**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Recrutamento e marcação química de trilha em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) sob diferentes fontes de estímulos

Fernando Ribeiro Sujimoto

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

**Piracicaba
2013**

Fernando Ribeiro Sujimoto
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Recrutamento e marcação química de trilha em *Atta sexdens rubropilosa*
(Hymenoptera: Formicidae) sob diferentes fontes de estímulos**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

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

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Sujimoto, Fernando Ribeiro

Recrutamento e marcação química de trilha em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) sob diferentes fontes de estímulos / Fernando Ribeiro Sujimoto. - - Piracicaba, 2013.

60 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Forrageio 2. Polietismo das castas 3. Defesa do ninho 4. Deposição de feromônio
I. Título

CDD 632.796
S948r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que me apoiaram e auxiliaram durante o período de mestrado.

Dedico em especial à minha amada noiva, Amanda, pela paciência e amor ininterruptamente doados;
À minha adorada família pelo apoio, e aos meus amigos pelo companheirismo.

Agradeço a todos que me acompanharam e apoiaram nessa caminhada, não somente no período de mestrado, mas em toda minha formação acadêmica.

Agradeço imensamente a Deus, que me tirou de problemas, protegeu e resguardou minha vida;

Agradeço à “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP pelos inestimáveis momentos de estudo e formação;
Agradeço à minha amada Amanda pela inspiração, dedicação e empatia;

Ao meu pai Hirooshi pelo incentivo e amor desde o início da minha vida;

À minha mãe Maria José pelo carinho e amor sempre a espera;
Aos meus irmãos, Silma e Reinaldo, pelas palavras e gestos animadores;
À minha querida Avó Olivina, pelas histórias, carinhos, cuidados e orações que serão sempre lembrados;

À minha tia Célia que sempre demonstrou e dedicou muito carinho a mim e meus irmãos;

Aos meus queridos primos, Amanda, Eloá, Bruno, Hugo e Nágila, pelos poucos, mas ótimos momentos juntos nos últimos anos;

Aos meus sogros, Sílvia e Marcos, pelo gentil acolhimento e incentivo;

Aos meus amigos Lucíla, Franciele, Mateus, Alexandre, Aline, Talita, Mariana, Felipe, Fúvia, Anselmo, William e Rosália pelas boas conversas e
ínestimável apoio;

Ao grande amigo Tayron, pelo apoio, pelas conversas e por sempre
atender ao telefone;

Ao Davi pela prontidão em ajudar, pelas conversas em inglês e por
partilhar da admiração pelas formigas;

A todos os meus colegas de laboratório que tanto fizeram para meu
crescimento;

Às Doutoradas Rejane, Ana Lía, Maria Fernanda e Carla, pela
participação imprescindível na minha formação e finalização desta etapa;

À técnica Arodi pelo acompanhamento e preparação para essa
conquista;

Em especial, agradeço ao Professor Dr. José Maurício Simões Bento,
pelos ensinamentos, orientação e formação profissional.

*“Ele te cobrirá com as suas penas,
e debaixo das suas asas te confiarás;
a sua verdade será o teu escudo e broquel.
Não terás medo do terror de noite
nem da seta que voa de dia,
Nem da peste que anda na escuridão,
nem da mortandade que assola ao meio-dia.
Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita,
mas não chegará a ti.
Somente com os teus olhos contemplarás,
e verás a recompensa dos ímpios.
Porque tu, ó Senhor, és o meu refúgio.
No Altíssimo fizeste a tua habitação.
Nenhum mal te sucederá,
nem praga alguma chegará à tua tenda.
Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito,
para te guardarem em todos os teus caminhos.”*

Salmo 91

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELA.....	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 DESENVOLVIMENTO	21
2.1 Revisão bibliográfica	21
2.1.1 Formigas cortadeiras.....	21
2.1.2 O gênero <i>Atta</i>	23
2.1.3 <i>Atta sexdens</i>	24
2.1.4 Comunicação em <i>Atta</i> spp.	25
2.1.5 Feromônio de trilha em <i>Atta</i> spp.	26
2.1.6 Recrutamento em formigas	28
2.2 Metodologia.....	32
2.2.1 Criação de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	32
2.2.2 Extração do Feromônio de Trilha	33
2.2.3 Forrageio e Comportamento	37
2.2.4 Análise Química	38
2.2.5 Análise Estatística	39
2.3 Resultados	39
2.3.1 Recrutamento de castas <i>versus</i> estímulo.....	39
2.3.2 Deposição de feromônio por casta.....	40
2.3.3 Relação entre castas recrutadas e deposição de feromônio de trilha	41
2.3.4 Perfil químico das trilhas	45
2.4 Discussão.....	46
3 CONCLUSÕES.....	51

REFERÊNCIAS	53
-------------------	----

RESUMO

Recrutamento e marcação química de trilha em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) sob diferentes fontes de estímulos

A formação, recrutamento e manutenção de trilhas em formigas cortadeiras do gênero *Atta* é controlada quimicamente e envolve a participação de diferentes castas. Todavia, são escassos os estudos sobre a dinâmica das castas sob diferentes fontes de estímulos para a colônia, e como isso interfere na deposição de trilhas químicas. O presente trabalho visou compreender a influência de diferentes fontes de estímulos no padrão químico de deposição das trilhas, bem como no comportamento de recrutamento, forrageamento e defesa das operárias em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Os resultados indicaram que houve variação do perfil etológico e alocação de tarefas desempenhadas pelos indivíduos presentes na colônia, de acordo com a fonte de estímulo. Neste caso foram oferecidos uma fonte de estímulo atrativa ('pétalas de rosas') e outra de agressividade ('rainha de outra colônia'). Além disso, os perfis químicos observados nas trilhas variaram qualitativamente e quantitativamente de acordo com os estímulos oferecidos. Estes dados sugerem que as operárias de *A. sexdens rubropilosa* seriam capazes de manejar quimicamente seu feromônio de trilha para informar e alterar o comportamento de suas companheiras de ninho, de acordo com a fonte de estímulo em que foram expostas.

Palavras-chave: Forrageio; Polietismo das castas; Defesa do ninho; Deposição de feromônio

ABSTRACT

Recruitment and chemical-marked trail in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) to different stimuli

Formation, recruitment and maintenance of trail in *Atta* leaf-cutting ants are chemically controlled and involve participation of different castes. Nevertheless, studies on caste dynamic under different stimuli to the colony are scarce, and how it interferes in the chemical deposition of the trail. This investigation aimed to understand how different source of stimuli influence the chemical pattern of trail marking as well as the recruitment, foraging and defense behavior by workers in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Results indicate variation in the ethological profile and task allocation performed by the colony individuals, according to the stimuli source. In this case, it was offered an attractive stimulus source ('rose petals') and an aggressive one ('other colony queen'). Moreover, the chemical profiles of the trail varied qualitatively and quantitatively in response to the stimuli they were exposed. These data suggest that *A. sexdens rubropilosa* workers would be able to chemically manipulate their trail pheromone with aim to inform and alter their nestmate behavior in response to the exposed stimuli source.

Keywords: Foraging; Caste polyethism; Nest defense; Pheromone release

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Disposição e quantidade padrão de fungo nas colônias de *Atta sexdens rubropilosa* utilizadas nos experimentos.....33
- Figura 2** - Estrutura física do ninho artificial das colônias de *A. sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório33
- Figura 3** - Estrutura confeccionada visando à deposição do feromônio de trilha por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. A seta indica o substrato inerte ('plataforma de vidro') que foi lavado com solvente ao final dos bioensaios para obtenção do feromônio de trilha efetivamente utilizado pelas operárias durante o forrageamento de acordo com o tratamento empregado (pétalas de rosa ou rainha de outra colônia)35
- Figura 4** - Bioensaios com *Atta sexdens rubropilosa* para registro dos recrutamentos tanto na presença do estímulo contendo 'pétala de rosas' (A), quanto para 'rainha de outra colônia' (B).....36
- Figura 5** - Lavagem e isolamento dos compostos químicos da trilha de feromônio de *Atta sexdens rubropilosa* depositados na plataforma de vidro (substrato). (A) Materiais de vidro utilizados para coleta e lavagem da trilha de feromônio; (B) Processo de lavagem com solvente da plataforma de vidro (substrato); (C) Frasco contendo o extrato natural da trilha de feromônio coletado após cada repetição37
- Figura 6** - Escala utilizando cabeças de *Atta sexdens rubropilosa* a partir de indivíduos das colônias utilizadas nos bioensaios, para determinação das castas (Escala adaptada de Wilson, 1980a).....38
- Figura 7** - Número médio ($\pm$ EP) de operárias por casta (generalistas, forrageadoras e soldados) de *Atta sexdens rubropilosa* recrutadas para os estímulos 'pétalas de rosas' e 'rainha de outra colônia' (T= 20 min.) (Regressão Log-linear em GLM). *** $P < 0,001$ 40
- Figura 8** - Número médio ($\pm$ EP) de operárias por casta (generalistas, forrageadoras e soldados) de *Atta sexdens rubropilosa* que depositaram feromônio para os estímulos 'pétalas de rosas' e 'rainha de outra colônia' (T= 20 min.) (Regressão Log-linear em GLM). *** $P < 0,001$ 41
- Figura 9** - Relação entre o fluxo de formigas de *Atta sexdens rubropilosa* na trilha (ida + volta) e a quantidade de vezes que houve a deposição do

feromônio de trilha por casta (jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados), frente ao estímulo 'pétalas de rosas' (Correlação de Pearson) 42

Figura 10 - Relação entre o fluxo de formigas de *Atta sexdens rubropilosa* na trilha (ida + volta) e a quantidade de vezes que houve a deposição do feromônio de trilha por casta (jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados), frente ao estímulo 'rainha de outra colônia' (Correlação de Pearson) 42

Figura 11 - Análise de componentes principais (PCA), primeiro e segundo componente principal com 96,34% e 3,37%, do total da avaliação, respectivamente. Correlação entre os estímulos pétalas de rosa e rainha de outra colônia (variáveis) com as castas de *Atta sexdens rubropilosa* (jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados) que foram recrutadas (observações) 44

Figura 12 - Análise de componentes principais (PCA), primeiro e segundo componente principal com 96,10% e 3,79%, do total da avaliação, respectivamente. Correlação entre os estímulos pétalas de rosa e rainha de outra colônia (variáveis) com as castas de *Atta sexdens rubropilosa* (jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados) que depositaram feromônio de trilha (observações)..... 45

Figura 13 - Perfis químicos das trilhas produzidas por *Atta sexdens rubropilosa*, a partir dos estímulos 'pétalas de rosas' (**vermelho**) e 'rainha de outra colônia' (**verde**); extrato de seis glândulas de veneno de forrageadoras (**azul**); e solvente hexano utilizado como padrão (**preto**). Os números indicam picos de substâncias químicas coincidentes baseados somente no tempo de retenção (min.) 46

Figura 14 - Comportamento dos soldados de *Atta sexdens rubropilosa* (setas) em experimento com pétalas de rosas, demonstrando: (A) Soldados recrutados em direção ao estímulo, e (B) soldados estáticos em frente ao orifício da colônia. Ambas as observações foram feitas após dez minutos de filmagem 49

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Correlação de Pearson entre o fluxo de indivíduos na trilha e formigas que depositaram feromônio, ambos por casta e sob os estímulos 'rosas' e 'rainha de outra colônia'	43
--	----

1 INTRODUÇÃO

Diante de toda diversidade de comportamentos e interações presente nos insetos sociais, a saída do ninho para a exploração espacial e busca por alimentos é uma etapa essencial à sobrevivência dos indivíduos e a manutenção da complexa vida na colônia (DORNHAUS, POWELL, BENGSTON, 2012; LANAN et al., 2012). Para as formigas essa atividade é inicialmente estimulada e, posteriormente, acelerada por um sistema de ‘recrutamento’ dos indivíduos da colônia (HOLLDOLBLER; WILSON, 1990). Recrutar, portanto, implica na mobilização de operárias do ninho em direção a um ponto onde o trabalho cooperativo é necessário (WILSON, 1971). A partir dessa movimentação –aparentemente desordenada – as formigas são guiadas por trilhas que possibilitam o fluxo ativo do ninho até a fonte de estímulo e vice-versa (SUDD, 1959).

Ao longo de uma trilha, as operárias podem se orientar por sinais visuais e/ou táteis (ROSENGREN, 1971; HOLLDOLBLER, 1976; VILELA; JAFFE; HOWSE, 1987; PIELSTROM; ROCES, 2012). Contudo, o principal sistema de comunicação envolvido no recrutamento de operárias na maioria das espécies de formigas é o químico, por meio de compostos denominados feromônios de trilha (WILSON, 1971; MORGAN, 2009). Primeiramente descrito por Tumlinson et al. (1971) em *Atta texana* (Hymenoptera: Formicidae), esses odores formam um espaço ativo determinado pelas concentrações das moléculas químicas, e são espécie-específico (MORGAN, 2009). Para o gênero *Atta*, os compostos químicos são principalmente pirazinas de cadeia longa, complementados por outras substâncias secundárias (MORGAN, 2009). A incomparável complexidade química do feromônio de trilha nestas espécies está relacionada com a intensa atividade de recrutamento em massa, sistema esse considerado o mais sofisticado entre as formigas (JAFFE; ISSA; SAINZ-BORG, 2012).

O fato ainda dessas espécies possuírem uma sociedade em que os indivíduos são divididos em castas, tornam mais heterogêneas as estratégias de recrutamento, formação de trilha, forrageio e defesa do ninho. De acordo com Wilson (1980a) as espécies de *Atta* são divididas em quatro castas (jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados) seguindo aspectos morfológicos e caracterizando uma distribuição alométrica, porém, com diferentes tarefas requeridas no ninho (i.e.

polietismo) (WILSON, 1980a). A polimorfia e o polietismo, no entanto, não são invariavelmente correlacionados. Por exemplo, jardineiras e generalistas, que sabidamente são responsáveis pelo cuidado com a prole, rainha e fungo (WILSON, 1980a; GERSTNER et al., 2011), em muitas situações são mais ativas na defesa contra intrusos co-específicos do que os soldados em *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) (SALZEMANN; JAFFE, 1991). Ao mesmo tempo, soldados dessa espécie e de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) não somente defendem a colônia contra ameaças, como também saem do ninho para cortarem pedaços de frutos caídos no substrato, provavelmente por possuírem mandíbulas mais fortes que outras castas forrageadoras (EVISON; RATNIEKS, 2007).

A partir disso, nota-se que as atividades de recrutamento e defesa da colônia, envolvem uma plasticidade comportamental além da participação de operárias especializadas etologicamente, caracterizando uma sociedade evolutivamente complexa (OSTER; WILSON, 1978; ANDERSON; McSHEA, 2001).

Neste sentido, são escassos os estudos envolvendo essa complexidade de interações ecológicas associadas aos feromônios de trilha depositados pelas formigas. Assim, este trabalho visou compreender se a presença de diferentes fontes de estímulos alteram o padrão químico de deposição das trilhas, bem como o comportamento de recrutamento, forrageamento e defesa das operárias em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Formigas cortadeiras

Insetos pertencentes à família Formicidae, subfamília Myrmicinae e tribo Attini, as formigas cortadeiras são conhecidas por representarem uma relação mutualística clássica com fungos. Nessa interação, o fungo é cultivado essencialmente como fonte de alimento, enquanto as formigas lhe fornecem proteção e dispersão (HOLLDOLBLER; WILSON, 1990; MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010). O surgimento dessa relação, datando entre 45 e 80 milhões de anos, mostra uma história co-evolutiva complexamente derivada, culminando no surgimento das formigas cortadeiras como o evento mais importante na evolução da tribo (HOLLDOLBLER; WILSON, 1990).

Os 12 gêneros e as 230 espécies dessa tribo são encontrados no Novo Mundo, e são ainda divididos de acordo com os diferentes sistemas de cultivo do fungo (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010). Dentre esses sistemas, formigas capazes de utilizar grande diversidade de plantas como substratos para os fungos, conquistaram uma ampla faixa geográfica das Américas (HOLLDOLBLER; WILSON, 1990). Essas formigas conhecidas como cortadeiras são compostas por 40 espécies descritas dentro de dois gêneros, *Atta* e *Acromyrmex*.

Apesar da origem paleocênica da maioria das formigas da tribo Attini, as espécies de cortadeiras que surgiram mais recentemente, cerca de 8 a 12 milhões de anos atrás no que se denomina Mioceno (SCHULTZ; BRADY, 2008; HOLLDOLBLER; WILSON, 1990). A partir de sua distribuição pelas regiões tropicais do Novo Mundo, esses insetos tornaram-se muito bem sucedidos e passaram a ser considerados como herbívoros dominantes. O grande sucesso evolutivo desses gêneros deu-se, portanto, pela sua relação mutualística com o fungo; a complexa organização morfológica e etológica das castas; e pela facilidade de aquisição de plantas em seu habitat (WILSON, 1980; SCHULTZ; BRADY, 2008; MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010).

Associadas intimamente a fungos dos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus* (Agaricaceae: Leucocoprinae) (MUELLER et al., 2001), as formigas cortadeiras os cultivam em material vegetal fresco, como folhas, flores, frutos e mesmo sementes. Frente à diversidade alimentar, esses insetos sociais são amplamente encontrados na paisagem ecológica das regiões tropicais, especialmente nas Américas Central e do Sul (CHERRETT, 1989). Por exemplo, nas regiões do cerrado, a densidade de ninhos das principais espécies desse ambiente, *Atta laevigata* (Fr. Smith) e *A. sexdens rubropilosa* (Linnaeus) (Hymenoptera: Formicidae), variam entre 2,7 e 6 ninhos por hectare (VASCONCELOS et al., 2008), e nas florestas tropicais onde as espécies de *Atta* também são abundantes, ocorre uma densidade de 0,6 a 3 ninhos por hectare (CHERRETT, 1989).

Organismos modificadores da disponibilidade de recursos, as formigas cortadeiras quando em equilíbrio com o ambiente são tidas como engenheiras do ecossistema. Seus ninhos, aumentam a fertilidade e permeabilidade do solo, trazendo grandes benefícios ao meio em que são encontrados. Agem ainda como determinadoras de sucessões ecológicas e como dispersoras de sementes, remodelando cenários florestais (MONTROYA-LERMA et al., 2012).

Além da importância ambiental, as formigas cortadeiras são também muito estudadas devido ao seu alto impacto nas atividades agrícolas de países americanos. Por cortarem e transportarem uma ampla diversidade de plantas e também optarem por plantas com alto teor de nitrogênio e fósforo (BERISH, 1986), formigas cortadeiras tornaram-se uma das principais pragas de diversas culturas agrícolas e florestais (DELLA-LUCIA, 1993). Mesmo havendo severas perdas qualitativas nas culturas dos países americanos, poucos dados foram levantados sobre tais danos, especialmente quanto aos prejuízos quantitativos (DELLA-LUCIA, 2003). Oliveira (1996) mostra, por exemplo, uma perda de 13% de volume de madeira em *Eucalyptus grandis* (Myrtaceae) devido ao desfolhamento realizado por formigas do gênero *Atta* no Brasil.

Devido a sua distribuição neotropical, as principais culturas agrícolas atacadas por essas espécies são: café (*Coffea arabica* L.), cacau (*Theobroma cacao* L.), citros (*Citrus* spp.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), milho (*Zea mays* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Em culturais florestais, coníferas (como *Pinus* spp.) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) são as mais afetadas (MONTROYA-LERMA et al., 2012).

Estratégias de controle químico, biológico, mecânico e cultural são amplamente propostas, porém, pouco sucesso vem sendo obtido (BOARETTO; FORTI, 1997).

2.1.2 O gênero *Atta*

Vulgarmente conhecidas como saúvas, o gênero *Atta* assemelha-se às *Acromyrmex* spp. (quenquéns) tanto no aspecto ecológico quanto comportamental e morfológico. As espécies de *Atta*, no entanto, são geralmente maiores e possuem três pares de espinhos dorsais (DELLA-LUCIA, 1993). Para a identificação dentro do gênero, são válidas as características morfológicas das operárias (MARICONI, 1970; GONÇALVES, 1982). Atualmente são reconhecidas dez espécies de *Atta* que ocorrem nas regiões brasileiras: *Atta cephalotes*, *A. laevigata*, *A. silvai*, *A. bisphaerica*, *A. robusta*, *A. opaciceps*, *A. sexdens*, *A. capiguara*, *A. vollenweideri* e *A. goiana* (DELLA-LUCIA, 1993; HOLLOBLER; WILSON, 1990). As espécies *A. colombica*, *A. insularis*, *A. mexicana*, *A. saltensis* e *A. texana* são encontradas em outras regiões das Américas (HOLLOBLER; WILSON, 1990).

Os representantes do gênero são conhecidos por possuírem ninhos inicialmente fundados no subterrâneo pela rainha fecundada após a revoada, e ampliados posteriormente pelas operárias. Constituídos por diferentes tipos de câmaras, os ninhos podem conter de dezenas a centenas de compartimentos, e, externamente, são fáceis de serem visualizados pelo monte de terra solta acumulada. Os montes são denominados olheiros e marcam a entrada e saída do ninho, sendo utilizados dentre outras características para identificação da espécie (WEBER, 1966; HOLLOBLER; WILSON, 1990; DELLA-LUCIA, 1993). As câmaras são funcionalmente divididas em quatro tipos: (i) “Câmaras vivas”, onde estão os fungos cultivados; (ii) “câmaras de lixo”, local de deposição de resíduos e cadáveres; (iii) “câmaras vazias”; (iv) “câmaras de terra” (MARICONI, 1970). A arquitetura do ninho é interligada por canais que, juntamente com os olheiros, permitem um sistema de ventilação eficiente (MOREIRA et al., 2010).

Além da arquitetura peculiar dos ninhos, as saúvas se destacam pela divisão dos indivíduos em castas (WILSON, 1971). As rainhas e os machos formam as castas temporárias, que criam asas e se desenvolvem sexualmente no período que antecede a revoada, geralmente, no Brasil e para *A. sexdens rubropilosa*, no início

dos dias chuvosos (BENTO, 1993). As castas permanentes são constituídas pela rainha e operárias, e são responsáveis, respectivamente, pela deposição de ovos e atividades não reprodutivas da colônia (HOLLDOBLE; WILSON, 1990). As operárias ainda são classificadas em quatro diferentes grupos: (i) jardineiras, que cuidam dos fungos e da prole; (ii) generalistas, ativas em diversas atividades, como incorporação do substrato nas hifas e cuidados com a rainha; (iii) forrageadoras, indivíduos que exploram, cortam e coletam a vegetação; e (iv) os soldados ou defensores, que defendem o ninho contra invasores (WILSON, 1980a; DELLA-LUCIA, 1993). Essa determinação é baseada em medidas alométricas, sendo as castas paralelamente classificadas também por padrões comportamentais (i.e. polietismo) (WILSON, 1980a). Perfazendo todos esses grupos, o número total de indivíduos de uma colônia de *Atta* spp. pode chegar a milhões, como por exemplo, para *A. sexdens rubropilosa*, em que o ninho adulto alcança 8 milhões de formigas (FOWLER et al., 1986).

2.1.3 *Atta sexdens*

Dentre os 15 representantes conhecidos de *Atta*, a espécie *Atta sexdens* está entre as maiores causadoras de danos na agricultura, sendo, portanto, muito estudada quanto as suas características biológicas e comportamentais (MONTROYA-LERMA et al., 2012). Suas operárias causam sérios danos com o desfolhamento de culturas como *Eucalyptus grandis*, *Pinus elliottii*, *Clitoria fairchildiana*, *Anacardium occidentale*, entre outras (ARAÚJO et al., 1997; DELLA-LUCIA, 2003; ORTIZ; GUZMÁN, 2007). São amplamente encontradas em países como Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela, em altitudes que variam de 100 a 450 metros (MONTROYA-LERMA et al., 2012).

Em sua maioria, os ninhos dessa espécie são construídos em locais sombreados, com uma alta porcentagem de cobertura de copa. A umidade dentro do ninho é maior ou igual a 90%, e a temperatura gira em torno de 25°C. Essas condições microclimáticas são ideais para o cultivo do fungo *Leucoagaricus* spp. e criação dos ovos, larvas e juvenis (VAN GILS; VANDERWOUDE, 2012).

Dividida em três subespécies, *Atta sexdens sexdens*, *A. sexdens rubropilosa* e *A. sexdens priventris*, essas formigas são diferenciadas de outras espécies de *Atta*

spp. por possuírem a cabeça opaca e rugosa (DELLA-LUCIA, 1993). Conhecidas como saúvas-limão, suas subespécies ocupam os braços mais derivados dentro da tribo Attini e, por meio de análises moleculares, juntamente com os gêneros *Acromyrmex*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex* e as demais espécies do gênero *Atta*, formam um clado verdadeiro dentro da filogenia da tribo (WETTERER et al., 1998).

2.1.4 Comunicação em *Atta* spp.

A comunicação entre as formigas pode ocorrer de diversas maneiras, incluindo visual, vibracional e mesmo o simples toque com as antenas (JANDER, 1963; JAFFE; HOWSE, 1979; HOLLOBLER, 1999). Indivíduos escavadores em *Atta vollenweideri* recrutam outras operárias para se unirem à escavação por meio de vibrações no substrato, maximizando a atividade e, portanto, contribuindo coletivamente para a construção do ninho (PIELSTROM; ROCES, 2012). Farji-Brener (2010), em uma perspectiva mais dinâmica, identifica como pistas a utilização de encontros frontais entre as operárias de *A. cephalotes* no trânsito de trilhas. Trilhas com maior tráfego em *A. colombica* também intensificam o contato social e, portanto, a exploração e busca de recursos (DUSSUTOUR et al., 2007). Assim sendo, tais encontros informam sobre a aquisição de alimento durante a atividade de forrageio, superando os custos das colisões e, dessa forma, auxiliando na manutenção da vida em sociedade.

Além disso, formigas de diferentes gêneros podem se orientar por meio de pistas visuais como rochas, troncos e mesmo guiando-se pelo compasso do sol (ROSENGREN, 1971; HOLLOBLER, 1976). A partir dos experimentos realizados e dados coletados por Vilela et al. (1987), houve uma clara demonstração da importância das pistas visuais no forrageio das espécies *A. cephalotes* e *A. laevigata*. Durante o dia, essas formigas são capazes de detectar diferenças espaciais na paisagem do percurso quando em forrageio. Contudo, durante a noite, a ausência de estímulos visuais leva a uma orientação menos acurada. Os resultados, portanto, parecem indicar um melhor forrageio na presença de luz, comparado com as dificuldades de orientação em sua ausência. No entanto, ainda assim, segundo Vilela et al. (1987), as operárias foram adaptativamente capazes de explorar o ambiente em ambos os turnos, pois parecem ser orientadas por uma

hierarquia de pistas. Primeiramente seriam guiadas pelo odor deixado na trilha; seguido da presença de pistas visuais, plano espacial e pistas gravitacionais.

Contudo, mesmo havendo diferentes maneiras de se comunicarem e orientarem, as espécies de formigas, incluindo *Atta* spp., utilizam majoritariamente pistas químicas (WILSON, 1958; HOLLOBLER, 1999; MARTIN; DRIJHOUT, 2009). Os compostos químicos envolvidos na comunicação entre indivíduos são chamados de semioquímicos, sendo classificados de acordo com as respostas comportamentais que desencadeiam (NORDLUND; LEWIS, 1976). Os sinais químicos mais estudados em insetos são aqueles que mediam interações entre indivíduos da mesma espécie, conhecidos como feromônios. Na comunicação entre formigas, estes podem ser encontrados intermediando comportamentos e atividades importantes para a colônia. Os principais tipos de feromônios existentes em Formicidae são: sexual, agregação, dispersão, alarme, territorial, *primers*, reconhecimento e trilha (JACKSON; MORGAN, 1993; LECANTE; HEFETZ, 2008; MARTIN; DRIJFHOUT, 2009). Nas formigas cortadeiras, no entanto, os feromônios de trilha são os mais conhecidos, especialmente pelo seu caráter determinante no forrageio, atividade que as fazem econômica e ecologicamente tão importantes (JAFTE; ISSA; SAINZ-BORGO, 2012).

2.1.5 Feromônio de trilha em *Atta* spp.

Um dos comportamentos mais característicos e peculiares das formigas cortadeiras é a formação de trilhas (HOLLOBLER; WILSON, 1990). Estruturas indispensáveis para a orientação em atividades de campo, as trilhas são formações físicas (geralmente temporárias) marcadas por compostos químicos capazes de guiar o fluxo de indivíduos em relação a fontes de estímulos (SUDD, 1959). Assim, como a maioria das atividades realizadas pela colônia, a formação, manutenção e transformação das trilhas são controladas quimicamente.

Liberados pelas operárias em atividades exploratórias fora do ambiente interno da colônia, esses compostos são produzidos por diferentes glândulas abdominais (NASCIMENTO; MORGAN, 1996). As glândulas de veneno e Dufour são as principais, sendo a primeira a fonte de feromônio de trilha da maior parte das espécies de Myrmicinae (MORGAN, 2009). À vista disso, a glândula de veneno é o

órgão produtor dos compostos que formam o feromônio de trilha nas espécies da tribo Attini. Juntamente à glândula, há um reservatório globular onde o feromônio é armazenado (MOSER, 1970). Localizado na região terminal do gaster, esse complexo estende-se em filamentos secretores, que, posteriormente, encontram o meio externo através do ferrão, depositando o feromônio no substrato. Ao encostarem o ferrão, as operárias ponteiam o feromônio por toda a extensão da trilha, marcando-a de forma descontínua (HOLDOBLER; WILSON, 1990; TRANIELLO; ROBSON, 1995). O feromônio é constituído por um líquido transparente, viscoso e altamente alcalino. Os compostos se solidificam assim que depositados, e, posteriormente, volatilizam em uma taxa muito mais baixa que outros tipos de feromônios conhecidos, visto que seu efeito deve perdurar por mais tempo (TUMLINSON et al., 1972).

Funcionalmente as glândulas parecem ser idênticas para as castas de *Atta*. No entanto, Schoeters e Billen (1990) diferenciaram morfológicamente as glândulas de veneno das castas nas subespécies *A. sexdens rubropilosa* e *A. sexdens sexdens*, encontrando diferenças quanto aos filamentos secretores. Operárias menores possuem filamentos mais longos e não pareados, enquanto as médias e maiores os dispõem mais próximo ao reservatório.

Diversos estudos em ecologia química identificaram a fonte glandular dos feromônios de trilha e, quimicamente, suas composições, demonstrando uma grande complexidade e diversidade de compostos encontrados em Formicidae (ATTYGALLE; MORGAN 1985, MORGAN; OLLETT, 1987; VANDER MEER et al., 1988; HOLDOBLER et al., 1995; TENTSCHERT et al., 2000; BLATRIX et al., 2002; KOHL et al., 2003). Vale ressaltar, no entanto, que os autores listados extraíram as glândulas produtoras para a identificação química destes compostos.

De modo geral, para a maioria das formigas *Atta*, o feromônio de trilha é composto por carboxilatos e pirazinas, que são compostos químicos semi-voláteis, com grande quantidade de carbonos (cadeias longas) e apropriados para o sistema de recrutamento em massa das formigas cortadeiras (JAFFE et al., 2012).

O primeiro isolamento e identificação de feromônio de trilha em formigas foram realizados por Tumlinson et al. (1971) na formiga *A. texana*. Um total de 3,7 Kg de operárias foi macerado para se chegar no principal componente do feromônio de trilha: o 4-metil-pirrol-2-carboxilato de metila (M4MPC). Posteriormente, descobriu-se a presença desse composto nos feromônios das espécies *A.*

cephalotes (RILEY et al., 1974), *A. robusta* (OLIVEIRA, 1975), *A. laevigata* e *A. bisphaerica* (OLIVEIRA et al., 1990). Nas subespécies *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa*, no entanto, um outro composto majoritário foi identificado: o 3-etil-2,5-dimetilpirazina (EDMP), além do M4MPC, acetatos de metil fenila e etil fenila como compostos secundários (CROSS et al., 1979; EVERSHED; MORGAN, 1983). Para *A. bisphaerica*, em contrapartida, EDMP é secundário em relação ao M4MPC.

Apesar de inicialmente acreditar-se que operárias de *A. sexdens sexdens* e *A. cephalotes*, por exemplo, poderiam seguir as trilhas umas das outras devido a coincidência nos compostos majoritários, posteriormente foi demonstrado a importância dos compostos secundários na especificidade das trilhas (MORGAN, 2009). Tais formigas podem detectar as trilhas devido à presença comum de compostos como M4MPC e EDMP, mas esses estão em proporções diferentes de acordo com a espécie. Visto isso, a relação M4MPC:EDMP nas formigas *A. cephalotes*, *A. sexdens sexdens* e *A. sexdens rubropilosa* estão, respectivamente, em uma razão de 3:1, 1:14 e 1:14 (EVERSHED; MORGAN, 1983; BILLEN et al., 1991). Portanto, a mistura de multicomponentes, assim sendo, gera graus de especificidade na mensagem química (SILVERSTEIN; YOUNG, 1976; HOLLOBLER; CARLIN, 1987).

2.1.6 Recrutamento em formigas

Definido como sistema de comunicação que leva operárias a um ponto do espaço onde certo trabalho é requerido, o recrutamento é uma das atividades mais dinâmicas no cotidiano das formigas (WILSON, 1971). Quando encontra uma fonte de alimento, por exemplo, alguns indivíduos da colônia são recrutados nessa direção, guiados primordialmente pelo feromônio de trilha depositado (HOLLOBLER; WILSON, 1970). Ainda havendo alimento a ser explorado no espaço pré-reconhecido, essa trilha é reforçada pelas formigas em tráfico. No entanto, ao se esgotar o alimento, os indivíduos não mais reforçam a mensagem química e, conseqüentemente, o odor aos poucos se evapora e o recrutamento cessa (MORGAN, 2009). Assim, esse sistema viabiliza a mobilização de formigas em atividades que não podem ser realizadas por apenas um indivíduo, sendo a trilha

um meio de comunicação presente e eficiente somente quando houver algum estímulo (JAFJE et al., 2012).

A trilha é inicialmente formada por uma formiga patrulheira, que, ao encontrar uma fonte de estímulo, retorna ao formigueiro geralmente marcando o caminho com feromônio. Nas proximidades da trilha pré-formada ou dentro do ninho, essa formiga atrai indivíduos em direção ao estímulo químico. A atração é realizada por diversas maneiras, incluindo toque com as antenas e regurgitação. Ainda que a presença do feromônio em si seja a estratégia mais utilizada entre as patrulheiras, a comunicação inicial no recrutamento varia entre os grupos de formigas (MOGLICH et al., 1974; MORGAN, 2009).

Em Formicidae, a atividade de recrutamento é claramente dividida em quatro categorias (JAFJE, 1984). Em espécies cuja quantidade de operárias é pequena, geralmente o recrutamento é realizado pelo sistema (a) '*tandem running*' (HOLLOBLER; WILSON, 1990; RICHARDSON et al., 2007; MORGAN, 2009). Nesse sistema, a patrulheira leva outras formigas recrutadas por meio do contato contínuo com as antenas em seus corpos. Esse sistema permite que apenas uma formiga por vez seja recrutada devido à necessidade do contato físico entre a "líder" e a "seguidora" e, pode ser observado, por exemplo, em *Leptothorax acervorum* e *Camponotus sericeus* (MÖGLICH et al., 1974). Outras espécies adicionam o feromônio de trilha no sistema, auxiliando na orientação em direção à fonte do estímulo (MORGAN, 2009; JAFJE, 2012). Neste caso, o feromônio passa a agir como reforçador desse comportamento, e o sistema passa a ser denominado (b) '*tandem running* com sinais de odor' ou simplesmente '*tandem calling*' (HOLLOBLER et al., 1974).

Nas espécies em que há mobilização de um grupo contendo entre cinco e trinta operárias, tem-se um (c) 'recrutamento em grupo', que envolve a deposição e orientação por feromônio de trilha, mas toques com as antenas também podem agir como sinais, sendo observado, por exemplo, em *Camponotus pennsylvanicus* (TRANIELLO, 1977). Semelhante ao último, o (d) 'recrutamento químico em massa' (RQM), no entanto, mobiliza de centenas a milhares de operárias em direção à fonte de estímulo. Como já subentendido no nome, o sistema é principalmente intermediado pela presença do feromônio de trilha (WILSON, 1971; JAFJE, 1984). Assim, quanto mais atrativa a fonte de alimento, maior será a quantidade de formigas que depositarão feromônio na trilha, e maior o esforço de deposição por

indivíduo. Consequentemente, o aumento de feromônio na trilha leva a uma maior porcentagem de operárias recrutadas (JAFFE, 1980). O recrutamento somente decai e posteriormente cessa, quando certa quantidade de formigas não mais alcança a fonte de alimento sobrecarregada de operárias, e, portanto, não depositam feromônio. Após esse limiar, os compostos já depositados começam a evaporar e a trilha química aos poucos se esvai. Desse modo, o fluxo de operárias na trilha está diretamente relacionado com as características da fonte de alimento, e é ajustado de acordo com a taxa de deposição de feromônio (JAFFE, 1980).

O RQM ainda pode ser classificado em dois outros sistemas quanto à tomada de decisão das formigas frente às características do estímulo e da colônia (JAFFE et al., 2012). No sistema democrático, como no gênero *Solenopsis*, todas as operárias realizam todas as tarefas da colônia, sendo que os indivíduos recrutados participam igualmente na adição e fixação do feromônio de trilha. O sistema é adaptado para um recrutamento rápido e eficiente, frente à necessidade de exploração de recursos efêmeros. Já em formigas como *Atta* spp., o sistema é chamado autocrático, em que há operárias especializadas na patrulha e obtenção de alimento. Nesse caso as formigas recrutadas são adaptadas a explorar simultaneamente diferentes fontes de alimentos com diferentes tempos de duração. Portanto, há uma variação na concentração do feromônio depositado em função de características como qualidade, quantidade e palatabilidade dos alimentos. Assim, indivíduos são recrutados para fontes de alimento atraentes por intermédio de uma alta concentração dos compostos do feromônio de trilha; enquanto fontes de alimento pouco atraentes são sinalizadas com baixa concentração desses compostos. Além da comunicação química, espécies de *Atta* podem utilizar sinais de toques para desencadear e modular o comportamento de recrutamento e exploração do alimento (JAFFE; HOWSE, 1979). À vista disto, o sistema RQM autocrático das formigas cortadeiras mostra-se, química e ecologicamente, o mais sofisticado dentre os insetos sociais (JAFFE et al., 2012).

Já sugerido por Jaffe (1980), o recrutamento em *Atta* spp. é pautado pela presença de componentes decisivos assim listados: (a) as formigas recrutadas teriam habilidade de medir a concentração do feromônio de trilha e, consequentemente, relacionar com a atratividade do alimento; (b) as operárias teriam a capacidade de modular a quantidade de feromônio depositado por indivíduo de acordo com a concentração dos odores já presentes na trilha, e também com a

qualidade do alimento; (c) teriam condições de medir a quantidade de formigas presentes na trilha e na fonte de alimento; e (d) a atratividade e fluxo de indivíduos na trilha estaria relacionada com a necessidade de se alimentarem. Portanto, o sistema seria muito mais complexo do que proposto por Wilson (1971). Apesar da clara diversidade de sistemas de recrutamento, essas características ainda não permitem uma classificação filogenética concreta. Contudo, comparações sugerem que o recrutamento químico em massa apareceu diversas vezes na história evolutiva das formigas (JAFJE et al., 2012).

As características químicas da trilha também são importantes para a eficiência da exploração e do forrageio nas formigas cortadeiras. A quantidade de carbono presente nos compostos do feromônio (i.e. peso molecular), por exemplo, é positivamente correlacionada com a volatilidade do odor (JAFJE et al., 2012). No entanto, outros fatores contribuem igualmente para a fixação do feromônio e, portanto, para a dinâmica de forrageio. Aspectos do substrato onde o feromônio é depositado e a temperatura e umidade do ar no entorno da trilha podem afetar a volatilidade dos compostos, interferindo no sistema de recrutamento (VAN OUDENHOVE et al, 2012; JAFJE, 2012).

Os fatores ambientais também podem intervir em condições bioecológicas e fisiológicas, indiretamente alterando as atividades comportamentais das formigas cortadeiras (DELLA-LUCIA, 1993). Apesar de ser conhecida a eficiência no forrageio e transporte de alimento dessas formigas, dados sobre esses aspectos variam de acordo com a região e época de amostragem, e também das espécies estudadas (JAFJE, 1980; DELLA-LUCIA, 1993; VIANA, 2004).

A atividade de forrageio, caracterizada pela seleção, corte e transporte do alimento até o ninho, está também relacionada com a distribuição das plantas e com a preferência dos fungos mutualistas por determinados substratos (FOWLER et al., 1991). De maneira geral, as formigas *Atta* spp. exploram plantas com alto teor nutricional, e muitas vezes ainda selecionam as partes das plantas a serem cortadas. Fatores como textura, teor de umidade e compostos secundários das folhas também são importantes para decisão e preferência no forrageio (HOWARD, 1987a; NICHOLS-ORIAN; SCHULTZ, 1989).

Além do recrutamento estimulado pela presença de alimento, formigas cortadeiras são mobilizadas quando alguma ameaça circunda o ninho (SALZEMANN; JAFJE, 1991). Diferentes estratégias são usadas para defesa e

ataque pelas formigas, sendo o perigo, em *Atta* spp. inicialmente sinalizado pela emissão de feromônio de alarme (BUTENANDT et al., 1959; MOSER et al., 1968; HOLLOBLER; WILSON, 1990).

2.2 Metodologia

2.2.1 Criação de *A. sexdens rubropilosa*

As colônias de *A. sexdens rubropilosa* foram obtidas no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) na UNESP, Campus de Rio Claro, a partir de rainhas recém fecundadas coletadas após a revoada no Horto da cidade de Rio Claro-SP. Para os experimentos, foram selecionados quatro colônias com idade de 2 anos, com presença de soldados, e volume de fungo entre 800 e 1000mL (Figura 1). Os ninhos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$; $50 \pm 10\%$ UR; fotoperíodo (L:E) 14:10h para a área de forrageamento, e 0:24h para as câmaras de fungo (revestidos com papel alumínio), no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP.

Os ninhos possuíam recipientes em acrílico transparentes, com tampas que permitiam pouca passagem de ar, visando simular a arquitetura natural das colônias, disposta em três divisões a seguir: (i) câmara de alimento (9 x 10 cm, altura x diâmetro), (ii) câmara de fungo (12,5 x 10 cm), e (iii) câmara de lixo (9 x 10 cm). O livre trânsito dos indivíduos entre as câmaras foi possível via tubos de plástico conectados entre as câmaras (9 x 1,5 cm, largura:diâmetro) (Figura 2).

Todos os ninhos foram alimentados diariamente com uma dieta alternada, incluindo folhas de hibiscos (*Hibiscus* spp.), caramboleiras (*Averrhoa* spp.), laranjeiras (*Citrus* spp.) e acalifas (*Acalypha* spp.); fatias de maçã e laranja; flocos de milho e aveia. Os alimentos foram devidamente selecionados e lavados em água corrente. A limpeza das colônias foi realizada periodicamente a cada 15 dias, sendo retirado o lixo acumulado. Em qualquer atividade de manutenção, o manuseio e abertura das câmaras foram realizados cuidadosamente, evitando-se o mínimo distúrbio no sistema.

Figura 1 - Disposição e quantidade padrão de fungo nas colônias de *Atta sexdens rubropilosa* utilizadas nos experimentos

Figura 2 - Estrutura física do ninho artificial das colônias de *A. sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório

2.2.2 Extração do Feromônio de Trilha

As amostras contendo feromônio de trilha das colônias de *A. sexdens rubropilosa* foram obtidas diretamente pela lavagem em solvente da superfície (substrato) de deposição das trilhas pelas operárias, logo após o encerramento de cada bioensaio. Para isso, os ninhos, contendo câmeras de fungo e lixo (Figura 2)

foram mantidos sobre colunas de vidro (6 x 13 cm, largura: altura) imersos em uma bandeja contendo água para evitar a fuga das operárias (Figura 3). No lado oposto à saída do ninho, foi disposta outra coluna de vidro nas mesmas dimensões anteriores, para ser utilizada como uma arena de forrageamento pelas formigas. Entre o ninho e a arena de forrageamento foi inserido uma 'plataforma de vidro' (material inerte) (15 x 1,5 cm; comprimento: largura) que serviu de substrato para deposição do feromônio de trilha e passagem das operárias.

Ao final de cada repetição, a plataforma de vidro (substrato) era cuidadosamente retirada da estrutura e lavada com solvente hexano. Por meio de pipetas descartáveis de vidro, cerca de 80µl de hexano foram utilizados para extrair e isolar os compostos depositados a cada repetição. Para facilitar o processo, pequenos funis de vidro garantiam o total armazenamento da amostra em frascos de vidro de 150µl, e, armazenadas em freezer à -30°C até a etapa de análise química (item 2.2.4).

Todo o sistema foi trocado e lavado a cada repetição, sendo que essa lavagem consistiu de: (a) limpeza com Extran® em concentração de 5%; (b) cinco lavagens com álcool, seguida de um enxágue com água destilada; (c) cinco lavagens com acetona e um enxágue com água destilada; e (d) secagem em estufa a 160 °C por duas horas.

Para impedir a saída dos indivíduos do sistema, além da água na bandeja foi utilizado talco inerte no orifício ligando a câmara de fungo com a de forrageio e ao redor da coluna onde se posicionou os estímulos.

Figura 3 - Estrutura confeccionada visando à deposição do feromônio de trilha por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. A seta indica o substrato inerte ('plataforma de vidro') que foi lavado com solvente ao final dos bioensaios para obtenção do feromônio de trilha efetivamente utilizado pelas operárias durante o forrageamento de acordo com o tratamento empregado (pétalas de rosa ou rainha de outra colônia)

Dois tratamentos foram utilizados para testar a hipótese de que as operárias de *A. sexdens rubropilosa* seriam capazes de alterar a composição da trilha química e o tipo de recrutamento das companheiras de ninho: (i) pétalas de rosa (*Rosa* spp.), como sendo uma fonte de alimento sabidamente preferida por *A. sexdens* (WILSON, 1980b); e (ii) rainha de outra colônia, da mesma espécie, uma vez que na presença de indivíduos de outro ninho, as operárias não os reconhecem e comportam-se agressivamente, muitas vezes matando os intrusos (WILSON, 1980a; WHITEHOUSE; JAFFE, 1996).

As colônias foram privadas de alimento por 48 horas antes da realização de cada bioensaio. As pétalas das flores foram padronizadas em cor-de-rosa e utilizadas no mesmo dia da coleta. A quantidade utilizada foi padronizada em 0,5 gramas de pétalas/repetição. No momento dos bioensaios as pétalas eram empilhadas no centro da arena de forrageamento, e a plataforma de vidro (substrato) posicionada entre esta arena e o ninho (Figura 4A).

O mesmo procedimento foi conduzido para o tratamento contendo a rainha de outra colônia, havendo, contudo, a utilização de um recipiente de vidro cilíndrico (6,0 x 3,5 cm) com uma abertura por onde era mantida a rainha de outra colônia (Figura 4B). Para evitar que as operárias matassem ou mutilassem essa rainha, ela era prontamente retirada do sistema e recolocada no seu ninho após o término de cada repetição.

Figura 4 - Bioensaios com *Atta sexdens rubropilosa* para registro dos recrutamentos tanto na presença do estímulo contendo 'pétala de rosas' (A), quanto para 'rainha de outra colônia' (B)

O tempo de duração dos bioensaios foi previamente estabelecido em 20 min., contatos a partir da colocação da plataforma de vidro (substrato). Este tempo foi determinado por meio de bioensaios preliminares. Foram conduzidas 4 repetições por colônia, totalizando 16 repetições por tratamento. Para o tratamento envolvendo rainha de outra colônia, foram utilizadas duas rainhas, sendo estas alternadas entre as quatro repetições por colônia. A idade destas rainhas foi de 1 ano, mantidas nas mesmas condições das rainhas padrões.

Figura 5 - Lavagem e isolamento dos compostos químicos da trilha de feromônio de *Atta sexdens rubropilosa* depositados na plataforma de vidro (substrato). (A) Materiais de vidro utilizados para coleta e lavagem da trilha de feromônio; (B) Processo de lavagem com solvente da plataforma de vidro (substrato); (C) Frasco contendo o extrato natural da trilha de feromônio coletado após cada repetição

2.2.3 Forrageio e Comportamento

Todos os bioensaios foram registrados por meio de uma câmera Sony HDSR12 durante os 20 min. de cada repetição. Posteriormente, as atividades comportamentais foram visualizadas e tabuladas por casta e por minuto, assim descritos: (i) número de indivíduos que se deslocaram até a fonte de estímulo; (ii) número de vezes que houve deposição de trilha química numa faixa central do substrato (5,0 cm); e (iii) número de indivíduos que retornaram à colônia. Os critérios para a efetivação dos registros mencionados foram assim definidos: No item (i) foram contabilizadas somente as formigas que tocaram com as antenas na fonte de estímulo; para o item (ii) o número de vezes que as formigas tocaram e arrastaram o gaster na faixa prevista do substrato, conforme comportamento descrito por Traniello

e Robson (1995), podendo ter sido tanto na ida quanto na volta do ninho; e para o item (iii) somente as formigas que adentraram completamente no orifício do ninho.

As operárias de *A. sexdens rubropilosa* foram agrupadas em quatro diferentes castas, de acordo com o tamanho da cápsula encefálica estabelecido por Wilson (1980a): (a) jardineiras entre 0,8 e 1,0 mm; (b) generalistas entre 1,1 a 1,4 mm; (c) forrageadoras entre 1,5 e 2,9 mm; e (d) soldados com 3,0 mm ou mais. Como padrão para a quantificação dos indivíduos/castas durante as análises dos vídeos, cabeças de formigas das colônias em estudo, foram posicionadas ordenadamente de acordo com a largura da cápsula cefálica estabelecida, e montadas como uma “escala” para os bioensaios (Figura 7).

Figura 6 - Escala utilizando cabeças de *Atta sexdens rubropilosa* a partir de indivíduos das colônias utilizadas nos bioensaios, para determinação das castas (Escala adaptada de Wilson, 1980a)

2.2.4 Análise Química

As amostras contendo feromônio de trilha obtidas para cada repetição e armazenadas conforme item 2.2.2. (Figura 5) foram assim analisadas: De acordo com a quantidade total de indivíduos recrutados por repetição, as amostras foram concentradas para um equivalente de seis indivíduos por μL . Como controle para as análises químicas foi obtida uma amostra a partir da extração da glândula de veneno de seis formigas forrageadoras de *A. sexdens rubropilosa* de diferentes colônias utilizadas no estudo. Além disso, foi também analisado uma amostra de $1\mu\text{L}$ do hexano puro (controle branco) utilizado na coleta das amostras, para verificar possíveis contaminantes.

Os extratos foram analisados ($1\mu\text{L}$ de extrato/repetição) pelo cromatógrafo a gás (CG), modelo Shimadzu GC-2010, equipado com detector de ionização de chama (FID) e com coluna capilar HP5MS (30 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 μm de filme) (Agilent J & W Scientific, EUA). O CG foi operado em modo *splitless* (300 °C), com

programação de temperatura de 100 °C por 1 min, aumentando 7 °C/min até 300 °C, permanecendo a esta temperatura por 10 min e Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min.

2.2.5 Análise Estatística

Tendo em vista que os tratamentos referem-se aos dados de contagem dos indivíduos, em um intervalo fixo de tempo, os elementos do recrutamento de casta *versus* estímulo e a deposição de feromônio por casta foram submetidos à análise estatística por metodologia GLM (*'Generalized Linear Model'* – Modelo Linear Generalizado), ajustando-se o modelo de Poisson com função de ligação log-linear. Para tanto, utilizou-se o software estatístico SAS (SAS/STAT, 2003). Para os mesmos dados e elementos, as análises de componentes principais (PCA) foram realizadas pelo programa XLStat® versão 5.06. 2013.

Além disso, uma correlação de Pearson entre número de indivíduos recrutados por casta e número de indivíduos que depositaram feromônio por castas foi empregada por meio do software estatístico Minitab® Release 14.1.

2.3 Resultados

2.3.1 Recrutamento de castas *versus* estímulo

A comparação das operárias por casta de *A. sexdens rubropilosa* que foram recrutadas nos estímulos 'pétalas de rosas' (alimento) e 'rainha de outra colônia' mostrou que há um maior recrutamento de todas as castas para o primeiro estímulo. O número de operárias generalistas recrutadas para o estímulo contendo 'pétalas de rosas' foi bem superior ao observado para a rainha de outra colônia ($n=4$; $F_{(1, 13)} = 236,85$; $P < 0,001$). O mesmo padrão de comportamento ocorreu para as operárias forrageadoras ($n=4$; $F_{(1, 13)} = 65,08$; $P < 0,001$) e para os soldados ($n=4$; $F_{(1, 13)} = 63,15$; $P < 0,001$) (Figura 7).

Mesmo havendo um pequeno recrutamento de jardineiras para o estímulo “rosas”, o não recrutamento em rainha impossibilitou comparações estatísticas para esta casta.

Figura 7 - Número médio ($\pm$ EP) de operárias por casta (generalistas, forrageadoras e soldados) de *Atta sexdens rubropilosa* recrutadas para os estímulos ‘pétalas de rosas’ e ‘rainha de outra colônia’ (T= 20 min.) (Regressão Log-linear em GLM). *** P<0,001

2.3.2 Deposição de feromônio por casta

Na comparação das operárias por casta que depositaram feromônio de trilha, de acordo com os estímulos ‘pétalas de rosas’ e ‘rainha de outra colônia’ ficou evidente o maior recrutamento de todas as castas para o primeiro estímulo. O número de indivíduos da casta generalista de *A. sexdens rubropilosa* que depositaram feromônio de trilha foi maior para o estímulo ‘pétalas de rosas’ do que em ‘rainha de outra colônia’ (n=4; $F_{(1, 6)} = 161,09$; $P < 0,001$). O mesmo comportamento foi observado para as operárias forrageadoras (n=4; $F_{(1, 6)} = 71,89$; $P < 0,001$), e também para os soldados (n=4; $F_{(1, 6)} = 40,39$; $P = 0,0007$) (Figura 8).

Figura 8 - Número médio ($\pm$ EP) de operárias por casta (generalistas, forrageadoras e soldados) de *Atta sexdens rubropilosa* que depositaram feromônio para os estímulos 'pétalas de rosas' e 'rainha de outra colônia' (T= 20 min.) (Regressão Log-linear em GLM). *** P<0,001

2.3.3 Relação entre castas recrutadas e deposição de feromônio de trilha

Quando colônias de *A. sexdens rubropilosa* estiveram sob o estímulo de 'pétalas de rosas' houve recrutamento e deposição de trilha por indivíduos de todas as castas (forrageadoras, generalistas, jardineiras e soldados), muito embora raramente foram observadas jardineiras nestas atividades ($12,7 \pm 10,2$; $5,0 \pm 4,0$) (Figura 9). Quando o estímulo foi 'rainha de outra colônia', houve recrutamento e deposição de trilha somente pelas forrageadoras, generalistas e soldados. Contudo, neste caso, foram poucos os indivíduos recrutados e que depositaram trilha nas castas generalistas ($20,0 \pm 5,4$; $8,5 \pm 2,9$) e soldados ($16,8 \pm 1,4$; $2,0 \pm 0,6$), respectivamente (Figura 10).

Por outro lado, de acordo com a 'Correlação de Pearson', quando o estímulo foi 'rainha de outra colônia', houve correlação positiva somente para as generalistas, sugerindo que esta casta foi a que, proporcionalmente, mais depositou feromônio de trilha durante o processo de forrageamento (Tabela 1). Já, para o estímulo 'pétalas de rosas' esta correlação positiva ocorreu para as forrageadoras, generalistas e jardineiras.

Figura 9 - Relação entre o fluxo de formigas de *Atta sexdens rubropilosa* na trilha (ida + volta) e a quantidade de vezes que houve a deposição do feromônio de trilha por casta (jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados), frente ao estímulo 'pétalas de rosas' (Correlação de Pearson)

Figura 10 - Relação entre o fluxo de formigas de *Atta sexdens rubropilosa* na trilha (ida + volta) e a quantidade de vezes que houve a deposição do feromônio de trilha por casta (jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados), frente ao estímulo 'rainha de outra colônia' (Correlação de Pearson)

Tabela 1 - Correlação de Pearson entre o fluxo de indivíduos na trilha e formigas que depositaram feromônio, ambos por casta e sob os estímulos 'rosas' e 'rainha de outra colônia'

Estímulo	Casta	Coefficiente de Pearson
Rosas	Jardineiras	0,998**
	Generalista	0,964*
	Forrageadoras	0,994**
	Soldados	0,880 ^{NS}
Rainha	Generalista	0,984*
	Forrageadoras	0,941 ^{NS}
	Soldados	- 0,442 ^{NS}

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$; NS = não significativo

Por meio das análises dos componentes principais (PCA) ($P < 0,05$), em ambos os casos, formigas recrutadas e que depositaram feromônio (Figuras 11 e 12), evidenciou-se uma correlação positiva das formigas forrageadoras com as quatro colônias estudadas, seja para o estímulo 'pétalas de rosas', quanto 'rainha de outra colônia'; em detrimento das generalistas, soldados e jardineiras, respectivamente. Ainda de acordo com esta análise, ressalta-se que o agrupamento de dados correspondentes ao estímulo 'pétalas de rosas' estão comparativamente mais distantes que aqueles da 'rainha de outra colônia', sugerindo uma maior semelhança inter colonial na resposta para este último estímulo.

Figura 11 - Análise de componentes principais (PCA), primeiro e segundo componente principal com 96,34% e 3,37%, do total da avaliação, respectivamente. Correlação entre os estímulos pétalas de rosa e rainha de outra colônia (variáveis) com as castas de *Atta sexdens rubropilosa* (jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados) que foram recrutadas (observações)

Figura 12 - Análise de componentes principais (PCA), primeiro e segundo componente principal com 96,10% e 3,79%, do total da avaliação, respectivamente. Correlação entre os estímulos pétalas de rosa e rainha de outra colônia (variáveis) com as castas de *Atta sexdens rubropilosa* (jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados) que depositaram feromônio de trilha (observações)

2.3.4 Perfil químico das trilhas

Os perfis químicos das trilhas depositadas por *A. sexdens rubropilosa* foram distintos entre os dois estímulos 'pétalas de rosas' e 'rainha de outra colônia' (Figura 13). Tomando-se como parâmetro os compostos químicos presentes na glândula de veneno, ocorreram picos de substâncias químicas que foram presentes somente no estímulo 'rainha de outra colônia' (pico 3, tempo retenção = 17 min.) e outros somente na 'pétalas de rosas' (picos 5 e 7, tempo de retenção 20 e 21,5 min.). Ademais, ocorrem picos de substâncias químicas exclusivas no tratamento 'pétalas de rosas' (picos 4 e 6, tempo de retenção 19,5 e 21 min.). O pico 1 (tempo de retenção 13 min.) presente no 'hexano puro' e 'pétalas de rosas' refere-se provavelmente há uma contaminação (tempo de retenção semelhante).

Figura 13 - Perfis químicos das trilhas produzidas por *Atta sexdens rubropilosa*, a partir dos estímulos 'pétalas de rosas' (**vermelho**) e 'rainha de outra colônia' (**verde**); extrato de seis glândulas de veneno de forrageadoras (**azul**); e solvente hexano utilizado como padrão (**preto**). Os números indicam picos de substâncias químicas coincidentes baseados somente no tempo de retenção (min.)

2.4 Discussão

O recrutamento de diferentes castas da formiga cortadeira, *A. sexdens rubropilosa*, observado neste estudo, independentemente do estímulo, ou seja, 'pétalas de rosas' (alimento) ou 'rainha de outra colônia', demonstrou claramente, a variação do perfil etológico e a alocação de tarefas desempenhadas pelos indivíduos presentes na colônia. Apesar da propensão de certas castas com atividades específicas – comumente relacionadas ao tamanho do indivíduo – a flexibilização e sobreposição das tarefas ocorre constantemente num ninho, estimulados pelas alterações do ambiente, interações entre os indivíduos (PACALA et al., 1996), ou suscitados por seu estado fisiológico (GORDON, 1996).

As jardineiras, por exemplo, não participam comumente da formação ou marcação de trilhas, evidenciando uma predisposição genética dessa casta à permanência no ambiente interno da colônia, geralmente exercendo cuidados com a rainha, prole e fungo (WILSON, 1980a; GOULSON; HUGHES, 2001; GERSTNER et al., 2011). Além disso, dado seu pequeno tamanho, não possuem características morfológicas apropriadas ao corte e transporte do alimento (STRADLING, 1978;

WILSON, 1980b). Mesmo assim, jardineiras podem eventualmente estar presentes nas trilhas de forrageio, geralmente aderidas aos fragmentos de alimentos carregados por indivíduos maiores. A presença de jardineiras nesse contexto tem sido referida como um possível papel de defesa, por exemplo, contra forídeos parasitas (FEENER; MOSS, 1990; ORR, 1192).

A casta das generalistas, assim como as jardineiras está mais restrita ao ambiente interno do ninho, principalmente, subdividindo os materiais vegetais e incorporando-os ao fungo e, ainda dando assistência à prole e rainha (WILSON, 1980a). Neste trabalho, as generalistas foram recrutadas tanto para o estímulo contendo alimento ('pétalas de rosas') quanto para a 'rainha de outra colônia'.

No caso das pétalas, as generalistas atuaram como forrageadoras e fizeram também a marcação de trilhas químicas, maximizando o seu efeito. Segundo Clark (2006), evidenciou em *Atta colombica*, o tamanho das formigas recrutadas é proporcional à rigidez do alimento a ser coletado, sendo que as operárias maiores exploraram, normalmente, os mais rígidos. Por possuírem consistência mais tenras para as formigas (WILSON, 1980b), as pétalas de rosa, portanto, seriam facilmente exploradas também pelas generalistas, sugerindo claramente que poderiam colaborar com funções externas ao ninho.

Para o estímulo contendo 'rainha de outra colônia', embora o número de generalistas recrutadas de *A. sexdens rubropilosa* tenha sido baixo (7,0% dos indivíduos) em relação as demais castas, proporcionalmente, foram as mais eficientes na marcação da trilha química no fluxo de forrageamento para este tratamento (Tabela 1). Curiosamente, durante os bioensaios as generalistas realizaram além da marcação da trilha para recrutamento, uma marcação em todo o local onde estave a 'rainha de outra colônia'. Não foi observado tão pouco, agressão das generalistas sobre as partes do corpo da "rainha de outra colônia", embora tenha ocorrido grande contato das antenas sobre o corpo destas rainhas.

Com relação as forrageadoras, o processo de recrutamento e marcação de trilhas químicas foi o mais representativo independente do estímulo 'pétalas de rosas' ou 'rainha de outra colônia'. Para o estímulo 'pétalas de rosas', esta casta foi responsável por 65,8% dos indivíduos recrutados e 66% dos que depositaram feromônio de trilha, contra 87 e 92%, respectivamente, para o estímulo 'rainha de outra colônia'.

Considerando à exploração do alimento ('pétalas de rosas'), o número de forrageadoras recrutadas foi condizente com o esperado papel dessa casta na colônia (WILSON, 1980a). Tal grupo é representado por indivíduos maiores que jardineiras e generalistas, parcialmente justificando sua intensa atividade externa pela sua maior massa e, portanto, mais adequado para cortar e carregar os alimentos (CLARK, 2006). Com isso, a taxa de forrageio é maior com o aumento no tamanho das formigas (HOWARD 1987b; BURD, 1996), além de promover uma melhor eficiência energética do sistema (WILSON, 1980b).

No caso do estímulo contendo 'rainha de outra colônia', surpreendeu o elevado percentual médio desta casta em relação as demais nas atividades de recrutamento (87%), e deposição de trilha química (92%). As generalistas participaram com 7,0 e 6,0%; e os soldados 6,0 e 2,0%, respectivamente. Aparentemente, dado a plasticidade comportamental desta casta, elas efetivamente exerceram papel de defesa da colônia, considerando a enorme agressividade observada sobre a 'rainha de outra colônia' (dados não quantificados), inclusive levando-as a morte. Neste sentido, considerando a trilha química como de fundamental importância para o recrutamento dos indivíduos numa sociedade como a das formigas, é possível que o feromônio de trilha depositado nestas situações seja qualitativamente, ou ao menos quantitativamente diferente de acordo com o estímulo que as formigas estão expostas fora do ninho. De fato, o perfil químico observado no presente estudo sugere que isto poderia estar efetivamente acontecendo, o que ajudaria a explicar o comportamento encontrado (Figura 13). Confirmando-se o resultado, este seria o primeiro relato de que as operárias vivendo numa sociedade seriam capazes de manejar quimicamente seu feromônio para informar e alterar o comportamento de suas companheiras de ninho, neste caso, particularmente em relação à fonte de estímulo em que foi exposta.

Em relação aos soldados, houve baixa participação no recrutamento e deposição de trilha por esta casta independente do tratamento ('pétalas de rosas' e 'rainha de outra colônia'). Tradicionalmente, os soldados, são tido como as operárias de maior tamanho corporal e largura da cabeça (WILSON, 1980a), e comumente associados como os principais protetores da colônia (WEBER, 1972). Esses indivíduos realmente desempenham um papel importante na proteção do ninho de *Atta* spp., mas não necessariamente são os defensores predominantes (SALZEMANN; JAFFE, 1991). Além disso, em certas situações podem também

exercer atividades de forrageio (SALZEMANN; JAFFE, 1991), o que foi também observado ao longo do estudo, embora em baixo número (Figura 14A). Todavia, os soldados permaneceram a maior parte do tempo em comportamento estático próximo ao orifício de entrada do ninho (Figura 14B).

Figura 14 - Comportamento dos soldados de *Atta sexdens rubropilosa* (setas) em experimento com pétalas de rosas, demonstrando: (A) Soldados recrutados em direção ao estímulo, e (B) soldados estáticos em frente ao orifício da colônia. Ambas as observações foram feitas após dez minutos de filmagem

Portanto, numa situação de ameaça ao ninho, espera-se inicialmente o recrutamento de indivíduos médios e grandes (WILSON, 1980a, VILELA; HOWSE, 1986). Em *A. laevigata*, por exemplo, generalistas e jardineiras são capazes de reconhecer precisamente ameaças da mesma espécie, desencadeando comportamentos agressivos como mordidas e mutilações. No entanto, as forrageadoras juntamente aos soldados (castas maiores), somente são recrutadas quando o inimigo está impregnado com feromônio de alarme (SALZEMANN; JAFFE, 1991). Assim sendo, estimulados também pela presença do feromônio de alarme, essa casta somente utiliza seus fortes músculos mandibulares e grandes mandíbulas frente a inimigos como vertebrados, que são recorrentes, porém mais raros que competidores da mesma ou diferentes espécies de formigas (WHITEHOUSE; JAFFE, 1996). O incomum ataque a inimigos co-específicos, dessa forma, explica a pouca mobilização de soldados até a ‘rainha de outra colônia’. De modo semelhante, e pela alta capacidade energética requerida, seria pouco provável seu recrutamento até a fonte de estímulo. Em nosso trabalho a presença do

feromônio de alarme não foi objeto de estudo, todavia, um possível efeito destas substâncias nos comportamentos encontrados deverá ser explorado em futuras pesquisas para melhor compreensão do real papel neste contexto.

O perfil das substâncias químicas encontrados neste trabalho revelaram que o tipo de estímulo teve papel preponderante na resposta comportamental das diferentes castas da formiga cortadeira, *A. sexdens rubropilosa*. Aparentemente, a fonte de alimento ('pétalas de rosas') demonstrou uma maior diversidade de compostos comparativamente a 'rainha de outra colônia', além de uma possível variação quantitativa nos compostos das trilhas químicas depositadas. Porém, uma investigação mais aprofundada ainda necessita ser realizada para as diferentes glândulas (veneno e Dufour, por exemplo) nas diferentes castas, além de se verificar uma influência ou não do contato das operárias com a fonte estímulo e sua possível sinalização na trilha.

Este trabalho, contudo, trouxe novas perspectivas para as interações mediadas por feromônios em insetos sociais, incluindo ecologia, comportamento e comunicação química. Essa pesquisa mostrou ainda um novo método para a extração do feromônio de trilha em formigas, restrito até então à extração e isolamento dos conteúdos das glândulas (ATTYGALLE; MORGAN, 1985; MORGAN; OLLETT, 1987; KOHL et al., 2003), e que demonstrou ser apropriado para a extração desses compostos diretamente no ambiente, podendo assim relacionar o comportamento das formigas, com a real resposta destes indivíduos, de acordo com a fonte de estímulo. Além do mais, todos os experimentos consideraram as colônias como indivíduos, e não operárias isoladas como unidades experimentais, permitindo uma avaliação do ninho como uma unidade social (superorganismo).

3 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir:

- O recrutamento em *Atta sexdens rubropilosa* é maior para todas as castas quando o estímulo é um alimento ('pétalas de rosas') em comparação à 'rainha de outra colônia';
- As forrageadoras de *A. sexdens rubropilosa* são as mais recrutadas e que depositam feromônio de trilha independentemente do estímulo, seguido das generalistas e soldados;
- Sob estímulo do alimento ('pétalas de rosas') há recrutamento e deposição de trilha por indivíduos de todas as castas (forrageadoras, generalistas, jardineiras e soldados), sendo as jardineiras, no entanto, raramente observadas para estes comportamentos;
- Sob o estímulo de 'rainha de outra colônia' há recrutamento e deposição especialmente pelas forrageadoras, e pouco pelas generalistas e soldados;
- Na presença do estímulo 'rainha de outra colônia', as generalistas são as que mais depositam feromônio de trilha, proporcionalmente às demais castas;
- Há uma correlação positiva das formigas forrageadoras, tanto para formigas recrutadas quanto para as que depositaram feromônio, com as quatro colônias estudadas em ambos os estímulos. No entanto, essa correlação é negativa para generalistas, soldados e jardineiras;
- Os perfis químicos das trilhas depositadas por *A. sexdens rubropilosa* variam qualitativamente e quantitativamente em função do estímulo oferecidos.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, C.; MCSHEA, D. Individual versus social complexity, with particular reference to ant colonies. **Biological Review**, Regensburg, v.76, p. 211-237, Nov. 2001.
- ARAÚJO, M.S.; DELLA-LUCIA, T.M.; MAYHÉ-NUNES, A.J. Levantamento de Attini (Hymenoptera, Formicidae) em povoamento de *Eucalyptus* na região de Paraopeba, **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 2, p. 323 - 328, 1997.
- BECKERS R.; DENEUBOURG, J-L.; GOSS, S. Trail laying behavior during food recruitment in the ant *Lasius niger* (L.). **Insectes Sociaux**, New York, v. 39, p. 59-72, Jan. 1992.
- ATTYGALLE, A.B.; MORGAN, E.D. Ant trail pheromones. In: JOHNSON, S.N.; HILTPOLD, I.; TURLINGS, T.C.J. **Advances in insect physiology**, London, v.18, p.1-30, 1985.
- BENTO, J.M.S. **Condições climáticas para o vôo nupcial e reconhecimento dos indivíduos em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)**. 98 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.
- BERISH, C.W. Leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*) select nitrogen-rich forage. **American Midland Naturalist**, Notre Dame, v. 115, n. 2, p. 268–276, Apr. 1986.
- BLATRIX, R.; SCHULZ, C.; JAISSON, P. [FRANCKE, W.](#); [HEFETZ, A.](#) Trail pheromone of ponerine ant *Gnamptogenys striatula*: 4-methylgeranylesters from Dufour's gland. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 28, p. 2557-2567. Dec. 2002.
- BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 11, n.30, p. 31–46, mai, 1997.
- BURD, M. Foraging performance by *Atta colombica*, a leaf-cutting ant. **American Naturalist**, Chicago, v. 148, n. 4, p. 597-612, Oct. 1996.
- BUTENANDT, A.; LINZEN, B.; LINDAUER, M. Über einen Duftstoff aus der Mandibeldrüse der Blattschneiderameise *Atta sexdens rubropilosa* Forel. **Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale**, Paris, v. 48, p. 13-19, 1959.
- CHERRETT, J.M. Leaf-cutting ants. In: LIETH, H.; WERGER, M.J.A. **Tropical rain forest ecosystems: biogeographical and ecological studies**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- CLARK, E. Dynamic matching of forager size to resource in the continuously polymorphic leaf-cutter ant, *Atta colombica* (Hymenoptera, Formicidae). **Ecological Entomology**, London, v. 31, n. 6, p. 629-635. Nov. 2006.

CROSS, J.H.; BYLER, R.C.; RAVID, U.; SILVERSTEIN, R.M.; ROBINSON, S.W.; BAKER, P.M.; OLIVEIRA, J.S.; JUTSUM, A.R.; CHERRETT, J.M. The major component of the trail pheromone of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel: 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 5, n. 2, 187-203, Feb. 1979.

DELLA LUCIA, T.M.C. **As formigas Cortadeiras**. Folha de Viçosa, Viçosa. 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C. Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 2003.

DORNHAUS, A.; POWELL, S.; BENGSTON, S. Group size and its effects on collective organization. **Annual Reviews in Entomology**, California, v.57, 123-141, Sep. 2012.

DUSSUTOIR, A.; BESHES, S.; DENEUBOURG, J.-L.; FOURCASSI, V. Crowding increases foraging efficiency in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Insectes Sociaux**, New York, v. 54, n. 2, p. 158 – 165, May, 2007.

EVERSHED, R.P.; MORGAN, E.D. The amounts of trail pheromone substance in the venom of worker of four species of Attine ants. **Insect Biochemistry**, London, v. 13, n. 5, p. 469-479, 1983.

EVISON, S.E.F.; RATNIEKS, F.L.W. New role for majors in *Atta* leafcutter ants. **Ecological Entomology**, London, v. 32, v. 5, p. 451-454, Jul. 2007.

FARJI-BRENER, A.G.; AMADOR-VARGAS, S.; CHINCHILLAC, F.; ESCOBARD, S.; CABRERA, S.; HERRERAF, M.I.; SANDOVAL, C. Information transfer in head-on encounters between leaf-cutting ant workers: food, trail condition or orientation cues? **Animal Behaviour**, London, v. 79, n. 2, p. 343–349, Feb. 2010.

FEENER, D.H.; MOSS, K.A.G. Defense against parasites by hitchhikers in leaf-cutting ants: a quantitative assessment. **Behavior Ecology and Sociobiology**, Konstanz, 26, n. 1, p.17-29, Jan. 1990.

FOWLER, H.G.; FORTI, L.C.; BRANDÃO, C.R.F.; DELABIE, J.C.; VASCONCELOS, H.L. Ecologia nutricional de formigas. In: PANIZZI, A.P., PARRA, J.R.P. **Ecologia nutricional de insetos**. São Paulo, Manole, p. 131-223. 1991.

FOWLER, H.G.; SILVA, P.; FORTI, L.C.; V., SAES, N.B. Economics of grass-cutting ants. In: LOFGREN, C.S. e VANDER MEER, R.K. **Fire ants and leaf-cutting ants: Biology and management**. Westview Press, Boulder, p. 18-35. 1986.

FRANCELINO, M.R.; MENDONÇA, A.L.; do NASCIMENTO, R.R.; SANT'ANA, A.E.G. The mandibular gland secretions of the leaf-cutting ants *Atta sexdens sexdens* and *Atta opaciceps* exhibit intercaste and intercolony variations. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, n. 3, p. 643-656, Mar. 2006.

- GONÇALVES, C.R. *Atta silvai*, nova espécie de formiga saúva (Hymenoptera, Formicidae). **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Itaguai, v. 5, n. 2, p. 173-178, Jul./ Dec. 1982.
- GORDON, M.D. The organization of work in social insect colonies. **Nature**, London v. 380, p. 121-124, Mar. 1996.
- HOLLDÖBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, 1990.
- HOLLDÖBLER, B. Multimodal signal in ant communication. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 184, n.2, p. 129-141. Mar. 1999.
- HOLLDÖBLER, B. Recruitment behaviour, home range orientation and territoriality in harvester ant *Pogonomyrmex*. **Behaviour Ecology and Sociobiology**, Boston, v. 1, n. 1, p. 3-14, Feb. 1976.
- HOLLDÖBLER, B.; CARLIN, N.F. Anonymity and specificity in the chemical communication signals of social insects. **Journal of Comparative Physiology**, New York, v. 161, n. 4, p. 567-581, Jun. 1987.
- HOLLDÖBLER, B.; OLDHAM, N.J.; MORGAN, E.D.; KÖNIG, W.A. Recruitment pheromones in the ants *Aphaenogaster albisetosus* and *A. cockerelli* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 41, p. 739-744, Mar. 1995.
- HOLLDÖBLER, B.; MOGLICH, M.; MASCHWIT, U. Communication by tandem running in ant *Camponotus sericeus*. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 90, p. 105-127, Nov. 1974.
- HOWARD, J.J. Leafcutting and diet selection: the role of nutrients, water and secondary chemistry. **Ecology**, London, v. 68, n. 3, p. 503-515, Jun. 1987.
- HOWARD, J.J. Leafcutting ant diet selection: relative influence of leaf chemistry and physical features. **Ecology**, London, v. 69, n. 1, p. 250-260, Feb. 1988.
- HUGHES, W.O.H.; GOULSON, D. Polyethism and the importance of context in the alarm reaction of the grass-cutting ant, *Atta capiguara*. **Behaviour Ecology and Sociobiology**, Boston, v. 49, n.6, p. 503-508, May, 2001.
- HUGHES, W.O.H.; HOWSE, P.E.; GOULSON, D. Mandibular gland chemistry of grass-cutting ants: species, caste, and colony variation. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, n. 1, p.109-124, Jan. 2001.
- JACKSON, B.D.; MORGAN, E.D. Insect chemical communication: pheromones and exocrine glands of ants. **Chemoecology**, Basel, v. 4, n. 3-4, p. 125-144, Aug. 1993.
- JAFFE, K. Negentropy and the evolution of chemical recruitment in ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 106, n. 4, p. 587-604, Feb. 1984.

JAFFE, K. Theoretical analysis of the communication system for chemical mass recruitment in ants. **Journal of Theoretical Biology**, London, v.84, n. 4, p. 589-609 Jun. 1980.

JAFFE, K.; HOWSE, P.E. The mass recruitment system of the leaf cutting ant, *Atta cephalotes* (L.). **Animal Behaviour**, London, v. 27, n. 2, p. 930-939, Aug. 1979.

JAFFE, K.; ISSA, S.; SAINZ-BORGO, C. Chemical recruitment for foraging in ants (Formicidae) and termites (Isoptera): a revealing comparison. **Psyche**, Cambridge, v. 2012, p. 1-11. Jan. 2012.

JANDER, R. Insect orientation. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.8, p.95-114, Jan. 1963.

JEASON, R.L.; FRANCIS, L.W.; RATNIEKS, S.; DENEUBOURG, J-L. Pheromone trail decay rates on different substrates in the Pharaoh's ant, *Monomorium pharaonis*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 192-198, Sep. 2003.

KOHL, E.; HÖLLDOBLER, B.; BESTMANN, H.-J. Trail pheromones and Dufour gland contents of three *Camponotus* species (*C. castaneus*, *C. balzani*, *C. serviceiventris*) (Formicidae: Hymenoptera). **Chemoecology**, Tübingen, v. 13, p. 113-122. 2003.

LANAN, M.C.; DORNHAUS, A.; JONES, E.I.; WASER, A.; BRONSTEIN, J.L. The trail less traveled: individual decision-making and its effect on group behavior. **Plos One**, Arizona, v.7, n. 10, p. 1-9, Oct. 2012.

LE CONTE, Y.; HEFETZ, A. Primer pheromones in social hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 53, p. 523–542, Feb. 2008.

MARICONI, F.M.A. **As saúvas**. Agronômica Ceres, São Paulo. 1970.

MARTIN, S.; DRIJFHOUT, F.A. review of ant cuticular hydrocarbons. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 10, p. 1151–1161, Oct. 2009.

MEHDIABADI, N.J.; SCHULTZ, T.R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Atinii). **Myrmecological News**, Vienna, v. 13, p. 35-55, Apr. 2010.

MOGLICH, M.; MASCHWITZ, U.; HÖLLDOBLER, B. Tandem calling: a new kind of signal in ant communication. **Science**, Washington, v. 186, n. 4168, p. 1046-1047, Dec. 1974.

MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRIB, C.; ARMBRECHTA, I.; FARJIBRENERC, A.; CALLEB, Z. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. **International Journal of Pest Management**, London, v. 58, n. 3, p. 225–247, Jan. 2012.

MOREIRA, A.; FORTI, L.C.; ANDRADE, A.P.; BOARETTO, M.A.; LOPES, J. Nest architecture of *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Lisse, v. 39, n. 2, p. 109-116, Aug. 2010.

- MORGAN, E.D. Trail pheromone of ants. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 1-17, Mar. 2009.
- MORGAN, E.D.; OLLETT, D.G. Methyl 6-methylsalicylate, trail pheromone of the ant *Tetramorium impurum*. **Naturwissenschaften**, Southampton, v. 74, p. 596-597, Aug. 1987.
- MOSER, J.C. Pheromones of social insect. In: WOOD, D.L.; SILVERSTEIN, R.M.; NAKAJIMA, M. **Control of insect behavior by natural products**. New York, Academic Press, p. 162-178, 1970.
- MOSER, J.C.; BROWNLEE, R.C.; SILVERSTEIN, R. Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 529-535, Apr. 1968.
- MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R.M.M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant fungus mutualism. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 76, n. 2, p. 169-197, Jun. 2001
- NASCIMENTO, R.R.; MORGAN, D. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 5, 987-1000, Jan. 1996.
- NICHOLS-ORIAN, C.M.; SCHULTZ, J.C. Leaf toughness affects leaf harvesting by the leaf-cutter ant *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). **Biotropica**, Washington, v. 21, n. 1, p. 80-83, Mar. 1989.
- NORLUND, D.A.; LEWIS, W.J. Terminology of chemical releasing stimuli in intra-specific and inter-specific interaction. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 2, n.2, p. 211-220, Apr. / Jun. 1976.
- OLIVEIRA, J.S. Estudos dos feromônios de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta robusta*. 1975. 92p. Tese, UFRJ, Rio de Janeiro. 1975.
- OLIVEIRA, J.S.; MARTINEZ, O.M.M.; CARNIERI, M.; VILELA, E.F.; REIS, H.O. Componentes do feromônio de trilha das formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica* Forel (Formicidae: Attini). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 143-154, 1990.
- OLIVEIRA, M.A. **Identificação de formigas cortadeiras e efeito do desfolhamento simulado em plantios de *Eucalyptus grandis***. 1996. 61 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1996.
- ORR, W.R. Parasitic flies (Diptera: Phoridae) influence foraging rhythms and caste division of labor in the leaf-cutter ant, *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). **Behavior Ecology and Sociobiology**, Boston, v. 30, n. 6, p. 395-402, Jun. 1992.

ORTIZ, A.; GUZMÁN, G.E. **Las hormigas cortadoras de hojas del Departamento de Antioquia**. Universidad de Antioquia, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, 111 p. 2007.

PACALA, S.W.; GORDON, D.M.; GODFRAY, H.C.J. Effects of social group size on information transfer and task allocation. **Evolutionary Ecology**, London, v.10, n. 2, p. 127-165, Mar. 1996.

PIELSTROM, S.; ROCES, F. Vibrational communication in the spatial organization of collective digging in the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. **Animal Behavior**, Bristol, v. 84, n. 4, p. 743-752, Oct. 2012.

RICHARDSON, T.O.; HOUSTON, A.I.; FRANKS, N.R. Teaching with evaluation in ants. **Current Biology**, London, v. 17, n. 17, p. 1520-1526, Sep. 2007.

RILEY, R.G.; SILVERSTEIN, R.M.; CARROL, B.; CARROL, R. Methyl-4-methylpyrrole-2-carboxylate: a volatile trail pheromone of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 651-654, Apr. 1974.

ROSENGREN, R. Route fidelity, visual memory and recruitment behaviour in foraging wood ants of the genus *Formica*. **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 133, p. 1-106. Feb. 1971.

SALZEMANN, A.; JAFFE, K. Polyéthisme et defense de la société chez la fourmi champignoniste *Atta laevigata* (Fr. Smith). **Insectes Sociaux**, New York, v. 38, n. p. 149-159. 1991.

SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Morphology of the venom gland in relation to worker size in leaf-cutting ants (Formicidae, Attini). **Insectes Sociaux**, New York, v. 37, n. 6, p. 71-75, 1990.

SCHOFIELD, R.M.S.; EMMETT, K.D. Leaf-cutter ant with worn mandibles cut half as fast, spend twice the energy, and tend to carry instead of cut. **Behavior Ecology and Sociobiology**, Boston, v. 65, n. 5, p. 969-982, May 2011.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, Apr. 2008.

SILVERSTEIN, R.M.; YOUNG, J.C. Insects generally use multicomponent pheromones. In: BEROZA, M. **Pest management with Insect Sex Attractants and Other Behavior-Controlling Chemicals**. Washington, D.C.: ACS Symp. Series 23. p. 1-29. 1976.

STRADLING, D.J. The influence of size on foraging in the ant, *Atta cephalotes*, and the effect of some plant defense mechanisms. **Journal of Animal Ecology**, London, v. 47, p. 173-188. 1978.

SUDD, J.H. Interactions between ants on a scent trail. **Nature**, London, v. 183, p. 1588, Jun. 1959.

TENTSCHERT, J.; BESTMANN, H.-J.; HÖLLDOBLER, B.; HEINZE, J. 2,3-Dimethyl-5-(2'-propyl) pyrazine, a trail pheromone component of *Eutetramorium mocquersyi* Emery (1899) (Hymenoptera: Formicidae). **Naturwissenschaften**, Southampton, v. 87, p. 377-380, Jun. 2000.

TRANIELLO, J.F.A. Recruitment behavior, orientation, and organization of foraging in carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus* Degeer (Hymenoptera-Formicidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Boston, v. 2, n. 1, p. 61-79, Apr. 1977.

TRANIELLO, J.F.A.; ROBSON, S.K. Trail and territorial communication in social insects. In: CARDÉ, R.T; BELL W.J. **Chemical ecology of insects 2**. New York: Chapman Hall. 1995.

TUMLINSON, J.H.; MOSER, J.C.; SILVERSTEIN, R.M.; BROWNLEE, R.G.; RUTH, J.M. A volatile trail pheromone of the leaf-cutting ant *Atta texana*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 809-814, May. 1972.

TUMLINSON, J.H.; SILVESTER, R.M.; MOSER, J.C.; BROWNLEE, R.G.; RUTH, J.M. Identification of the trail pheromone of a leaf-cutting ant, *Atta texana*. **Nature**, London, v. 234, p. 348-349, Dec. 1971.

VANDER MEER, R.K.; ALVAREZ, F.M.; LOFGREN, C.S. Isolation of the trail recruitment pheromone of *Solenopsis invicta*. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 14, n. 3, p. 825-838, May. 1988.

VAN GILS, H.A.J.A.; VANDERWOUDE, C. Leafcutter ant (*Atta sexdens*) (Hymenoptera: Formicidae) nest distribution responds to canopy removal and changes in micro-climate in the southern colombian Amazon. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, n. 4, p. 914-921, Dec. 2012.

VAN OUDENHOVE, L.; BOULAY, R.; LENOIR, A.; BERSTEIN, C.; CERDA, X. Substrate temperature constrains recruitment and trail following behavior in ants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 38, n. 6, p. 802-809, Jun. 2012.

VASCONCELOS, H.L.; COSTA, A.N.; VIEIRA-NETO, E.H.M.; BRUNA, E.M. **Insetos Sociais: da biologia à aplicação**. In: VILELA, E.V.; SANTOS, I.A.; SCHOEREDR, J.H.; SERRÃO, J.E.; CAMPOS, L.A.O.; LINO-NETO, J. (Eds). Efeitos da herbivoria por formigas do gênero *Atta* Fabricius, 1804 sobre a vegetação do cerrado. UFV, Viçosa, p. 301-311, 2008.

VIANA, L.R.; SANTOS, J.C.; ARRUDA, L.J.; SANTOS, G.P.S.; FERNANDES, G.W. Foraging patterns of the leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith) (Myrmicinae: Attini) in an area of cerrado vegetation. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 391-393, May / June, 2004.

- VILELA, E.F.; HOWSE, P.E. Territoriality in leaf-cutting ants, *Atta* spp. In.: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R.K. **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**, Westview: Boulder, p. 159-171, 1986.
- VILELA, E.F.; JAFFÉ, K.; HOWSE, P.E. Orientation in leaf-cutting ants (Formicidae: Attini). **Animal Behaviour**, London, v. 35, n. 5 p. 1443-1453, Oct. 1987.
- WEBER, N.A. Fungus growing ants. **Science**, Washington, v. 153, p. 587-604. 1966.
- WEBER, N.A. Gardening ants: the attines. **Memoirs of American Philosophical Society**, Philadelphia, v.92, p. 1-146, June, 1972.
- WETTERER, J.K.; SCHULTZ, T.R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 9, n. 1, p. 42-47, Feb. 1998.
- WILSON, E.O. **The insect societies**. Harvard University Press: Cambridge, 1971.
- WILSON, E.O. A chemical releaser of alarm and digging behavior in the ant *Pogonomyrmex badius* (Latreille). **Psyche**, Cambridge, v. 65, n. 2-3, p. 41-51, June / Sep. 1958.
- WILSON, E.O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern of *A. sexedens*. **Behaviour Ecology and Sociobiology**, Boston, v. 7, p. 143-156, Feb. 1980a.
- WILSON, E.O. Caste and division of labor in the leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). II. The ergonomic optimization of leaf cutting. **Behavior Ecology and Sociobiology**, Boston, v. 7, n. 2, p. 157-165, Feb. 1980b.
- WILSON, E.O. Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima* (Fr. Smith). 1. The organization of mass-foraging. **Animal Behavior**, Bristol, v. 10, n. 1-2, p. 134-147. Jan / Apr. 1962.