível porque possuem um complexo sistema de defesa que inclui estruturas físicas (cupinzeiro) e biológicas (operários e soldados) que regulam a entrada de intrusos (Noirot & Darlington, 2000; Seid et al., 2008). Desta forma, os inquilinos que coexistem em cupinzeiros potencialmente devem desenvolver estratégias para evitar serem detectados pela colônia construtora. Uma hipótese plausível com base nestes resultados é de que os inquilinos que consomem carbono e nitrogênio distintos dos construtores não são facilmente encontrados e, conseqüentemente expulsos.

Corroborando a hipótese desse trabalho, os inquilinos coexistentes no cupinzeiros apresentaram maior sobreposição no carbono do

que no nitrogênio (Fig. 3.2b) possivelmente, porque o carbono não é um recurso limitante. O carbono está amplamente disponível no ambiente e pode ser encontrado em quantidade suficiente em todos os itens alimentares frequentemente utilizados pelos cupins (Traniello & Leuthold, 2000) como madeira, líquens, briófitas, serapilheira, madeira em decomposição, solo e húmus (Davies, 2002). Desta maneira, é possível que a sobreposição em carbono apresentada pelos inquilinos permite a manutenção das colônias inquilinas, assim como sua coexistência com construtores via sobreposição de recursos sob alta oferta.

O nitrogênio, ao contrário do carbono, é bastante restrito nos ecossistemas terrestres (Vitousek & Howarth, 1991) e dentre as fontes alimentares utilizadas pelos cupins normalmente a proporção de C/N é muito maior do que a encontrada em seus próprios tecidos (Higashi et al., 1992; Traniello & Leuthold, 2000). Assim, os cupins precisam suprir suas necessidades selecionando os recursos e buscando fontes adicionais de nitrogênio ou, eliminando o excesso de carbono ingerido (Higashi et al., 1992; Traniello & Leuthold, 2000). Possivelmente, o custo na partição do nitrogênio com outros indivíduos seja muito elevado, o que poderia tornar inviável a manutenção da colônia inquilina, uma vez que este recurso é essencial para o metabolismo dos cupins (La Fage & Nutting, 1978). Desta maneira, o uso do nitrogênio deve ser determinante para o estabelecimento e permanência dos inquilinos porque sua sobreposição é pouco tolerada entre os cupins coexistentes em cupinzeiros.

Teoricamente são as diferenças na utilização dos recursos limitantes e as semelhanças na capacidade competitiva que possibilitam a coexistência entre as espécies (Mayfield & Levine, 2010). Entre os cupins construtores e inquilinos a coexistência parece ser mediada pelas diferenças

no uso do nitrogênio, uma vez que verificamos baixa sobreposição deste recurso ( $<0.1$ ). Desta maneira, como a diferenciação no uso dos recursos é alta, a capacidade competitiva destas espécies possivelmente tem pouca influência nesta coexistência (Fig. 3.3). Neste e em outros trabalhos a diferenciação interespecífica na utilização dos recursos têm sido considerada essencial na manutenção da diversidade de espécies para diferentes sistemas (Levine & HilleRisLambers, 2009).

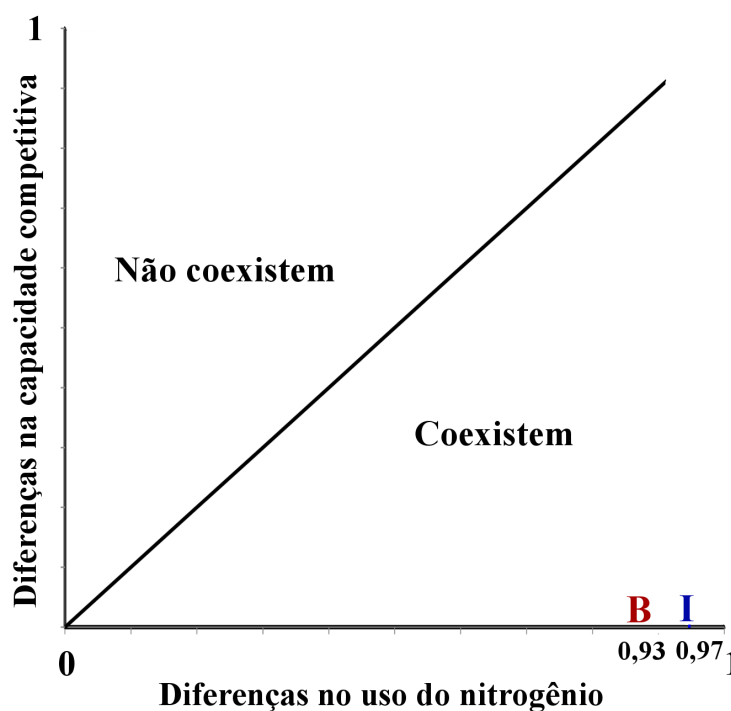


Figura 3.3: Relação entre capacidade competitiva e uso do  $\delta^{15}\text{N}$  pelos construtores e inquilinos coabitantes de cupinzeiros. **B**: construtor e **I**: inquilino.

Concluindo, cupins construtores e inquilinos se diferenciam no uso dos recursos alimentares. Para os inquilinos, esta diferenciação ocorre mais fortemente quanto ao uso do nitrogênio. Desta maneira, terá mais chance de coexistir no cupinzeiro o inquilino que: (i) causar no construtor baixa sobreposição no uso do carbono e do nitrogênio e (ii) apresentar baixa

sobreposição na utilização do nitrogênio.

Capítulo **4**

How to preserve termite samples in  
the field for carbon and nitrogen  
stable isotopes studies?

Daniela F. Florencio, Cassiano S. Rosa, Alessandra Marins, Paulo F.

Cristaldo, Ana P. A. Araújo, Ivo R. da Silva & Og DeSouza

*Aceito no periódico Rapid Communications in Mass Spectrometry*

## 4.1 Letters to the Editor

*Dear Editor,*

### **How to preserve termite samples in the field for carbon and nitrogen stable isotopes studies?**

The measurement of stable isotopes of carbon ( $^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}$ ) is a powerful tool in ecological studies, since it can indicate food preferences of organisms (Tayasu et al., 1997). This is possible because these isotopes are available in the environment and are acquired during feeding. So, the isotopic composition of animal tissues reflects the diet gained and assimilated throughout the animal's life (DeNiro & Epstein, 1978). Particularly for termites, whose diets vary subtly within a decomposition continuum from sound wood to highly humified material, isotope analyses can be rather revealing. In such cases, carbon isotope signals indicate the source (eg. C3 or C4 plants) (Spain & Reddell, 1996), whereas nitrogen isotopes generally reflect the decomposition degree of the diet (Ji & Brune, 2005, 2006) (although this is not straightforward for wood feeding termites which are able to fix  $\text{N}_2$  from the atmosphere) (Yamada et al., 2006).

The analyses demand specimens to be processed soon after collection to prevent deterioration and, therefore, isotopic changes. Termites, however, are highly prone to decompose due to their weakly chitinized and very fragile body. So, for this group, more attention to prevent dete-

rioration and isotopic alteration is needed. Currently, for isotopic analysis, termites are immediately dried at 60°C for 24h<sup>1,7-9</sup> (Tayasu et al., 1997, 2000, 2002a; Bourguignon et al., 2009) or frozen after collection (De Visser et al., 2008). Very often, however, collections occur in remote regions, away from well-equipped labs. In such places, fast processing is unfeasible, which demands techniques for specimens preservation to avoid sample decomposition.

The conventional technique for preserving termites is their immersion in ethanol 80% which maintains the morphological characteristics in the long term (Constantino, 2002). Being an organic compound with liposolvent capabilities, ethanol could affect carbon content and, hence, be unsuitable to preserve samples for carbon isotopic analyses (Tillberg, 2006). This theoretical unsuitability of ethanol, however, has not been always confirmed, for both vertebrates and invertebrates (Sarakinis et al., 2002). Ethanol-preserved tissues of quails (Hobson et al., 1997), sheep (Hobson et al., 1997), turtles (Barrow et al., 2008) and caddisflies (Sarakinis et al., 2002) have shown no alteration in carbon isotopic signature. Alternatives would include inorganic –carbon-free– preserving substances, of which sodium chloride (NaCl) seems the cheapest, best known, and worldwide available.

This work, therefore, aimed to establish a technique for preserving termites which would suit field work in remote regions while still allowing  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic analyses. To do so, isotopic as well as C/N ratios of stored samples of *Cornitermes cumulans* termites were compared to values for samples analysed immediately after collection. Stored samples were kept in vials containing (i) NaCl solution and (ii) ethanol. Our rationale is that stored samples should vary in their carbon and nitrogen content,

because (i) ethanol preserved samples are subjected to lipid loss, whereas (ii) NaCl preserved samples should keep carbon and nitrogen original content. Therefore, we hypothesize that freshly processed samples should not differ from NaCl preserved samples and would differ on carbon content from ethanol preserved ones.

The experiment was performed using workers (third instar and beyond) from three field colonies of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera, Termitidae), in Viçosa, state of Minas Gerais, in Southeastern Brazil. *Cornitermes* spp. are Neotropical termite species occurring in several habitats, including forests, “cerrados” (Brazilian savannas) and man-modified habitats, such as pastures or even gardens within cities, where they feed on living and dead grass and herbs (Canello, 1989).

As soon as mound fragments were taken to the laboratory, termite specimens were extracted and allocated to the appropriate treatments, as described below. Voucher specimens were preserved in 80% ethanol, labelled and identified by comparison with the collection of the Termite Section of the Entomological Museum (UFVB) of the Federal University of Viçosa (UFV). This work was carried out from December/2009 to February/2010.

From each termite mound, 30 samples of five workers each, were collected to compose ten replicates for each of the processing techniques below.

**Freshly processed:** workers placed in vials with distilled water, immediately frozen at  $-14^{\circ}\text{C}$  for about two hours and then freeze-dried. This is thought to be the optimal procedure for isotopic analyses, as it avoids sample degradation.

**Preserved in ethanol:** workers placed in vials with etha-

nol 80% at room temperature for 49 days, until washed in distilled water and placed in vials with distilled water to be freeze-dried. The ethanol concentration was confirmed by an alcoholmeter, after adding distilled water to 92.8° GL commercial sugar cane ethanol (Miyako do Brazil Industria e Comercio Ltda, Guarulhos, Brazil). This is the traditional method to maintain termite samples in collections, and it is expected to be only a partially suitable procedure, as it is bound to affect  $\delta^{13}\text{C}$  isotopic signal, because the alcohol could leach lipids and add carbon to the sample.

**Preserved in NaCl:** workers placed in vials containing a brine solution of table salt (300 g/L), at room temperature for 49 days, until freeze-dried. A brine solution was obtained by adding salt to distilled water, at room temperature, until the water could no longer dissolve any more salt. This is thought to be the best procedure to our aims, as it is cheap, straightforward, and prevents samples decomposition without masking isotopic signals, as the compound is void of carbon and nitrogen.

To proceed with the isotopic analyses, all samples were freeze-dried for 48 hours, ground, sieved (mesh=100) and placed in tin capsules.

$\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic ratios and C/N ratio in each sample (1.5  $\mu\text{g}$ ) were determined in a mass spectrometer for isotope ratio (ANCA-GSL 20-20, SerCon Ltd, Cheshire, UK), at the Laboratory of Stable Isotopes, Soils Department, Federal University of Viçosa, Brazil.

The abundance of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in the samples were expressed in  $\delta$  notation, defined as parts per thousand (‰) deviations from an International Standard, as given by the formula:

$$\delta X = \frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} * 1000 \quad (4.1)$$

where  $R$  is the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratio and for the sample ( $R_{\text{sample}}$ ) for

the International Standard ( $R_{standard}$ ). X stands for the “heavy” isotopes  $^{13}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}$ . Standards are Pee Dee Belemnite (PDB) limestone for  $\delta^{13}\text{C}$  and atmospheric nitrogen for  $\delta^{15}\text{N}$ .  $\delta\text{X}$  values denote isotopic enrichment or depletion relative to the standard; positive values meaning that the sample contains more of the “heavy” stable isotope. The estimated analytical precision of these measurements was  $\pm 0.1\%$  for carbon and of  $\pm 0.2\%$  for nitrogen. One laboratory standard was analysed for every twelve unknown samples in each analytical sequence, allowing instrument drift to be corrected.

Generalized linear models were used to verify whether  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic signals of termite samples differed between processing techniques, *i.e.*, termites freshly processed, preserved in ethanol, or preserved in NaCl. Analyses were performed independently for each y-variable ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  or C/N), and included mounds as a blocking factor. Contrast analysis inspected statistical similarity between processing techniques. Modelling was performed using R (R Development Core Team, 2009), with Normal errors confirmed by residual analysis.

Samples preserved in NaCl and ethanol did not show any sign of decomposition by the end of the experiment (49 days). The external morphology of termite individuals was fully preserved by NaCl or ethanol.

$\delta^{13}\text{C}$  signals for freshly processed termite samples did not differ from signals for samples preserved in NaCl or in ethanol samples (Tabs. 4.1 and 4.3).

$\delta^{15}\text{N}$  signals for freshly processed samples did not differ from signals for all other processing techniques (Tabs. 4.1 and 4.3).

C/N ratios for freshly processed termite samples differed from ratios for samples preserved in NaCl and did not differ from ratios for samples preserved in ethanol (Tabs. 4.2 and 4.3).

Tabela 4.1: Mean  $\pm$  standard deviation (SD) for  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic signals of termite samples subjected to differing processing techniques.

Technique	Mean $\pm$ SD	
	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Freshly processed	-12.59 $\pm$ 0.15	17.79 $\pm$ 0.86
Preserved in NaCl solution	-12.21 $\pm$ 0.19	17.12 $\pm$ 1.23
Preserved in Ethanol	-12.88 $\pm$ 0.15	16.40 $\pm$ 0.30

Tabela 4.2: Carbon and nitrogen content (mean  $\pm$  standard deviation) of termite samples subjected to differing processing techniques.

Technique	Mean $\pm$ SD		
	C (%)	N (%)	ratio (C/N)
Freshly processed	38.23 $\pm$ 0.36	6.50 $\pm$ 0.07	5.89 $\pm$ 0.05
Preserved in NaCl solution	7.80 $\pm$ 0.50	1.21 $\pm$ 0.05	6.32 $\pm$ 0.20
Preserved in Ethanol	35.90 $\pm$ 0.38	6.39 $\pm$ 0.09	5.64 $\pm$ 0.07

Our results bring promising news to termite studies demanding carbon and nitrogen isotopic analyses. Samples preserved in ethanol 80% or in NaCl for 49 days can present isotopic signals similar to freshly processed samples (Tabs. 4.1 and 4.3). This would make both methods as potentially suitable for termite preservation, contradicting our expectations which previewed ethanol as an unsuitable preservative.

The scenario is not so straightforward, however. On one hand, salt-treated termite samples did not present alterations in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic signatures, and that is consistent with Ponsard & Amlou (1999) who tested the effects of salted water (33 g/L) on isotopic signals of *Drosophila melanogaster*. On the other hand, NaCl solution did increase the C/N ratio of preserved termite samples relative to fresh ones, and

Tabela 4.3: Models and contrasts used to inspect the effects of processing techniques (x variable) on the  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic signals and C/N ratio of termite samples (y variables). Treatment levels are: Fresh= freshly processed, NaCl= preserved in NaCl solution and Ethanol= preserved in 80% ethanol. Contrasts were performed between the full model (m1) and a model in which the concerned treatment levels were amalgamated into a single level. Amalgamation is indicated by the symbol  $\&$ . The termite mounds were included as a blocking factor. Models with Normal error distribution. NS= $p>0.05$  and  $*=p<0.05$ .

Model										
m1: $y \sim \text{mound} + \text{treatments (Fresh, NaCl, Ethanol)}$										
m2: $y \sim \text{mound} + \text{treatments (Fresh\&NaCl, Ethanol)}$										
m3: $y \sim \text{mound} + \text{treatments (Fresh\&Ethanol, NaCl)}$										
Source	$\delta^{13}\text{C}$				$\delta^{15}\text{N}$			C/N		
	df	F	<i>p</i>		F	<i>p</i>		F	<i>p</i>	
Contrasts										
m1 $\times$ m2	1	3.05	0.0844	NS	0.37	0.5456	NS	6.72	0.0112	*
m1 $\times$ m3	1	1.69	0.1972	NS	1.60	0.2087	NS	2.17	0.1447	NS
Error	86									

this was achieved by a larger depletion in nitrogen than in carbon content of such samples (Tabs. 4.2 and 4.3). The reasons for both (i) depletion of nitrogen and carbon and (ii) larger nitrogen relative to carbon depletion in salt-treated samples remain to be investigated. It is puzzling to realize, however, that despite differences in carbon and nitrogen content, isotopic signatures have been preserved in samples treated with NaCl. Caution prevent us to recommend such a technique to preserve termite samples, before further research is carried out.

A better picture arises from ethanol-preserved samples, whose carbon and nitrogen isotopic signals did not differ from those of fresh samples (Tabs. 4.1 and 4.3), a result which is in-line with other studies on

insects such as caddisflies (Sarakinos et al., 2002), despite in disagreement with results on *Drosophila* flies (Ponsard & Amlou, 1999) and ants (Tillberg, 2006). It is however reassuring to notice that C/N ratio of alcohol-treated samples did not differ from C/N of fresh ones (Tabs. 4.2 and 4.3), implying that under the time frame here considered (49 days), termite samples had their natural carbon and nitrogen preserved. Ethanol preservation would seem alluring to termitologists, because termites are traditionally collected and preserved in such a chemical. A single collection, hence, could provide specimens for isotopic analyses and voucher samples. In addition, ethanol can also be used to preserve termite samples for DNA analyses (Szalanski et al., 2003).

Different mechanisms have been proposed to explain how preservation techniques may affect  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios in samples. Among them it has been hypothesized that an enrichment can occur through the loss of molecules carrying the “lighter” isotope (*e.g.*, lipid molecules or nitrogenous excreta), or by the assimilation of the “heavier” one possibly present in the preserving agent (Sarakinos et al., 2002; Barrow et al., 2008).

This would easily explain the absence of isotopic alterations in NaCl preserved samples as compared to freshly processed ones, but not their increased C/N ratio. NaCl is supposed to only promote dissection of tissues, without loss of constituent materials.

Another result remains to be explained: the absence of alterations in carbon isotopic signals of ethanol preserved samples. Samples subjected to organic solvents such as ethanol may suffer changes in carbon isotopic signals by both, loss of dissolved lipids or gain of solvent’s constituent carbon. By removing lipids, which are depleted of  $^{13}\text{C}$  and rich in  $^{12}\text{C}$ , ethanol would enlarge  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  for the sample (Wessels & Hahn, 2010)

amplifying its  $\delta^{13}\text{C}$  signal. Furthermore, carbon from ethanol constitution might be incorporated and alter the isotopic signals of the samples (Bugoni et al., 2008). Contrarily to our expectations, termites samples here analysed kept natural carbon isotopic signals, despite being preserved in ethanol (Tabs. 4.1 and 4.3). A similar result was found for tissues of quails (Hobson et al., 1997), sheep (Hobson et al., 1997), turtles (Barrow et al., 2008) and caddisflies (Sarakinos et al., 2002) preserved for up to 60 days and compared with samples dried immediately after collection (freeze-dried or at  $60^\circ\text{C}$ ). Reasons for such a result would include fast exposure to solvent preventing changes in the chemical composition of samples or carbon losses from dissolved lipids being compensated by gains from ethanol molecule. Support for this last hypothesis could be found on the fact that we used ethanol from sugar cane (a  $\text{C}_4$  plant) and the termite studied (*C. cumulans*) may feed on  $\text{C}_4$  grasses. Whether or not these occurred to our samples, it is beyond the aims of our work. It seems, however more conservative to suspect that no gains or losses have occurred. In fact, the alternative hypothesis would call for carbon losses from termite tissues to be counteracted –equally and simultaneously– by carbon gains from the preserving alcohol, which would seem a more convoluted explanation.

In conclusion, 80% ethanol can be safely recommended as a preservative for termite samples for up to 49 days prior to carbon and nitrogen isotopic analyses. NaCl preservation is a promising technique, still demanding more conclusive research.

Additional studies are needed to evaluate the suitability of

such methods for longer preservation periods.

### **Acknowledgements**

We thank J.M. Waquil from EMBRAPA for the logistic support, and E.E.L. Borges J.M. Ferreira from the Lab Analysis Forest Seeds-UFV for freeze-drying termite samples. This work was partially funded by FAPEMIG (CRA-APQ-02124-09 and BPD-00135-10), CNPq (306081/2007-5 and 200271 /2010-5), CAPES. All computational work was performed using free software (GNU-Linux/Debian, L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, XEmacs, Inkscape, R, OpenClipArt, Xournal, among others). This is contribution 44 of the Termitology Lab at Federal University of Viçosa, Brazil (<http://www.isopectera.ufv.br>).

# Capítulo 5

## Conclusões

1. Os resultados desta tese sugerem que a coexistência entre cupins construtores e inquilinos em cupinzeiros é mediada pela diferenciação no uso dos recursos alimentares.
2. Os inquilinos consomem recursos de fontes diferentes (carbono) e de níveis de decomposição (nitrogênio) distintos dos construtores.
3. Essa diferenciação, para os inquilinos, é mais evidente no uso do recurso menos abundante, como o nitrogênio. Para os construtores, a diferenciação é semelhante no uso do carbono e do nitrogênio.
4. Os cupins podem ser preservados em álcool ou em solução de NaCl por até 49 dias para análise isotópica de  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$ . Esta informação contribui para posteriores estudos de análises isotópicas em cupins, facilitando a coleta e a preservação adequada do material.
5. A utilização diferencial de recursos entre cupins construtores e inquilinos podem contribuir para explicar os padrões de coexistência em cupinzeiros, assim como possivelmente os padrões de diversidade destes organismos em diferentes ecossistemas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, P. The theory of limiting similarity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.14, p.359–376, 1983.
- AGRITEMPO. Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. Embrapa Informática Agropecuária. <http://www.agritempo.gov.br/agroclima/sumario> (accessed 13 July 2009), 2009.
- ARAÚJO, R. Termites of the Neotropical Region. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., (Ed.), **Biology of Termites**, Academic Press, IIv., 1970.
- BARROS, E.; CURMI, P.; HALLAIRE, V.; CHAUVEL, A.; LAVELLE, P. The role of macrofauna in the transformation and reversibility of soil structure of an oxisol in the process of forest to pasture conversion. **Geoderma**, v.100, p.193–213, 2001.
- BARROW, L. M.; BJORNDAL, K. A.; REICH, K. J. Effects of preservation method on stable carbon and nitrogen isotope values. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.81, p.688–693, 2008.
- BEARHOP, S.; ADAMS, C. E.; WALDRON, S.; FULLER, R. A.; MACLEOD, H. Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. **Journal of Animal Ecology**, v.73, p.1007–1012, 2004.
- BERNHARDT-RÖMERMANN, M.; RÖMERMANN, C.; PILLAR, V. D.; KUDERNATSCH, T.; FISCHER, A. High functional diversity is related to high nitrogen availability in a Deciduous Forest – Evidence from a functional trait approach. **Folia Geobotanica**, v.45, p.111–124, 2010.

- BLACK, H. I. J.; OKWAKOL, M. J. N. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of termites. **Applied Soil Ecology**, v.6, p.37–53, 1997.
- BOOTSMA, H. A.; HECKY, R. E.; HESSLEIN, R. H.; TURNER, G. F. Food partitioning among Lake Malawi nearshore fishes as revealed by stable isotope analyses. **Ecology**, v.77, n.4, p.1286–1290, 1996.
- BOUILLON, A. Termites of the Ethiopian Region. In: KRISHNA, K.; WESSNER, F. M., (Ed.), **Biology of Termites**, Academic Press, Iiv., 1970.
- BOURGUIGNON, T.; SOBOTNÍK, J.; LEPOINT, G.; MARTIN, J.; ROISIN, Y. Niche differentiation among Neotropical soldierless soil-feeding termites revealed by stable isotope ratios. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, p.2038–2043, 2009.
- BUGONI, L.; MCGILL, R. A. R.; FURNESS, R. W. Effects of preservation methods on stable isotope signatures in bird tissues. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.22, p.2457–2462, 2008.
- CANCELLO, E. Revisão de *Cornitermes* Wasmann (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae), 1989. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.
- CARRIJO, T. F.; BRANDÃO, D.; OLIVEIRA, D. E.; COSTA, D. A.; SANTOS, T. Effects of pasture implantation on the termite (Isoptera) fauna in the Central Brazilian Savanna (Cerrado). **Journal of Insect Conservation**, v.13, p.575–581, 2009.
- CHASE, J. M.; LEIBOLD, M. A. **Ecological Niches: linking classical and contemporary approaches**. The University of Chicago Press, 2003. 212p.
- CONSTANTINO, R. Abundance and diversity of termites (Insecta: Isoptera) in two sites of primary rain forest in Brazilian Amazonia. **Biotropica**, v.24, p.420–430, 1992.
- CONSTANTINO, R. An illustrated key to Neotropical termite genera (Insecta: Isoptera) based primarily on soldiers. **Zootaxa**, v.67, p.1–40, 2002.

- CONSTANTINO, R. Padrões de diversidade e endemismo de térmitas no bioma do Cerrado. In: SCARIOT, A. O.; SILVA, J. C. C.; FELFILI, J. M. (Ed.). **Biodiversidade, Ecologia e Conservação do Cerrado**. Ministério do Meio Ambiente, 2005. p.319-333.
- CORNELL, H.; LAWTON, J. Species interactions, local and regional processes, and limits to the richness of ecological communities: a theoretical perspective. **Journal of Animal Ecology**, v.61, p.1-12, 1992.
- COSTA, D.; CARVALHO, R.; LIMA FILHO, G.; BRANDÃO, D. Inquilines and invertebrate fauna associated with termite nests of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) in the Emas National Park, Mineiros, Goiás, Brazil. **Sociobiology**, v.53, p.443-453, 2009.
- COSTA, D. A. Inquilinos associados a ninhos de *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae) em uma área de campo no Parque Nacional das Emas, GO, 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás.
- COUTINHO, L. M. Fire in the ecology of the Brazilian cerrado. In: GOLDAMMER, J. G., (Ed.), **Fire in the tropical biota: Ecosystem processes and global challenges**, Springer-Verlag, 84v., 1990.
- CRAWLEY, M. **The R Book**. John Wiley & Sons Ltd, 2007. 942p.
- CRISTALDO, P. F. Mecanismos de defesa em ninhos de cupins (Insecta: Isoptera), 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- CUNHA, H. F. D.; COSTA, D. A.; SANTO FILHO, E.; SILVA, L. O.; BRANDÃO, D. Relationship between *Constrictotermes cyphergaster* and inquiline termites in the cerrado (Isoptera: Termitidae). **Sociobiology**, v.42, p.761-770, 2003.
- DANGERFIELD, J. M.; MCCARTHY, T. S.; ELLERY, W. N. The mound-building *Macrotermes michaelseni* as an ecosystem engineer. **Journal of Tropical Ecology**, v.14, p.507-520, 1998.
- DAVIES, R. G. Feeding group responses of a neotropical termite assemblage to rain forest fragmentation. **Oecologia**, v.133, p.233-242, 2002.

- DE VISSER, S. N.; FREYMAN, B. P.; SCHNYDER, H. Trophic interactions among invertebrates in termitaria in the African savanna: a stable isotope approach. **Ecological Entomology**, v.33, p.758–764, 2008.
- DENIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animal. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.42, p.495–506, 1978.
- DESOUZA, O.; ARAÚJO, A. P. A.; REIS-JR, R. Trophic controls delaying foraging by termites: reasons for the ground being brown? **Bulletin of Entomological Research**, v.99, n.6, p.603–609, 2009.
- DESOUZA, O.; BROWN, V. Effects of habitat fragmentation on amazonian termite communities. **Journal of Tropical Ecology**, v.10, p.197–206, 1994.
- DOMINGOS, D. J.; GONTIJO, T. A. Multi-occupation of termites mounds in cerrado vegetation in South-eastern Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.56, p.717–723, 1996.
- DONOVAN, S. E.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D. E. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. **Ecological Entomology**, v.26, p.356–366, 2001.
- EGGERS, T.; JONES, T. H. You are what you eat...or are you? **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, p.265–266, 2000.
- EGGLETON, P. Global patterns of termite diversity. In: ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M., (Ed.), **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**, Kluwer Academic Publishers, 2, 2000.
- EGGLETON, P.; BIGNELL, D. E. Secondary occupation of epigeal termite (Isoptera) mounds by other termites in Mbalmayo Forest Reserve, southern Cameroon, and its biological significance. **Journal of African Zoology**, v.111, p.489–498, 1997.
- FARGIONE, J.; TILMAN, D. Diversity decreases invasion via both sampling and complementarity effects. **Ecology Letters**, v.8, p.604–611, 2005a.

- FARGIONE, J.; TILMAN, D. Niche differences in phenology and rooting depth promote coexistence with a dominant C4 bunchgrass. **Oecologia**, v.143, p.598–606, 2005b.
- FLORENCIO, D.; DREZZA, T.; BERTI-FILHO, E. Ocorrência de cupins das subfamílias Heterotermitinae, Apicotermitinae e Nasutitermitinae em um ninho epígeo no município de Anhembi, SP. **Acta Biologica Leopoldensia**, v.24, p.205–207, 2002.
- FOX-DOBBS, K.; DOAK, D. F.; BRODY, A. K.; PALMER, T. M. Termites create spatial structure and govern ecosystem function by affecting N<sub>2</sub> fixation in an East African savanna. **Ecology**, v.91, p.1296–1307, 2010.
- FREYMANN, B. P.; VISSER, S. N. D.; MAYEMBA, E. P.; OLFF, H. Termites of the genus *Odontotermes* are optionally keratophagous. **Ecotropica**, v.13, n.July 2005, p.143–147, 2007.
- GENNER, M. J.; TURNER, G. F.; BARKER, S.; HAWKINS, S. J. Niche segregation among Lake Malawi cichid fishes? Evidence from stable isotope signatures. **Ecology Letters**, v.2, p.185–190, 1999.
- GONTIJO, T. A.; DOMINGOS, D. J. Guild distribution of some termites from Cerrado vegetation in South-east Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v.7, p.523–529, 1991.
- GRASSÉ, P. **Termitologia**. Masson, Paris - New York, 1986. IIIv.
- HIGASHI, M.; ABE, T.; BURNS, T. Carbon-nitrogen balance and termite ecology. **Proceedings of the Royal Society London B**, v.249, p.303–308, 1992.
- HOBSON, K. A.; GLOUTNEY, M. L.; GIBBS, H. L. Preservation of blood and tissue sample for stable-carbon and stable-nitrogen isotope analysis. **Canadian Journal of Zoology**, v.75, p.1720–1723, 1997.
- HOLT, R. D.; GROVER, J.; TILMAN, D. Simple Rules for Interspecific Dominance in Systems with Exploitative and Apparent Competition. **The American Naturalist**, v.144, n.5, p.741, 1994.

- HUBBELL, S. P. **The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography**. Princeton University Press, 2001.
- JI, R.; BRUNE, A. Digestion of peptidic residues in humic substances by an alkali-stable and humic-acid-tolerant proteolytic activity in the gut of soil-feeding termites. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, p.1648–1655, 2005.
- JI, R.; BRUNE, A. Nitrogen mineralization, ammonia accumulation, and emission of gaseous NH<sub>3</sub> by soil-feeding termites. **Biogeochemistry**, v.78, p.267–283, 2006.
- KORB, J. Thermoregulation and ventilation of termite mounds. **Naturwissenschaften**, v.90, p.212–219, 2003.
- KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B.; RUBEL, F. World map of the Koppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v.15, p.259–263, 2006.
- LA FAGE, J.; NUTTING, W. Nutrient dynamics of termites. In: BRIAN, M. (Ed.). **Production Ecology of Ants and Termites**. Cambridge University Press, 1978. p.165–232.
- LACHER-JR, T. E.; EGLER, I.; ALHO, C. J. R.; MARES, M. A. Termite community composition and mound characteristics in two grassland formations in Central Brazil. **Biotropica**, v.18, p.356–359, 1986.
- LEE, K. E.; WOOD, T. G. **Termites and Soil**. London and New York: Academic Press, 1971. 251p.
- LEVINE, J. M.; HILLERISLAMBERS, J. The importance of niches for the maintenance of species diversity. **Nature**, v.461, p.254–258, 2009.
- MAGALHÃES, S.; BROMMER, J. E.; SILVA, E. S.; BAKKER, F. M.; SABELIS, M. W. Life-history trade-off in two predator species sharing the same prey: a study on cassava-inhabiting mites. **Oikos**, v.102, p.533–542, 2003.

- MATHEWS, A. G. A. **Studies on termites from the Mato Grosso State, Brazil.** Rio de Janeiro, RJ: Academia Brasileira de Ciências, 1977. 267p.
- MAYFIELD, M.; LEVINE, J. Oposing effect of competitive exclusion on the phylogenetic structure of communities. **Ecology Letters**, 2010.
- MIURA, T.; MATSUMOTO, T. Diet and nest material of the processional termite *Hospitalitermes*, and cohabitation of *Termes* (Isoptera, Termitidae) on Borneo Island. **Insectes soc.**, v.44, p.267–275, 1997.
- NADELHOFFER, K. J.; FRY, B. Nitrogen isotope studies in forest ecosystems. In: LAJTHA, K.; MICHENER, R. H., (Ed.), **Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science**, Blackwell Scientific Publications, II, 1994.
- NOIROT, C.; DARLINGTON, J. P. E. C. Termite nests: architecture, regulation and defence. In: ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M., (Ed.), **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**, Kluwer Academic Publishers, 6, 2000.
- NOIROT, C. H. The nests of termites. In: KRISHNA, K.; WEESNER, F., (Ed.), **Biology of Termites**, Academic Press, IIv., 1970.
- PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, v.168, p.45–55, 2005.
- PETERSON, A. T.; HOLT, R. D. Niche differentiation in Mexican birds: using point occurrences to detect ecological innovation. **Ecology Letters**, v.6, p.774–782, 2003.
- PONSARD, S.; AMLOU, M. Effects of several preservation methods on the isotopic content of *Drosophila* samples. **Académie des sciences**, v.322, p.35–41, 1999.
- PRINGLE, R. M.; DOAK, D. F.; BRODY, A. K.; JOCQUÉ, R.; PALMER, T. M. Spatial pattern enhances ecosystem functioning in an African Savanna. **Public Library of Science Biology**, v.8, p.e1000377, 2010.

- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009. ISBN 3-900051-07-0.
- REDFORD, K. H. The termitaria of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) and their role in determining a potential keystone species. **Biotropica**, v.16, p.112–119, 1984.
- SARAKINOS, H. C.; JOHNSON, M. L.; VANDER ZANDEN, M. J. A synthesis of tissue-preservation effects on carbon and nitrogen stable isotope signatures. **Canadian Journal of Zoology**, v.80, p.381–387, 2002.
- SEID, M. A.; SCHEFFRAHN, R. H.; NIVEN, J. E. The rapid mandible strike of a termite soldier. **Current Biology**, v.18, n.22, p.1049 – 1050, 2008.
- SPAIN, A. V.; REDDELL, P.  $\delta^{13}\text{C}$  values of selected termites (Isoptera) and termite-modified materials. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.1585–1593, 1996.
- SYVARANTA, J.; JONES, R. I. Changes in feeding niche widths of perch and roach following biomanipulation, revealed by stable isotope analysis. **Freshwater Biology**, v.53, p.425–434, 2008.
- SZALANSKI, A. L.; AUSTIN, J. W.; OWENS, C. B. Identification of *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Reticulitermatidae) from South Central United States by PCR-RFLP. **Journal of Economic Entomology**, v.96, p.1514–1519, 2003.
- TAYASU, I. Use of carbon and nitrogen isotope ratios in termite research. **Ecological Research**, v.13, p.377–387, 1998.
- TAYASU, I.; ABE, T.; EGGLETON, P.; BIGNELL, D. E. Nitrogen and carbon isotope ratios in the termites: an indicator of trophic habit along the gradient from wood-feeding to soil-feeding. **Ecological Entomology**, v.22, p.343–351, 1997.

- TAYASU, I.; HYODO, F.; ABE, T. Caste-specific N and C isotope ratios in fungus-growing termites with special reference to uric acid preservation and their nutritional interpretation. **Ecological Entomology**, v.27, p.355–361, 2002a.
- TAYASU, I.; HYODO, F.; ABE, T.; INOUE, T.; SPAIN, A. Nitrogen and carbon stable isotope ratios in the sympatric Australian termites, *Armitermes laurensis* and *Drepanotermes rubriceps* (Isoptera, Termitidae) in relation to their feeding habits and the quality of their food materials. **Soil Biology & Biochemistry**, v.34, p.297–301, 2002b.
- TAYASU, I.; HYODO, F.; TAKEMATSU, Y.; SUGIMOTO, A.; INOUE, T.; KIR-TIBUTR, N.; ABE, T. Stable isotope ratios and uric acid preservation in termites belonging to three feeding habits in Thailand. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v.36, p.259–272, 2000.
- TILLBERG, C. Measuring the trophic ecology of ants using stable isotopes. **Insectes soc.**, v.53, p.65–69, 2006.
- TILMAN, D. **Resource Competition and Community Structure**. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1982.
- TRANIELLO, J.; LEUTHOLD, R. Behavior and ecology of foraging in termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D.; HIGASHI, M., (Ed.), **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**, Kluwer Academic Publishers, 7, 2000.
- VITOUSEK, P. M.; HOWARTH, R. W. Nitrogen limitation on land and in the sea - how can it occur? **Biogeochemistry**, v.13, p.87–115, 1991.
- WESSELS, F. J.; HAHN, D. A. Carbon 13 discrimination during lipid biosynthesis varies with dietary concentration of stable isotopes: implications for stable isotope analyses. **Functional Ecology**, 2010.
- WISHEU, I. How organisms partition habitats: different types of community organization can produce identical patterns. **Oikos**, v.83, p.246–258, 1998.

- WOOD, T. Food and feeding habits of termites. In: BRIAN, M., (Ed.), **Production Ecology of Ants and Termites**, Cambridge University Press, 4, 1978. 409 p.
- YAMADA, A.; INOUE, T.; WIWATWITAYA, M.; OHKUMA, M.; KUDO, T.; SUGIMOTO, A. Nitrogen fixation by termites in Tropical Forests, Thailand. **Ecosystems**, v.9, p.75-83, 2006.

## Anexos