Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Dinâmica do crescimento do fungo simbionte e estruturação de castas em formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*)

Isabella Bueno

Dissertação apresentada para obtenção do título Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2020

Isabella Bueno
Bacharela em Ciências Biológicas

Dinâmica do crescimento do fungo simbionte e estruturação de castas em formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **WESLEY AUGUSTO CONDE GODOY**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Bueno, Isabella

Dinâmica do crescimento do fungo simbionte e estruturação de castas em formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*) / Isabella Bueno. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

50 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Atta sexdens* 2. Proporções de castas 3. Dinâmica de crescimento 4. Fungo simbionte I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas mulheres que vieram antes de mim. À todas, cientistas ou não, que dedicaram a vida a abrir o caminho pelo qual trilhamos hoje. Às que lutaram pela nossa igualdade e poder de escolha, tornando concebível a nós, o exercício da ciência. A força dessas mulheres, antepassadas, reverberam dentro de nós.

Dedico este trabalho ao movimento feminista.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus pais, que apoiam incondicionalmente meus sonhos. Ao meu irmão, Matheus que sempre tornou a vida mais leve.

Meus sinceros agradecimentos ao meu companheiro, Fábio por caminhar comigo e que me auxiliou em inúmeros passos dessa dissertação.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Wesley, que além do apoio acadêmico integral, é fonte de inspiração diária, como pesquisador e como ser humano.

Aos meus professores da graduação, em especial Maria Rosa Camargo, que me conduziu ao caminho lúcido do exercício da pesquisa, que me mostrou que nem mesmo a ciência é neutra, me proporcionando dicernimento para observar a quais interesses serve, e se estes estão alinhados com meus valores de vida. Herança esta, inestimável.

Ao Bruno, Jéssica, Rafael, Walter, Igor e Sujimoto que contribuíram de forma fundamental com essa pesquisa.

Aos meus amigos, Isabelle, Felipe, Maysa, Thalita, Mayara, Lucas e Larine que tornam o cotidiano leve e divertido.

À Bianca e Andresa que me ajudaram nas coletas de campo e nos cuidados com a criação das colônias.

Agradeço a Capes pela concessão da bolsa que tornou essa pesquisa possível e a todos e todas que lutam pela independência e autonomia da universidade pública e da pesquisa no Brasil.

"Para mi solo recorrer los caminos que tienen corazón,
cualquier caminho que tenga corazón.
Por ahí yo recorro, y la única prueba que vale es atravesar
todo su largo. Y por ahí yo recorro mirando, mirando, sin
aliento."

(Para mim só existe percorrer os caminhos que tenham
coração, qualquer caminho que tenha coração. Por ali
eu viajo, e o único desafio que vale a pena é percorrer
toda sua extensão. E por ali viajo, olhando, olhando,
arquejante.)

Dom Juan

(Carlos Castañeda, The Teachings of Don Juan, 1968)

SUMÁRIO

RESUMO **7**

ABSTRACT **8**

LISTA DE FIGURAS **9**

LISTA DE TABELAS **12**

1. INTRODUÇÃO **13**

2. MATERIAL E MÉTODOS **17**

2.1. COLETA DAS COLÔNIAS EM CAMPO 17

2.2. MEDIÇÃO DAS CÁPSULAS CEFÁLICAS E MONTAGEM DA RÉGUA DE OPERÁRIAS 20

2.3. EXPERIMENTO DE PROPORÇÃO DE SUBCASTAS 22

2.4. EXPERIMENTO PARA ESTIMATIVA DO CRESCIMENTO DO FUNGO 23

2.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ESTIMATIVA 24

2.6. PRODUÇÃO DE LIXO 26

2.7. ANÁLISE COMPORTAMENTAL DO FORRAGEIO 26

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA 27

3. RESULTADOS **29**

4. DISCUSSÃO **41**

5. CONCLUSÃO **45**

REFERÊNCIAS **47**

RESUMO

Dinâmica do crescimento do fungo simbionte e estruturação de castas em formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*)

As formigas-cortadeiras promovem o corte e o carregamento de folhas para dentro dos seus ninhos a fim de cultivar o fungo simbionte obrigatório que é utilizado como principal fonte alimentar e abrigo para a prole. *Atta* é um dos dois gêneros existentes e ocorre em quase todo território brasileiro, causando impactos ecológicos positivos, mas também econômicos negativos em diversas culturas, principalmente florestais. O cultivo do fungo simbionte através da vegetação fresca depende de uma divisão de trabalho específica entre as castas polimórficas, que vão desde o preparo do substrato e o cuidado com a prole, até o corte e carregamento das folhas, além da defesa da colônia. Esse estudo teve como objetivo compreender a dinâmica de crescimento da colônia, essencialmente baseando-se na relação entre o crescimento do fungo simbionte e as proporções de indivíduos da subcasta generalista. A dinâmica de crescimento do fungo foi estudada com diferentes proporções de generalistas, ou seja 100%, 50% e 10%. Além disso, o comportamento de corte e transporte de folhas pelos indivíduos remanescentes da colônia foi avaliado. Em relação ao efeito da interação entre o tratamento e a tendência temporal, o crescimento dos fungos nos três tratamentos apresentaram flutuações temporais, no entanto o crescimento final do volume dos jardins de fungo foi semelhante nos três tratamentos, indicando que possivelmente algum mecanismo homeostático atua na colônia em resposta a perda de operárias. Encontramos também variações em variáveis comportamentais e mudanças no grau de agregação dos indivíduos remanescentes em resposta a perda de operárias.

Palavras-chave: *Atta sexdens*, Proporções de castas, Dinâmica de crescimento, Fungo simbionte

ABSTRACT

Growth dynamics of symbiote fungus and caste structure in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*)

Leaf-cutting ants promote the cutting and loading of leaves into their nests in order to grow the obligatory symbiotic fungus which is used as the main food source and shelter for the offspring. *Atta* is one of the two existing genera and occurs in almost all Brazilian territory, causing positive ecological impacts, but also negative economic impacts on several crops, especially forest. Cultivation of symbiotic fungus through fresh vegetation depends on a specific division of labor among polymorphic castes, ranging from substrate preparation and care of the offspring, to leaf cutting and loading, as well as the defense of the colony. This study aimed to understand the growth dynamics of the colony, essentially based on the relationship between the growth of the symbiote fungus and the ratios of generalist subcaste individuals. The fungus growth dynamics were studied with different ratios of generalists, i.e. 100%, 50% and 10%. In addition, leaf cutting and transport behavior by the remaining individuals of the colony were evaluated. Regarding the effect of the interaction between the treatment and the temporal tendency, the fungal growth in the three treatments showed temporal fluctuations. However, the final growth of the fungal garden volume was similar in the three treatments, likely indicating that some homeostatic mechanisms act on the colony growth in response to loss of workers. We also found variations in behavioral variables and changes in the degree of aggregation of the remaining individuals in response to worker loss.

Keywords: *Atta sexdens*, Caste ratio, Growth dynamics, Symbiont fungus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista externa no montículo de terra característico de ninhos de saúva. Imagem registrada pela autora em talhão de teca, município de Anhembi/SP.....17

Figura 2. Foto do fungo simbionte de *Atta sexdens* no interior do ninho durante escavação em área de talhão de teca, município de Anhembi/SP. Foto da autora.....18

Figura 3. Foto da rainha, operárias e fungo simbionte em colônia inicial de *Atta sexdens* armazenadas em recipiente plástico em laboratório. Foto da autora.....19

Figura 4. Estrutura de potes plásticos interligados por mangueiras simulando o sistema de colônias de formigas-cortadeiras, sendo da esquerda para direita o primeiro simulando a câmara de lixo, o segundo simulando a câmara do fungo e o terceiro simulando a câmara de forrageio.....20

Figura 5. a) Fotos mostrando as medições dos intervalos de cápsula cefálica através da ocular micrométrica (Wild MM 5235) acoplada ao microscópio estereoscópico; a) Mensuração da cápsula cefálica de um indivíduo pertencente a subcasta das "jardineiras"; b) mensuração da cápsula cefálica de um indivíduo pertencente a subcasta das "generalistas"; c) mensuração da cápsula cefálica de um indivíduo pertencente a subcasta das "forrageiras"; d) mensuração da cápsula cefálica de um indivíduo pertencente a subcasta dos "soldados".....21

Figura 6. Régua contendo cabeças de operárias de *Atta sexdens* com intervalos de medida das respectivas subcastas.....22

Figura 7. Esquema mostrando o procedimento da realização das fotos suspensas em ângulo reto e com distância padronizada para mensuração da área e altura do fungo.....24

Figura 8. Captura de tela da interface do programa Image J mostrando o processo de medição da área através da foto do fungo simbionte de uma colônia de *Atta sexdens*.....24

Figura 9. Esquema caracterizando o experimento de proporção de castas, incluindo o plano de validação das estimativas.....25

Figura 10. Captura de tela da interface do sistema de captura de imagens automatizado EthoVision analisando o comportamento de forrageio de uma colônia.....26

Figura 11. Gráficos demostrando os padrões de crescimento da área dos jardins de fungos de cada réplica durante o desenvolvimento de 24 colônias, da semana 1 até a semana 24 nos três tratamentos: T1= 100% das generalistas, representado pela curva vermelha; T2= 50% das generalistas, representado pela curva verde e T3= 10% das generalistas, representado pela curva azul. O eixo y se refere ao tempo em semanas e o eixo x a área em cm².....30

Figura 12. Gráfico mostrando a variação média da área dos jardins de fungos em função do tempo nos tratamentos T1, T2 e T3, representado pelas diferentes cores das curvas. O eixo y se refere ao tempo em semanas e o eixo x a área em cm². A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3.....31

Figura 13. Padrões de crescimento dos jardins de fungos de cada réplica em relação a altura durante 24 semanas para 24 colônias nos três tratamentos: T1= 100% das generalistas, representado pela curva vermelha; T2= 50% das generalistas, representado pela curva verde; e T3= 10% das generalistas, representado pela curva azul. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y a altura em cm.....32

Figura 14. Gráfico mostrando a variação média da altura do jardim de fungos em função do tempo, nos tratamentos T1, T2 e T3, indicado pelas diferentes cores das curvas. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y a altura em cm. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3.....33

Figure 15. Curvas mostrando os padrões de crescimento dos jardins de fungos de cada réplica em relação a altura durante o desenvolvimento de 24 colônias por 24 semanas nos três tratamentos: T1= 100% das generalistas, representado pela curva vermelha; T2= 50% das generalistas, representado pela curva verde; e T3= 10% das generalistas, representado pela curva azul. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y ao volume em cm³.....34

Figure 16. Curvas mostrando o comportamento médio do aumento do volume estimado do jardim de fungos nos tratamentos T1, T2 e T3, indicado pelas diferentes cores de curvas. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y ao volume em cm³. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3.....35

Figura 17. Gráfico mostrando a relação entre o volume estimado em cm³ (eixo x) e o peso úmido do jardim de fungos em gramas (eixo y) 36

Figura 18. Curvas indicando o peso de (em gramas) do lixo seco produzido em cada réplica durante o desenvolvimento de 24 colônias para 24 semanas nos três tratamentos: T1= 100% das generalistas, representado pela curva vermelha; T2= 50% das generalistas, representado pela curva verde; e T3= 10% das generalistas, representado pela curva azul. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y ao peso seco do lixo em gramas.....37

Figura 19. Curvas mostrando o comportamento médio do peso em gramas (g) do lixo produzido pelas colônias nos tratamentos T1, T2 e T3, indicado pelas diferentes cores de curvas. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y peso do lixo em gramas. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3.....37

Figura 20. Mapa de calor representando o gradiente de agregação dos indivíduos nos diferentes tratamentos, sendo maior agregação na cor mais quente e as menores agregações nas cores frias.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela mostrando os valores das variáveis "distância média movida", "velocidade média" e "movimento médio" nos três tratamentos, T1, T2 e T3.. 38

Tabela 2. Tabela mostrando os valores das variáveis medidas “distância média ao ponto central” (D. Point Mean), “movimento cumulativo” (Mov. Cum) e “tempo acumulado na zona de interesse” (Zone Cumu), nos três tratamentos, T1, T2 e T3. 38

1. INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras tem distribuição limitada ao novo mundo, com predomínio nos trópicos das Américas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). O grupo taxonômico pertence a subtribo Attina (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) (SOSA-CALVO et al., 2017) com aproximadamente 230 espécies descritas de cultivadoras de fungo (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2009), sendo *Atta* e *Acromyrmex* os gêneros classificados como Attina superiores por serem os únicos que cultivam o fungo simbionte através de material vegetal fresco (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). *Atta* é o gênero com maior importância econômica da América do Sul por atacar diversas culturas economicamente importantes. Por outro lado, há outro aspecto inerente deste grupo de insetos que faz dele importante sob o ponto de vista ecológico, a nutrição do solo. O acúmulo de grande quantidade de matéria orgânica devido ao carregamento de folhas para baixo da superfície do solo, permite a propagação de grande número de bactérias, fungos e nematoides, que desempenham importantes papéis ecológicos para a sustentabilidade de agroecossistemas (WEBER, 1966) (CHEEKE; COLEMAN; WALL, 2012) sendo as formigas-cortadeiras, consideradas engenheiras de ecossistemas, alterando significativamente a comunidade de microrganismos aos arredores do ninho (RODRIGUES et al., 2013).

Este grupo de insetos é classificado como eusocial pelo alto grau de socialização e possui acentuadas diferenças morfológicas entre as castas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). O sistema de divisão de castas observado no gênero *Atta* é o mais complexo e filogeneticamente derivado dentre todas as formigas. O sistema baseado no alto grau de polimorfismo intimamente ligado ao polietismo é associado essencialmente ao processamento da vegetação fresca para o cultivo de um fungo simbionte, com existência obrigatória para o sucesso do formigueiro, que nele encontra sua fonte nutricional (WILSON, 1980a).

Casta é um conjunto de indivíduos dentro da colônia especializado em determinado agrupamento de tarefas em um período de tempo. Podem ser classificadas por tamanho, idade ou ambos. No gênero *Atta*, ocorre a divisão da casta das operárias em subcastas específicas. Essas subcastas possuem um gradiente de tamanho e tarefas, no entanto, são separadas de acordo com critérios específicos (OSTER e WILSON, 1978; WILSON, 1980a).

As castas, divisão de indivíduos reprodutores e não reprodutores, e as subcastas, subdivisões da casta não reprodutora são organizações importantes para o sistema, visto que o conjunto de operárias executa tarefas com alta especificidade na colônia de forma organizada e

integrada garantindo a eficiência necessária a complexidade do sistema (WEBER, 1966; WILSON, 1971; OSTER e WILSON, 1978). As subcastas são determinadas em *Atta* pelo tamanho de suas cápsulas cefálicas e pelo complexo de tarefas executadas. Uma tarefa é um conjunto de ações que flui de maneira integrada e se for interrompida por uma operária e retomada por outra, resulta em perda da eficiência. Através das curvas de polietismo é possível definir o complexo de atividades que reflete o repertório comportamental individual, tornando possível classificar as subcastas de acordo com a variedade de tarefas executadas na colônia (WILSON, 1980a).

Morfologicamente, as subcastas são classificadas pelo tamanho da cápsula cefálica. As operárias menores compõe as jardineiras e enfermeiras, com tamanho aproximado de 2 milímetros de comprimento e largura da cápsula cefálica de 1 milímetro. As generalistas possuem cápsula cefálica com 1,4 milímetros. Forrageiras e escavadoras tem cápsula medindo 2,2 milímetros. Os soldados exibem cápsula cefálica acima de 3,0 milímetros, podendo chegar a 14 milímetros de comprimento (WEBER, 1966; WILSON, 1980). Essas medidas são representativas de diferentes castas, com tarefas específicas de alta relevância para a colônia.

As tarefas são analisadas por curvas de polietismo. Jardineiras e enfermeiras são especializadas no cuidado das hifas do fungo simbionte, na incorporação das folhas tratadas no jardim de fungos e no cuidado com a ninhada e rainha. As generalistas possuem repertório de tarefas mais amplo, relacionado ao processamento da vegetação antes de ser incorporada ao fungo, reconstrução da estrutura do fungo, transporte do lixo, assistência da ninhada em ecdise e cuidado com a rainha. As forrageiras e escavadoras cortam, transportam a vegetação e escavam os ninhos. As soldadas defendem os ninhos de ataques que apresentam grande risco para a colônia (WILSON, 1980a).

Associações simbióticas são comuns entre os organismos vivos e apesar de pouco estudadas, em comparação com outras relações ecológicas como por exemplo competição, há consenso de que as relações mutualísticas são fundamentais na determinação da distribuição dos organismos (RISCH; BOUCHER, 1976), além de serem reconhecidas como fator chave para a evolução de grupos taxonômicos de maior nível hierárquico (CURRIE, 2001). A associação entre insetos e fungos visando alimentação em insetos e substratos para crescimento em fungos é um exemplo clássico de simbiose.

A complexidade do desenvolvimento micelial e do próprio cultivo de fungos por insetos, tem provavelmente significativa influência do tempo por tratar-se de um processo interativo em curso há cerca de 40 a 60 milhões de anos, antes das ações pioneiras em prol da agricultura. Além

das formigas, outros grupos de insetos, como algumas espécies de besouros e cupins, também desenvolveram esta habilidade. Em especial, cupins e formigas, são grupos caracterizados por sociedades complexas. A divisão de tarefas nesses organismos tem desenvolvido, ao longo do tempo, uma forma bem-sucedida de cultivo do fungo simbionte. O cultivo do fungo simbionte por grandes sociedades aumentou notavelmente a relevância das interações complexas no cenário da ecologia trófica (MUELLER; GERARDO, 2002).

O cultivo de fungos por formigas teve uma única origem na história evolutiva e ocorreu no Novo Mundo, possuindo distribuição essencialmente Neotropical (SCHULTZ; MEIER, 1995). O fungo cultivado *Leucoagaricus gongylophorus*, pertencente ao grupo Basidiomiceto, é cultivado pelas formigas-cortadeiras a partir de folhas frescas trazidas ao ninho (GARRETT et al., 2016). Após o corte, realizado pelas formigas da subcasta das forrageiras, as jardineiras mastigam os fragmentos umedecendo-os com saliva e as vezes inserindo uma gotícula de líquido fecal. O substrato preparado é cuidadosamente incorporado ao fungo. A região recém preparada é enriquecida com micélios de outras partes do fungo (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Colônias de insetos eusociais podem ser estudadas segundo a abordagem do "superorganismo" e, dessa forma, pode-se relacionar seu desenvolvimento com o desenvolvimento de um organismo isolado. O estágio inicial da colônia no momento da fundação é tão distinto da colônia adulta quanto um embrião é distinto do organismo adulto. Dessa forma, a ontogenia de uma colônia é análoga a ontogenia de um organismo individual (TSCHINKEL, 2010). Esse processo de fundação do ninho até a maturidade da colônia é chamado "sociogênese" (WILSON, 1985).

Sociogênese, ou o ciclo de vida da colônia, é dividido em três fases: a primeira fase é a fundação do ninho pela rainha inseminada, que oviposita e cria a primeira ninhada de operárias, com baixo grau de polimorfismo, a partir de suas reservas energéticas. Quando atingem a fase adulta, as primeiras operárias assumem as tarefas de forrageio e cuidado da prole, enquanto a rainha assume a única tarefa de ovipositar. Esta segunda fase, dedicada ao crescimento da colônia, é chamada fase ergonômica. Após um período que varia de acordo com a espécie, a colônia entra na terceira fase, a reprodutiva, em que fêmeas e machos reprodutivos são produzidos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

A organização colonial em insetos eusociais é um dos eventos evolutivos mais relevantes. Juntamente com a metamorfose e voo, essa organização é responsável pelo sucesso ecológico do grupo (WILSON, 1985). Os insetos sociais, estudados sob a ótica do superorganismo,

fornecem uma oportunidade de relacionar os processos individuais de desenvolvimento com o desenvolvimento da colônia, levando em consideração fatores ecológicos, de forma a relacionar o desenvolvimento à evolução (TSCHINKEL, 2011). A compreensão sobre o desenvolvimento de uma colônia de insetos sociais é essencial para o entendimento da dinâmica de interações entre insetos e fungo simbionte e, para tanto, estimativas sobre o crescimento da colônia, bem como a descrição dos seus componentes, no caso, larvas, adultos, rainha e fungo são fundamentais. Esse método de estudo é denominado "sociometria" (TSCHINKEL, 1991).

O termo "sociometria" foi proposto por Tschinkel (1991) para designar a coleta e análise dos atributos físicos e numéricos das colônias de insetos sociais. A sociometria envolve basicamente três níveis: a compilação de dados, comparação dos atributos observados entre espécies e as relações dos atributos descritos entre si. Entretanto, a obtenção de dados descritivos observacionais sobre a dinâmica da colônia é indispensável para a análise teórica.

Como os trabalhadores das colônias de formigas-cortadeiras controlam ativamente a dinâmica do jardim de fungos preparando o substrato foliar, inoculando o fungo e removendo o material morto e outros microrganismos contaminantes, eles interferem diretamente no crescimento das hifas na superfície do jardim (BASS; CHERRETT, 1994). Diante dessa relação íntima do crescimento do jardim de fungos com a execução de tarefas por trabalhadores, é fundamental que as variáveis, taxa de crescimento do fungo e atividade das castas, sejam estudadas a fim de compreendermos a dinâmica do crescimento do jardim de fungos em colônias de formigas-cortadeiras.

Sistemas biológicos como colônias de formigas-cortadeiras, devem por certo contar com intenso e contínuo balanço entre a alocação de recursos para o crescimento e para a própria manutenção fisiológica do sistema. Os mecanismos envolvidos no alcance deste balanço são provavelmente baseados em propriedades organizacionais específicas para o sistema biológico, as quais são totalmente desconhecidas em *A. sexdens*. Nesse estudo foi investigada a relação entre aumento da biomassa do jardim de fungos de *A. sexdens* e a proporção de generalistas visando compreender a dinâmica de crescimento de colônias de saúvas. Parâmetros sociométricos relacionados com a dinâmica do crescimento da colônia foram estimados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das colônias em campo

Foram realizadas coletas em campo de colônias iniciais de *Atta sexdens* cerca de 2 a 3 meses após a fundação. As coletas foram realizadas entre fevereiro e abril de 2018 e janeiro a fevereiro de 2019 nas cidades de Anhembi/SP e Itirapina/SP. Em Anhembi, as colônias foram coletadas na Estação Experimental de Ciências Florestais da ESALQ/USP (Lat.22°40' S Long. 48°10' W), na borda do talhão de Teca (*Tectona grandis*) e nas bordas e interior do SAF (sistema agroflorestal). Na cidade de Itirapina (Lat. 22° 15′ 13″ S Long. 47° 49′ 22″ W) as colônias foram coletadas em bordas de Eucalipto (*Eucalyptus* spp.). Os ninhos foram identificados através do montículo de terra característico da espécie (Figura 1). A coleta dos ninhos foi realizada por escavação e as colônias contendo a rainha, o fungo simbionte e as primeiras operárias (Figura 2), retirados e transferidos para recipientes plásticos. Após a coleta, os recipientes contendo as colônias foram levados ao laboratório de Ecologia e Entomologia Florestal do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP.

Figura 1. Vista externa no montículo de terra característico de ninhos de saúva. Imagem registrada pela autora em talhão de teca, município de Anhembi/SP.

Figura 2. Foto do fungo simbionte de *Atta sexdens* no interior do ninho durante escavação em área de talhão de teca, município de Anhembi/SP. Foto da autora.

As colônias recém coletadas foram colocadas em recipientes plásticos de aproximadamente um litro (Figura 3) e transportadas ao laboratório de Ecologia e Entomologia Florestal onde permaneceram em câmara climática com temperatura regular de 23ºC ±1 e escotofase de 24 horas. As colônias permaneceram tampadas e a umidade foi controlada dentro dos próprios recipientes esborrifando água (umedecer) e com suprimento de aveia (desumedecer).

Figura 3. Foto da rainha, operárias e fungo simbionte em colônia inicial de *Atta sexdens* armazenadas em recipiente plástico em laboratório. Foto da autora.

Suprimento de folhas foi oferecido aos ninhos três vezes por semana, variando as espécies entre folhas de caramboleira (*Averrhoa carambola*) e folhas e pétalas de rosa (*Rosa L.*) por serem folhas mais macias facilitando o corte das operárias menores.

Após três meses as colônias estabelecidas foram transferidas para recipientes plásticos interligados por uma mangueira simulando as câmaras características do ninho de saúva. As câmaras foram forradas com um centímetro de gesso, com o objetivo de manter a umidade (Figura 4). Os recipientes utilizados mediam 12 cm de altura e 12 cm de diâmetro, com capacidade volumétrica de um litro. O primeiro foi destinado a câmara de forrageio, onde foram fornecidas as folhas, o segundo à câmara do fungo e o terceiro destinado a câmara do lixo, local de depósito de matéria orgânica morta do fungo, operárias mortas e demais rejeitos. Os novos recipientes foram mantidos nas mesmas condições de temperatura e escotofase. Nessa fase, as colônias passaram a receber suprimento de folhas mais duras, como folhas de abacateiro (*Persea americana*), Acalifa (*Acalypha wilkesiana*) e Àlamo (*Populus* spp.).

Figura 4: Estrutura de potes plásticos interligados por mangueiras simulando o sistema de colônias de formigas-cortadeiras, sendo da esquerda para direita o primeiro simulando a câmara de lixo, o segundo simulando a câmara do fungo e o terceiro simulando a câmara de forrageio.

2.2 Medição das cápsulas cefálicas e montagem da régua de operárias

Para identificação das subcastas morfológicas, foi utilizada a medida das cápsulas cefálicas. A medida da cápsula cefálica refere-se a maior largura da cabeça em face ventral e em ângulo reto com o eixo longitudinal da cabeça (WILSON, 1980b). A medida foi realizada no Laboratório de Biologia de Insetos, ESALQ/USP, através de uma ocular micrométrica (Wild MM 5235) acoplada ao microscópio estereoscópico. O critério utilizado para definir morfologicamente as castas polimórficas foi a medida da largura da cápsula cefálica, sendo que as jardineiras possuem cápsula cefálica no intervalo de 0,6 a 1,4mm; generalistas de 1,4 a 2,2mm; forrageiras de 2,2 a 3,0mm; e os soldados acima de 3,0mm (Figuras 5A, 5B, 5C, 5D).

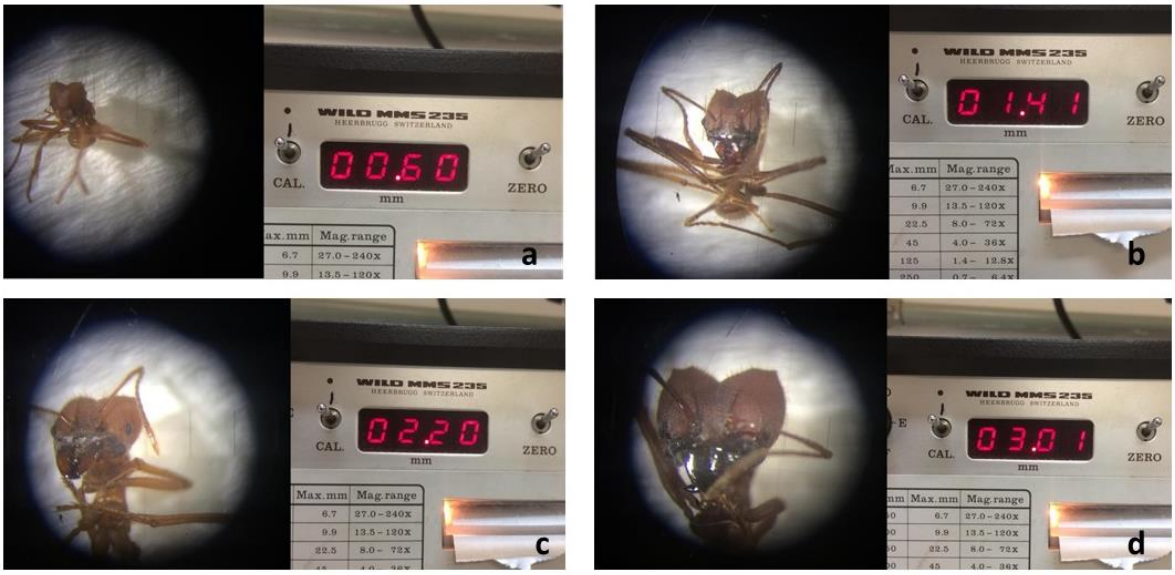

Figura 5. Fotos mostrando as medições dos intervalos de cápsula cefálica através da ocular micrométrica (Wild MM 5235) acoplada ao microscópio estereoscópico; a) mensuração da cápsula cefálica de um indivíduo pertencente a subcasta das "jardineiras"; b) mensuração da cápsula cefálica de um indivíduo pertencente a subcasta das "generalistas"; c) mensuração da cápsula cefálica de um indivíduo pertencente a subcasta das "forrageiras"; d) mensuração da cápsula cefálica de um indivíduo pertencente a subcasta dos "soldados".

Foi realizada a medida da cápsula cefálica de todos os indivíduos de uma colônia de aproximadamente um ano e meio de idade. A referida colônia não continha indivíduos com cápsula cefálica maior que 3,00mm, da subcasta "soldado". Estes foram coletados no formigueiro destinado a visitação do Departamento de Entomologia e Acarologia da Esalq. A partir dessas medidas, foi escolhido um exemplar de cada subcasta que mais se aproximava dos limites de medida classificatórios. Esses quatro exemplares tiveram as cabeças retiradas e estas foram dispostas em uma régua por ordem de tamanho. Entre os espaços de cada uma dessas cabeças, outras cabeças com intervalos regulares de medidas foram dispostas a fim de marcar o intervalo de tamanho das cápsulas cefálicas referentes a cada uma das subcastas (Figura 6) (SUJIMOTO, 2018 dados não publicados). A régua foi utilizada como referência para a retirada das generalistas nos diferentes tratamentos.

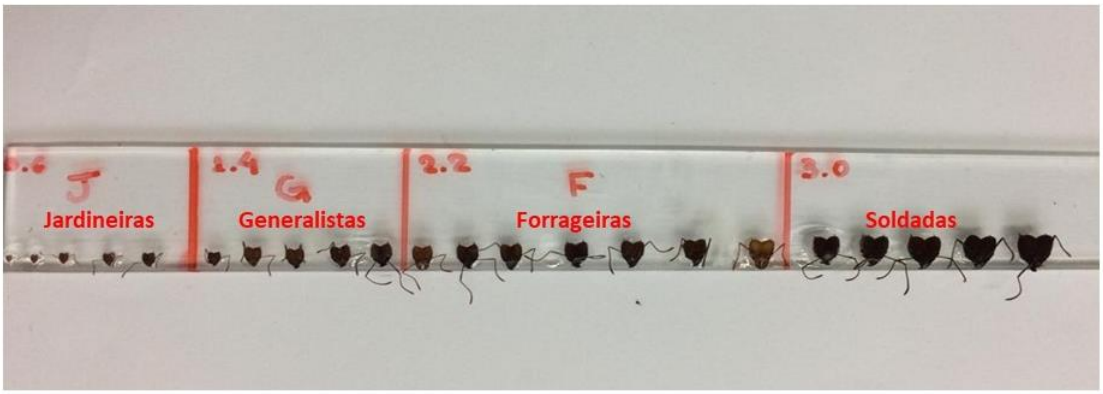

Figura 6. Régua contendo cabeças de operárias de *Atta sexdens* com intervalos de medida das respectivas subcastas.

2.3 Experimento de proporção de subcastas

Três tratamentos foram realizados a fim de investigar se diferentes proporções de indivíduos da subcasta das generalistas alteram o padrão de crescimento do jardim de fungos. No primeiro tratamento, 100% das generalistas foram deixadas na colônia para investigação da dinâmica de crescimento do fungo. No segundo tratamento, 50% e no terceiro tratamento, 10% das generalistas permaneceram. Para cada tratamento, oito réplicas foram produzidas.

Para identificação das subcastas e retirada do número determinado de generalistas, foi utilizada como referência a medida das cápsulas cefálicas com auxílio da régua de cápsulas cefálicas (Figura 6). Os indivíduos das colônias foram anestesiados pela aplicação de gás carbônico e as operárias da subcasta das generalistas dos tratamentos 2 e 3 foram retiradas e contadas. No tratamento 2 foram devolvidas 50% das generalistas e no tratamento 3, 10% das generalistas. Nas colônias utilizadas no ensaio haviam apenas indivíduos das subcastas “jardineiras” e “generalistas”, sendo que “forrageiras” e “soldadas” ainda não haviam aparecido devido à idade das colônias.

A primeira retirada foi realizada na semana 9 de forma aleatória em relação a idade e tamanho da cápsula cefálica (porém dentro da faixa de 1,4 a 2,2mm). Nas próximas quatro semanas que seguiram a quantidade das operárias restantes foi verificada e indivíduos adicionais foram retirados para manutenção do número inicial deixado em cada tratamento. Após oito semanas, quando o número de generalistas havia se restabelecido em sua abundância original e proporcional ao tamanho da colônia, foi realizada nova contagem das generalistas e as porcentagens retiradas com base na quantidade atual.

2.4 Experimento para estimativa do crescimento do fungo

O experimento de crescimento do fungo foi iniciado em abril, quando as colônias atingiram um tamanho e estado de crescimento estável. Ao longo dos meses que se seguiram, abril a setembro, as colônias receberam quantidades iguais em peso úmido de folhas frescas de espécies de plantas comumente utilizadas em criação de formigas-cortadeiras em laboratório. As folhas utilizadas foram: acalifa (*Acalypha wilkesiana*), folhas de abacateiro (*Persea americana*) e folhas de carambola (*Averrhoa carambola*).

A biomassa do fungo foi estimada através de métodos não invasivos, com mensurações semanais de todas as colônias (CLARK; FEWELL, 2014). Para isso foram feitas fotos suspensas em ângulo reto de forma padronizada em relação à distância (Figura 7) para mensuração da área do fungo e fotos frontais (Figura 7) para mensuração da altura do fungo. A área e a altura do fungo foram medidas através do programa Image J (https://imagej.nih.gov/ij/) (Figura 8). A partir dos dados de área e altura, o maior volume possível do fungo foi estimado. Considerando que o jardim de fungos em condições laboratoriais cresce semelhante a um cilindro apesar das irregularidades na forma, o volume de cada jardim foi estimado a partir das medidas de área e altura. O experimento foi iniciado com vinte e quatro colônias.

Medições também foram feitas com colônias para validação. Para tanto a área foi mensurada e a colônia posteriormente destruída, todos os indivíduos adultos e larvas retirados, e o fungo pesado para correlação posterior da área calculada com o peso úmido real do fungo.

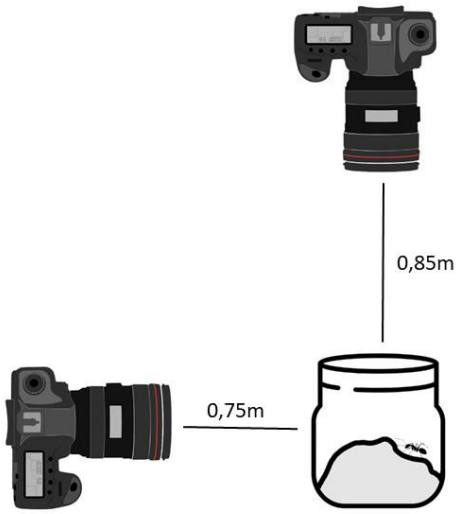

Figura 7. Esquema mostrando o procedimento da realização das fotos suspensas em ângulo reto e com distância padronizada para mensuração da área e altura do fungo.

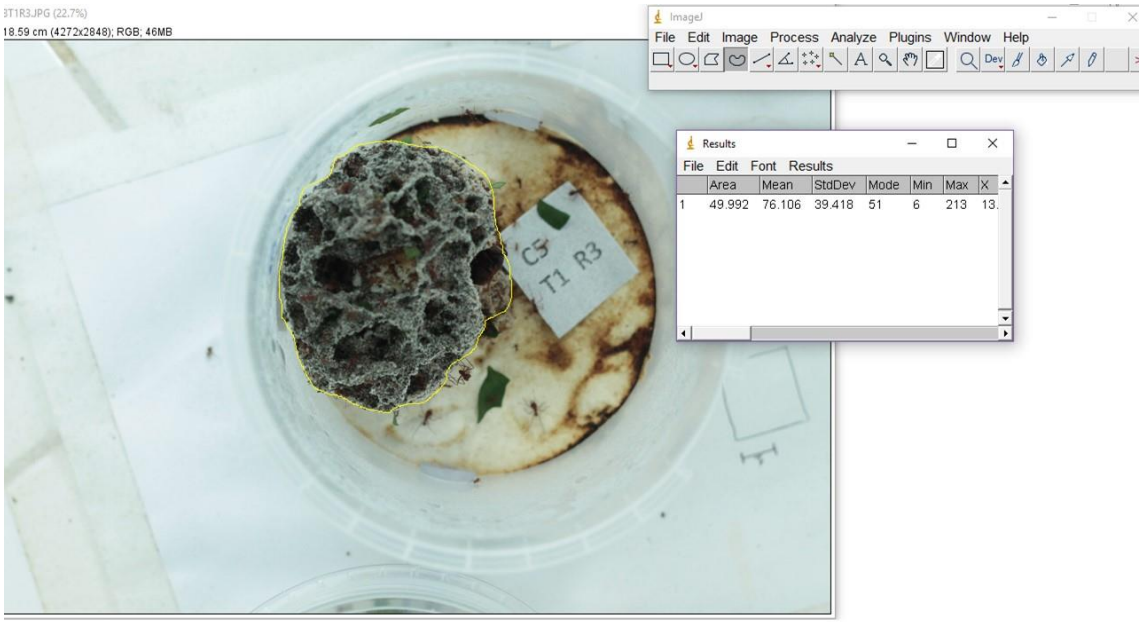

Figura 8. Captura de tela da interface do programa Image J mostrando o processo de medição da área através da foto do fungo simbionte de uma colônia de *Atta sexdens*.

2.5 Validação do método de estimativa

Visto que a avaliação direta da massa do jardim de fungos requer a destruição da colônia, o que não poderia ser feito durante o experimento, o método de estimativa do

volume do jardim de fungos foi validado repetindo as medidas em um conjunto de outras 24 colônias, uma por semana (Figura 9).

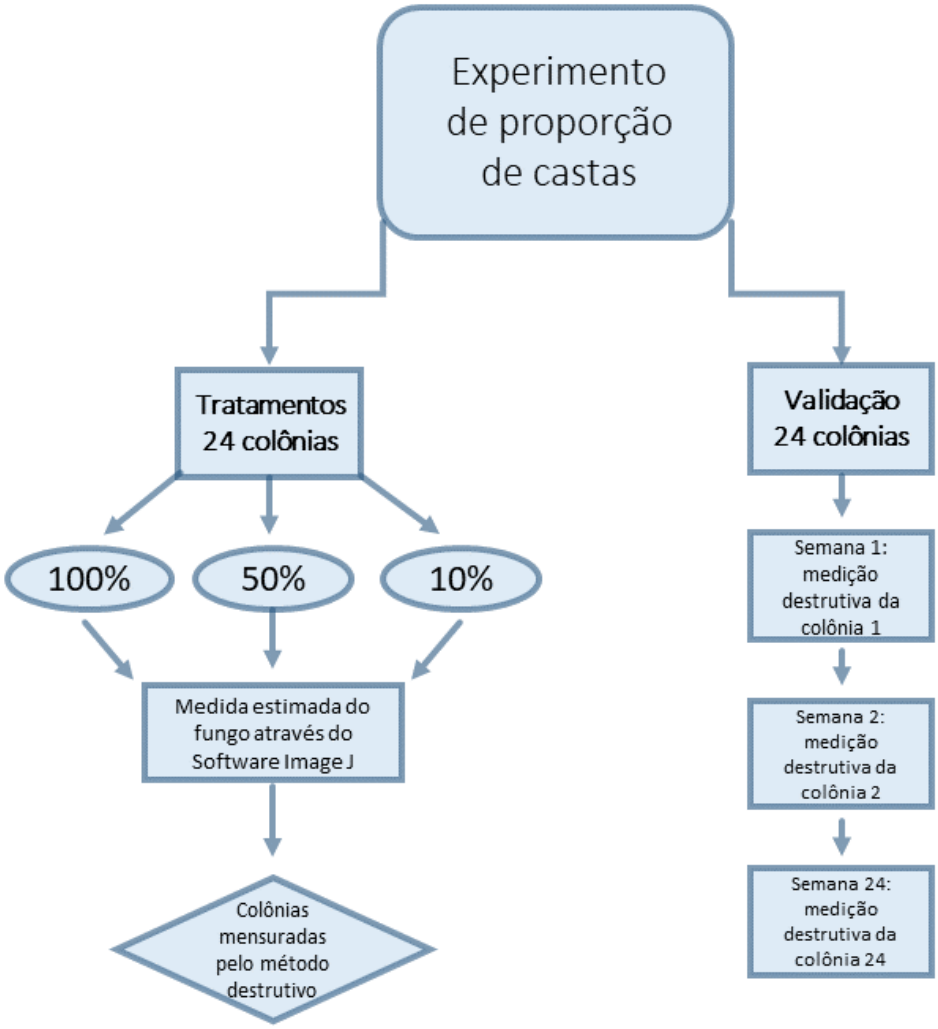

Figura 9. Esquema caracterizando o experimento de proporção de castas, incluindo o plano de validação das estimativas.

Para validar o método de estimativa, as colônias utilizadas para validação foram mantidas durante o mesmo período do experimento com a mesma quantidade de recurso. O método de estimativa foi repetido e após a repetição, as pupas, larvas e adultos foram removidos. O jardim de fungos foi pesado em balança de precisão. No final das 24 semanas, as colônias dos experimentos passaram pelo mesmo processo. Os dados obtidos do peso do jardim de fungo foram utilizados para avaliar a precisão do método de estimativa. A avaliação foi feita calculando a correlação entre o que foi estimado e a medida real.

2.6 Produção de lixo

A produção de lixo das colônias também foi analisada ao longo das 24 semanas, nos três tratamentos. O lixo produzido em cada colônia foi retirado a cada quatro semanas e pesado em balança de precisão para posterior análise.

2.7 Análise comportamental do forrageio

Com o auxílio de um sistema de captura de imagem, foi avaliada mudança no comportamento de forrageio dos indivíduos remanescentes em cada um dos tratamentos: T1 = dinâmica da colônia com 100% das generalistas; T2 = dinâmica da colônia com 50% das generalistas; T3= dinâmica da colônia com 10% das generalistas.

O comportamento dos indivíduos na câmara de forrageio foi filmado através de um sistema de captura de imagens automatizado, EthoVision (NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2001), em cada um dos tratamentos por um período de 1 hora, dividido em quatro blocos, com um tratamento por bloco (Figura 10). As colônias utilizadas foram privadas de alimento 24 horas antes do início das filmagens. A captura de imagens foi iniciada imediatamente após o oferecimento do alimento, sendo este, dois círculos de folhas de abacateiro com área padronizada de 3cm de diâmetro para todas as réplicas.

Figura 10. Captura de tela da interface do sistema de captura de imagens automatizado EthoVision analisando o comportamento de forrageio de uma colônia.

As variáveis comportamentais foram escolhidas de acordo com o interesse biológico.

Os vídeos foram utilizados para geração de mapas de calor, indicando a variação da densidade de indivíduos nos diferentes tratamentos.

2.8 Análise Estatística

2.8.1 Análise de dados do crescimento do fungo

Os dados foram analisados utilizando o programa R. Modelos lineares mistos foram ajustados aos dados de altura, área e volume estimado, incluindo uma tendência temporal diferente por tratamento utilizando base b-spline com seis graus de liberdade e uma interceptação aleatória por colônia para testar a hipótese de que as observações feitas dentro da mesma colônia estão correlacionadas. A significância dos efeitos foi avaliada por testes de razão de verossimilhança (RV) para modelos aninhados. A qualidade do ajuste foi avaliada usando parcelas semi-normais com um envelope simulado (Moral et al., 2017).

2.8.2 Validação

Para a validação do método de estimativa do volume com o peso do fungo, foi utilizado o teste de correlação de Pearson para verificar se há correlação entre o volume estimado e o peso úmido do fungo e um modelo simples de regressão linear para verificar a relação entre as duas variáveis.

2.8.3 Análise da produção de lixo

Modelos lineares mistos foram ajustados aos dados da produção de lixo, incluindo uma tendência temporal diferente por tratamento, utilizando uma base b-spline com três graus de liberdade, e um intercepto aleatório por colônia para explicar o fato de que as observações feitas na mesma colônia são correlacionadas. A significância dos efeitos foi avaliada por meio de testes de razão de verossimilhança (RV) para modelos aninhados. A qualidade do ajuste foi avaliada usando parcelas semi-normais com envelope simulado (Moral et al., 2017).

2.8.4 Análise comportamental do forrageio

Para dados com distribuição normal, ANOVA foi aplicada para verificar se houve diferença significativa entre os tratamentos. Para os dados com distribuição desconhecida, mesmo após transformação por Box-Cox, utilizou-se o modelo de Kruskal-Wallis.

3. RESULTADOS

3.1 Crescimento do fungo segundo diferentes proporções de castas

Após a retirada das proporções de castas a partir da semana 9, mudanças na dinâmica de crescimento do jardim de fungos foram observadas. Os resultados, descritos pela análise da relação entre as estimativas da área, altura e do volume com o tempo, indicam que existe relação entre as variáveis dependentes "área", "altura" e "volume" e a independente, "tempo" (semanas). Das 24 colônias estabelecidas no início do experimento, 19 chegaram até a última semana, sendo que as mortes das colônias ocorreram apenas no início do experimento, com uma morte nos tratamentos T1 (semana 10), e T2 (semana 16) e três mortes no tratamento T3 (semanas 10, 12 e 13).

Área

A comparação entre réplicas para áreas mensuradas da semana 1 a 24 resultou em trajetórias analisadas levando em conta o efeito da interação entre o tratamento e a tendência temporal (Fig. 11). As trajetórias indicam que a área aumentou aproximadamente duas vezes na maioria as réplicas, durante o período analisado.

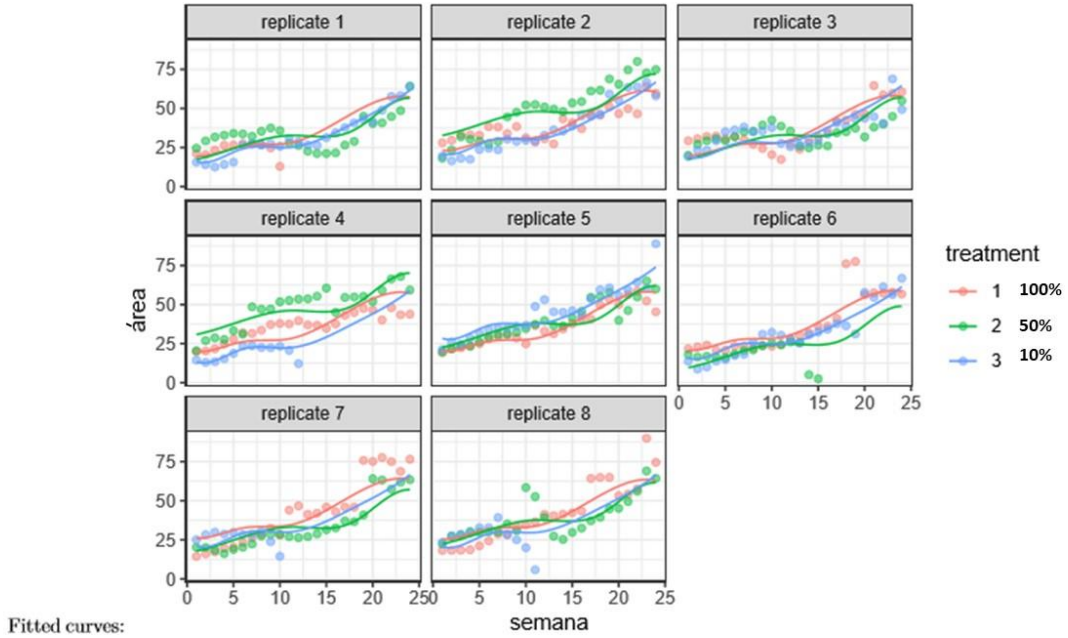

Figura 11: Gráficos demostrando os padrões de crescimento da área dos jardins de fungos de cada réplica durante o desenvolvimento de 24 colônias, da semana 1 até a semana 24 nos três tratamentos: T1= 100% das generalistas, representado pela curva vermelha; T2= 50% das generalistas, representado pela curva verde e T3= 10% das generalistas, representado pela curva azul. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y a área em cm².

A média das réplicas indica que as curvas da área tiveram tendência de crescimento aparentemente similar para os três tratamentos, resultando em curvas ascendentes (Fig. 12).

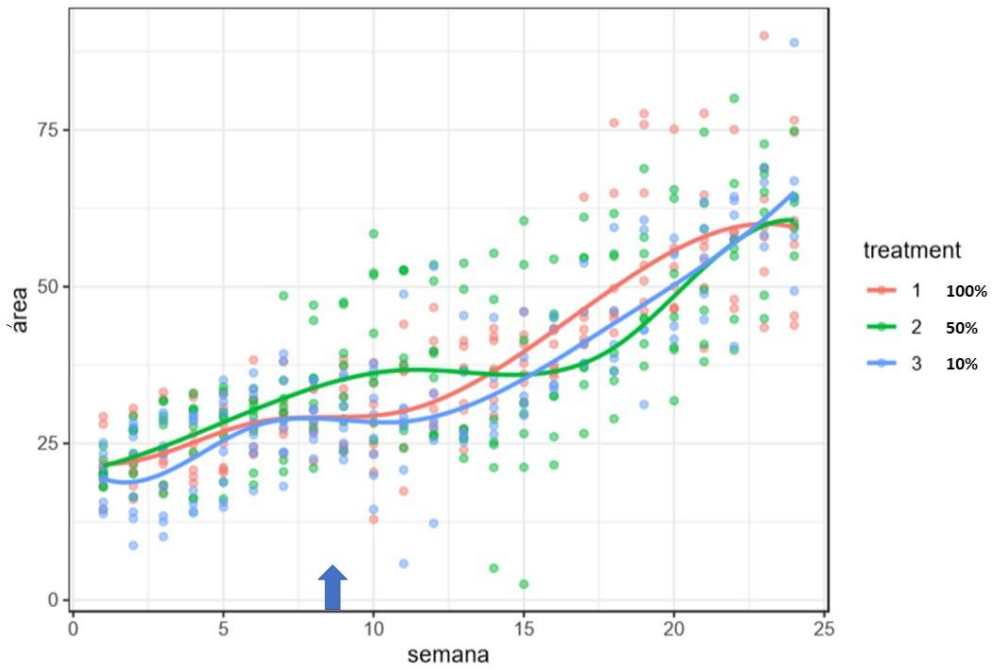

Figura 12: Gráfico mostrando a variação média da área dos jardins de fungos em função do tempo nos tratamentos T1, T2 e T3, representado pelas diferentes cores das curvas. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y a área em cm². A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3.

O crescimento da área para os três tratamentos foi aparentemente similar, apesar das flutuações observadas. O efeito da interação entre tratamentos e tempo (semanas) foi significativo, indicando que a influência sobre o tamanho da área advém da interação entre esses fatores (RV = 46,24; GL= 12; $p < 0,0001$). Na 24ª semana as curvas se encontram praticamente no mesmo valor, mas demonstram tendências diferentes durante a trajetória de crescimento. Entre as semanas 5 e 12, a área do jardim de fungos não exibiu a mesma ascendência observada antes e depois deste período, nos três tratamentos. A partir da semana 12, os três tratamentos apresentaram aumento significativo da área, demonstrado pela ascendência nas curvas. Comparando o tratamento 1 com o tratamento 3, notou-se não haver diferença significativa em relação ao crescimento total da área (GL = 7; p= 0,2111).

Altura

A altura mensurada entre as semanas 1 a 24, variou no tempo e de forma relativamente similar entre réplicas e tratamentos (Fig. 13).

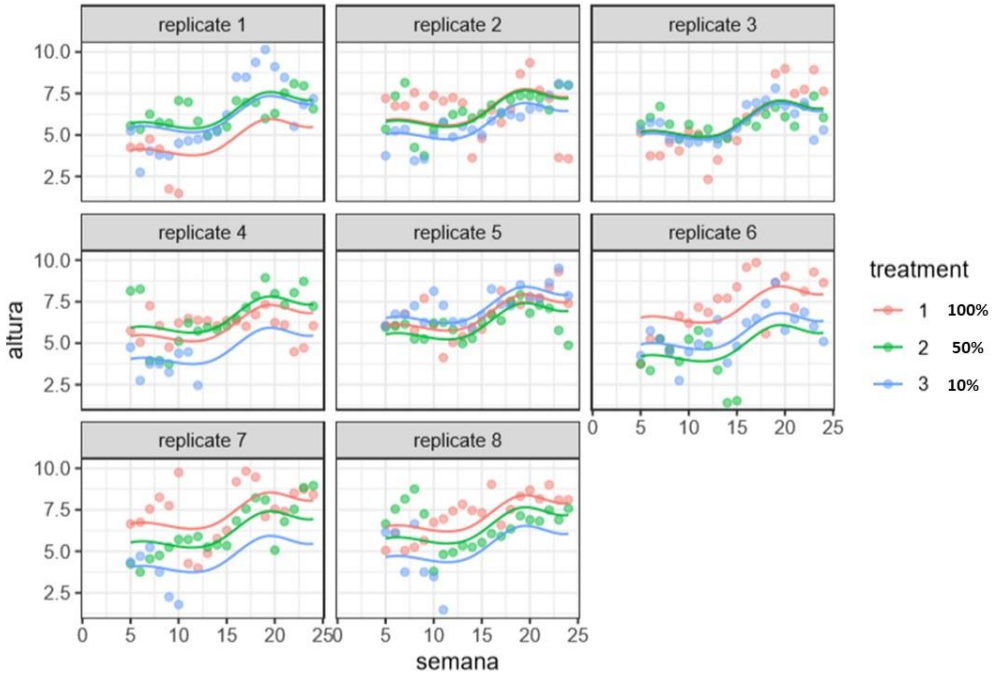

Figura 13: Padrões de crescimento dos jardins de fungos de cada réplica em relação a altura durante 24 semanas para 24 colônias nos três tratamentos: T1= 100% das generalistas, representado pela curva vermelha; T2= 50% das generalistas, representado pela curva verde; e T3= 10% das generalistas, representado pela curva azul. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y a altura em cm.

A comparação entre as trajetórias da altura média por tratamentos pode ser vista na Figura 14, com resultados indicando maiores valores para a altura a partir da 15ª semana.

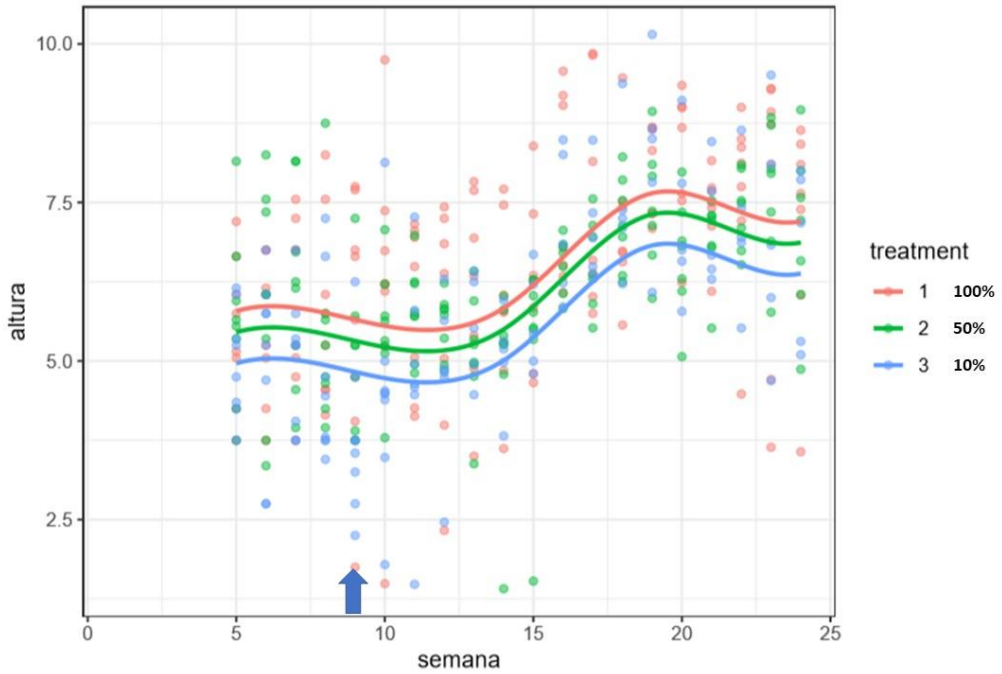

Figura 14: Gráfico mostrando a variação média da altura do jardim de fungos em função do tempo, nos tratamentos T1, T2 e T3, indicado pelas diferentes cores das curvas. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y a altura em cm. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3.

Em relação a altura, o efeito da interação entre o tratamento e a tendência temporal, não foi significativo (RV = 18,87; GL = 12; p = 0,0917), portanto, a variação da altura não é função da interação entre os dois fatores.

Volume estimado

Assumindo que o jardim de fungos cresce semelhante a um cilindro, apesar das irregularidades, o volume foi estimado através da fórmula simples de cálculo do volume do cilindro, utilizando os dados de altura e área.

A variação do volume do jardim de fungos, estimado da semana 1 a 24 pode ser comparada visualizando as oito réplicas, observando a figura 15.

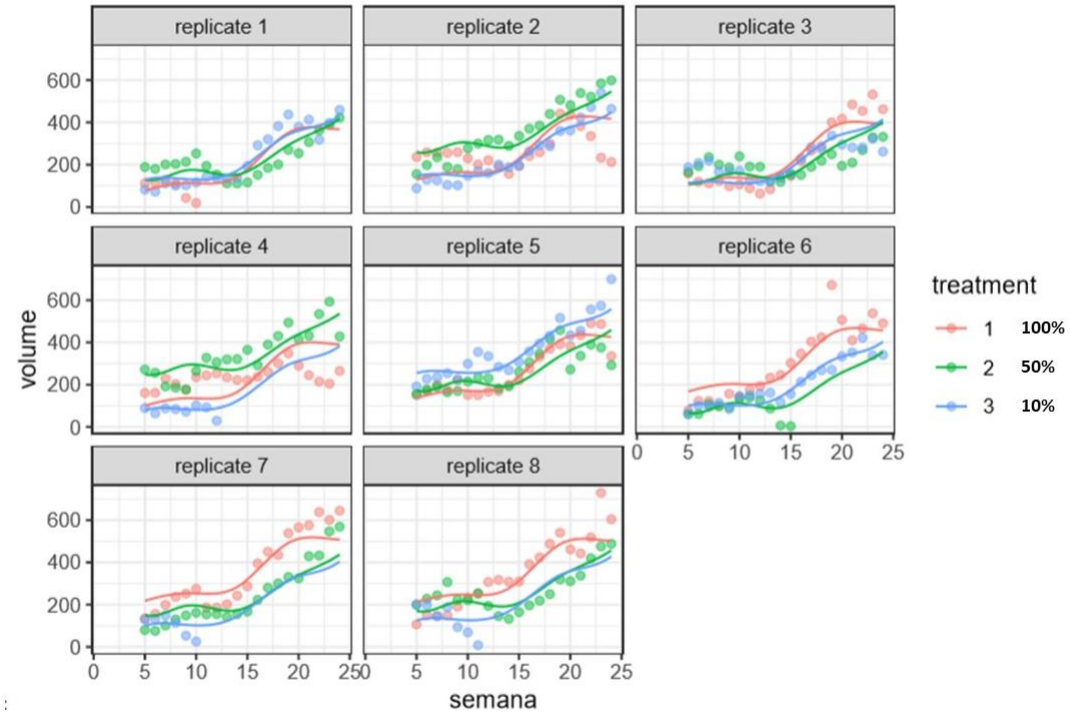

Figure 15: Curvas mostrando os padrões de crescimento dos jardins de fungos de cada réplica em relação a altura durante o desenvolvimento de 24 colônias por 24 semanas nos três tratamentos: T1= 100% das generalistas, representado pela curva vermelha; T2= 50% das generalistas, representado pela curva verde; e T3= 10% das generalistas, representado pela curva azul. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y ao volume em cm^3.

Observa-se nas oito réplicas trajetória semelhante das curvas dos tratamentos T2 e T3 caracterizadas pelo aumento do volume do fungo (Fig. 15). O volume do fungo tende a aumentar nos dois tratamentos com a evolução do tempo. Contudo, para o tratamento 1 a curva indica tendência de saturação nas últimas semanas (Fig. 15).

Os valores médios do volume do jardim de fungos indicam inclinação ascendente acentuada a partir da 15ª semana nos três tratamentos (Fig. 16).

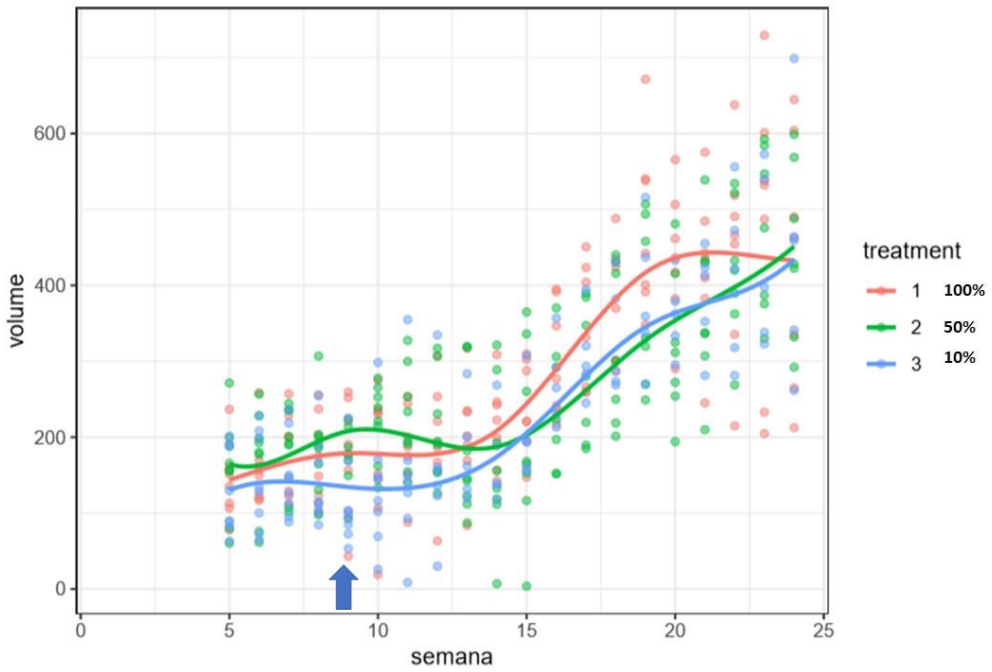

Figure 16: Curvas mostrando o comportamento médio do aumento do volume estimado do jardim de fungos nos tratamentos T1, T2 e T3, indicado pelas diferentes cores de curvas. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y ao volume em cm^3. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3.

O efeito da interação entre os tratamentos e a tendência temporal foi significativo (RV= 36,58; GL= 12; p< 0,0003). Na última semana de experimentos as curvas convergem para valores próximos, mas indicam tendências diferentes no comportamento de crescimento, sobretudo ao se compararem os tratamentos 2 e 3 com o tratamento 1 (Fig. 16). Entre a semana 5 e a semana 12, a área do jardim de fungos se manteve relativamente estável nos três tratamentos. A partir da semana 12, os três tratamentos apresentaram aumento significativo da área, demonstrado pelo claro aumento dos valores do volume (Fig. 16).

Comparando o tratamento 1 com o tratamento 3, não se nota diferença significativa em relação ao crescimento geral do volume (χ^2 calculado = 7,5614; GL = 7; p = 0,3729).

Validação

Para validar a estimativa do volume dos jardins de fungos, correlacionamos os dados da estimativa do volume do fungo com seu peso úmido (Fig. 17)

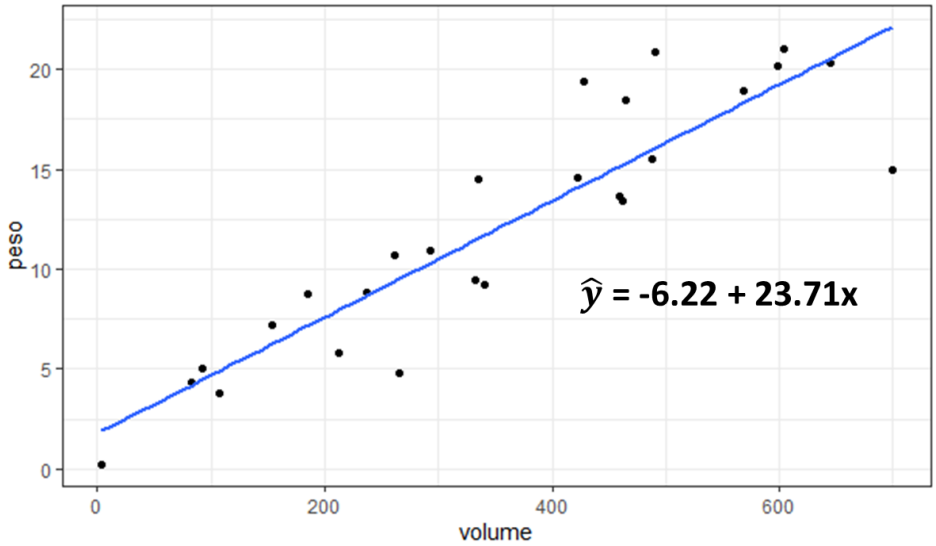

Figura 17: Gráfico mostrando a relação entre o volume estimado em cm³ (eixo x) e o peso úmido do jardim de fungos em gramas (eixo y).

A correlação da estimativa do volume com o peso úmido do jardim de fungos foi significativa, positiva e de alta magnitude (r=0,9015) mostrando que a estimativa do volume através da relação da área com a altura foi válida. A análise mostrou relação linear significativa entre a estimativa do volume do fungo (cm³) e seu peso úmido (g) ($p < 0,0001$; $r^2 = 95,92\%$). Das 24 colônias estabelecidas no início do experimento para validação, apenas 8 sobreviveram. A baixa taxa de sobrevivência pode ter sido decorrente da alta temperatura no transporte do campo para o laboratório além da mortalidade natural. Foram utilizadas para validação além dessas oito, as 19 colônias que chegaram até o final dos três tratamentos no experimento de crescimento do fungo. Dessa forma foi possível cobrir a maior parte dos tamanhos atingidos pelo jardim de fungos para correlação.

3.2 Produção de lixo

Os resultados encontrados indicam que o peso do lixo aumenta com o tempo de forma similar para todas as réplicas (Fig. 18).

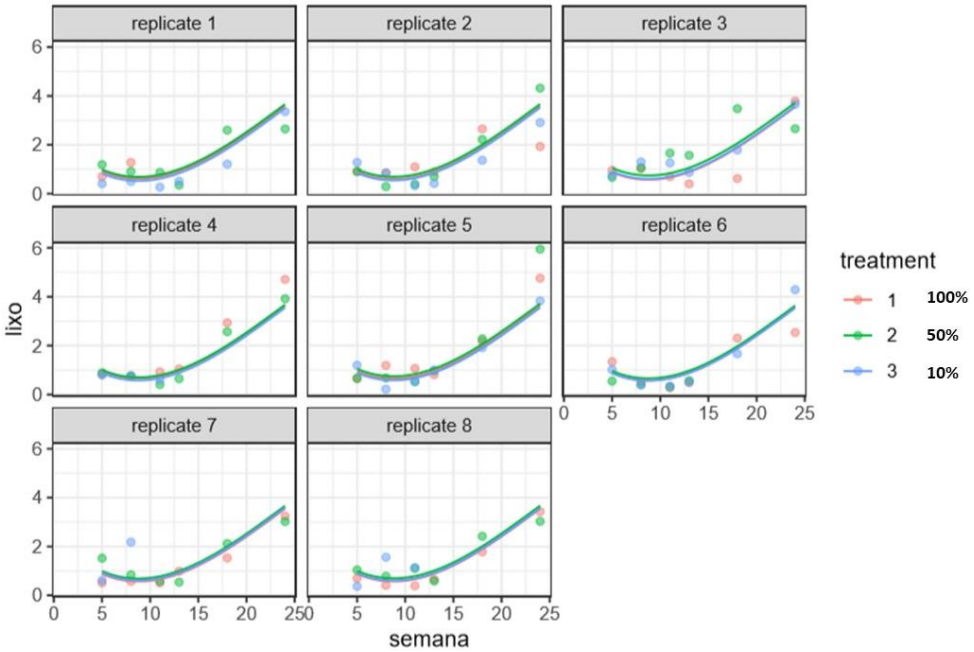

Figura 18: Curvas indicando o peso de (em gramas) do lixo seco produzido em cada réplica durante o desenvolvimento de 24 colônias para 24 semanas nos três tratamentos: T1= 100% das generalistas, representado pela curva vermelha; T2= 50% das generalistas, representado pela curva verde; e T3= 10% das generalistas, representado pela curva azul. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y ao peso seco do lixo em gramas.

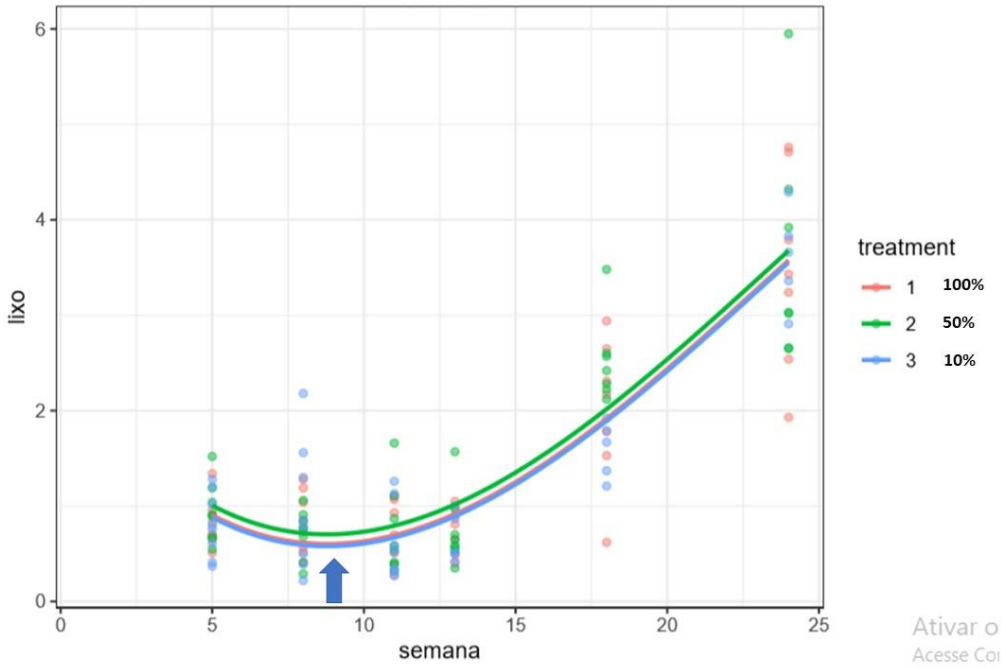

Figura 19: Curvas mostrando o comportamento médio do peso em gramas (g) do lixo produzido pelas colônias nos tratamentos T1, T2 e T3, indicado pelas diferentes cores de curvas. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3. O eixo x se refere ao tempo em semanas e o eixo y peso do lixo em gramas. A seta indica o início da retirada de operárias no tratamento T2 e T3.

A diferença na produção de lixo entre os três tratamentos não foi significativa (RV = 9,29; GL= 6; p > 0,15). Testando os principais efeitos do tratamento e tendência temporal sobre o lixo foi observado efeito significativo das duas variáveis sobre a produção de lixo (RV = 192,11; GL = 3; p < 0,0001), visto que naturalmente, a quantidade de lixo produzido aumenta na proporção em que o tamanho da colônia aumenta.

3.3 Análise comportamental do forrageio

Dentre as variáveis selecionadas, as que apresentaram diferença significativa entre os tratamentos foram: distância média, velocidade média, movimento médio, distância média ao ponto central (D. Point Mean), movimento cumulativo (Mov. Cum) e tempo acumulado na zona de interesse (Zone Cumu), que no caso, corresponde as folhas disponíveis para o corte.

Tabelas da análise descritiva das variáveis nos três tratamentos:

Tabela 1. Tabela mostrando os valores das variáveis "distância média movida", "velocidade média" e "movimento médio" nos três tratamentos, T1, T2 e T3.

TRATAMENTO	DISTÂNCIA MÉDIA MOVIDA*	VELOCIDADE MÉDIA*	MOVIMENTO MÉDIO*
	(cm)	(cm/s)	(s)
T1	0,1610±0,0066a	0,3096±0,0127a	0,7584±0,0221b
T2	0,1380±0,0033a	0,2655±0,0063a	0,8200±0,0213b
T3	0,0877±0,0204b	0,1687±0,0393b	1,2122±0,2446a

Tabela 2. Tabela mostrando os valores das variáveis medidas “distância média ao ponto central” (D. Point Mean), “movimento cumulativo” (Mov. Cum) e “tempo acumulado na zona de interesse” (Zone Cumu), nos três tratamentos, T1, T2 e T3.

TRATAMENTO	D. POINT MEAN **	MOVIMENTO CUM. **	ZONE CUMU **
	(cm)	(s)	(s)
T1	2,2468±0,0751b	55,0987±8,6695a	2994,6269±79,5014a
T2	2,2991±0,0563b	36,7656±3,8374a	2948,1319±63,3546a
T3	2,9968±0,2976a	1,9381±0,7810b	998,6925±284,5353b

Obs: Dados com distribuição Gamma *

Dados com distribuição não conhecida **

Para analisar se houve diferença significativa entre os tratamentos, utilizou-se o modelo de análise de variância e de Kruskal-Wallis para as variáveis com distribuição não conhecida.

Distância média movida é a média percorrida pelo centro de massa de cada indivíduo. É utilizada para fornecer uma medida geral de atividade e como base de cálculo para outras variáveis, como velocidade. Velocidade média é a média da distância percorrida por cada indivíduo dividido por unidade de tempo. Movimento é uma variável discreta que fornece informações da atividade locomotora. O objeto consta como "movimento" quando a velocidade média está acima da velocidade de parada. A distância média ao ponto central é a média da menor distância entre o objeto analisado e o centro da zona demarcada, a arena. A variável "Movimento Cumulativo" refere-se a duração acumulada do estado em movimento, baseado na variável "Movimento". O "tempo acumulado na zona de interesse" é o tempo que os indivíduos passaram em cima da folha disponível para corte (NOLDUS, 2013).

3.4 Mapas de calor

A partir da captura de vídeo da atividade de forrageio nos três tratamentos, foram gerados os seguintes mapas de calor:

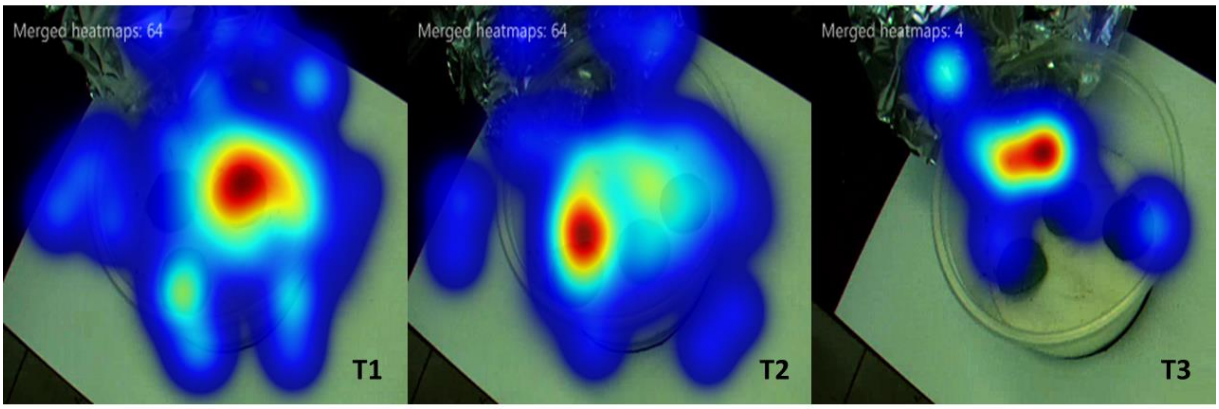

Figura 20. Mapa de calor representando o gradiente de agregação dos indivíduos nos diferentes tratamentos, sendo maior agregação na cor mais quente e as menores agregações nas cores frias.

Os resultados mostram que o nível de agregação é alterado quando se altera a proporção de operárias. Em caso de hipótese nula, o nível de agregação não seria alterado com a retirada das proporções de castas. Nesse caso, aceitamos a hipótese alternativa de que em pelo menos uma das condições, a proporção de castas alteraria o gradiente de agregação.

Observamos que com 100% das generalistas os indivíduos se encontravam menos agregados na câmara de forrageio, enquanto com 10% delas a agregação é mais facilmente perceptível. Situação intermediária ocorreu com 50% das generalistas.

4. DISCUSSÃO

A dinâmica de crescimento do jardim de fungos nos três diferentes tratamentos apresentou diferenças na evolução temporal ao longo do tempo. A avaliação do crescimento do fungo ao final do período analisado indicou inexistência de diferença significativa sugerindo possíveis ações compensatórias pela colônia diante da perda de operárias, incluindo o cenário de remoção drástica de indivíduos, como no caso do tratamento T3 em que 90% das generalistas foram retiradas. No entanto, notou-se que houve diferenças nos valores do crescimento do fungo expressas pela trajetória temporal após a retirada da proporção de formigas da respectiva casta.

Em relação ao volume (figura 15), observamos que entre a semana 5 e a semana 12 o volume do jardim de fungos se manteve estável nos três tratamentos, não havendo crescimento significativo. A partir da semana 12, os três tratamentos apresentaram crescimento significativo, evidenciado pelo aumento da não linearidade nas curvas. Embora as curvas dos três tratamentos tenham mostrado maior ascendência, a partir da semana 20, a curva do tratamento 1 tende a estabilização enquanto as curvas dos tratamentos 2 e 3 continuam ascendendo.

A tendência de estabilização da curva do tratamento 1 em contraste com as curvas dos tratamentos 2 e 3 pode estar indicando que o fungo atingiu sua capacidade limite de crescimento. A relação mutualista entre as formigas-cortadeiras e o fungo simbionte é obrigatória, já que o fungo constitui parte do recurso alimentar dos indivíduos adultos e único recurso alimentar das larvas (QUINLAN; CHERRETT, 1979; BASS; CHERRETT, 1995). A estabilização observada pode indicar que no tratamento T1 o fungo atingiu o limite de recursos disponíveis diante de grande número de operárias se alimentado dele.

O crescimento semelhante nos três tratamentos sugere que o crescimento do jardim de fungos não sofreu alterações, mesmo com a expressiva proporção de formigas generalistas removidas, sugerindo a existência de mecanismos compensatórios na colônia, em resposta ao impacto da perda de operárias. Em experimentos com colônias iniciais de *Acromyrmex versicolor*, Clark e Fewell (2013) notaram atenuação e declínio do crescimento fúngico após emergência de operárias. Se por um lado mais operárias estão disponíveis para executar tarefas relacionadas ao cultivo do jardim de fungos, por outro lado, a disponibilidade de

recursos diminui explicando o contínuo crescimento do volume do fungo nos tratamentos T2 e T3, condições em que menos operárias estavam disponíveis.

Holland e Deangelis (2010) desenvolveram a teoria para dinâmica do mutualismo como sendo uma relação recurso-consumidor (R-C), assim como predação e competição, já que nessa relação ocorre transferência de energia R-C, e no caso do mutualismo com adição de bidirecionalidade que configura troca de recursos interespecífica. Dessa forma é possível compreender melhor a dinâmica populacional que envolve as duas espécies mutualísticas. As interações C-R relacionam o processo de transferência de energia do fungo (recurso) para a formiga (consumidor). Assim, o fungo aumenta o crescimento populacional das formigas dentro de uma faixa de disponibilidade do fungo (recurso) que também depende obrigatoriamente das formigas para incorporação do substrato vegetal que garante seu desenvolvimento.

A partir da abordagem de Holland e Deangelis (2010), um modelo matemático da dinâmica populacional de formigas-cortadeiras e seu jardim de fungos em colônias iniciais foi desenvolvido para explicar os possíveis fatores que determinam benefícios ou custos para colônia. Dados experimentais e de simulação sugerem que a população de formigas tem crescimento exponencial enquanto que a população de fungos apresenta crescimento linear (KANG et al., 2011). A diferença entre esses padrões de crescimento poderia explicar os resultados aqui encontrados, visto que no tratamento T1 a população de formigas cresceu além da capacidade de suprimento do fungo, estagnando o crescimento deste.

Em termos evolutivos, uma série de mecanismos estão relacionados à manutenção da eusocialidade como por exemplo, a relação entre a demografia da colônia e seu fitness (SCHMID-HEMPEL, 1992). Há estudos mostrando que após perturbações relacionadas a variação nas proporções de castas, as colônias tendem a restaurar a homeostase do sistema, recompondo valores populacionais originais em relação a demografia e proporção de castas (WILSON, 1983a; JOHNSTON; WILSON, 1985). A restauração da demografia pela produção ativa de indivíduos que foram perdidos, porém não acontece de forma específica em formigas-cortadeiras, mas de forma passiva determinada por taxas intrínsecas de nascimento (WILSON, 1983a; JOHNSTON; WILSON, 1985; PORTER; TSCHINKEL, 1985).

O fato das colônias de formigas-cortadeiras não responderem fisiologicamente produzindo mais indivíduos da casta perdida para recompor as proporções originais (WILSON, 1983), sugere que a colônia deve lançar mão de outros mecanismos de compensação. Wilson

(1983), em experimento com retirada de 90% das forrageiras de colônias de *Atta cephalotes* verificou que apesar da drástica diminuição das forrageiras, a taxa de coleta de folhas não foi alterada. Esse resultado reflete um mecanismo compensatório, no qual as forrageiras restantes aumentaram sua atividade individual em até cinco vezes. Além disso, parte das forrageiras que aparentemente não exibiam intensa atividade estavam disponíveis para compor a força de trabalho reserva, sendo recrutadas pela colônia para participar do corte.

Há estudos mostrando que formigas também apresentam rápida resposta comportamental adaptativa individual diante de outros tipos de distúrbios, tais como exposição do jardim de fungos e da prole a riscos repentinos, como por exemplo simulação de um ataque de algum vertebrado (NORMAN; PAMMINGER; HUGHES, 2016), diante do ataque de formigas parasitas sociais (PAMMINGER et al., 2011), ou mesmo em resposta a variação de fatores abióticos como umidade (GORDON; DEKTAR; PINTER-WOLLMAN, 2013) e pressão atmosférica (SUJIMOTO et al., 2019).

Diferenças no comportamento de forrageio e agregação dos indivíduos foram observadas em diferentes proporções de castas, indicando que as colônias exibiram respostas diferentes para diferentes números de generalistas. Não foi encontrada diferença significativa nas variáveis comportamentais comparando T1 e T2. Esse resultado sugere que a redução de 50% dos trabalhadores não resulta em mudança de comportamento. Por outro lado, com redução de 90% das generalistas, a colônia mostra mudanças comportamentais, indicando que existe um limiar a partir do qual os trabalhadores respondem comportamentalmente à perda de operárias. Não sabemos se as mudanças desses parâmetros comportamentais se traduzem no aumento da eficiência individual do forrageio resultando em um mecanismo de compensação a falta de operárias. Investigar esta relação poderia ser o próximo passo do nosso estudo.

A agregação de formigas parece ter sido influenciada pelas remoções de insetos. Com 100% das generalistas os indivíduos se encontravam menos agregados na câmara de forrageio, enquanto com 10% delas a agregação era mais facilmente perceptível. Situação intermediária ocorreu com 50% das generalistas. A taxa de interação entre os indivíduos pode mudar de acordo com a densidade populacional alterando também comportamentos específicos como forrageio (PACALA; GORDON; GODFRAY, 1996). Para minimizar os efeitos resultantes da densidade alterada, as formigas podem mudar as taxas de interações entre os indivíduos como um mecanismo de homeostase, de certa forma um ajuste da dinâmica do

comportamento em função ao número de indivíduos envolvidos no mesmo. Além disso, o tamanho do grupo altera a alocação de tarefas entre os indivíduos em atividades quando a atividade envolve interação social para tomada de decisão. Essa mudança na taxa de interação social pode ser um mecanismo de homeostase da colônia diante da mudança de densidade (PACALA; GORDON; GODFRAY, 1996; MODLMEIER et al., 2019). A maior agregação diferenciada encontrada nos tratamentos com diferentes proporções de generalistas podem indicar variação na interação social dos grupos em resposta a mudança de densidade, visto que a comunicação pelo contato de antenas exige que os indivíduos estejam próximos fisicamente.

Em relação a produção do lixo, não encontramos diferenças significativas nos três tratamentos. Mesmo com apenas 10% de generalistas na colônia, a produção do lixo não foi alterada. Visto que as colônias de formigas-cortadeiras são compostas por milhões de indivíduos densamente aglomerados, o acúmulo de resíduos representa grande ameaça ao grupo (CREMER, 2007). O resíduo descartado no lixo é fonte constante de patógenos e a ausência de descarte pode aumentar o risco de propagação de doenças (FARJI-BRENER; TADEY, 2012). A importância do descarte adequado dos resíduos pode explicar o fato de que as colônias, mesmo com o impacto drástico da perda de operárias não alterou essa função, evidenciando ser função prioritária dentro da colônia.

Formigas-cortadeiras apresentam adaptações morfológicas e comportamentais sofisticadas que permitiram a esse grupo tamanho sucesso evolutivo. Além disso, apresentam flexibilidade comportamental que permitem a esse grupo responder plasticamente as adversidades e demandas do ambiente (NORMAN, 2016).

Colônias jovens e maduras são fundamentalmente distintas. Colônias incipientes realizam menos tarefas que colônias mais velhas (WILSON, 1983) e possuem, portanto, menos mecanismos para responder a adversidades. A divisão do trabalho pelas operárias e as condições iniciais são dois fatores importantes que determinam se as colônias de formigas-cortadeiras e seu jardim de fungos irão sobreviver e se estabelecer com sucesso (KANG et al., 2011). A investigação de aspectos ligados a homeostase e dinâmica de crescimento de colônias iniciais de formigas-cortadeiras é de extrema importância para a compreensão dos mecanismos que regem a formação e sucesso do “superorganismo”.

5. CONCLUSÃO

Variações da área, altura e consequentemente o volume do jardim de fungos apresentam variações no tempo. No entanto, a interação desses parâmetros com os tratamentos não foi significativa. Da mesma forma, a produção de lixo pelas colônias teve interação com o tempo e não teve interação com os tratamentos. Esses resultados somados a variação comportamental encontrada entre os tratamentos, indicam que mesmo colônias jovens possuem plasticidade para responder às adversidades ambientais como a perda drástica das operárias e mesmo assim, manter a homeostase da colônia.

REFERÊNCIAS

BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.1-6, mar. 1995. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3032.1995.tb00793.x.

CLARK, R. M.; FEWELL, J. H. Transitioning from unstable to stable colony growth in the desert leafcutter ant *Acromyrmex versicolor*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 68, n. 1, p. 163–171, 2014.

CHEEKE, Tanya E.; COLEMAN, David C.; WALL, Diana H. **Microbial ecology in sustainable agroecosystems.** Crc Press, 2012. 308 p.

CREMER, Sylvia; ARMITAGE, Sophie A.O.; SCHMID-HEMPEL, Paul. Social immunity. **Current Biology**, [s.l.], v. 17, n. 16, p.693-702, ago. 2007. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008.

CURRIE, C. R. A Community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 357–380, 2001.

FARJI-BRENER, Alejandro G.; TADEY, Mariana. Trash to treasure: leaf-cutting ants repair nest-mound damage by recycling refuse dump materials. **Behavioral Ecology**, [s.l.], v. 23, n. 6, p.1195-1202, 2012. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/beheco/ars101.

GARRETT, Ryan W. et al. Leaf processing behaviour in Atta leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. **Royal Society Open Science**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-12, jan. 2016. The Royal Society. http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150111.

GORDON, Deborah M.; DEKTAR, Katherine N.; PINTER-WOLLMAN, Noa. Harvester ant colony variation in foraging activity and response to humidity. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.1-6, 23 maio 2013. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063363.

HOLLAND, J. Nathaniel; DEANGELIS, Donald L. A consumer–resource approach to the density-dependent population dynamics of mutualism. **Ecology**, [s.l.], v. 91, n. 5, p.1286-1295, May 2010. Wiley. http://dx.doi.org/10.1890/09-1163.1.

HÖLLDOBLER, Bert; WILSON, Edward O. **The ants.** Cambridge: Harvard University Press, 1990. 732 p.

JOHNSTON, Ardis B.; WILSON, Edward O. Correlates of variation in the major/minor ratio of the ant, *Pheidole dentata* (Hymenoptera: Formicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, [s.l.], v. 78, n. 1, p.8-11, 1 jan. 1985. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/aesa/78.1.8.

KANG, Yun et al. Mathematical modeling on obligate mutualism: Interactions between leaf-cutter ants and their fungus garden. **Journal of Theoretical Biology**, [s.l.], v. 289, p.116-127, nov. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.08.027.

RODRIGUES, Andre et al. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 11, p.1186-1196, 17 maio 2013. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201200458.

MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, v. 13, n. April, p. 37–55, 2009.

MODLMEIER, Andreas P et al. Ant colonies maintain social homeostasis in the face of decreased density. **Elife**, [s.l.], v. 8, p.1-17, 2 maio 2019. ELife Sciences Publications, Ltd. http://dx.doi.org/10.7554/elife.38473.

MORAL, Rafael A; HINDE, John; DEMÉTRIO, Clarice G B. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package. **Journal of Statistical Software**, [s.l.], v. 81, n. 10, p.1-23, 2017. Foundation for Open Access Statistic. http://dx.doi.org/10.18637/jss.v081.i10.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15247–9, 26 nov. 2002.

NOLDUS, L. P. J. J.; SPINK, A. J.; TEGELENBOSCH, R. A. J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments, and Computers**, v. 33, n. 3, p. 398–414, 2001.

NOLDUS, L.P.J.J. **EthoVision XT 10 Reference Manual**. Wageningen, 2013. 750 p.

NORMAN, V. C.; PAMMINGER, T.; HUGHES, W. O. H.. The effects of disturbance threat on leaf-cutting ant colonies: a laboratory study. **Insectes Sociaux**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.75-85, 15 set. 2016. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/s00040-016-0513-z.

OSTER, George F.; WILSON, Edward O. **Caste and ecology in the social insects.** 12. ed. Princeton University Press, 1978. 372 p.

PACALA, Stephen W.; GORDON, Deborah M.; GODFRAY, H. C. J.. Effects of social group size on information transfer and task allocation. **Evolutionary Ecology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.127-165, mar. 1996. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/bf01241782.

PAMMINGER, Tobias et al. Increased host aggression as an induced defense against slave-making ants. **Behavioral Ecology**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.255-260, 2011. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arq191.

PORTER, Sanford D.; TSCHINKEL, Walter R.. Fire Ant Polymorphism (Hymenoptera: Formicidae). **Annals Of The Entomological Society Of America**, [s.l.], v. 78, n. 3, p.381-386, 1 maio 1985. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/aesa/78.3.381.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M.. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.151-160, maio 1979. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2311.1979.tb00570.x

RISCH, S.; BOUCHER, D. Wiley, Ecological Society of America. Ecological Society of America, v. 57, n. 3, p. 8–9, 1976.

SCHMID-HEMPEL, Paul. Worker castes and adaptive demography. **Journal of Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-12, jan. 1992. Wiley. http://dx.doi.org/10.1046/j.1420-9101.1992.5010001.x

SOSA-CALVO, Jeffrey et al. Rediscovery of the enigmatic fungus-farming ant: Formicidae). **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.1-29, 10 maio 2017. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176498.

SUJIMOTO, Fernando R. et al. Foraging activity of leaf-cutter ants is affected by barometric pressure. **Ethology**, [s.l.], p.1-7, 2 out. 2019. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/eth.12967.

TSCHINKEL, W. R. Insect sociometry, a field in search of data. **Insectes Sociaux**, v. 38, n. 1, p. 77–82, 1991.

TSCHINKEL, W. R. Back to basics: Sociometry and sociogenesis of ant societies (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, v. 14, n. January, p. 49–54, 2011.

WEBER, N. A. Fungus-Growing Ants. **Science**, [s.l.], v. 153, n. 3736, p.587-604, 5 ago. 1966. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/science.153.3736.587.

WILSON, E. O. The sociogenesis of insects colonies. **Science**, v. 228, n. 4707, p. 1489–1495, 1985.

WILSON, Edward O. Caste and Division of Labor in Leaf-Cutter Ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta): a) The Overall Pattern in *A. sexdens.* **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Cambridge, v. 7, n. 2, p.143-156, fev. 1980.

WILSON, Edward O. Caste and Division of Labor in Leaf-Cutter Ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta): b) The Ergonomic Optimization of Leaf Cutting. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Cambridge, v. 7, n. 2, p.157-165, fev. 1980.

WILSON, Edward O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.55-60, dez. 1983. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/bf00366656.