

ALERTA E FUGA: EFEITO DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO NA COMUNICAÇÃO DE
ALARME E NO COMPORTAMENTO DE *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855)
(TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE)

por

THIAGO HENRIQUE CAVALCANTI DE MENDONÇA
(Sob Orientação do Professor Paulo Fellipe Cristaldo -UFRPE)

RESUMO

Os cupins (Blattodea: Isoptera) possuem uma gama de estratégias defensivas a fim de manter a proteção da colônia contra perigos iminentes. A sofisticada comunicação de alarme presente nesse grupo garante que os membros da colônia evitem contato com predadores, competidores e até mesmo patógenos. Por outro lado, o efeito de substâncias tóxicas, como por exemplo os inseticidas, na comunicação de alarme e no comportamento ainda não foi elucidado. Aqui, analisamos os efeitos do inseticida imidacloprido na comunicação de alarme e no comportamento de *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae). Para isso, testamos as seguintes hipóteses: (i) o inseticida desencadeia comportamento de alerta em cupins, por meio de aumento do número de vibrações; (ii) esse comportamento de alerta é dose-dependente do inseticida e (iii) o comportamento de alerta desencadeia um comportamento de fuga de grupos de cupins não-expostos ao inseticida. Bioensaios manipulativos de alarme e comportamento em laboratório foram realizados a fim de testar as hipóteses acima. De um modo geral, nossos resultados demonstraram que, de fato, grupos de *N. corniger* expostos ao inseticida imidacloprido aumentam o número de vibrações, desencadeando um comportamento de alerta. No entanto, existe uma diminuição da atividade de caminhada nos grupos expostos ao inseticida. A resposta de alerta, via vibração, nos grupos expostos ao inseticida

é dose-dependente. Além disso, grupos expostos ao inseticida são capazes de transmitir a presença de inseticida via vibração para grupos não expostos, desencadeando um comportamento de fuga. Nossos resultados demonstram a existência de um ‘*comportamento de alerta ao inseticida*’ em *N. corniger* e parece ser um mecanismo de comunicação previamente não reconhecido em cupins que permite reduzir os riscos de intoxicação na colônia.

PALAVRAS-CHAVE: ecologia comportamental, vibração, neonicotinoide.

PANIC AND RUN: EFFECT OF IMIDACLOPRID INSECTICIDE ON ALARM
COMMUNICATION AND BEHAVIOR OF *Nasutitermes corniger* (TERMITIDAE:
NASUTITERMITINAE)

por

THIAGO HENRIQUE CAVALCANTI DE MENDONÇA

(Sob Orientação do Professor Paulo Fellipe Cristaldo)

ABSTRACT

Termites (Blattodea: Isoptera) have a range of defensive strategies in order to maintain colony protection against imminent dangers. The sophisticated alarm communication present in this group ensures that colony members avoid contact with predators, competitors and even pathogens. On the other hand, the effect of toxic substances, such as insecticides, on alarm communication and behavior has not yet been elucidated. Here, we analyze the effects of the insecticide imidacloprid on the alarm communication and behavior of *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae). For this, we tested the following hypotheses: (i) the insecticide triggers alert behavior in termites, through an increase in the number of vibrations; (ii) this alert behavior is dose-dependent on the insecticide and (iii) the alert behavior triggers an escape behavior of groups of termites not exposed to the insecticide. Manipulative alarm and behavioral bioassays were performed in the laboratory in order to test the above hypotheses. In general, our results demonstrated that, in fact, groups of *N. corniger* exposed to the insecticide imidacloprid increase the number of vibrations, triggering an alert behavior. However, there is a decrease in walking activity in groups exposed to the insecticide. The alert response, via vibration, in the groups exposed to the insecticide is dose dependent. In addition, groups exposed to the insecticide can transmit the presence of the insecticide via vibration

to non-exposed groups, triggering an escape behavior. Our results demonstrate the existence of an *'insecticide alert behavior'* in *N. corniger* and it seems to be a previously unrecognized communication mechanism in termites that allows reducing the risks of intoxication in the colony.

KEY WORDS: Behavioral ecology, vibration, neonicotinoid

ALERTA E FUGA: EFEITO DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO NA COMUNICAÇÃO DE
ALARME E NO COMPORTAMENTO DE *Nasutitermes corniger* (TERMITIDAE:
NASUTITERMITINAE)

por

THIAGO HENRIQUE CAVALCANTI DE MENDONÇA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Entomologia.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2023

ALERTA E FUGA: EFEITO DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO NA COMUNICAÇÃO DE
ALARME E NO COMPORTAMENTO DE *Nasutitermes corniger* (TERMITIDAE:
NASUTITERMITINAE)

por

THIAGO HENRIQUE CAVALCANTI DE MENDONÇA

Comitê de Orientação:

Paulo Fellipe Cristaldo - UFRPE

ALERTA E FUGA: EFEITO DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO NA COMUNICAÇÃO DE
ALARME E NO COMPORTAMENTO DE *Nasutitermes corniger* (TERMITIDAE:
NASUTITERMITINAE)

por

THIAGO HENRIQUE CAVALCANTI DE MENDONÇA

Banca Examinadora:

Paulo Fellipe Cristaldo – UFRPE

Luciana Iannuzzi – UFPE

José Dijair Antonino de Souza Júnior – UFRPE

Thiago H. Cavalcanti de Mendonça
Mestre em Entomologia

Prof. Paulo F. Cristaldo – UFRPE
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M539a Mendonça, Thiago, Thiago Henrique Cavalcanti de
Alerta e fuga: efeito do inseticida imidacloprido na comunicação de alarme e no comportamento de *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae) / Thiago, Thiago Henrique Cavalcanti de Mendonça. - 2023.
73 f. : il.

Orientador: Paulo Fellipe Cristaldo.
Inclui referências e apêndice(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Recife, 2023.

1. Ecologia comportamental. 2. Vibração. 3. Neonicotinoide. I. Cristaldo, Paulo Fellipe, orient. II. Título

CDD

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades, e por permitir concluir mais uma etapa em minha vida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, aos professores que compõem o corpo docente do programa que contribuíram para minha formação, e também aos meus colegas de turma, em especial aqueles que ao final vieram a se tornar meus amigos só tenho agradece-lhes Felipe, Elton, Ianne, Vitor e Manoely.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador. Prof. Dr. Paulo Fellipe Cristaldo, por me receber como aluno de mestrado no seu laboratório, ao qual concedeu a oportunidade de continuar nesse mundo da pesquisa científica, em que contribuiu com sua orientação e dedicação para meu desenvolvimento como pesquisador científico, e deixo um muito obrigado pela confiança no meu trabalho.

Minha mãe, Elilde Cavalcanti minha base, meu tudo, sempre me apoiando nas decisões que eu tomo, isso foi essencial para que eu chegasse até aqui hoje. E também a minha vó Dona Biu, sei que se ela estivesse lúcida estaria muito feliz em me ver concluindo mais um ciclo em minha vida.

Aos meus colegas do Laboratório Ecologia de Insetos – UFRPE que também contribuíram para elaboração desse trabalho, sempre estando disponíveis quando precisava, tanto assistindo minhas apresentações quanto no desenvolvimento da pesquisa, deixo a vocês: Sara Yuri, Aline Nascimento, Cátia Regina, Renan Santos, Helter Lima, Larissa Freitas, Lara e Ana Beatriz uma palavra *gratidão*.

E a minhas amigas Gisele Oliveira, Alciele Leite, Jane Clésia, Jessica Lidiane e Elaine Lopes que mesmo estando distantes estavam sempre lá quando precisei, sendo para um momento de desabafo no qual me confortavam, ou para dar dicas com suas contribuições ao assistirem minhas apresentações.

Por fim, a cada um que de alguma forma direta ou indireta contribui para realização desse trabalho deixo meus agradecimentos e forte abraço.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
LITERATURA CITADA.....	6
2 HOW TO PERCEIVE THE INSECTICIDE? THE NEOTROPICAL TERMITE <i>Nasutitermes corniger</i> (TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE) TRIGGER ALERT BEHAVIOR AFTER EXPOSURE TO IMIDACLOPRID	10
ABSTRACT	11
RESUMO	12
INTRODUCTION.....	13
MATERIAL AND METHODS	15
RESULTS.....	20
DISCUSSION	21
ACKNOWLEDGMENT.....	24
REFERENCES.....	24
3 'COMPORTAMENTO DE ALERTA AO INSETICIDA': OS CUPINS REPASSAM A INFORMAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE INSETICIDA AOS SEUS COMPANHEIROS DE NINHO?	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO	43

MATERIAL E MÉTODOS	45
RESULTADOS	48
DISCUSSÃO.....	49
AGRADECIMENTOS	53
LITERATURA CITADA.....	53
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade de obter e transmitir informações é uma das características centrais da história de vida dos organismos. É através do processo de comunicação que os indivíduos conseguem trocar informações intraespecíficas (presença de parceiros sexuais, alimento) e também interceptam as interespecíficas (presença de competidores, predadores e/ou perigos) (Evans *et al.* 2009, Cristaldo *et al.* 2016, Mark & Rufus 2013, Šobotník, Jirošová & Hanus 2010). De modo geral, os insetos são um grupo taxonômico e funcionalmente mais diversos no planeta Terra, os quais apresentam uma ampla peculiaridade quanto a sua comunicação, tendo destaque para a sofisticada comunicação presente nos insetos sociais (cupins, formigas, abelhas e vespas) (Holldobler 1999, Amorin *et al.* 2013).

ORDENS	ESTILO DE VIDA	MODOS DE COMUNICAÇÃO			
Archaeognatha (jumping bristletails)	▲	?	-	-	-
Zygentoma (silverfish)	▲ ●	?	-	👁️	-
Odonata (damselflies and dragonflies)	▲	👁️ 👁️ 👁️	👁️	-	-
Ephemeroptera (mayflies)	▲	👁️	👁️	-	-
Dermaptera (earwigs)	◆	👁️ 👁️ 👁️	-	👁️	?
Plecoptera (stoneflies)	▲	👁️	-	-	-
Orthoptera (crickets and katydids)	▲ ●	👁️ 👁️ 👁️	👁️ 👁️ 👁️	👁️	-
Phasmatodea (stick and leaf insects)	▲	?	-	-	-
Mantodea (praying mantids)	▲	👁️	-	-	-
Blattodea (cockroaches)	▲ ● ◆ ★	👁️ 👁️ 👁️	?	👁️	👁️
Isoptera (termites)	★	👁️ 👁️	-	👁️ 👁️	👁️
Thysanoptera (thrips)	▲ ● ◆ ★	👁️ 👁️	👁️	👁️	?
Hemiptera (bugs and cicadas)	▲ ● ◆ ★	👁️ 👁️	👁️ 👁️	👁️ 👁️	👁️
Hymenoptera (wasps, bees and ants)	▲ ● ◆ ★	👁️ 👁️ 👁️	👁️ 👁️	👁️ 👁️ 👁️	👁️ 👁️
Coleoptera (beetles)	▲ ● ◆ ★	👁️ 👁️ 👁️	👁️ 👁️ 👁️	👁️ 👁️	👁️ 👁️
Lepidoptera (moths and butterflies)	▲ ●	👁️ 👁️ 👁️	👁️ 👁️ 👁️	👁️ 👁️ 👁️	-
Diptera (true flies)	▲	👁️ 👁️ 👁️	👁️ 👁️ 👁️	👁️ 👁️	-

Leonhardt *et al.* (2016)

Os cupins são insetos eussociais que vivem em colônias e a comunicação exerce um papel fundamental para manter a coesão do grupo (Costa-Leonardo 2002, Costa-Leonardo *et al.* 2009). Além disso, por conta de seu hábito críptico e pela casta estéril ser cega, a comunicação se torna ainda mais importante para a condução das atividades dentro e fora da colônia (Bagnères & Hanus 2015). A falta do sentido visual em operários e soldados tornou sua comunicação por sinais químicos e mecânicos ainda mais complexa (Šobotník, Jirošová & Hanus, 2010). Ao qual a química é mediada por feromônios que são substâncias (na maioria voláteis) secretadas por glândulas exócrinas presentes no corpo do inseto (Costa-Leonardo 2002). Enquanto, a comunicação através de sinais mecânicos, é mediada por ondas vibroacústicas desencadeadas por vibrações transmitidas para o substrato por movimentos oscilatórios verticais (MOVs), longitudinais (MOLs) e/ou complexos (MOCs) (Howse 1964, Stuart 1963, Hager & Kirchner 2013, Cristaldo *et al.* 2015). Tendo o órgão subgenual responsável por captar o sinal mecânico, e este órgão cordotonal está presente na tíbia das pernas desses insetos (Howse 1964).

Os cupins apresentam complexidades, ao qual são subdivididos em dois grandes grupos, o primeiro é os cupins filogeneticamente basais (cupins primitivos), e outro são os filogeneticamente derivados (cupins superiores) (Engel *et al.* 2009). As espécies pertencentes ao grupo dos basais são formados por pequenas colônias, tendo um sistema de casta simples e habitam no local que se alimentam (Noirot & Pasteels 1987, Engel *et al.* 2009). Em contrapartida, as espécies derivadas suas colônias são altamente populosas, ao qual apresentam um sistema de castas bastante desenvolvido (Engel *et al.* 2009).

Ao longo da filogenia dos cupins – *das espécies basais às derivadas* – há uma tendência de aumento da complexidade na comunicação química e mecânica. As espécies de cupins basais vivem e se alimentam no mesmo local, o que de certa forma necessita de um repertório menos complexo de comunicação. Por outro lado, nas espécies derivadas, a separação total entre ninho e fonte de

alimento provocou uma série de adaptações que permitiram a busca por alimento fora do ninho de forma eficiente, incluindo uma comunicação complexa via sinais químicos e/ou mecânicos. Nesse último caso, algumas espécies conseguem utilizar ambos os sinais de maneira conjunta (Cristaldo *et al.* 2015, Delattre *et al.* 2015). De uma maneira geral, a complexidade na comunicação dos cupins varia conforme os hábitos de nidificação, e forrageamento, influenciados também pelo tamanho das colônias (Bagnères & Hanus 2015, Breed & Buchwald 2009).

Por conta do tipo de alimento consumido pelos cupins (materiais ricos em lignocelulose), estes são conhecidos como macro invertebrados detritívoros dos ecossistemas terrestres, e possuem uma grande importância ecológica devido ao seu papel na ciclagem de nutrientes e na manutenção e aumento da biodiversidade local (Bignell & Eggleton 2000). No entanto, os cupins são geralmente conhecidos pelo seu potencial de causar perdas econômicas nos ambientes agrícolas, urbanos e florestais e sua mera presença é tido como uma ameaça (Constantino 2002, Bacci *et al.* 2015). A estimativa do prejuízo mundial da atividade dos cupins gira em torno de U\$ 50 bilhões/ano (Korb 2007). Desta forma, o uso de inseticidas convencionais é a principal opção para o controle dos cupins (Bacci *et al.* 2015).

Os inseticidas convencionais são pertencentes aos grupos químicos dos piretroides, neonicotinoides e fenil-pirazol (Woodrow & Grace 2008), no qual atuam no sistema nervoso dos insetos. Estes são divididos em três grupos, os repelentes (piretroide), não-repelente com ação rápida (clopirifós) e não-repelentes de ação lenta (imidacloprido) (Su *et al.* 1982, Woodrow & Grace 2008). Os produtos desse último são capazes de controlar as áreas tratadas, bem como as populações de cupins (Shelton & Grace 2003, Ibrahim *et al.* 2003). Isso, possivelmente, está relacionado pela capacidade na transferência dos compostos tóxicos que acontece por meio da coleta do recuso alimentar contaminado, e o repasse aos companheiros de ninho (Woodrow & Grace 2008).

Com isso, ao decorrer dos anos pesquisas foram desenvolvidas afim de verificar os efeitos do uso de produtos químicos em cupins. Como, por exemplo, exposições sub-letais do imidacloprido provocaram uma caminhada cambaleante em *Reticulitermes virginicus*, além de afetar o comportamento de tunelamento (Thorne & Breisch, 2001). Em *R. hesperus* após breves exposições ao clorfenapir, ocasionou redução dos movimentos (Rust & Saran, 2006). A aplicação de lufenuron reduziu significativamente a sobrevivência de cupins (Wang *et al.* 2014). No entanto, por conta do hábito críptico e o repertório de comportamentos complexos, isso são fatores que geralmente impede que essas substâncias tenham sucesso na eliminação da infestação.

Por se tratar de insetos sociais, os cupins apresentam uma organização hierárquica, no qual possuem um sistema de comunicação bastante desenvolvido, e para fazer o reconhecimento entre os indivíduos da colônia e atividades como forrageamento, é necessário estímulos semioquímicos (Traniello & Leuthold 2000). Por isso, se faz indispensável a compreensão dos efeitos dos produtos aplicados no comportamento dos cupins e das colônias, e a utilização de produtos com diferentes modos de ação pode ter um efeito complementar para o controle de cupins (Bacci *et al.* 2015).

Ainda, faz-se necessário considera alguns fatores, pois estes interferem na eficiência do modo de ação do produto aplicado. Por exemplo, durante o forrageamento acontece a troca de informações, comunicação e comportamentos que minimizam possíveis ameaças de patógenos e contaminantes, e ainda, há espécies que possuem ninhos policálicos que acaba dificultando as trocas de substâncias tóxicas entre os indivíduos da colônia (Esparza-Mora *et al.* 2020, Rust & Su, 2012). Além disso, após a utilização de algum produto para controle, sempre restam indivíduos vivos, e estes conseguem recuperar o ninho (Passos 2009). O tamanho da colônia também dificulta no controle (Potenza *et al.* 2004), e ainda, por conta do hábito críptico, acaba dificultando na localização da colônia (Korb 2007, Chouvenc *et al.* 2011, Rust & Su 2012, Evans & Lqbal 2015, Boulogne *et al.* 2017).

O cupim *Nasutitermes corniger* Motschulsky (Blattodea: Termitidae: Nasutitermitinae) vem sendo considerada uma das espécies mais importantes na América do Sul (Constantino 2002, Fontes & Milano 2002). Estes cupins possuem colônias populosas variando de 50.000 a 900.000 indivíduos (Dunn & Messier 1999, Thorne 1984). Ainda, apresentam uma elevada plasticidade alimentar, pois conseguem se alimentar de madeiras com diferentes densidades e teores de umidade (Reis & Canello 2007, Silva 2008). Por isso, vem sendo considerado praga (Scheffrahn *et al.* 2014), principalmente de ambientes urbanos, no qual, se adaptou muito bem, e ainda, é um cupim arborícola que consegue causar vários danos neste ambiente (Constantine 2002).

Para minimizar os danos causados por *N. corniger* o seu controle é feito por meio do uso de inseticidas aplicados diretamente nos ninhos ou nos túneis (Scheffrahn *et al.* 2014). Entretanto, esta tática de controle não é eficaz, por conta, de utilizarem inseticidas voltados para cupins subterrâneos (Su & Scheffrahn 1998). Como também, está espécie apresenta ninhos policíclicos, ou seja, são construídos fora do local de onde estão causando danos (Costa-Leonardo 2002). E ainda, em estudos foi demonstrado que o uso iscas não apresentou sucesso a *N. corniger* por conta da baixa atração das iscas (Su 1994, Costa-Leonardo 2002). No entanto, em decorrência da elevada importância de *N. corniger* como praga, ainda não se sabe do seu comportamento de alarme via vibração após exposição ao inseticida, e como a informação é repassado para os demais companheiros de ninho.

Sendo assim, o objetivo dessa dissertação foi investigar o efeito do inseticida imidacloprido na comunicação de alarme e no comportamento em *N. corniger*. A dissertação foi dividida em quatro capítulos, no qual temos no primeiro capítulo uma introdução geral, em que é proporcionado ao leitor uma breve introdução sobre a temática desse estudo. O segundo capítulo consiste no artigo **“How to perceive the insecticide? The Neotropical termite *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae) triggers alert behavior after exposure to imidacloprid”** submetido na revista

Behavioral Process, no qual mostramos efeito do imidacloprido no comportamento de alarme de *N. corniger*. Enquanto, que o terceiro capítulo, apresenta o artigo “**‘Comportamento de alerta ao inseticida’: os cupins repassam a informação sobre a presença de inseticida aos seus companheiros de ninho?’**”, em que verificamos o efeito do imidacloprido no comportamento de grupos de cupins expostos ou não ao inseticida. Por fim, o último capítulo consiste nas considerações finais desse estudo.

Literatura citada

- Amorin, M.C.P., S.S. Pedroso, M. Bolgan, J.M. Jordão, M. Caiano & P.J. Fonseca. 2013.** Painted gobies sing their quality out loud: acoustic rather than visual signals advertise male quality and contribute to mating success. *Funct. Ecol.* 27: 289-298.
- Bacci, L., J.K.A. Lima, A.P.A. Araújo, A.F. Em Branco, I.M.A. Silva, A.A. Santos, A.C.C. Santos, P.B. Alves & M.C. Picanço. 2015.** Toxicity, behavior impairment, and repellence of essential oils from pepper-rosmarin and patchouli to termites. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 156: 66-76.
- Bagnères, A.G. & R. Hanus. 2015.** Communication and Social Regulation in Termites, p. 192-248. In: L. Aquiloni & E. Tricarico (eds.), *Social Recognition in Invertebrates: The Knowns and the Unknowns*, Springer, London, 277p.
- Bignell, D.E. & P. Eggleton 2000.** Termites in ecosystems, p. 363-387. In: T. ABE, D.E. Bignell & M. Higashi, (eds.), *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Boulogne, I., R. Costantino, N. Amusant, M. Falkowski, A.M.S. Rodrigues & E. Houel. 2017.** Ecology of termites from the genus *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) and potential for science-based development of sustainable pest management programs. *Journal of Pest Science.* 90: 19-37.
- Breed, M.D. & R. Buchwald. 2009.** Cue diversity and social recognition, p. 173-194. In: J.G. Gadau & J.F. Fewell (eds.), *Organization of insect Societies: From genome to Sociocomplexity*, Harvard University Press, 617p.
- Chouvenc, T., N.Y. Su & J.K. Graça. 2011.** Fifty years of attempted biological control of termites—Analysis of a failure. *Biological Control.* 59: 69-82.

- Constantino, R. 2002.** The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. *Journal of Applied Entomology*. 126: 355-65.
- Costa-Leonardo, A.M. 2002.** Cupins-praga: morfologia, biologia e controle. Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 128p.
- Costa-Leonardo, A.M., F.E. Casarin & J.T. Lima. 2009.** Chemical Communication in Isoptera. *Neotropical Entomology*. 38: 001-006.
- Cristaldo, P.F., V. Jandák, K. Kutalová, V.B.R. da Silva, M. Brothánek, O. Jiricek, O. De Souza & J. Sabotnik. 2015.** The nature of alarm communication in *Constrictotermes cyphergaster* (Blattodea: Termitoidea: Termitidae): the integration of chemical and vibroacoustic signals. *Biology Open*. 4: 1649-1659.
- Cristaldo, P.F., V.B.R. da Silva, S.L. Elliot, A.P.A. Araújo & O. De Souza. 2016.** Heterospecific detection of host alarm cues by an inquiline termite species (Blattodea: Isoptera: Termitidae). *Animal Behaviour*. 120: 43-49.
- Delattre, O., D. Sillam-Dusses, V. Jandák, M. Brothánek, K. Rucker, T. Bourguignon, B. Vytisková, J. Cvacka, O. Jiricek & J. Sabotnik. 2015.** Complex alarm strategy in the most basal termite species. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 69: 1945-1955.
- Dunn R. & S. Messier. 1999.** Evidence for the opposite of the dear enemy phenomenon in termites. *J Insect Behav*. 12: 461-464.
- Engel M.S., D.A Grimaldi & Krishna K. 2009.** Termites (Isoptera): their phylogeny, classification, and rise to ecological dominance. *Am Mus Novit* 3650:1–27. environment. 1 ed. London: Chapman & Hall.
- Esparza-Mora. M.A., H.E. Davis, S. Meconceli, R. Plarre & D.P. McMahon. 2020.** Inhibition of a Secreted Immune Molecule Interferes With Termite Social Immunity. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 8: 1-10.
- Evans, T. A. & N. Iqbal. 2015.** Termite (order Blattodea, infraorder Isoptera) baiting 20 years after commercial release. *Pest management Science*. 71: 897-906.
- Evans, T.A., R. Inta, J.C.S. Lai, S. Prueger, N.W. Foo, E.W. Fu & M. Lenz. 2009.** Termites eavesdrop to avoid competitors. *Biological Sciences*. 276: 4035-4041.
- Fontes L.R. & S. Milano. 2002.** Termites as an urban problem in South America. *Sociobiology* 40:103-151.
- Hager, F.A. & W.H. Kirchner. 2013.** Vibrational long-distance communication in the termites *Macrotermes natalensis* and *Odontotermes* sp. *Journal of Experimental Biology*. 216: 3249-3256.
- Hölldobler, B. 1999.** Multimodal signals in ant communication. *J. Comp. Phys. A*. 184: 129-141.

- Howse, P. 1964.** The significance of the sound produced by the termite *Zootermopsis angusticollis* (Hagen). *Animal Behaviour*. 12: 284-300.
- Ibrahim, S.A., G. Henderson & H. J. Fei. 2003.** Toxicity, Repellency, and Horizontal Transmission of Fipronil in the Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 461-467.
- Korb, J. 2007.** *Current Biology*. 1: 95-99.
- Leonhardt, S.D., F. Menzel, V. Nehring & T. Schmitt. 2016.** Ecology and evolution of communication in social insects. *Cell*. 164: 1277 – 1287.
- Mark, L. & J. Rufus. 2013.** Animal signals. *Current Biology*. 23: R829-R833.
- Noirot, C., & J.M. Pasteels. 1987.** Ontogenetic development and evolution of the worker caste in termites. *Experientia*. 43: 851 - 860.
- Reis, Y.T. & E.M. Canello. 2007.** Riqueza de cupins (Insecta, Isoptera) em áreas de Mata Atlântica primária e secundária do sudeste da Bahia. *Iheringia. Série Zoologia*. 97: 229-234.
- Rust, M. & N.Y. Su. 2012.** Managing social insects of urban importance. *Annual review of entomology*. 57: 355-375.
- Rust, M.K. & R.K. Saran. 2006.** The toxicity, repellency, and transfer of chlorfenapyr against western subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*. 99: 864-872.
- Scheffrahn, R.H., H.H. Hochmair, W.H. Warner, J. Krecek, B. Maharajh, B.J. Cabrera & R.B. Hickman. 2014.** Targeted elimination of the exotic termite, *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), from infested tracts in southeastern Florida. *Int. J. Pest. Manag.* 60: 9-21.
- Shelton, T.G. & J.K.J. Grace. 2003.** Effects of exposure duration on transfer of nonrepellent termiticides among workers of *Coptotermes formosanus shiraki* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 456-460.
- Silva, V.S.G. 2008.** Comportamento de forrageamento de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) (Isoptera: Termitidae) e sua ocorrência em áreas urbanas. Tese de Doutorado Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 108p.
- Šobotník, J., A. Jirošová & R. Hanus. 2010.** Chemical warfare in termites. *Journal of Insect Physiology*. 56: 1012-1021.
- Stuart, A.M. 1963.** Studies on the communication of alarm in the termite *Zootermopsis nevadensis* (Hagen), Isoptera. *Physiol Zool*. 36:85-96.

- Su, N.-Y. & R.H. Scheffrahn. 1998.** A review of subterranean termite control practices and prospects for integrated pest management programs. *Integr. Pest Manag.* 3: 1-13.
- Su, N.-Y. 1994.** Field evaluation of hexaflumuron bait for population suppression of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Econ Entomol.* 87: 389-397.
- Su, N.-Y., M. Tamashiro, J.R. Yates & M.I.J. Haverty. 1982.** The effect of behavior in the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the *Formosan subterranean* termite. *J. Econ. Entomol.* 75: 188-193.
- Thorne, B.L. 1984.** Polygyny in the neotropical termite *Nasutitermes corniger*: life history consequences of queen mutualism. *Behav Ecol Sociobiol.* 14: 117-136.
- Thorne, B.L. & N.L. Breisch. 2001.** Effects of sublethal exposure to imidacloprid on subsequent behavior of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology.* 94: 492-498.
- Traniello, J.F.A. & R.H. Leuthold. 2000.** Behavior and ecology of foraging in termites. p, 141-168. In: Bignel, D.E. & M. Higashi (eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, Springer.
- Wang, C., G. Henderson, B.K. Gautama & X. Chen. 2014.** Lethal and Sublethal Effects of Lufenuron on the Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology.* 107: 1573-1581.
- Woodrow, R.J. & J.K. Grace. 2008.** Termite control from the perspective of the termite: a 21st century approach. In: Schultz TP, Militz H, Freeman MH, Goodell B, Nicholas DD (eds) *Development of commercial wood preservatives: efficacy, environmental and health issues.* ACS symposium series 982. American Chemical Society, Oxford University Press, USA.

CAPÍTULO 2

HOW TO PERCEIVE THE INSECTICIDE? THE NEOTROPICAL TERMITE *Nasutitermes corniger* (TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE) TRIGGER ALERT BEHAVIOR AFTER EXPOSURE TO IMIDACLOPRID¹

THIAGO H. C. DE MENDONÇA ^{a,b}, CÁTILA R. SILVA ^b, SARA Y. M. WATANABE ^{a,b},
ALINE F. N. SILVA ^{a,b}, RENAN E. C. SANTOS ^b & PAULO F. CRISTALDO ^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Recife, PE, Brasil

^bLaboratório de Ecologia de Insetos, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Recife, PE, Brasil

¹MENDONÇA, T.H.C., SILVA, C.R., WATANABE, S.Y.M., SILVA, A.F.N., SANTOS, R.E.C. & CRISTALDO, P.F. How to perceive the insecticide? The Neotropical termite *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae) trigger alert behavior after exposure to imidacloprid. Submitted to Behavioural Processes (*under review*).

HOW TO PERCEIVE THE INSECTICIDE? THE NEOTROPICAL TERMITE *Nasutitermes corniger* (TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE) TRIGGER ALERT BEHAVIOR AFTER EXPOSURE TO IMIDACLOPRID

ABSTRACT – In eusocial insects, alarm signaling is used to inform nestmates about threats such as predators, competitors and pathogen. Such behavior is important for survival of colonies. However, studies evaluating the effect of insecticides on alarm in termites have not been reported yet. Here, we inspected the effect of insecticide on alarm communication in *Nasutitermes corniger*. Specifically, we test the following hypotheses: (1) termite groups exposed to insecticide imidacloprid increase the body shaking movements, displaying an alert behavior; and (2) the alert behavior displayed after exposition to insecticide is dose dependent. Bioassays were conducted evaluating the body shaking movements and walking activity of termite’s groups exposed and non-exposed to insecticide. Thereafter, the number of body shaking movements were evaluated in groups submitted to different doses of insecticide. In general, exposing termite groups to insecticide resulted in significantly higher body shaking movements compared to non-exposed groups. There was a positive effect of imidacloprid doses in the shaking movements. Walking activity, however, decreases in those groups exposed to insecticide. Our results demonstrate the existence of ‘*insecticide alert behavior*’ in *N. corniger* and it appears to be a previously unrecognized communication mechanism in termites that allows to reduce the intoxication risks in the colony.

KEYWORDS: alarm communication, dose-dependent effect, neonicotinoid, vibration

COMO PERCEBER O INSETICIDA? O CUPIM NEOTROPICAL *Nasutitermes corniger*
(TERMITIDAE: NASUTITERMITINAE) DESENCADEIA O COMPORTAMENTO DE
ALERTA APÓS A EXPOSIÇÃO AO IMIDACLOPRIDO

RESUMO – Em insetos eussociais, a sinalização de alarme é usada para informar os companheiros de ninho sobre ameaças como predadores, competidores e patógenos. Tal comportamento é importante para a sobrevivência das colônias. No entanto, estudos avaliando o efeito de inseticidas no alarme de cupins ainda não foram relatados. Aqui, nós inspecionamos o efeito do inseticida na comunicação de alarme em *Nasutitermes corniger*. Especificamente, testamos as seguintes hipóteses: (1) grupos de cupins expostos ao inseticida imidacloprido aumentam o número de vibrações, exibindo um comportamento de alerta; e (2) o comportamento de alerta exibido após a exposição ao inseticida depende da dose. Bioensaios foram conduzidos avaliando os movimentos de agitação corporal e atividade de caminhada de grupos de cupins expostos e não expostos ao inseticida. Em seguida, avaliou-se o número de movimentos corporais de agitação em grupos submetidos a diferentes doses de inseticida. Em geral, a exposição de grupos de cupins ao inseticida resultou em movimentos corporais significativamente maiores em comparação com grupos não expostos. Houve um efeito positivo das doses de imidacloprido nos movimentos de agitação. A atividade de caminhada, no entanto, diminuiu nos grupos expostos ao inseticida. Nossos resultados demonstram a existência de um ‘comportamento de alerta inseticida’ em *N. corniger* e parece ser um mecanismo de comunicação previamente não reconhecido em cupins que permite reduzir os riscos de intoxicação na colônia.

PALAVRA-CHAVE: Comunicação de alarme, dose-dependente, neonicotinóide, vibração

Introduction

Being able to perceive imminent threats is of paramount importance for any organism. However, such ability has only attained a high complexity in eusocial insect (termites, ants, bees, and wasps) (Hölldobler & Wilson 2009, Leonhardt *et al.* 2016, Wilson 1971). The ability to inform nestmates about dangerous is known to be critical for survival of colonies and to initiate the social mechanisms of defense. In general, an alarm signal emitted by a nestmate can triggers two distinct scenarios: quickly recruitment to the signal source, following by defensive behaviors or evasion of individuals to prevent death (Blum 1969). According to Leonhardt *et al.* (2016), the ability to give and perceive conspecific signaling about threats, in eusocial insects, evolved a multitude of signals of chemical, acoustic, and potentially visual nature.

In termites, which non-reproductive castes are blind and present cryptical lifestyle, alarm communication is known to be transmitted via chemical and vibroacoustic signals (Cristaldo *et al.* 2015; Šobotník *et al.* 2010). Chemical signal is mediated by alarm pheromones produced by exocrine glands localized in the head of soldiers. Alarm pheromones is present only in *Mastotermes* and Neoisoptera group. According to Sillam-Dussès *et al.* (2022), the presence of alarm pheromones in these groups is related to the life-type of the species. In *Mastotermes darwiniensis*, the most basal termite species, alarm pheromone is originated from the labial gland of soldiers (Delattre *et al.* 2015). On the other hand, in the phylogenetic derived species, alarm pheromones are produced in the frontal gland (Prestwich 1984, Šobotník *et al.* 2010).

Alarm communication via vibroacoustic signals is observed in all termite species studied so far (Cristaldo *et al.* 2015, Delattre *et al.* 2019, 2015, Sillam-Dussès *et al.* 2022, Šobotník *et al.* 2010). The use of vibroacoustic signals in termite species must be related with the high benefits for

rapid transmission of information among nestmates (Inta *et al.* 2007). Vibracoustic signals are produced by body vibrations and perceived by Johnson's or subgenual organs localized in the tibiae (Howse 1965, 1964, Stuart 1967). There are two main types of vibration in termites: drumming and shaking. Drumming consists of vertical oscillatory movements, which is produced when soldiers drumming their head against the substrate. On the other hand, shaking consists of horizontal oscillatory movements, produced by soldiers and workers shaking bodies held firmly to the substrate (Cristaldo *et al.* 2015, Delattre *et al.* 2019, 2015, Howse 1965, 1964, Sillam-Dussès *et al.* 2022, Šobotník *et al.* 2010).

Unlike in hymenopteran eusocial insects, vibroacoustic signal in the alarm communication of termites is triggered in different contexts of dangers, such as disturbance in the nest (Leis *et al.*, 1994), presence of competitors (Evans *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2018) and presence of entomopathogenic fungi (Bulmer *et al.* 2019; Rosengaus *et al.* 1999). In *Zootermopsis angusticollis*, for instance, nymphs exposed to spores of *Metarhizium anisopliae* significantly increase the vibratory movements after detecting of the spores, which authors called as “*pathogen alarm behavior*” (Rosengaus *et al.* 1999). A similar behavior was observed in workers of *Reticulitermes flavipes* after exposure to spores of *Metarhizium brunneum* and *M. robertsii* (Bulmer *et al.* 2019).

Although termites play a crucial role in the functioning of ecosystems through decomposition, nutrient cycling and increased of local biodiversity (Ashton *et al.* 2019, Bonachela *et al.* 2015, Jouquet *et al.* 2011), some species are known to cause serious damage to agricultural and urban environments (Constantino 2002a, Fontes & Milano 2002; Rust & Su 2011, Su & Scheffrahn 1998, Verma *et al.* 2009). The control of termite pest species is commonly conduct with application of insecticides in the nests and peripheral areas (Rust & Su 2011, Scheffrahn *et al.* 2014). According to Verma *et al.* (2009), several active ingredients are used globally as termiticides, such as bifenthrin, chlorfenapyr, cypermethrin, fipronil, imidacloprid and permethrin. However, the

chemical control is not always efficient to eradicate termite colonies, in addition to create problems in human health and environment (Chouvenc *et al.* 2011, Rust & Su 2011, Verma *et al.* 2009).

In the phylogenetic derived species from Termitidae family, the cryptical lifestyle associated with a complex social organization make difficult to control these species (Boulogne *et al.* 2017, Lima *et al.* 2013, Santos *et al.* 2019). In addition, the elaborate communication and behaviors impair the dissemination of the toxic substances among nestmates. However, to the best of our knowledge, studies evaluating the effect of insecticides on communication in termites have not yet been reported. Therefore, a plausible hypothesis is that termites can perceive the presence of insecticide and trigger alarm communication to avoid intoxication risks in the colony, as already showed in the presence of entomopathogen. Although the phylogenetic derived termites account for approximately 85% of all termite species, no studies have been conducted to examine the mechanisms to prevent spread of insecticide in their colonies.

In the present study we explore the effect of sublethal dose of imidacloprid insecticide on alarm communication of a Neotropical nasute termite *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855) (Termitidae: Nasutitermitinae). Specifically, we test the following hypotheses: (1) termite groups exposed to insecticide imidacloprid increase the body shaking movements, displaying an alert behavior among nestmates; and (2) the alert behavior displayed after exposition to insecticide is dose dependent.

Material and Methods

Studied system: termite and insecticide. Among Isoptera group, the genus *Nasutitermes* is known as the most diverse and complex with a wide geographic distribution and highly populated colonies (Boulogne *et al.* 2017, Krishna *et al.* 2013, Miura *et al.* 2000). *Nasutitermes corniger* is recognized

as a pest of high importance in the New World with a high capacity to adapt to urban environments (Boulogne *et al.* 2017, Constantino 2002a). This species is native from southern Mexico to northern Argentina and in the Caribbean islands, and it is an invasive species in the Bahamas, Florida and New Guinea (Evans *et al.* 2013, Scheffrahn *et al.* 2005). The high feeding plasticity of this species makes it one of the most important structural pests in some regions of North and South America (Scheffrahn *et al.* 2014). In Brazil, the neonicotinoid imidacloprid is one of the most insecticides used in the chemical control of *N. corniger*.

Neonicotinoid are neurotoxic insecticides used worldwide for controlling a range of insect pests, including termites (Jeschke *et al.* 2011, Simon-Delso *et al.* 2015). Imidacloprid was the first neonicotinoid to be marketed (Kurwadkar & Evans 2016). This type of insecticide interacts with acetylcholine receptors, and directly affect the central and peripheral nervous system of insects (Williamson & Wright 2013). Several studies have been demonstrated a range of physiological and behavioral effects of neonicotinoid insecticides in insects. According to Wang *et al.* (2015), sublethal doses of imidacloprid have profound behavioral effects on social insects.

Termite collection and ethic declaration. To carry out experiments, a total 16 (8 for effect of imidacloprid insecticide on body shaking movements, and 8 for dose-dependent effect of imidacloprid on body shaking movements) nests of *N. corniger* containing active colonies were collected at campus SEDE of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), localized in the municipality of Recife, Pernambuco, Brazil (8°04'03'' S, 34°55'00'' W). The area is characterized as “subtropical humid or sub-humid” (Aw) according to Köppen classification (Pidwirny 2011), with average annual temperature of 25.8° C and average annual precipitation of 1804 mm (Climate 2022).

All nests sampled were transported to Insect Ecology Laboratory – UFRPE and kept under controlled conditions (25 ± 2 °C, r.h. $70\pm 5\%$, darkness) until the conduction of behavioural bioassays. Before the experiments, all sampled nests were kept separately in plastic boxes for 24 hours maximum. Permits for termite collection were issued by ICMBio-IBAMA (#47652). No specific permits were required for the described studies undertaken in the laboratory with a non-endangered or protected species.

Termites were individually identified to species level, following specific literature referred by Constantino (2002) and confirmed by comparison with the collection of the Insect Ecology Laboratory at the UFRPE, where voucher specimens were deposited.

Experimental set-up. Bioassays were conducted using the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the form of granules dispersed in water (700g ai/kg). The insecticide was purchased commercially from Bayer CropScience® (Sao Paulo, Brazil). The acetone solvent (Panreac, UV-IR HPLC-GPC PAI-ACS, 99,9%) was used to dilute the insecticide.

Before the main experiments, we compared the behavioral responses of termite groups in the blank control and solvent control (acetone); which did not differ between them (see SM01). So, main experiments were conducted with imidacloprid insecticide as treatment and blank control as control. The choosing of use only blank control instead of blank and/or solvent control was based in the logistic reason.

Effect of imidacloprid insecticide on body shaking movements and walking activity.

Behavioral bioassays were conducted in the laboratory in order to check the effect of imidacloprid insecticide on body shaking movements and walking activity of *N. corniger* groups. To do so, a dose of 55.6 µL (Watanabe *et al.* 2023) of insecticide was applied in the filter paper. After

evaporation of insecticide, groups of termites composed by seven workers and three soldiers were confined to experimental arenas made from plastic Petri dish (\varnothing 60 mm), whose internal bottom surface was lined with filter paper (Whatman n° 1) treated with insecticide. The choice of the caste ratio and termite numbers in each experimental arena was a compromise between natural caste proportions (soldier:worker=3:7; Thorne 1985) and optimal density to maximize inter-individual contacts and survival (Miramontes & DeSouza 1996). Control consisted of termite groups in the experimental arena, whose internal bottom surface was lined only with filter paper. A total of three repetition per colony were performed in both treatment and control, totalizing 48 bioassays.

The responses of termite groups to insecticide and control were recorded, for posterior analysis, using a digital camera attached to a tripod. Each recording lasted for five minutes. All recordings were performed in a room under dimmed daylight and with temperature set between 25°C and 26°C.

Termite's responses to imidacloprid and blank control was evaluated quantifying (1) the number of visually detectable body shaking, and (2) the movements of all termites in the experimental arenas. The number of body shaking movements in the experimental arenas was quantify visually using an analog counter. The movements were estimated using Ethoflow[®] software (Bernardes *et al.* 2021), based on which, we calculated walking distance (cm), mean velocity (cm s^{-1}), resting time (s), the number of stops, and the number of meanderings. All videos were processed using blinded methods in order to minimize observer bias. In total, we monitored the behavior of 480 termites (30 termites (groups of 10 per repetition) for each of the eight colonies exposed to control and treatment).

Dose-dependent effect of imidacloprid on body shaking movements. In order to check the dose-dependent effect of imidacloprid insecticide on body shaking movements of *N. corniger*, a second

behavioural bioassay was conducted under laboratory conditions. Bioassays were conducted following the similar procedures of those described in the previous bioassays. However, termite groups in the experimental arenas were submitted to eight different doses of insecticide: 17, 35, 52, 69, 87, 104, 121 and 139 μL . Control consisted of termite groups in the experimental arena, whose internal bottom surface was lined only with filter paper (0 μL of insecticide). A total of two repetition per colony were performed for each dose and control, totalizing 144 bioassays.

The number of body shaking movements in the experimental arenas after exposition to insecticide was quantify visually using an analog counter. All videos were processed using blinded methods in order to minimize observer bias. In total, we monitored the behaviour of 1,440 termites (20 termites (groups of 10 per repetition) for each of the eight colonies exposed to insecticide doses).

Statistical analysis. All analyses were carried out in R (R Development Core Team, 2022) using generalized linear mixed models (GLMMs) followed by residual analysis to check model assumption and model quality. To assess significance of treatment effect, a Wald test was performed. Pairwise comparisons of estimated marginal means (*EMMeans*) corrected by the false discovery rate method were used as post hoc tests.

To test whether imidacloprid insecticide (*x-var*) affects the body shaking movements (*y-var*) in *N. corniger* groups, data were submitted to GLMM with Guassian error distribution. The variation in the walking activity [walking distance (cm), mean velocity (cm s^{-1}), resting time (s), the number of stops, and the number of meanderings] (*y-vars*) were analysed as a function of treatment and control (*x-var*). Test for each *y* variable were done separately using GLMM with Gaussian or Negative Binomial error distributions.

The effect of different doses of imidacloprid (*x-var*) on body shaking movements (*y-var*) of *N. corniger* groups were analysed using GLMM with Gaussian error distribution.

Results

Effect of imidacloprid on body shaking movements and walking activity

The mean body shaking movements performed by *N. corniger* groups were significantly affected by imidacloprid insecticide (GLMM; $Chisq=108.53$, $P < 0.001$). Termite groups exposed to insecticide present a higher number of body shaking movements compared to groups exposed to control (Fig. 1).

Among the walking activity analyzed, the tracked distance, the mean walking speed and the number of meanderings were significantly affected by imidacloprid insecticide (Tab. 1). Groups of *N. corniger* exposed by contact to imidacloprid insecticide walked less and in lower speed than termite groups from control (Fig. 2A and 2B). Most representative trails of termite groups exposed and non-exposed to insecticide are showed in Fig. 2C. On the other hand, *N. corniger* groups exposed to insecticide increase the number of meanderings compared to nasute termite groups in the control (Fig. 2D). That is, termite groups in contact with insecticide performing more movements in constant changing of direction.

There were no significant effects of insecticide in the resting time and number of stops (Tab. 1).

Dose-dependent effect of insecticide on body shaking movements

The above evidence that *N. corniger* groups respond the imidacloprid insecticide increasing the mean number of body shaking movements are clearly dose-dependent (GLMM; $Chisq= 5.48$, $d.f.= 8$, $P=0.01$). The number of body shaking movements was positively affected by the increasing of imidacloprid doses (Fig. 3).

Discussion

An effective and efficient alarm communication among nestmates is a key life trait in eusocial groups. Here, we showed that nasute termite species can trigger an alert behavior after exposure to sublethal doses of imidacloprid insecticide by increasing the body shaking movements (Fig. 1). Furthermore, our results demonstrate that this observed behavior is dose-dependent, in which *N. corniger* increasing the number of body's shaking movements according to the increase in doses of the imidacloprid insecticide (Fig. 3). On the other hand, the walking activity decreases in contact with insecticide (Fig. 2).

The use of vibratory movements to the emission of alert and warning signals is widely diffused in eusocial groups (Hunt & Richard 2013) In termites, previous studies have been showed the ability to triggers alarm behavior after contact with competitors (Evans *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2018), predators (Oberst *et al.* 2017) and entomopathogenic fungi (Bulmer *et al.* 2019, Rosengaus & Traniello 1993). However, in the best of our knowledge, it is the first time that alarm communication is observed in termite after exposure to sublethal dose of insecticide. Such ability may allow termite, as a group, to reduce the intoxication risks within the colony. Recently, Watanabe *et al.* (2023) have been shown that groups of *N. corniger* with soldiers increased the survivorship after exposure to imidacloprid insecticide compared to termite groups without soldiers. Vibratory movements in termites are almost triggered by the soldier caste. Thus, one possible mechanism increasing the tolerance to insecticide in groups with soldiers is the ability of trigger alarm communication in the presence of insecticide, via body shaking movements (Watanabe *et al.* 2023). In fact, our results empirically show that *N. corniger* can trigger alert behavior increasing the number of bodies shaking movements after exposure to imidacloprid insecticide.

An open question now is to evaluate whether the alert behavior observed here is able to lead to an increase in the prophylactic behaviors (*e.g.* grooming and trophallaxis), as hypothesized by Watanabe *et al.* (2023). In Archotermopsidae and Rhinotermitidae (phylogenetic basal termite groups), for instance, alarm behavior after exposure to entomopathogenic fungi is already known to affect prophylactic behaviors, decreasing the spread of diseases in the colony. According to Bulmer *et al.* (2019), there is a positive correlation between vibratory movements and grooming in *Reticulitermes flavipes*. In *Zootermopsis angusticollis*, vibratory movements and allogrooming were performed at significantly higher frequency and/or for longer periods of time after nymphs contacted the spores of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Rosengaus *et al.* 2011).

The decrease in the distance tracked and walking speed (Fig. 2A and 2B) indicate that nasute termite groups exposed to imidacloprid have their walking activity impaired. The negative effect on walking activity must be related with neurotoxic action of imidacloprid. Insecticides such as the neonicotinoids interact with acetylcholine receptors, which directly affect the central and peripheral nervous system of insects (Brown *et al.* 2006). According to Williamson and Wright (2013), neonicotinoids impair the cognitive functions in insects compromising their ability to interpret external signals. A series of previous studies have been showed that sublethal doses of the neonicotinoid insecticides negatively affect the behavior of insects, mainly eusocial insects (Galvanho *et al.* 2013, Palmer *et al.* 2013, Thorne & Breisch 2001). For example, sublethal dose of imidacloprid decrease the mobility of workers in callow stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Tomé *et al.* 2012). The tunneling behavior of the subterranean termite *R. virginicus* is negatively affected by sublethal doses of imidacloprid (Thorne & Breisch 2001).

Another important point about walking activity is the increase in the number of meanderings performed in nasute termite groups exposed to imidacloprid. This result indicates that groups in

contact with insecticide present a greater disorientation in the walking compared to non-exposed groups. On a larger scale, it is possible to hypothesized that the negative effects on walking activity observed in nasute termites exposed to imidacloprid should have significant effect on foraging behavior, which, in a long-term, may compromise the survival of colony. However, the ability of *N. corniger* groups to perceive the presence of insecticide and triggers the alert behavior must decrease such effect. Future studies should evaluate whether the ability to triggers alert behavior is transmitted to individuals in the colony not yet exposed to insecticide.

The alert behavior after contact with imidacloprid by increase the body shaking movements was clearly dose dependent (Fig. 3), which indicate the complexity of this ‘*insecticide alert behavior*’. That is, more than only perceive the presence of toxic substance, *N. corniger* groups seems to be able to perceive the increase in the risk of such contamination. In termites, the alarm signaling throughout vibratory movements is observed in all groups, from the phylogenetic basal groups (Delattre *et al.* 2019, 2015) to the most derived ones (Cristaldo *et al.* 2015, Ferreira *et al.* 2018). However, in the best of our knowledge, it seems that only phylogenetic derived groups have a high complexity in the transmission of these signals. In *Constrictotermes cyphergaster*, for instance, it has been shown that vibratory movements can trigger distinct behavior from alert to evasion according to the stimulus source (Cristaldo *et al.* 2015). In *N. aff. coxipoensis*, individuals consuming similar food source increase the emission of alertness via vibratory movements, which seems to inform the nestmates about the presence of competitors (Ferreira *et al.* 2018). These results, together with those found in this study, seem to confirm the complexity and elaborate alarm communication in Nasutiterminae species, which can help to understand the success of the group.

Concluding, our results provide evidence that *N. corniger* is able to trigger alert behavior via body shaking movements after exposure to imidacloprid insecticide. Such behavior is clearly dose dependent, indicating a high complexity in the alarm communication in *N. corniger*. We believe

that our study should open new perspectives on ecological-evolutionary studies about communication in termites. In addition, the results found here can help to develop new managements in the control of this important urban pest worldwide.

Acknowledged

This study was partially funded by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), the Foundation for Research of the State of Pernambuco (FACEPE), and Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES). THCM and ANFS are supported with a scholarship from CAPES. CRS and SYMW are supported with a scholarship from CAPES. RECS is supported with a scholarship from CNPq. Research Fellowship from CNPq is held by PFC (PQ 310395/2019-4).

References

- Ashton, L.A., H.M. Griffiths, C.L. Parr, T.A. Evans, R.K. Didham, F. Hasan, Y.A. Teh, H.S. Tin, C.S. Vairappan, & P. Eggleton. 2019.** Termites mitigate the effects of drought in tropical rainforest. *Science* 363, 174–177. <https://doi.org/10.1126/science.aau9565>
- Bernardes, R.C., M.A.P. Lima, R.N.C. Guedes, C.B. da Silva & G.F. Martins. 2021.** Ethoflow: Computer Vision and Artificial Intelligence-Based Software for Automatic Behavior Analysis. *Sensors* 21, 3237. <https://doi.org/10.3390/s21093237>
- Blum, M.S. 1969.** Alarm Pheromones. *Annu. Ver. Entomol.* 14, 57–80. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.000421>
- Bonachela, J.A., R.M. Pringle, E. Sheffer, T.C. Coverdale, J.A. Guyton, K.K. Caylor, S.A. Levin & C.E. Tarnita. 2015.** Termite mounds can increase the robustness of dryland ecosystems to climatic change. *Science* 347, 651–655. <https://doi.org/10.1126/science.1261487>
- Boulogne, I., R. Constantino, N. Amusant, M. Falkowski, A.M.S. Rodrigues & E. Houël. 2017.** Ecology of termites from the genus *Nasutitermes* (Termitidae: Nasutitermitinae) and potential

for science-based development of sustainable pest management programs. *J. Pest Sci.* 90, 19 – 37. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0796-x>

Brown, L.A., M. Ihara, S.D Buckingham, K. Matsuda & D.B. Sattelle. 2006. Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 99, 608–615. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04084.x>

Bulmer, M.S., B.A. Franco & E.G. Fields. 2019. Subterranean Termite Social Alarm and Hygienic Responses to Fungal Pathogens. *Insects* 10, 240. <https://doi.org/10.3390/insects10080240>

Chouvenc, T., N.Y. Su, & J. Kenneth Grace. 2011. Fifty years of attempted biological control of termites – Analysis of a failure. *Biological Control* 59, 69–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.015>

Constantino, R., 2002a. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. *J. of Appl. Entom.* 126, 355–365. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2002.00670.x>

Constantino, R., 2002b. An illustrated key to neotropical termite genera (Insecta: Isoptera) based primarily on soldiers. *Zootaxa* 67, 1–40. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.67.1.1>

Cristaldo, P.F., V. Jandák, K. Kotalová, V.B. Rodrigues, M. Brothánek, O. Jiříček, O. DeSouza & J. Šobotník. 2015. The nature of alarm communication in *Constrictotermes cyphergaster* (Blattodea: Termitoidea: Termitidae): The integration of chemical and vibroacoustic signals. *Biol. Open* 4, 1649-1659. <https://doi.org/10.1242/bio.014084>

Delattre, O., D. Sillam-Dussès, V. Jandák, M. Brothánek, K. Rücker, T. Bourguignon, B. Vytisková, J. Cvačka, O. Jiříček & J. Šobotník. 2015. Complex alarm strategy in the most basal termite species. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 69, 1945–1955. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-2007-9>

Delattre, O., J. Šobotník, V. Jandák, J. Synek, J. Cvačka, O. Jiříček, T. Bourguignon & D. Sillam-Dussès. 2019. Chemical and vibratory signals used in alarm communication in the termite *Reticulitermes flavipes* (Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux* 66, 265–272. <https://doi.org/10.1007/s00040-018-00682-9>

Evans, T.A., B.T. Forschler & J.K. Grace. 2013. Biology of Invasive Termites: A Worldwide Review. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 455–474. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153554>

Evans, T.A., R. Inta, J.C.S. Lai, S. Prueger, N.W. Foo, E.W. Fu & M. Lenz. 2009. Termites eavesdrop to avoid competitors. *Proc. R. Soc. Lond. B* 276, 4035–4041. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1147>

Ferreira, D.V., P.F. Cristaldo, M.L.C. Rocha, D.L. Santana, L. Santos, P.S.S. Lima & A.P.A. Araújo. 2018. Attraction and vibration: Effects of previous exposure and type of food resource

in the perception of allocolonial odors in termites. *Ethology* 124, 743–750. <https://doi.org/10.1111/eth.12806>

Fontes, L.R. & S. Milano. 2002. Termites as an urban problem in South America. *Sociobiology* 40, 103–151.

Galvanho, J.P., M.P. Carrera, D.D.O. Moreira, M. Erthal, C.P. Silva & R.I. Samuels. 2013. Imidacloprid Inhibits Behavioral Defences of the Leaf-Cutting *Ant acromyrmex* subterraneus subterraneus (Hymenoptera:Formicidae). *J. Insect Behav.* 26, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10905-012-9328-6>

Hölldobler, B. & E.O. Wilson. 2009. *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies.* W. W. Norton & Company.

Howse, P.E. 1965. On the significance of certain oscillatory movements of termites. *Insectes Soc.* 12, 335–345. <https://doi.org/10.1007/BF02222723>

Howse, P.E. 1964. The significance of the sound produced by the termite *Zootermopsis angusticollis* (Hagen). *Anim. Behav.* 12, 284–300. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90015-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-3472(64)90015-6)

Hunt, J.H. & F.J. Richard. 2013. Intracolony vibroacoustic communication in social insects. *Insectes Soc.* 60, 403–417. <https://doi.org/10.1007/s00040-013-0311-9>

Inta, R., J.C.S. Lai, E.W. Fu & T.A. Evans. 2007. Termites live in a material world: exploration of their ability to differentiate between food sources. *J. of the R. Soc. Interface* 4, 735–744. <https://doi.org/10.1098/rsif.2007.0223>

Jeschke, P., R. Nauen, M. Schindler & A. Elbert. 2011. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908. <https://doi.org/10.1021/jf101303g>

Jouquet, P., S. Traoré, C. Choosai, C. Hartmann & D. Bignell. 2011. Influence of termites on ecosystem functioning. Ecosystem services provided by termites. *Eur. J. Soil Biol.* 47, 215–222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.05.005>

Krishna, K., D. Grimaldi, V. Krishna & M.S. Engel. 2013. Treatise on the Isoptera of the World. *Bull. of the American Museum of Natural History* 377, 1–200. <https://doi.org/10.1206/377.1>

Kurwadkar, S. & A. Evans. 2016. Neonicotinoids: Systemic Insecticides and Systematic Failure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 745–748. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1968-3>

Leis, M., I. Angelini, A. Sbrenna-Micciarelli & G. Sbrenna. 1994. Further observations on intercaste communication in *Kaloterme flavicollis*: frequency of vibratory movements under different experimental conditions. *Ethol. Ecol. Evol.* 6, 11–16. <https://doi.org/10.1080/03949370.1994.10721966>

- Leonhardt, S.D., F. Menzel, V. Nehring & T. Schmitt. 2016.** Ecology and Evolution of Communication in Social Insects. *Cell* 164, 1277–1287. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.035>
- Lima, J.K.A., E.L.D. Albuquerque, A.C.C. Santos, A.P. Oliveira, A.P.A Araújo, A.F. Blank, M. de F. Arrigoni-Blank, P.B. Alves, D. de A. Santos & L. Bacci. 2013.** Biototoxicity of some plant essential oils against the termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *Ind. Crops Prod.* 47, 246–251. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.018>
- Miramontes, O. & O. Desouza. 1996.** The Nonlinear Dynamics of Survival and Social Facilitation in Termites. *J. theor. Biol.* 181, 373–380. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0138>
- Miura, T., Y. Roisin & T. Matsumoto. 2000.** Molecular phylogeny and biogeography of the nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the pacific tropics. *Mol. Phylogenet Evol.* 17, 1–10. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0790>
- Oberst, S., G. Bann, J.C.S. Lai & T.A. Evans. 2017.** Cryptic termites avoid predatory ants by eavesdropping on vibrational cues from their footsteps. *Ecol. Lett.* 20, 212–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ele.12727>
- Palmer, M.J., C. Moffat, N. Saranzewa, J. Harvey, G.A. Wright & C.N. Connolly. 2013.** Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nat. Commun.* 4, 1634. <https://doi.org/10.1038/ncomms2648>
- Pidwirny, M. 2011.** Köppen Climate Classification System. *Encycl Earth*, 1-8.
- Prestwich, G.D. 1984.** Defense mechanisms of termites. *Annual review of entomology* 29, 201–232. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.29.1.201>
- R Development Core Team. 2022.** R: A Language and Environment for Statistical Computing, Version 4.2.2. Available via <https://www.r-project.org/>
- Rosengaus, R.B., C. Jordan, M.L. Lefebvre & J.F.A. Traniello. 1999.** Pathogen Alarm Behavior in a Termite: A New Form of Communication in Social Insects. *Naturwissenschaften* 86, 544–548. <https://doi.org/10.1007/s001140050672>
- Rosengaus, R.B. & J.F.A. Traniello. 1993.** Disease risk as a cost of outbreeding in the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6641–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6641>
- Rosengaus, R.B., J.F.A. Traniello, & M.S. Bulmer. 2011.** Ecology, behavior and evolution of disease resistance in termites, in: Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N. (Eds.), *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer, Dordrecht, pp. 165–191. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3977-4_7
- Rust, M.K. & N.Y. Su. 2011.** Managing Social Insects of Urban Importance. *Annu. Rev. Entomol.* 57, 355–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100634>

- Santos, A.A., C.R. Melo, B.M.S. Oliveira, A.S. Santana, A.C.C. Santos, T.S. Sampaio, A.F. Blank, P.F. Cristaldo, A.P.A. Araújo & L. Bacci. 2019.** Acute Toxicity and Sub-lethal Effects of the Essential Oil of *Aristolochia trilobata* and Its Major Constituents on *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae). *Neotrop. Entomol.* 48, 515-521. <https://doi.org/10.1007/s13744-018-0665-9>
- Scheffrahn, R.H., H.H. Hochmair, W.H. Kern, J. Warner, J. Krecek, B. Maharajh, B.J. Cabrera & R.B. Hickman. 2014.** Targeted elimination of the exotic termite, *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), from infested tracts in southeastern Florida. *Int. J. Pest Manag.* 60, 9–21. <https://doi.org/10.1080/09670874.2014.882528>
- Scheffrahn, R.H., J. Krecek, A.L. Szalanski & J.W. Austin. 2005.** Synonymy of Neotropical Arboreal Termites *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with Evidence from Morphology, Genetics, and Biogeography. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98, 273–281. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2005\)098\[0273:SONATN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0273:SONATN]2.0.CO;2)
- Sillam-Dussès, D., V. Jandák, P. Stiblík, O. Delattre, T. Chouvenc, O. Balvín, J. Cvačka, D. Soulet, J. Synek, M. Brothánek, O. Jiříček, M. Engel, T. Bourguignon & J. Sobotník. 2022.** Alarm communication predates eusociality in termites. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1869980/v1>
- Simon-Delso, N., V. Amaral-Rogers, L.P. Belzunces, J.M. Bonmatin, M. Chagnon, C. Downs, L. Furlan, D.W. Gibbons, C. Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D.P. Kreutzweiser, C.H. Krupke, M. Liess, E. Long, M. McField, P. Mineau, E.A.D. Mitchell, C.A. Morrissey, D.A. Noome, L. Pisa, J. Settele, J.D. Stark, A. Tapparo, H. van Dyck, J. van Praagh, J.P. van der Sluijs, P.R. Whitehorn & M. Wiemers. 2015.** Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- Šobotník, J., A. Jiřosová & R. Hanus. 2010.** Chemical warfare in termites. *J. Insect Physiol.* 56, 1012–21. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.02.012>
- Stuart, A.M. 1967.** Alarm, Defense, and Construction Behavior Relationships in Termites (Isoptera). *Science* 156, 1123–1125. <https://doi.org/10.1126/science.156.3778.1123>
- Su, N.-Y. & R.H. Scheffrahn. 1998.** A review of subterranean termite control practices and prospects for integrated pest management programmes. *Integrated Pest Management Reviews* 3, 1–13. <https://doi.org/10.1023/A:1009684821954>
- Thorne, B.L. 1985.** Numerical and biomass caste proportions in colonies of the termites *Nasutitermes corniger* and *N. ephratae* (Isoptera; Termitidae). *Insectes Soc.* 32, 411–426. <https://doi.org/10.1007/BF02224018>
- Thorne, B.L., & N.L. Breisch. 2001.** Effects of Sublethal Exposure to Imidacloprid on Subsequent Behavior of Subterranean Termite *Reticulitermes virginicus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 94, 492–498. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.2.492>

- Tomé, H.V.V., G.F. Martins, M.A.P. Lima, L.A.O. Campos & R.N.C. Guedes. 2012.** Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. PLoS One 7, e38406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038406>
- Verma, M., S. Sharma & R. Prasad. 2009.** Biological alternatives for termite control: A review. Int. Biodeterior. Biodegradation 63, 959–972. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.05.009>
- Wang, L., L. Zeng & J. Chen. 2015.** Impact of imidacloprid on new queens of imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). Sci. Rep. 5, 17938. <https://doi.org/10.1038/srep17938>
- Watanabe, S.Y.M., L.F. Ferreira, M.R.P. da Cruz, A.P.A. Araújo, O. DeSouza & P.F. Cristaldo. 2023.** It is not only group size: soldiers also modulate the tolerance to insecticide in termites (Blattodea: Isoptera). Entomol. Sci. Accepted.
- Williamson, S.M. & G.A. Wright. 2013.** Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. Journal of Experimental Biology 216, 1799–1807. <https://doi.org/10.1242/jeb.083931>
- Wilson, E.O. 1971.** The Insect Societies. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.

Table 1. Effect of treatment (control and insecticide) on walking activity in *Nasutitermes corniger* groups.

Source	Treatment (mean \pm s.e)		Chisq	d.f.	P	
	Control	Insecticide				
Tracked distance (cm)	2,161.71 \pm 464.42	1,284.23 \pm 346.96	7.47	1	0.01	*
Mean walking speed (cm/s)	3.83 \pm 0.46	2.24 \pm 0.28	8.36	1	0.003	**
Meandering	682.73 \pm 143.56	1554.33 \pm 359.85	7.41	1	0.006	**
N° of stops	2888.35 \pm 145.91	2642.71 \pm 158.00	1.31	1	0.25	<i>n.s</i>
Resting time (s)	218.77 \pm 44.73	211.62 \pm 42.69	0.01	1	0.90	<i>n.s</i>

Analysis of Deviance (Type II Wald chisquare tests) with Gaussian or Negative Binomial error distributions.

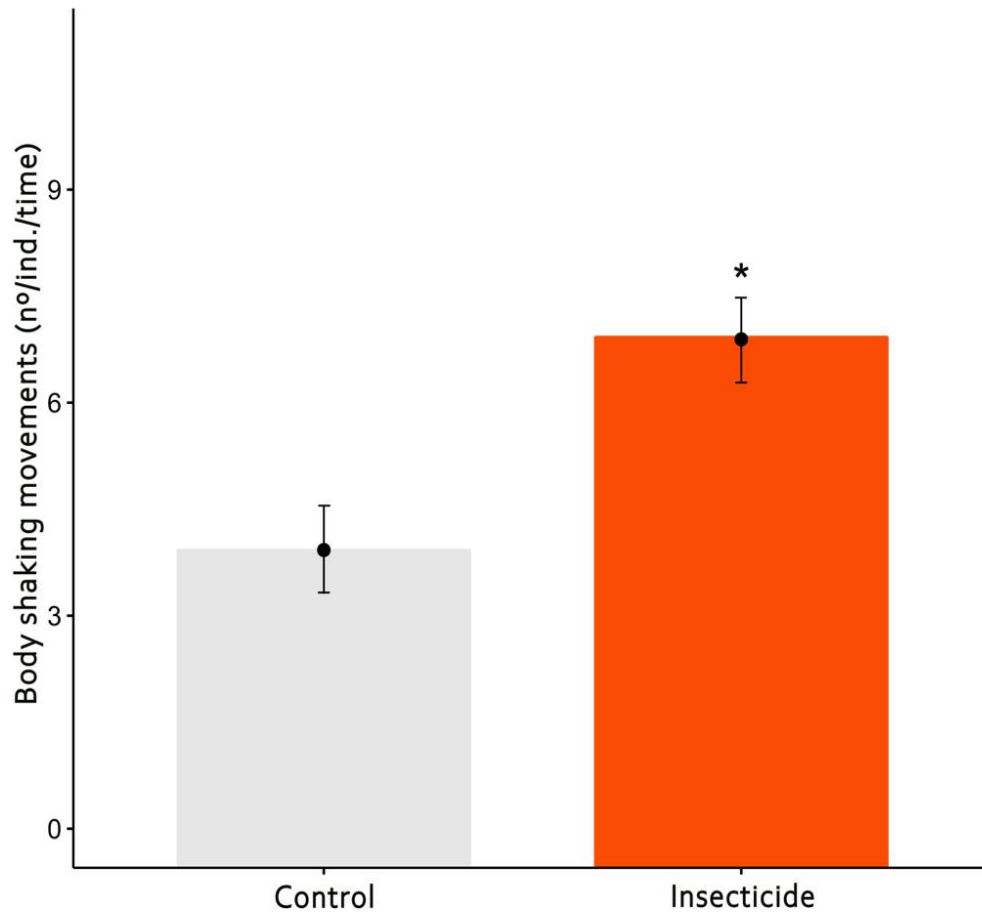


Figure 1. Body shaking behaviour of *Nasutitermes corniger* groups after exposure by contact to imidacloprid insecticide (LD₃₀: 55.6 µL). The bar is mean± standard error of a total of 480 termites (10 termites in experimental arenas from each of the eight colonies).

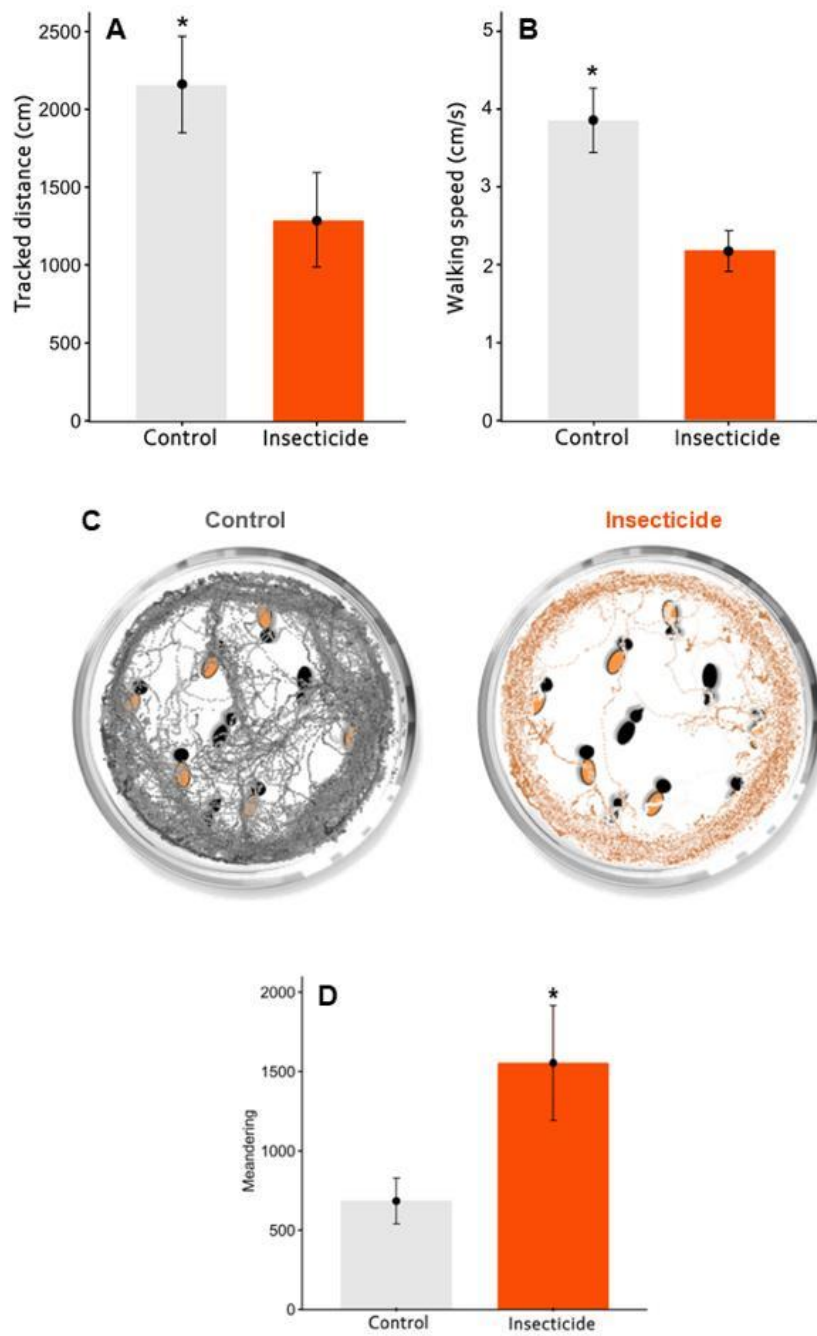


Figure 2. Walking activity of *Nasutitermes corniger* groups after exposure by contact to imidacloprid insecticide (LD₃₀: 55.6 μ L). (A) Tracked distance (cm) by groups of *N. corniger* exposed to imidacloprid insecticide and control. (B) Mean walking speed (cm/s) presented by

groups of *N. corniger* exposed to imidacloprid insecticide and control. (C) Most representative tracks showing the walking behaviour of *N. corniger* groups in control and insecticide. (D) Meandering behaviour presented by groups of *N. corniger* exposed to imidacloprid insecticide and control. The bars are means \pm standard errors of a total of 480 termites (10 termites in experimental arenas from each of the eight colonies with three repetition per colony in treatment and control). Bar with asterisk is significantly different according to the pairwise comparisons of estimated marginal means (EMMeans) corrected by the false discovery rate method.

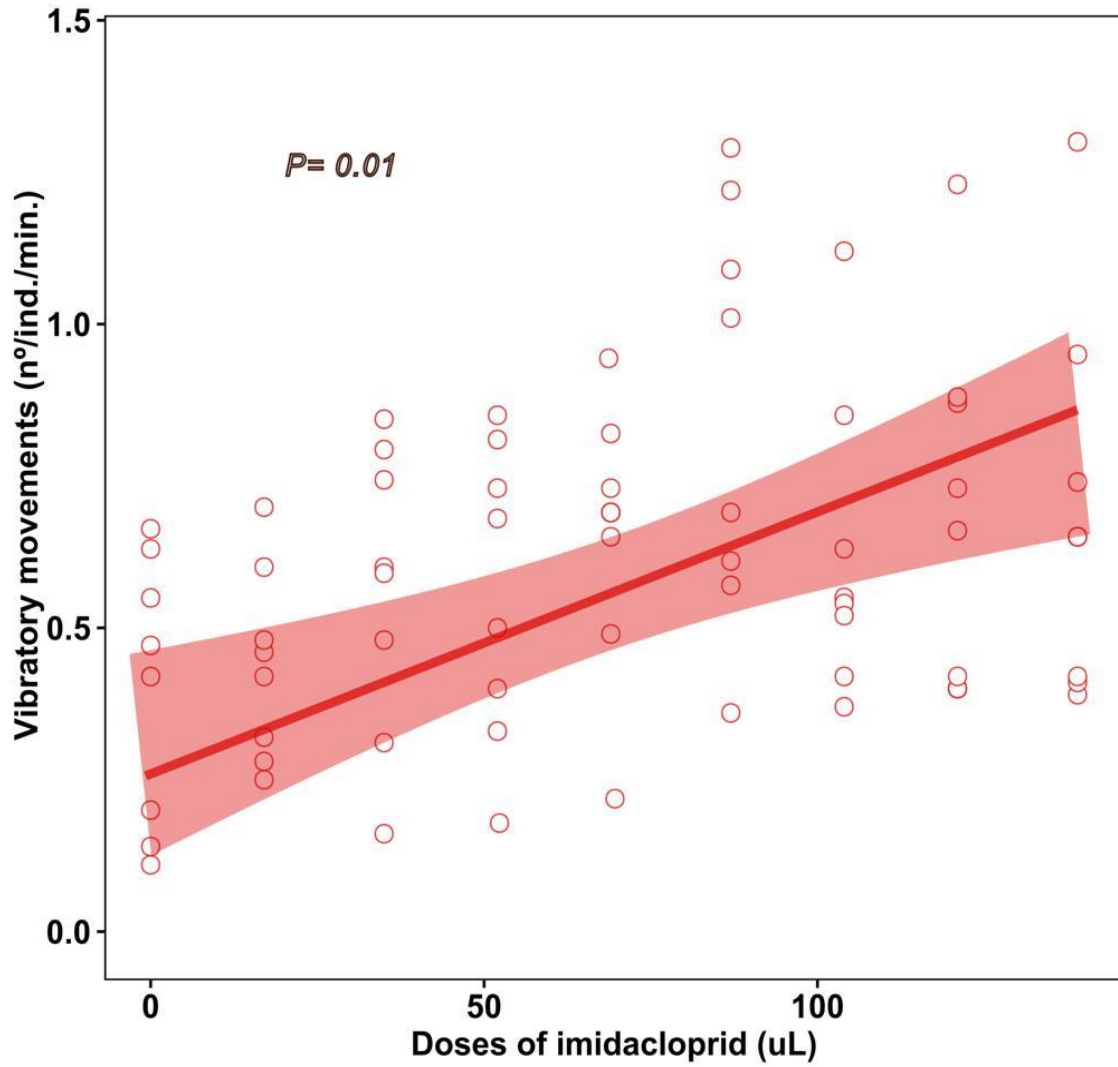


Figure 3. Dose-dependent effect of imidacloprid insecticide on body shaking behaviour of *Nasutitermes corniger* groups.

Supplementary Material 01. Behavioral responses of *N. corniger* groups to controls

Here, we investigate the behavioral responses of termite groups in the blank control and solvent control (acetone). Such procedure was conducted because imidacloprid insecticide was diluted in the acetone solvent. Thus, we compare the responses in both controls (blank and solvent) in order to choose only one control in the main experiments.

The study was performed at Laboratory of Insect Ecology from the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), *campus* SEDE, in the municipality of Recife, Pernambuco, Brazil. Six nests with active colonies of *N. corniger* were collected from field and taken to the laboratory for the conduction of bioassays. In the lab., *N. corniger* colonies were kept in plastic box containing moistened cotton and pieces of sugarcane. All bioassays were conducted under controlled condition (25 ± 2 °C, 70% U.R.), in less than 24 hours after collection of colonies. The identification of species was performed based on Constantino (2002) and by comparison with specimens deposited in the collection of Synanthropic Insects Laboratory - UFRPE.

Bioassays were performed following the procedures described in the subsection 2.3.2 of the manuscript (Effect of imidacloprid insecticide on body shaking movements and walking activity). Statistical analyses were carried out in R (R Development Core Team, 2022) using generalized linear mixed models (GLMMs) followed by residual analysis to check model assumption and model quality. To assess significance of treatment effect, a Wald test was performed. Pairwise comparisons of estimated marginal means (EMMeans) corrected by the false discovery rate method were used as post hoc tests.

The number of body shaking movements did not differ between blank control and solvent control ($F_{1,5} = 1.98$; $P = 0.15$; Fig. SM1). No significant differences between blank control and solvent control were also observed in the walking activity analyzed (tracked distance [$F_{1,5} = 0.20$;

$P= 0.65$; Fig. SM2] and walking speed [$F_{1,5}= 1.91$; $P= 0.16$; Fig. SM3]). Thus, in the main experiments, we used only blank control because the logistic.

References

Abbott W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265–267.

R Development Core Team. 2019. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

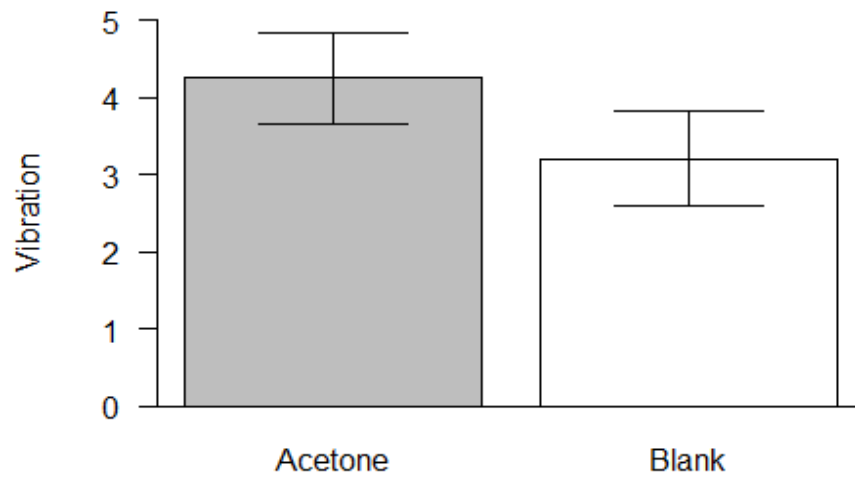


Fig. SM1. Effect of controls (blank and acetone) on the mean number of body shaking movements in *Nasutitermes corniger* groups.

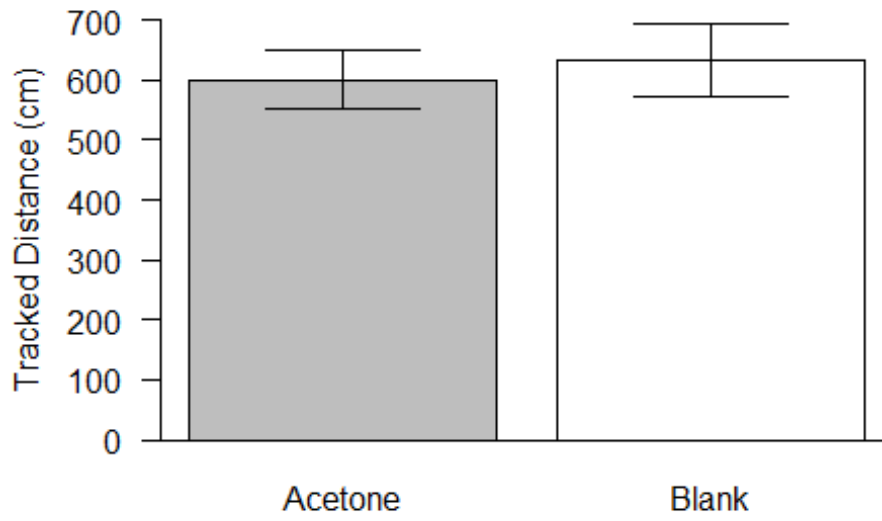


Fig. SM2. Effect of controls (blank and acetone) on the tracked distance in *Nasutitermes corniger* groups.

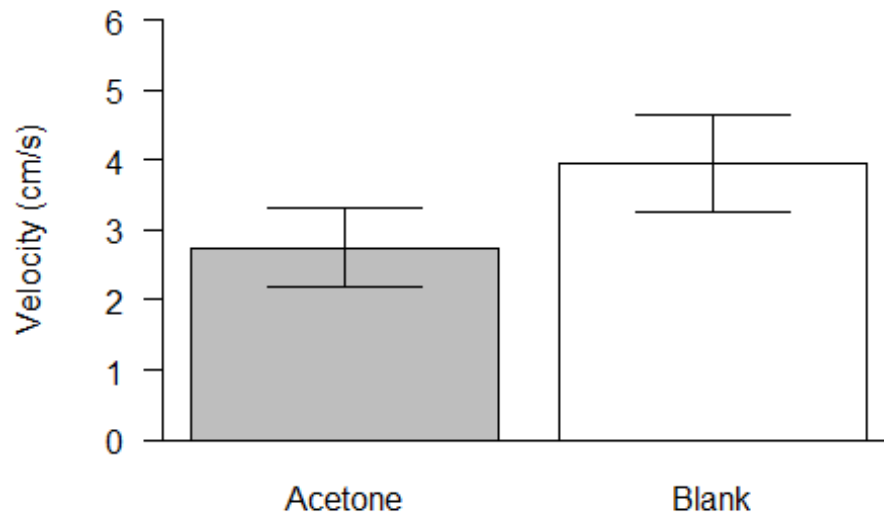


Fig. SM3. Effect of controls (blank and acetone) on the walking speed in *Nasutitermes corniger* groups.

CAPÍTULO 3

“*COMPORTAMENTO DE ALERTA AO INSETICIDA*”: OS CUPINS REPASSAM A
INFORMAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE INSETICIDA AOS SEUS COMPANHEIROS DE
NINHO?¹

THIAGO H. C. DE MENDONÇA^{a,b}, CÁTILA R. SILVA^b, SARA Y. M. WATANABE^{a,b},
ALINE F. N. SILVA^{a,b}, RENAN E. C. SANTOS^b & PAULO F. CRISTALDO^{a,b,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Recife, PE, Brasil

^bLaboratório de Ecologia de Insetos, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Recife, PE, Brasil

¹MENDONÇA, T.H.C., SILVA, C.R., WATANABE, S.Y.M., SILVA, A.F.N., SANTOS, R.E.C.
& CRISTALDO, P.F. '*Comportamento de alerta ao inseticida*': os cupins repassam a informação
sobre a presença de inseticida aos seus companheiros de ninho? A ser submetido.

'COMPORTAMENTO DE ALERTA AO INSETICIDA': OS CUPINS REPASSAM A
INFORMAÇÃO SOBRE A PRESENÇA DE INSETICIDA AOS SEUS COMPANHEIROS DE
NINHO?

Resumo - O uso de inseticidas no controle de cupins, apesar de amplamente utilizado, é muitas vezes ineficiente. Isso porque os indivíduos da colônia expostos à inseticidas tendem a evitar tais áreas, não disseminando o produto entre os demais membros da colônia. Estudo recente demonstrou que indivíduos de *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae), expostos ao inseticida imidacloprido, aumentam os sinais vibratórios, desencadeando um sinal de alerta. No presente estudo, analisamos se os movimentos vibratórios transmitem informações sobre a presença de inseticida de cupins expostos para companheiros de ninho não expostos ao inseticida. Especificamente, testamos a hipótese de que o principal efeito da vibração após o contato com inseticida é fazer com que os cupins não expostos fujam para evitar o contato com o composto tóxico. Para isso, bioensaios manipulativos foram realizados a fim de quantificar o comportamento de fuga dos cupins não expostos ao inseticida após a exposição de um grupo de cupins ao inseticida. De um modo geral, nossos resultados mostraram que grupos de cupins não expostos ao inseticida apresentam comportamento de fuga, direcionando-se para a câmara de escape após um grupo ser exposto ao inseticida. No entanto, não existe efeito significativo do inseticida na distância da barreira onde se encontrava o composto tóxico. O presente contribui para a compreensão da complexidade de comunicação nos cupins e para o desenvolvimento de novas táticas de controle de cupins pragas de ambientes urbanos.

PALAVRAS-CHAVES: *Nasutitermes corniger*, imidacloprido, comunicação

'INSECTICIDE ALERT BEHAVIOUR': DO TERMITES TRANSMIT THIS INFORMATION TO
THEIR NESTMATES?

ABSTRACT - The use of organosynthetic insecticides to control termites, although widely used, is often ineffective. This is because individuals in the colony exposed to insecticides avoid such areas, not disseminating the product among nestmates. A recent study demonstrated that individuals of *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae), exposed to the insecticide imidacloprid, increase vibratory signals, triggering an alert signal. In the present study, we analyzed whether these vibratory movements convey information about the presence of insecticide from exposed termites to nestmates not exposed to the insecticide. Specifically, we tested the hypothesis that the main effect of vibratory movements after contact with insecticides is to make termites not yet exposed to flee to avoid contact with the toxic compound. For this, manipulative bioassays were performed in order to quantify the escape behavior of termites not exposed to the insecticide after exposure of a group of termites to the insecticide. In general, our results showed that groups of termites not exposed to the insecticide exhibit escape behavior, heading towards the escape chamber after a group was exposed to the insecticide. However, there is no significant effect of the insecticide on the distance from the barrier where the toxic compound was located. The present work contributes to the understanding of the complexity of communication in termites.

KEYWORDS - communication, imidacloprid, *Nasutitermes corniger*

Introdução

A troca de informações entre os animais impacta, direta e indiretamente, uma série de comportamentos que afetam o *fitness* desses indivíduos (Alcock 2005). Desta forma, a capacidade de se comunicar efetivamente com outros indivíduos tem um papel chave na história de vida de todos os organismos (Wiley 2006). Em insetos eussociais (cupins, formigas, abelhas e vespas), por exemplo, uma comunicação eficaz entre os membros da colônia é ainda mais crucial, uma vez que é por meio da comunicação que os indivíduos garantem a coesão da colônia e atividades essenciais da colônia, como a busca por parceiro sexual, o forrageamento e a fuga de perigos que possam levar a morte (Grüter & Czaczkes 2019, Zahavi 1977). De acordo com Leonhardt *et al.* (2016), uma troca de informações eficiente e bem elaborada entre os membros da colônia é um dos principais responsáveis pelo sucesso ecológico e evolutivo dos insetos eussociais.

De uma maneira geral, os insetos eussociais são reconhecidos pelos importantes papéis ecológicos prestados aos ecossistemas. Abelhas, por exemplo, são os principais polinizadores de ambientes naturais e agrícolas. Os cupins são os principais responsáveis pela ciclagem de nutrientes em ambientes terrestres tropicais; além de seu importante papel na degradação de matéria orgânica morta e no aumento da biodiversidade local. Por outro lado, algumas espécies de insetos eussociais são conhecidas pelos altos danos causados em ambientes agrícolas, urbanos e florestais (Rust & Su 2011). De acordo com Korb (2007), os danos resultantes da atividade global dos cupins foram de US\$ 50 bilhões somente em 2005. A espécie *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855) (Termitidae: Nasutitermitinae) é uma das principais espécies de cupins causando danos em casas e patrimônios históricos (Mello *et al.* 2014, Scheffrahn *et al.* 2014).

A introdução de *N. corniger* na América do Norte tem aumentado a preocupação em torno dos danos causados pelos cupins. O controle dessa espécie em ambientes urbanos é um entrave devido principalmente as suas características biológicas, o elaborado sistema de comunicação e a presença de comportamentos complexos observados nessa espécie. O método de controle mais utilizado em ambientes urbanos é a aplicação de inseticidas organosintéticos diretamente no ninho ou em túneis de forrageio (Elango *et al.* 2012, Santana *et al.* 2010, Scheffrahn *et al.* 2014). No entanto, tal procedimento é ineficaz uma vez que essa espécie apresenta hábito críptico com ninhos policálicos (rede de ninhos que se conectam). Além disso, os indivíduos de *N. corniger* tendem a abandonar os locais onde o produto tóxico foi aplicado, dificultando a disseminação dos desses compostos entre os indivíduos da colônia (Lima *et al.* 2013, Santos *et al.* 2019).

Recentemente, foi demonstrado que a exposição do inseticida neonicotinóide imidacloprido desencadeia o comportamento de alerta entre cupins da espécie *N. corniger* (Mendonça *et al. submetido*). Além disso, os autores demonstraram que esse ‘*comportamento de alerta ao inseticida*’ é dose dependente, ou seja, os cupins não apenas percebem o inseticida, disparando uma maior vibração corpórea, como também modulam esse comportamento com a intensidade da dose do inseticida. No entanto, ainda existe uma pergunta em aberto: será que os cupins possuem a capacidade de transmitir essa informação da presença do inseticida para companheiros do ninho não expostos?

No presente estudo, analisamos se os movimentos vibratórios de corpo transmitem informações sobre a presença de inseticida dos cupins expostos para companheiros de ninho não expostos. Especificamente, testamos a hipótese de que o principal efeito dos movimentos vibratórios de corpo após o contato com inseticidas é fazer com que os cupins ainda não expostos fujam para evitar o contato com o composto tóxico.

Materiais e Métodos

Declaração de ética e Área de estudo. As licenças para coleta de cupins foram emitidas pelo ICMBio – IBAMA (nº 47652). Não foram necessárias licenças específicas para o presente estudo, uma vez que o mesmo foi realizado em laboratório com uma espécie não ameaçada ou protegida.

Os ninhos de *N. corniger* utilizadas nos experimentos foram coletadas no *campus* SEDE da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (8°04'03''S, 34°55'00''O), localizada no município de Recife, Pernambuco, Brasil. O clima da região é classificado como 'tropical de savana' (Aw), conforme a classificação climática de Köppen (Kottek *et al.* 2006). A temperatura média anual da área de estudo é de aproximadamente 25,8 °C e precipitação média anual de 1804 mm (Climate-data 2022).

Coleta e identificação dos cupins. Ninhos com colônia ativas de *N. corniger* ($N= 8$) foram coletados e levados para Laboratório de Ecologia de Insetos – UFRPE. No laboratório, essas colônias foram acondicionadas, separadamente, em caixas plásticas, fechadas e mantidas sob condições controladas (25 ± 2 °C, UR $70\pm 5\%$, escuro). Para cada bioensaio, foi utilizado indivíduos de colônias com até 24 horas após a coleta.

Os espécimes foram identificados com base na literatura (Constantino 2002) e por comparação com material depositado no Museu de Termitologia do Laboratório de Ecologia de Insetos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Design Experimental. A fim de verificar se os movimentos vibratórios de corpo após contato com inseticida transmitem informações sobre a presença de inseticida para companheiros de ninho não expostos, bioensaios comportamentais foram realizados em laboratório seguindo os procedimentos descritos em Rosengaus *et al.* (1999), com modificações.

Os bioensaios comportamentais foram realizados em arenas experimentais compostas de dois potes plásticos (7,6 cm [altura] x 6,4 cm [largura]; 0,48 m²) conectados por uma fina barreira feita com malha *voil* branco (gramatura: 145 g/metro linear) (Fig. 1; ‘arena central’). A barreira de malha *voil* teve como objetivo eliminar o contato direto entre os grupos de cupins em cada arena central; no entanto, permitir a transferência de sinais relacionados com a presença do inseticida e/ou sinais produzidos pelos próprios cupins. Cada arena central foi conectada, por meio de uma mangueira transparente (Ø 7 mm), à uma placa de Petri de plástico (Ø 60 mm) forrada com papel filtro (Fig. 1; ‘arena de fuga’).

Para quantificar o comportamento de fuga, grupos compostos de 10 indivíduos (sete operários e três soldados) foram acondicionados nas arenas. A proporção de casta e o número total de indivíduos nas arenas foi determinado a fim de manter a densidade ideal para maximizar os contatos interindividuais e a sobrevivência (Miramontes & Desouza 1996), bem como manter a proporção natural de castas (soldado: operário= 3:7; Mathews 1977, Thorne 1985). Os grupos de cupins foram divididos em “grupos não-expostos” e “grupos expostos”. Os “grupos não-expostos” foram os grupos que não tiveram acesso ao tratamento com inseticida. Por outro lado, os “grupos expostos” foram aqueles com contato com o inseticida. Os grupos de cupins “não expostos” foram acondicionados na arena central, e ficaram em repouso por duas horas antes do início do experimento. No mesmo período, placas de Petri contendo grupo de cupins, para posteriormente serem transferidos para arena central do lado exposto, foram separados. Após o período de repouso, na arena central “expostos” foram colocados o tratamento e os controles, seguidos dos grupos de cupins.

Os grupos de cupins foram submetidos aos seguintes controles e tratamento: (1) apenas papel filtro (controle branco), (2) apenas cupins (controle positivo), (3) apenas inseticida (controle negativo) e (4) inseticida + cupins (tratamento). O inseticida utilizado nesse experimento foi o

neonicotinóide imidacloprido, na forma de grânulos dispersos em água (700 g ia/kg), adquirido comercialmente da Bayer CropScience® (São Paulo Brasil). A dose utilizada no experimento foi de 52 µL de inseticida. A dose escolhida foi baseada na dose que induz o comportamento de vibração em cupins expostos ao inseticida imidacloprido, descrita por Mendonça *et al.* (*submetido*). Um total de 96 bioensaios foram realizados, sendo três repetições para cada combinação de colônia ($N= 8$) x tratamento e controles.

O comportamento de fuga foi avaliado considerando dois parâmetros: a distância do grupo não-exposto para a barreira de *voil* e a proporção de indivíduos do grupo na câmara de fuga do lado não exposto. Em ambos os casos, a quantificação foi realizada após 30 e 60 minutos da inserção do grupo exposto na arena. A quantificação da distância para barreira de *voil* foi realizada por meio de fotografias feitas com auxílio de uma câmera digital. As fotos foram processadas, posteriormente, por meio do software ImageJ® (Schneider *et al.* 2012). Sendo, mensurado a partir da localização da cabeça de cada cupim no grupo. A partir desses dados foi calculada a distância média do grupo para a barreira de *voil*. Enquanto, nos mesmos períodos foi quantificado a proporção de indivíduos na câmara de fuga do lado não exposto, sendo feita visualmente, e posteriormente dividindo o número de indivíduos presentes na câmara de fuga pelo total de indivíduos dentro da arena experimental (ou seja, 10 indivíduos).

Análises Estatísticas. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (R Development Core Team 2022) utilizando Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM), seguidos por Análises de Resíduo a fim de verificar a adequabilidade do modelo e a distribuição de erros escolhida. Para avaliar a significância do modelo, realizamos um teste de *Wald*. Comparações pareadas das médias marginais estimadas (*EMMeans*) corrigidas pelo método da taxa de

descoberta foram usadas como testes *post-hoc*. Os seguintes pacotes foram utilizados: ‘*drc*’, ‘*emmeans*’, ‘*lme4*’, ‘*lmerTest*’ e ‘*ggpubr*’.

A fim de verificar o efeito do tratamento e controles (*x-vars*) na distância dos cupins para a barreira nos grupos não expostos (*y-var*), os dados foram submetidos GLMM com distribuição de erros Gaussiano. A ‘*repetição*’ aninhada dentro de ‘*colônia*’ foram utilizadas no modelo como fator randômico. Foi realizada uma análise independente para cada variável resposta (controle branco, controle positivo, controle negativo e tratamento) em cada tempo amostrado. Em seguida, comparação pareada das médias foi realizada a fim de verificar diferença entre os controles e tratamento.

Para verificar o efeito do tratamento e controles (*x-vars*) na proporção de cupins na arena de fuga (*y-var*), os dados foram submetidos GLMM com distribuição de erros Binomial. A ‘*repetição*’ aninhada dentro de ‘*colônia*’ foram utilizadas no modelo como fator randômico. Foi realizada uma análise independente para cada variável resposta (controle branco, controle positivo, controle negativo e tratamento) em cada tempo amostrado. Em seguida, comparação pareada das médias foi realizada a fim de verificar diferença entre os controles e tratamento.

Resultados

Distância dos grupos para a barreira

A distância dos cupins para a barreira de *voil* nos grupos não expostos, após 30 minutos, não variou significativamente entre os tratamentos (Tab. 1)

Após 60 min., o padrão observado após 30 min. se manteve, não existindo efeito significativo dos tratamentos na distância dos grupos de cupins não expostos para a barreira de *voil* (Tab. 1).

Proporção de indivíduos na câmara de fuga

No que diz respeito ao comportamento de escape para a câmara de fuga, após 30 min. de exposição, existe uma diferença significativa na proporção de cupins presentes na área central comparado com a câmara de fuga de grupos não expostos no tratamento ‘*inseticida + cupim*’, controle positivo (apenas cupins) e controle branco (apenas papel filtro) (Tab. 2). Nesses grupos, a maior proporção de cupins se encontra na área central da arena experimental do que na câmara de fuga (Fig. 2A). Por outro lado, não existe diferença significativa na proporção de cupins presentes na área central e na câmara de fuga no controle negativo (apenas inseticida) (Fig. 2A).

Após 60 min., o comportamento de escape para a câmara de fuga apresenta algumas diferenças. Não existe diferença significativa na proporção de cupins presentes na área central comparado com a câmara de fuga no tratamento (‘*inseticida + cupim*’) e no controle negativo (apenas inseticidas). No entanto, a interação foi significativa no tratamento (‘*inseticida + cupim*’), sugerindo que ao longo do tempo deve ter uma maior proporção de cupins na câmara de fuga comparado com a área central (Fig. 2B). No controle positivo (apenas cupins) e controle branco (apenas papel filtro), existe uma diferença significativa na proporção de cupins entre a área central e a câmara de fuga. Em ambos os casos, existe uma maior proporção de cupins presentes na área central do que na câmara de fuga (Fig. 2B).

Discussão

Nossos resultados mostraram que, embora o tratamento (‘*inseticida + cupins*’) não aumente a distância da barreira nos grupos de cupins não expostos (Tab. 1), os grupos de *N. corniger* expostos ao inseticida imidacloprido parecem possuir a capacidade de transmitir a informação da presença do composto tóxico aos companheiros de ninho não-expostos, desencadeando assim um comportamento de escape desses indivíduos para a câmara de fuga (Tab. 2; Fig. 2B).

A percepção da presença de substâncias tóxicas e/ou patógenos deve ser um ponto crucial para limitar a propagação entre os membros das colônias de insetos eussociais. Isto porque as colônias são compostas por milhares de indivíduos aparentados em que os encontros frequentes entre os indivíduos quase sempre incluem contato uns com os outros. Desta forma, a transmissão de patógenos e/ou tóxicos pode ocorrer de forma rápida, gerando um alto custo para a colônia. No caso de patógenos, uma série de estudos tem demonstrado uma gama de mecanismos coletivos a fim de reduzir a transmissão na colônia. Em *Zootermopsis angusticollis*, por exemplo, ninfas expostas à conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* possuem a capacidade de desencadear um comportamento de alarme, o qual faz com que ninfas não expostas aumentem a distância do ponto infectado bem como apresentem um comportamento de fuga a fim de evitar o contato com ninfas expostas ao fungo (Rosengaus *et al.* 1999). Para substâncias tóxicas, como por exemplo os inseticidas, não existem, até o presente momento, estudos na literatura abordando esse aspecto. No entanto, os mecanismos parecem ser diferentes daqueles observados com patógenos uma vez que não observamos efeito da distância da barreira de grupos não-expostos ao inseticida imidacloprido. A ausência de efeito significativo na distância da barreira nos grupos não expostos ao tratamento (Tab. 1), deve estar relacionada com as características químicas do inseticida utilizado. Os inseticidas neonicotinóides (imidacloprido, tiametoxam, acetamiprido, etc.) possuem ação neurotóxica, atuando diretamente no sistema nervoso central e periférico dos insetos (Williamson & Wright 2013). O imidacloprido é conhecido por ter uma ação lenta e não possuir efeito repelente (Dai *et al.* 2019, Paul *et al.* 2018). De acordo com Hassan *et al.* (2018), esse inseticida possui uma baixa pressão de vapor, com persistência de aproximadamente 27 dias no solo. Desta forma, essas características químicas do inseticida utilizado nos bioensaios devem ter contribuído para não se observar, dentro do período amostrado, um distanciamento do grupo não exposto da área com a presença do tratamento. Vale ressaltar que no controle de insetos eussociais é indicado a aplicação

de produtos não repelentes e de ação lenta; características que não parecem afetar a transferência da substância tóxica entre os indivíduos da colônia (Rust & Su 2011, Su *et al.* 1987).

Outro ponto que pode estar relacionado é a relação de substâncias tóxicas com os cupins. A presença de fungos em colônias de cupins é relatada desde grupos filogeneticamente basais que vivem restrito ao recurso (geralmente madeira seca) até em colônias de grupos filogeneticamente derivados que apresentam uma separação total entre ninho e recurso. Sendo assim, os comportamentos profiláticos contra as doenças fúngicas em cupins possivelmente foram conservadas em parte de seus ancestrais, enquanto as funções protetoras por meio dos mecanismos de resistência a substâncias tóxicas parecem ter sido adquiridas de forma secundária (Rosengaus *et al.* 2011). Então, dessa mesma forma, os comportamentos de defesa contra inseticidas estão sendo, provavelmente, adquiridos após adaptações devido as exposições frequentes destes produtos em seus recursos e colônias.

Independentemente do mecanismo envolvido na ausência de efeito do inseticida na distância da barreira pelos grupos não expostos, a alta significância da interação estatística na proporção de indivíduos não expostos na câmara de fuga, após 60 min. (Tab. 2; Fig. 2B), sugere que a informação sobre a presença do inseticida está sendo repassada, via vibração, para o grupo de cupins não expostos. O fato de o inseticida escolhido ter uma ação lenta deve ter retardado a percepção da informação e, conseqüente, resposta de fuga dos indivíduos no grupo não exposto. Sendo assim, o padrão de maior proporção na câmara de fuga comparado com a arena central deve ocorrer após 60 minutos.

A utilização de sinais vibroacústicos na comunicação em cupins é, sem dúvida, a forma predominante de comunicação entre os membros da colônia (Hager *et al.* 2019, Hunt & Richard 2013, Oberst *et al.* 2017). De acordo com Pailler *et al.* (2021), os sinais vibratórios, quando emitidos, possibilitam o envio de mensagens de forma rápida e eficiente, independentemente da

presença de obstáculos físicos, permitindo assim a codificação de informações complexas. De fato, os sinais vibratórios estão envolvidos em diferentes contextos em cupins, como por exemplo: a presença de predadores (Chen *et al.* 2022, Oberst *et al.* 2017), competidores (Evans *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2018), patógenos (Bulmer *et al.* 2019, Rosengaus *et al.* 1999), inseticidas (Mendonça *et al.* *submetido*), espécies inquilinas no ninho (Cristaldo *et al.* 2016), parceiros sexuais (Pailler *et al.* 2021, Ruhland *et al.* 2020) e até para informar a quantidade de recurso alimentar (Evans *et al.* 2005, 2007, Inta *et al.* 2007). Além disso, Cristaldo *et al.* 2015 demonstraram que a comunicação vibratória em *Constrictotermes cyphergaster* (Termitidae: Nasutitermitinae) é modulada conforme a fonte do estímulo e as diferentes vibrações desencadeadas representam comportamentos distintos, indicando diferentes informações.

A subfamília Nasutitermitinae representa uma das linhagens de cupins mais filogeneticamente derivada e bem-sucedidas (Bourguignon *et al.* 2015). As espécies dessa subfamília possuem uma distribuição cosmotropical e se alimentam de uma ampla gama de recursos (de madeira seca à materiais vegetais altamente decompostos no solo) (Donovan *et al.* 2001). Além disso, esse grupo é conhecido por apresentar estratégias de forrageio não observadas em outros grupos, como por exemplo, o forrageio ao ar livre e o forrageio combinado (Almeida *et al.* 2016). A separação total entre ninho e recurso juntamente os a exposição durante o forrageio deve ter impulsionado uma troca de informação complexa e eficaz. Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a presença de um sistema de comunicação complexo e bem elaborado em Nasutitermitinae.

Um ponto que merece estudos futuros nos nossos resultados foi a maior proporção de cupins na arena central do que na câmara de escape nos grupos de cupins expostos (Fig. 3). Para patógenos, já é conhecido a capacidade de cupins em aumentar os comportamentos profiláticos (grooming,

trofalaxia) na tentativa de minimizar a infecção (Rosengaus *et al.* 2011). Será possível que *Nasutitermes* conseguiu de certa forma reduzir o efeito do inseticida?

Como já foi visto, os cupins percebem o inseticida (Mendonça *et al.* submetido), a priori parece que isso está relacionado com a comunicação vibracional. No entanto, ainda não se sabe se isto também pode estar envolvido com outros mecanismos como, por exemplo, a produção de substâncias que possam reduzir o efeito do inseticida. Como já se foi visto em outros trabalhos, secreções defensivas de soldados de *Nasutitermes* apresentaram um efeito fungistático contra *Metarhizium anisopliae* (Rosengaus, Lefebvre & Traniello 2000), assim como também foi visto em abelhas sociais que produzem terpenos que diminuem o crescimento de bactérias dentro da colônia (Wiese *et al.* 2018).

Agradecimentos

O presente estudo foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX). THCM e ANFS possuem bolsa de estudo da CAPES. CRS e SYMW possuem bolsa de estudo da FACEPE e RECS possui bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) do CNPq. Por fim, PFC agradece ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ 310395/2019-4) do CNPq.

Leitura citada

Alcock, J. 2005. Animal behavior: An evolutionary approach, Sinauer Associates, 564p.

- Almeida, C. S., P.F. Cristaldo, D.F. Florencio, N.G. Cruz, A.A. Santos, A.P. Oliveira, A.S. Santana, E.J.M. Ribeiro, A.P.S. Lima, L. Bacci & A.P. Araújo. 2016.** Combined foraging strategies and soldier behaviour in *Nasutitermes* aff. *coxipoensis* (Blattodea: Termitoidea: Termitidae). *Behavioural Processes*. 126: 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.03.006>
- Bourguignon, T., N. Lo, S.L. Cameron, J. Šobotník, Y. Hayashi, S. Shigenobu, D. Watanabe, Y. Roisin, T. Miura & T.A. Evans. 2015.** The Evolutionary History of Termites as Inferred from 66 Mitochondrial Genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 32: 406-421. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu308>
- Bulmer, M. S., B.A. Franco, & E.G. Fields. 2019.** Subterranean Termite Social Alarm and Hygienic Responses to Fungal Pathogens. *Insects*. 10: 240 <https://doi.org/10.3390/insects10080240>
- Chen, Y., L. Zhang, S. Zhang, B. Liu, W. Zeng & Z. Li. 2022.** The mite *Acarus farris* inducing defensive behaviors and reducing fitness of termite *Coptotermes formosanus*: implications for phoresy as a precursor to parasitism. *BMC Ecology and Evolution*. 22: 80. <https://doi.org/10.1186/s12862-022-02036-3>
- Climate-data.org. 2022.** Available in <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/pernambuco/recife-5069/#climate-table>. Accessed in 16/08/2022.
- Constantino, R. 2002.** An illustrated key to neotropical termite genera (Insecta: Isoptera) based primarily on soldiers. *Zootaxa*. 40: 1–40.
- Cristaldo, P.F., V. Jandák, K. Kotalová, V.B. Rodrigues, M. Brothánek, O. Jiříček, O. DeSouza & J. Šobotník. 2015.** The nature of alarm communication in *Constrictotermes cyphergaster* (Blattodea: Termitoidea: Termitidae): The integration of chemical and vibroacoustic signals. *Biology Open*. 4: 1649-1659. <https://doi.org/10.1242/bio.014084>
- Cristaldo, P.F., V.B. Rodrigues, S.L. Elliot, A.P.A. Araújo & O. DeSouza. 2016.** Heterospecific detection of host alarm cues by an inquiline termite species (Blattodea: Isoptera: Termitidae). *Animal Behaviour*. 120: 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.07.025>
- Dai, P., C.J. Jack, A.N. Mortensen, T.A. Bustamante, J.R. Bloomquist & J.D. Ellis. 2019.** Chronic toxicity of clothianidin, imidacloprid, chlorpyrifos, and dimethoate to *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. *Pest Management Science*. 75: 29–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.5124>
- Donovan, S.E., P. Eggleton & D.E. Bignell. 2001.** Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. *Ecological Entomology*. 26: 356–366.
- Elango, G., A. Abdul Rahuman, C. Kamaraj, A. Bagavan, A. Abduz Zahir, T. Santhoshkumar, S. Marimuthu, K. Velayutham, C. Jayaseelan, A.V. Kirthi & G. Rajakumar. 2012.** Efficacy of medicinal plant extracts against Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *Industrial Crops and Products*. 36: 524–530. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.10.032>

- Evans, T.A., R. Inta, J.C.S. Lai & M. Lenz. 2007.** Foraging vibration signals attract foragers and identify food size in the drywood termite, *Cryptotermes secundus*. *Insectes Sociaux*. 54: 374–382. <https://doi.org/10.1007/s00040-007-0958-1>
- Evans, T.A., J.C.S. Lai, E. Toledano, L. McDowall, S. Rakotonarivo & M. Lenz. 2005.** Termites assess wood size by using vibration signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 3732–3737. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408649102>
- Evans, T.A., R. Inta, J.C.S. Lai, S. Prueger, N.W. Foo, E.W. Fu. & M. Lenz. 2009.** Termites eavesdrop to avoid competitors. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 276: 4035–4041.
- Ferreira, D.V., P.F. Cristaldo, M.L.C. Rocha, D.L. Santana, L. Santos, OS.S. Lima & A.P.A. Araújo. 2018.** Attraction and vibration: Effects of previous exposure and type of food resource in the perception of allocolonial odors in termites. *Ethology*. 124: 743–750. <https://doi.org/10.1111/eth.12806>
- Grüter, C. & T.J. Czaczkes. 2019.** Communication in social insects and how it is shaped by individual experience. *Animal Behaviour*. 151: 207–215. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2019.01.027>
- Hager, F.A., K. Krausa & W.H. Kirchner. 2019.** Vibrational Behavior in Termites (Isoptera), p. 309-327. In P.S.M. Hill, R. Lakes-Harlan, V. Mazzoni, P.M. Narins, M. Virant-Doberlet, & A. Wessel (Eds.), *Biotremology: Studying Vibrational Behavior*, Springer International Publishing, 534p. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22293-2_16
- Hassan, B., S. Ahmed & M.A. Ejaz. 2018.** Persistency of Chlorpyrifos and Termiban (Imidacloprid) in soil against subterranean termites. *Journal of Entomological and Acarological Research*: 50: 2. <https://doi.org/10.4081/jear.2018.7735>
- Hunt, J.H. & F.J. Richard. 2013.** Intracolony vibroacoustic communication in social insects. *Insectes Sociaux*. 60: 403–417. <https://doi.org/10.1007/s00040-013-0311-9>
- Inta, R., J.C.S. Lai, E.W. Fu & T.A. Evans. 2007.** Termites live in a material world: exploration of their ability to differentiate between food sources. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 4: 735–744. <https://doi.org/10.1098/rsif.2007.0223>
- Korb, J. 2007.** Termites. *Current Biology*. 17: R995–R999. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.033>
- Kottek, M., J. Grieser, C. Beck, B. Rudolf & F. Rubel. 2006.** World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*. 15: 259–263. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>

- Leonhardt, S.D., F. Menzel, V. Nehring & T. Schmitt. 2016.** Ecology and Evolution of Communication in Social Insects. *Cell.* 164: 1277–1287. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.035>
- Lima, J.K.A., E.L.D. Albuquerque, A.C.C. Santos, A.P. Oliveira, A.P.A. Araújo, A.F. Blank, M. de F. Arrigoni-Blank, P.B. Alves, D.A. Santos & L. Bacci. 2013.** Biototoxicity of some plant essential oils against the termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *Industrial Crops and Products.* 47: 246–251. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.018>
- Mathews, A.G.A. 1977.** Studies on termites from the Mato Grosso State, Brazil. *Academia Brasileira de Ciências*, 267p.
- Mello, A.P. de, B.G. da Costa, A.C. da Silva, A.M.B. Silva & M.A. Bezerra-Gusmão. 2014.** Termites in historical buildings and residences in the semiarid region of Brazil. *Sociobiology.* 61: 318–323. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i3.318-323>
- Mendonça, T.H.C. de., C.R. Silva, S.Y.M. Watanabe, A.F.N. Silva, R.E.C. Santos & P.F. Cristaldo. 2022.** How to perceive the insecticide? The Neotropical termite *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae) trigger alert behavior after exposure to imidacloprid. *Behavioural Processes Submitted.*
- Miramontes, O. & O. Desouza. 1996.** The Nonlinear Dynamics of Survival and Social Facilitation in Termites. *J. Theor. Biol.* 181: 373–380.
- Oberst, S., G. Bann, J.C.S. Lai & T.A. Evans. 2017.** Cryptic termites avoid predatory ants by eavesdropping on vibrational cues from their footsteps. *Ecology Letters.* 20: 212–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ele.12727>
- Pailler, L., S. Desvignes, F. Ruhland, M. Pineirua & C. Lucas. 2021.** Vibratory behaviour produces different vibration patterns in presence of reproductives in a subterranean termite species. *Scientific Reports.* 11: 9902. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88292-7>
- Paul, B., S. Singh, K. Shankarganesh & Md.A. Khan. 2018.** Synthetic Insecticides: The Backbone of Termite Management, p. 233-260. In Md. A. Khan & W. Ahmad (Eds.), *Termites and Sustainable Management: Volume 2 - Economic Losses and Management.* Springer International Publishing, 324p. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68726-1_11
- R Development Core Team. 2022.** R: A Language and Environment for Statistical Computing, Version 4.2.2. Available via <https://www.r-project.org/>
- Rosengaus, R.B., C. Jordan, M.L. Lefebvre & J.F.A. Traniello. 1999.** Pathogen Alarm Behavior in a Termite: A New Form of Communication in Social Insects. *Naturwissenschaften* 86: 544–548. <https://doi.org/10.1007/s001140050672>

- Rosengaus, R. B., J.F.A. Traniello & M.S. Bulmer. 2011.** Ecology, behavior and evolution of disease resistance in termites, p. 165-191. In D.E. Bignell, Y. Roisin, & N. Lo (Eds.), *Biology of Termites: A modern Synthesis*, Springer, 576p.
- Rosengaus, R.B., M.L. Lefebvre & J.F.A. Traniello. 2000.** Inhibition of Fungal Spore Germination by *Nasutitermes*: Evidence for a Possible Antiseptic Role of Soldier Defensive Secretions. *Journal of Chemical Ecology*. 26: 21 – 39.
- Ruhland, F., M. Moulin, M. Choppin, J. Meunier & C. Lucas. 2020.** Reproductives and eggs trigger worker vibration in a subterranean termite. *Ecology and Evolution*. 10: 5892–5898. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ece3.6325>
- Rust, M.K. & N.-Y. Su. 2011.** Managing Social Insects of Urban Importance. *Annual Review of Entomology*. 57: 355–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100634>
- Santana, A.L.B.D., C.A. Maranhão, J.C. Santos, F.M. Cunha, G.M. Conceição, L.W. Bieber & M.S. Nascimento. 2010.** Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64: 7–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.07.009>
- Santos, A.A., C.R. Melo, B.M.S. Oliveira, A.S. Santana, A.C.C. Santos, T.S. Sampaio, A.F. Blank, P.F. Cristaldo, A.P.A. Araújo & L. Bacci. 2019.** Acute Toxicity and Sub-lethal Effects of the Essential Oil of *Aristolochia trilobata* and Its Major Constituents on *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae). *Neotropical Entomology*. 48: 515-521. <https://doi.org/10.1007/s13744-018-0665-9>
- Scheffrahn, R.H., H.H. Hochmair, W.H. Kern, J. Warner, J. Krecek, B. Maharajh, B.J. Cabrera & R.B. Hickman. 2014.** Targeted elimination of the exotic termite, *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), from infested tracts in southeastern Florida. *International Journal of Pest Management*. 60: 9–21. <https://doi.org/10.1080/09670874.2014.882528>
- Schneider, C.A., W.S. Rasband & K.W. Eliceiri. 2012.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 9: 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Su, N.-Y., M. Tamashiro & M.I. Haverty. 1987.** Characterization of Slow-acting Insecticides for the Remedial Control of the *Formosan subterranean* Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*. 80: 1–4. <https://doi.org/10.1093/jee/80.1.1>
- Thorne, B.L. 1985.** Numerical and biomass caste proportions in colonies of the termites *Nasutitermes corniger* and *N. ephratae* (Isoptera; Termitidae). *Insectes Sociaux*. 32: 411–426. <https://doi.org/10.1007/BF02224018>
- Wiese, N., J. Fischer., J. Heider., O. Lewkowski., J. Degenhardt & S. Erler. 2018.** The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (*Thymus vulgaris*) inhibit growth of bee disease-associated microbes. *Scientific Reports*. 8: 14634.

Wiley, R.H. 2006. Signal Detection and Animal Communication. In *Advances in the Study of Behavior*. 36: 217-247. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(06\)36005-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3454(06)36005-6)

Williamson, S.M. & G.A. Wright. 2013. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*. 216: 1799–1807. <https://doi.org/10.1242/jeb.083931>

Zahavi, A. 1977. Reliability in communication systems and the evolution of altruism, p. 253-259. In B. Stonehouse & C. Perrins (Eds.), *Evolutionary Ecology*, Macmillan Education UK. https://doi.org/10.1007/978-1-349-05226-4_21

Tabela 1. Efeito do tratamento (*inseticida + cupins*) na distância para a barreira de grupos de cupins não expostos após 30 e 60 minutos do início do experimento. Análise de Desvio (Teste *Chisq* Tipo II de Wald). Modelagem Linear Generalizada Mista.

Tratamentos	média±e.p	Chisq	d.f	P	
30 minutos					
Papel filtro	3,47±0,38				
Papel filtro + inseticida	2,87±0,33	1,94	3	0,58	<i>n.s.</i>
Papel filtro + cupim	3,48±0,45				
Papel filtro + inseticida + cupim	3,55±0,36				
60 minutos					
Papel filtro	4,19±0,40				
Papel filtro + inseticida	3,82±0,49	2,41	3	0,49	<i>n.s.</i>
Papel filtro + cupim	3,30±0,40				
Papel filtro + inseticida + cupim	3,50±0,43				

n.s. = não- significativo

Tabela 2. Efeito do tratamento (*'inseticida + cupins'*) e controles na proporção de cupins de grupos não expostos em diferentes locais da arena experimental (área central e câmara de fuga). Análise de Desvio (Teste *Chisq* Tipo II de Wald). Modelagem Linear Generalizada Mista.

Source	Chisq	d.f.	P	
30 minutos				
Tratamento (T)	0,00	3	1,00	n.s.
Local (L)	34,11	1	< 0,0001	***
T:L	3,40	3	0,33	n.s.
60 minutos				
Tratamento (T)	0,00	3	1,00	n.s.
Local (L)	9,12	1	0,002	**
T:L	12,03	3	0,007	**

** $P < 0.001$; n.s. = não- significativo

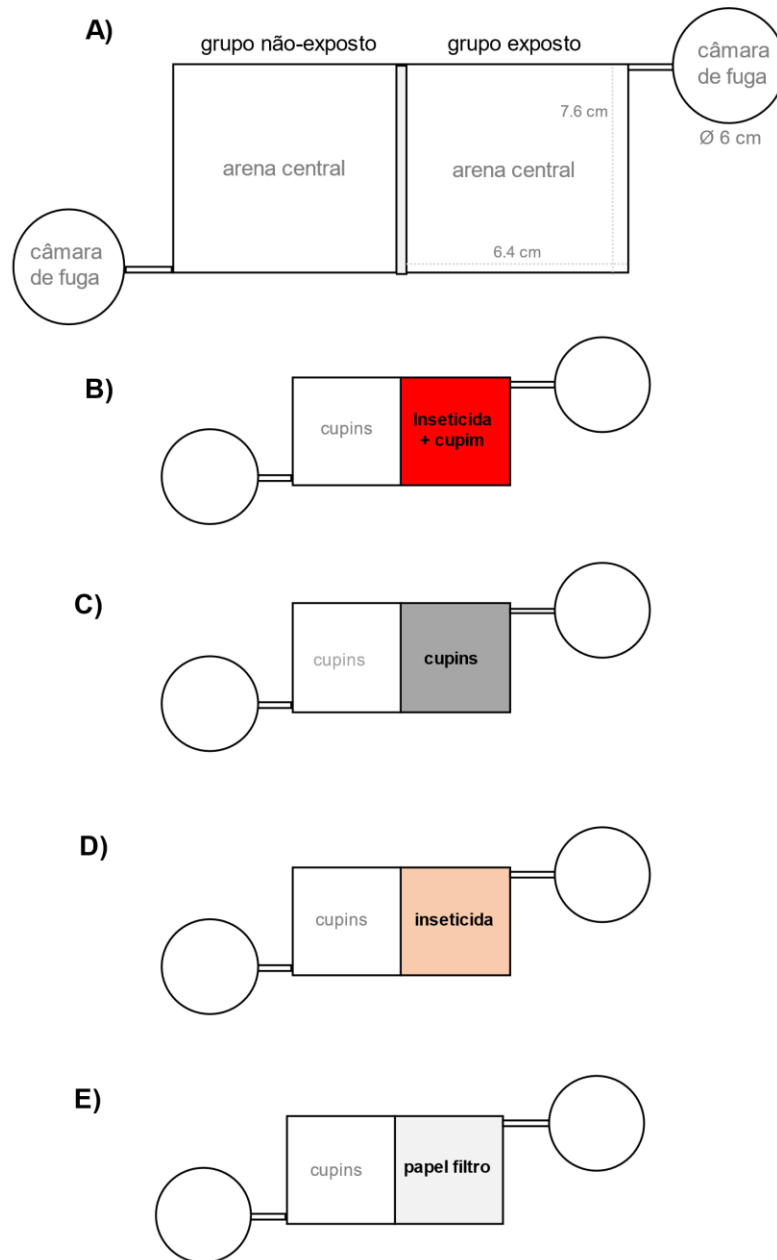


Figure 1. Desenho esquemático do experimento comportamental. A) Visão geral das arenas experimentais utilizadas durante os bioensaios; B) Visão geral da arena com o tratamento ('inseticida + cupins'); C) Visão geral da arena com o controle positivo (apenas cupins); Visão geral da arena com o controle negativo (apenas inseticida); D) Visão geral da arena com o controle branco (apenas papel filtro). Maiores detalhes podem ser obtidos na seção Material & Métodos.

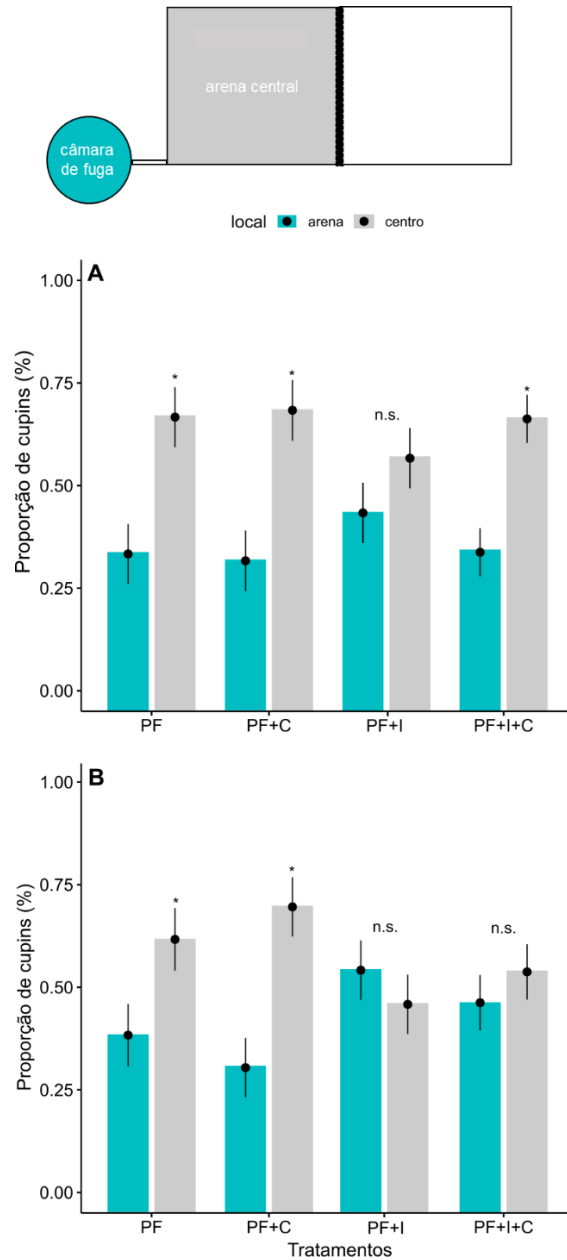


Figure 2. Proporção média de cupins presentes na arena central e na câmara de fuga nos grupos não-expostos ao inseticida imidacloprido após 30 minutos (A) e 60 minutos (B) do início do experimento. * indica diferença significativa na proporção de indivíduos entre a arena central e a câmara de fuga nos grupos não-expostos nos diferentes tratamentos. *n.s.* indica ausência de diferença significativa na proporção de indivíduos entre a arena central e a câmara de fuga nos grupos não-expostos nos diferentes tratamentos.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados descobertos nessa dissertação sugerem, de forma conjunta, que o inseticida imidacloprido causa um efeito na comunicação de alarme em *Nasutitermes corniger*. No qual, os movimentos vibratórios desencadeados na presença do inseticida parecem ter uma função importante, uma vez que os resultados encontrados no segundo capítulo indicam um comportamento de alerta, sendo dependente da dose, ao qual indica uma complexidade. Entretanto, requer de novos estudos para observar se estes movimentos corporais de agitação ao inseticida são iguais a outros perigos que podem ser acometidos aos cupins ou cada perigo emite uma resposta de movimentos diferente. Além disso, com os resultados obtidos no terceiro capítulo indicam a complexidade se estende, uma vez que os cupins parecem perceber o inseticida, no qual desencadeiam um comportamento de escape aos seus companheiros de ninho não expostos, tendo assim, o repasse da informação. Porém, não se sabe se está complexidade encontrada em *N. corniger* é algo presente só nessa espécie ou também pode ser visto em grupos de cupins filogeneticamente basais. Logo, requer mais estudos, a fim de verificar se a complexidade se estende ao longo da infraordem Termitodea.

Concluindo, o presente estudo fornece novos conhecimentos a respeito da comunicação de alarme em cupins, e ainda, pode contribuir para desenvolvimento de novos métodos de controle dessa praga importante de ambiente urbano.