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

Polimorfismo e polietismo na comunicação química, comportamento de limpeza
e trofalaxia em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)

Fernando Ribeiro Sujimoto

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2018

Fernando Ribeiro Sujimoto
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Polimorfismo e polietismo na comunicação química, comportamento de limpeza e
trofalaxia em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2018

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

Sujimoto, Fernando Ribeiro

Polimorfismo e polietismo na comunicação química, comportamento de limpeza e trofalaxia em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) / Fernando Ribeiro Sujimoto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

92 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Sensilas 2. Eletrofisiologia 3. Interação social 4. Variação morfológica 5. Ecologia química 6. Grooming 7. Troca de alimento 8. Formigas cortadeiras I. Título

*A Amanda, meus pais, Zezínha e Hirooshí, meus irmãos, Sílna e
Reinaldo, por todo o apoio e incentivo. Graças a vocês, realizei mais
este sonho
Dedico*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante esses árduos
quatro anos;*

Agradeço a Deus, pela Luz e Paz para chegar até meus objetivos;

*Agradeço à “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP
pelos inestimáveis momentos de estudo e formação, desde a graduação até o
doutorado;*

*Agradeço à Amanda, por toda força e carinho, que mesmo nas horas mais
difíceis esteve ao meu lado;*

Ao meu pai Hirooshí, pelo exemplo como homem, pessoa e dedicação;

*À minha mãe Zezinha, pelo carinho, amor, fé e, acima de tudo, prontidão
para me apoiar e levantar minha cabeça;*

*Aos meus irmãos, Sílma e Reinaldo, pelas inúmeras horas de carinho,
atenção e companheirismo;*

*À minha sobrinha, Marie, por me fazer um ser humano melhor e por me dar
a honra de ser seu padrinho;*

À minha querida Avó Olivina, pelo exemplo de força, fé e valores familiares;

À minha tia Célia, o qual tenho imenso carinho e admiração;

A todos os meus primos, pela ótima companhia desde nossa infância;

*Aos meus amigos e colegas de laboratório: Lucila (ótimos conselhos), Franciele
(ombro amigo), Mateus (bom humor), Talita (espírito materno), Mariana
(grande amizade), Rafaela (muitas risadas), Camila (parcerias), Arodi (fé e
trabalho), Natalia (The maestra) e Denise (super interação social);*

*Aos meus amigos Karen, Taciana, Tayron, Alexandre, Vitor e Nayara, e
tantos outros, pelos momentos de apoio e diversão;*

*Aos meus queridos alunos do cursinho e de inglês, por me tornarem uma
pessoa mais profissional, compreensiva e capaz;*

*Ao Davi, Guilherme, Caio e Andressa, estagiários e amigos que contribuíram
para meu crescimento, e tiveram muita paciência;*

Ao meu orientador, José Maurício, pelas grandes oportunidades e ensinamentos;

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro e apoio científico.

EPÍGRAFE

*“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 tí. 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.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. DESCRIÇÃO DA TESE	17
REFERÊNCIAS	17
2 SENSILAS, POLIMORFISMO E POLIETISMO EM FORMIGAS CORTADEIRAS	25
RESUMO	25
ABSTRACT	26
2.1. INTRODUÇÃO	26
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.3. RESULTADOS	31
2.4. DISCUSSÃO	44
REFERÊNCIAS	52
3 VARIAÇÃO DAS RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS A FEROMÔNIOS NAS OPERÁRIAS E CASTAS REPRODUTIVAS DE <i>Atta sexdens</i>	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
3.1. INTRODUÇÃO	58
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	60
3.3. RESULTADOS	62
3.4. DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS	72
4 PAPEL DAS SUB CASTAS E IMPORTÂNCIA DA RAINHA NOS COMPORTAMENTOS DE TROFALAXIA E <i>GROOMING</i> EM <i>Atta sexdens</i>	77
RESUMO	77
ABSTRACT	77
4.1. INTRODUÇÃO	78
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	79
4.3. RESULTADOS	82
4.4. DISCUSSÃO	88
REFERÊNCIAS	90

RESUMO

Polimorfismo e polietismo na comunicação química, comportamento de limpeza e trofalaxia em *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

Formigas são insetos eusociais intensamente dependentes da comunicação química, possuindo características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais adaptadas a um estilo de vida circundado por mensagens químicas. Esta peculiaridade olfativa do ponto de vista biológico, reflete nos padrões altamente polimórficos encontrados nas colônias dos grupos mais derivados, como as formigas cortadeiras (Attini). Assim, as castas e sub castas encontradas nos ninhos de formigas do gênero *Atta*, possuiriam características, como os órgãos olfativos e a sensibilidade eletrofisiológica, variáveis de acordo com seus tamanhos corpóreos e funções exercidas na colônia. Portanto, haveria uma correlação direta ou indireta do tamanho das formigas, os perfis comportamentais e comunicação química nessas espécies. Essa relação poderia ser vista em diversas atividades, como a limpeza entre os indivíduos e a troca de alimentos via oral. Dessa forma, a presente tese foca na interação entre o polimorfismo, polietismo e comunicação química nas formigas de *Atta sexdens*. Ainda descreve a participação das operárias e rainha nos comportamentos de *grooming* e trofalaxia, ligando-os à possível função de dispersão de hidrocarbonetos de cutícula na colônia. A tese esta dividida em quatro capítulos. O **Capítulo 1**, compreendeu uma introdução dos conhecimentos abordados em toda tese, e as linhas gerais do trabalho. No **Capítulo 2**, foi realizado uma descrição quantitativa e qualitativa das sensilas em todas as castas e sub castas encontradas em ninhos de *A. sexdens*. Os resultados indicaram que esses órgãos sensoriais variaram de acordo com os padrões polimórficos e perfis etológicos. O **Capítulo 3** abordou as respostas eletrofisiológicas da antenas a diferentes feromônios, comparando todos os grupos polimórficos de *A. sexdens*. Foram observados neste caso, similaridades e discrepâncias na sensibilidade aos conteúdos das glândulas de veneno, Dufour e mandibular entre as sub castas (jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados), e também entre os machos e rainhas, possibilitando a correlação com as atividades que exercem no ninho. No **Capítulo 4** investigou-se a participação de cada tipo de operárias de *A. sexdens* nos comportamentos de trofalaxia, *allogrooming* e *self-grooming*, relacionando-os com a presença da rainha dentro da câmara. Adicionalmente, frente aos resultados, as diferentes ações das sub castas nesses comportamentos puderam ser associadas à possível importância da limpeza e troca de alimentos na dispersão de compostos de reconhecimento e formadores do *gestalt* químico da colônia. Estes resultados, contribuem para uma melhor compreensão do complexo cenário sustentado pela eusocialidade, ecologia química, percepção olfativa e comportamento nas formigas cortadeiras.

Palavras-chave: Sensilas; Eletrofisiologia; Interação social; Variação morfológica; Ecologia química; *Grooming*; Troca de alimento; Formigas cortadeiras

ABSTRACT

Polymorphism and polyethism in chemical communication, grooming and trophallaxis of the leaf cutter ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)

Ants are eusocial insects intensely dependent on chemical communication. They have morphological, biochemical, physiological and behavioral features adapted to a life surrounded by many molecules messages. Furthermore, each olfactory peculiarity in any of the biological level mentioned above, reflects on the highly polymorphic patterns found in the colonies of the most derived groups, as the leaf cutter ants (Attini). Thus, the castes and sub castes of *Atta* ants, would have characteristics, as olfactory organs and electrophysiological sensibility, that vary following the body sizes and tasks performed in the colonies. Therefore, it would have a direct or indirect correlation among the sizes of the ants, their ethological profiles and the chemical communication in these species. This relation could be seen over different activities, as the grooming and oral trophallaxis. In this way, this thesis focus in the interaction among the polymorphism, polyethism and chemical communication in *Atta sexdens*. It still describes the participation of workers and queen in grooming and trophallaxis, linking them to a possible role in cuticular hydrocarbon dispersion over the colony. The thesis is divided in four chapters. In the **Chapter 1**, it is presented an introduction to the knowledge explored in all thesis, and also its outline. In the **Chapter 2**, there is a quantitative and qualitative description of sensilla from all castes and sub castes of *A. sexdens*, showing that these sensory organs vary following the polymorphic patterns and ethological profiles. The **Chapter 3** explores the differences in the antennae electrophysiological responses to three pheromones, comparing them with all polymorphic groups of *A. sexdens*. The results demonstrate similarities and discrepancies in the sensibility to the contents of poison, Dufour and mandibular glands among the sub castes (gardeners, generalists, foragers and soldiers), and also between males and queens, enabling a correlation with their tasks. In the **Chapter 4**, it is investigated the roles of each type of *A. sexdens* workers in the trophallaxis, allogrooming and self-grooming behaviors, relating them with the queen presence. Additionally, and based in the results, the different roles of the sub castes can be associated to a possible action of grooming and trophallaxis in the dispersion of intraspecific recognition molecules and in the formation of a colony chemical gestalt. All results and discussion distributed along the thesis, therefore, contribute to a better understanding of a complex scenario, supported by the eusociality, chemical ecology, olfactory perception and behavior of the leaf cutter ants.

Keywords: Sensilla; Eletroctrophysiology; Social interaction; Morphological variation; Chemical ecology; Grooming, Food exchange; Leaf cutter ants

1. INTRODUÇÃO

1.1. Insetos Sociais e Feromônios

Caracterizados pela complexa interação entre indivíduos aparentados, os insetos sociais são animais cujas atividades e comportamentos estão sempre relacionados com a manutenção e sobrevivência de uma unidade maior, a colônia (Le conte & Hefetz, 2008). Como aspecto essencial para tais interações dentro ou fora do ninho, insetos como as formigas e abelhas mantêm uma rede de comunicação sempre ativa e dinâmica. Em consequência, uma grande diversidade de meios de comunicação surgiu durante a história evolutiva desses organismos.

Grupos como das abelhas, vespas e formigas comunicam-se por toque, vibração (Schneider & Lewis, 2004), visão, referências espaciais (Able, 1991; Schwarz et al., 2012), variação no campo magnético (Sandoval et al., 2012), entre outros. Mesmo frente a essa variedade de meios, a comunicação por mensagens químicas é o modo predominante e mais antigo dentro de praticamente todos os grupos de insetos sociais (Hunt & Richard, 2013).

Os compostos utilizados como mensagens, ou semioquímicos, são divididos em: (i) aleloquímicos, odores mediadores de interações entre indivíduos de espécies diferentes; e (ii) feromônios, compostos que mediam interações entre indivíduos da mesma espécie (Holldobler & Wilson, 1990; Vilela & Della Lucia, 2001). Os feromônios ainda são caracterizados com base nos comportamentos que elicitam, havendo compostos associados desde a corte de um parceiro sexual, até mesmo ao reconhecimento químico de diferentes níveis sociais (Le Conte & Hefetz, 2008; Alaux et al., 2010).

Na comunicação dos insetos sociais estão presentes feromônios sexuais (Buschinger, 1976; Coppée et al., 2011; Salerno, et al., 2012), de alarme (Moser et al., 1968; Urlacher et al., 2010), trilha (Morgan, 2009; Czaczkes et al., 2013), território (Wenseleers et al., 2002), reconhecimento (Nehring, et al., 2011; Hunt & Richard, 2013), além de feromônios ‘primer’, como o de rainha (Kocher & Grozinger, 2011; Holman et al., 2014). Esses odores possuem características que estão direta ou indiretamente relacionadas com as atividades ou comportamento que mediarão. Feromônios sexuais e de alarme, por exemplo, são formados por compostos mais voláteis, transportados pelo ar, possuindo assim um raio de alcance maior para a transmissão da mensagem ao receptor em potencial. Já os feromônios que participam da comunicação mais interna do ninho (local com menor fluxo de ar), como os de reconhecimento e de rainha, são menos voláteis e, portanto, são

transportados de maneira mais dependente do contato entre os indivíduos (Billen & Morgan, 1998).

1.2. Formigas Cortadeiras do Gênero *Atta* e Feromônios

Pertencentes à família Formicidae, subfamília Myrmicinae tribo Attini e sub tribo Attina, as formigas cortadeiras do gênero *Atta*, ou saúvas, são conhecidas por apresentarem uma relação mutualística clássica com fungos dos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocuprinus* (Agaricaceae: Leucocoprinae) (Holldobler & Wilson, 1990; Mueller et al., 2001; Mehdiabadi & Schultz, 2010). São insetos sociais que vivem em ninhos subterrâneos compartimentalizados, sendo que os compartimentos, ou câmaras, são divididos em quatro tipos: (i) ‘Câmaras vivas’ – onde estão os jardins do fungo cultivado; (ii) ‘câmaras de lixo’ – local de deposição de resíduos e cadáveres; (iii) ‘câmaras vazias’ – que serão possivelmente definidas como ‘câmaras vivas’ ou ‘câmaras de lixo’; e (iv) ‘câmaras de terra’ (Mariconi, 1970).

As espécies desse gênero ainda se destacam por sociedades divididas em castas morfológica e etologicamente bem definidas (Wilson, 1971; 1980). Machos (bitus) e fêmeas aladas (içás) constituem as castas temporárias; enquanto a fêmea fecundada (rainha fundadora) e as operárias formam as castas permanentes. Dentro das operárias ainda, os indivíduos são classificados em sub castas: (i) jardineiras – cuidadoras do fungo e da prole; (ii) generalistas – formigas ativas em diversas tarefas, como incorporação do substrato nas hifas e cuidados com a rainha; (iii) forrageadoras – indivíduos que exploram o ambiente externo, cortam, coletam e transportam o material vegetal; e (iv) os soldados ou defensores – que protegem o ninho contra invasores e outras ameaças (Wilson, 1980; Della Lucia, 1993). Perfazendo todas essas divisões, ninhos de espécies como *A. sexdens* chegam a possuir oito milhões de indivíduos (Fowler et al., 1986).

A rede de interação dessa grande quantidade de indivíduos é, como para todos os grupos de insetos sociais, primordialmente mediada por mensagens químicas. Os feromônios, em todos os cenários sociais do grupo, são os compostos mais importantes e, dessa forma, os mais estudados. Para as espécies de *Atta*, foram bem retratados e descritos feromônios de alarme (Moser et al., 1968) e trilha (Morgan, 2009)

Os odores de alarme são formados por um ou mais compostos químicos e se encontram em quase todas as espécies de *Atta*. Estes compostos são caracterizados pela alta volatilidade, devido, especialmente, aos seus baixos pesos moleculares, fator importante

para a rápida dispersão da mensagem em momentos de ameaça ao ninho (Billen & Morgan, 1998). O composto 4-metilheptan-3-ona é o mais comum no gênero, mostrando ser esse semioquímico uma identidade conservada no grupo. Os feromônios de alarme foram descritos para *A. sexdens rubropilosa* (Butenandt et al., 1959), *A. robusta* (Blum et al., 1968), *A. colombica* (Blum et al., 1968), *A. texana* (Riley et al., 1974a), *A. cephalotes* (Riley et al., 1974a), *A. laevigata* (Hernandez et al., 1999), *A. bisphaerica* e *A. capiguara* (Hughes et al., 2001).

Compostos utilizados para a demarcação de trilha são os mais estudados dentro do gênero, sendo que todas as espécies acima citadas já foram descritas quanto aos compostos e comportamentos elicitados por esse feromônio (De Oliveira et al., 1990, para *A. bisphaerica* e *A. laevigata*; Evershed & Morgan, 1983; Riley et al., 1974b, para *A. cephalotes*; Robinson & Cherrett, 1978, para *A. sexdens*; Evershed & Morgan, 1983; Cross et al., 1979, para *A. sexdens rubropilosa*; Evershed & Morgan, 1983; Billen et al., 1992; Morgan et al., 2006, para *A. sexdens sexdens*; Sonnet & Moser, 1972; Tumlinson et al., 1972; para *A. texana*). Feromônios de trilha são semi voláteis, sendo eficientes para marcar uma rota que será seguida pelas operárias em busca de alimento ou um novo local para o ninho (Morgan, 2009).

A terceira categoria de feromônio, o de marcação, ainda é pouco descrito e estudado. Jaffe et al. (1979) mostraram a presença de compostos específicos à colônia, que marcava a área de ninho de *A. cephalotes*. O uso dos compostos sintéticos no entorno da colônia ainda estimulou comportamentos semelhantes aqueles vistos em feromônios de territorialidade.

1.3. Estruturas de percepção físico-química em formigas

Tendo em vista a predominante comunicação química entre as formigas, as antenas são os principais órgãos sensoriais em insetos como um todo. Localizadas na cabeça, essas estruturas são responsáveis por receber estímulos como aleloquímicos, feromônios, vapor d'água, dióxido de carbono e mesmo vibrações (Renthal et al., 2003).

As antenas possuem pequenas estruturas denominadas sensilas, não somente em formigas, mas em todos os insetos. Essas estruturas são divididas de acordo com seus formatos, inserções, número de poros e especificidade na percepção de estímulos físicos e químicos (Schneider & Steinbrecht, 1968). As funções de todos os tipos de sensilas são

encapsular e proteger os dendritos dos neurônios sensitivos, responsáveis pela transmissão da informação para áreas de processamento olfativo do sistema nervoso (Zacharuk, 1980).

Em formigas, estudos envolvendo técnicas de microscopia para melhor compreensão das estruturas das antenas têm sido realizados nos últimos anos, especialmente com o intuito de identificar diferentes sensilas ao longo do órgão sensitivo (Renthall et al., 2003; Marques-Silva et al., 2006). Além da identificação e de descrições morfológicas nas espécies, outros trabalhos ainda demonstraram a diferença nos tipos e distribuição de sensilas entre os sexos (*Camponus japonicus*, Nakanishi et al., 2009), e diferenças morfológicas nas antenas entre castas e sub castas (formigas indianas *Oecophylla smaragdina*, Babu et al., 2011; e *Camponotus compressus*, Mysore et al., 2010).

Poucas investigações foram feitas sobre a morfologia e estruturas encontradas ao longo das antenas de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. Kleineidam et al. (2000) mostraram que a estrutura chamada sensila ampulacea é responsável pela percepção do gás carbônico em *A. sexdens*. Em *A. vollenweideri*, foram encontradas sensilas coeloconicas termo-sensitivas nos antenômeros apicais (Ruchty et al., 2009). Kelber et al. (2009) ainda mostraram haver diferenças entre inervações das sensilas, número de glomérulos e tamanho dos lóbulos antenais em duas sub castas de *A. vollenweideri*. Poucos trabalhos foram realizados quanto a descrições e comparações morfo-anatômicas das sensilas nas diferentes castas e sub castas de formigas cortadeiras, relacionando suas peculiaridades etológicas e seus sistemas de comunicação química.

1.4. Eletroantenografia e formigas

Os insetos somente são capazes de perceber os estímulos físicos e químicos por possuírem estruturas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas intimamente integradas. As sensilas, portanto, são apenas o início desse processo. Assim que entram em contato com os dendritos dos neurônios sensitivos encapsulados pelas sensilas, e mediado por proteínas ligantes e receptores olfativos, as moléculas desencadeiam sinais (Leal, 2013) que podem ser ‘lidos’ por meio da técnica de eletroantenografia. Descrita como uma metodologia em que se é possível medir a sensibilidade da antena a estímulos químicos (Bjostad, 1998), ela se faz uma ferramenta primordial para compreender a percepção das formigas a compostos como os feromônios descritos acima.

As técnicas de eletroantenografia são pouco exploradas na maioria das espécies de formigas. Há trabalhos que mostram a sensibilidade de formigas a compostos de feromônios,

como certas substâncias da glândula de Dufour em *Ectatomma ruidum* da subfamília Ectatominae, (Bestmann et al., 1995); ou compostos do feromônio de trilha em *Pristomyrmex pungens* (Myrmicinae) (Janssen et al., 1997). Quanto às formigas cortadeiras, o primeiro trabalho realizado foi por Andryszak et al. (1990), em que testaram séries de diluição do feromônio de alarme e trilha nas operárias, machos e rainhas de *A. mexicana*. Apesar de mostrar diferentes percepções entre as castas para ambos os feromônios, eles pouco discutem as relações desses resultados com os perfis comportamentais, característica marcante nas espécies da tribo Attini. Assim, cabe ressaltar a necessidade de estudos mais profundos quanto a relação das variações dos padrões polimórficos das formigas cortadeiras, seus comportamentos e a maneira e intensidade com que esses insetos percebem os estímulos químicos diversos.

1.5. Trofalaxia, Grooming e Identidade Química da Colônia

Os comportamentos de troca de alimentos entre os indivíduos dentro do ninho de insetos sociais (trofalaxia) são divididos em via oral e anal. No entanto, entre as formigas, a troca por meio da cavidade bucal é a mais comum. Esse comportamento visa distribuir conteúdo líquido entre as operárias, fortificando a homeostase e coesão do ninho (Holldobler & Wilson, 1990). O mesmo vale para as atividades de limpeza entre os indivíduos. Chamado de *grooming*, esse se divide entre a autolimpeza (*self-grooming*) e aquela realizada mutuamente (*allogrooming*) (Holldobler & Wilson, 1990). No entanto, esse comportamento ainda é pouco explorado nas formigas cortadeiras (Attini). Sabe-se que ocorrem em espécies de *Acromyrmex* (Richard & Errard, 2009), mas poucos trabalhos focam nas espécies de *Atta*.

Além do caráter alimentar e higiênico dos dois comportamentos, esses podem estar relacionados com a manutenção da identidade química da colônia. Não somente os hidrocarbonetos cuticulares (HCs), mas também todos os compostos da cutícula das formigas são transportados e fixados pelo contato entre um indivíduo e outro. Essa dinâmica é possível pelo simples toque, ou por comportamentos peculiares das colônias, como o *self-grooming*, *allogrooming* e trofalaxia (Richard & Hunt, 2013).

Os HCs são originalmente produzidos por células denominadas enócitos, localizadas nos corpos gordurosos de insetos adultos (Martin & Ramalho-Ortigao, 2012). Logo após sua produção, os compostos são espalhados pela cutícula e acumulados em estruturas como a glândula pós-faringiana. A acumulação dos HCs nessas glândulas se dá pelo comportamento de autolimpeza, em que o próprio indivíduo, especialmente ao limpar

as pernas, transpõe os compostos para a estrutura (Dahbi et al., 1999). As moléculas então são somente passadas para os membros da colônia por meio da limpeza mútua. Esse comportamento permite que o odor da colônia esteja sempre o mais homogeneizado possível e que haja uma frequente atualização dos perfis em resposta a mudanças exógenas e endógenas (Richard & Hunt, 2013).

A trofalaxia é outro processo responsável pela translocação de compostos cuticulares entre as formigas (Hölldobler & Wilson, 1990; Buffin et al., 2011). Com os mesmos benefícios gerados pela limpeza, ela é de grande importância para o processo dinâmico da identificação química dentro e mesmo fora da colônia (Richard & Errard, 2009). A taxa de transferência de HCs e outros compostos cuticulares são ainda dependentes da frequência desses dois comportamentos (Soroker et al., 1998; 2003).

2. DESCRIÇÃO DA TESE

Além do capítulo que aqui se finaliza, a tese foi redigida em outros três. No **Capítulo 2**, denominado “Sensilas, polimorfismo e polietismo em formigas cortadeiras”, são descritos todos os órgãos olfativos encontrados ao longo das antenas das castas e sub castas da espécie de formiga cortadeira, *Atta sexdens*. Como resultados, foi possível notar que há variações quantitativas e qualitativas entre os grupos polimórficos, e que esses podem ser relacionados com os diversos comportamentos que exercem dentro e fora do ninho. O **Capítulo 3**, intitulado “Variação das respostas eletrofisiológicas a feromônios nas operárias e castas reprodutivas de *Atta sexdens*”, explora as variações na sensibilidade das antenas das castas e sub castas ao conteúdo das glândulas de veneno, Dufour e mandibular da mesma espécie de formiga-cortadeira. As respostas eletrofisiológicas geradas pelos grupos polimórficos mostraram semelhanças e diferenças olfativas, as quais refletem direta ou indiretamente na comunicação química e perfis comportamentais das formigas cortadeiras. Já no **Capítulo 4**, “Papel das sub castas e importância da rainha nos comportamentos de trofalaxia e *grooming* em *Atta sexdens*”, houve a investigação dos papéis que os tipos de operárias (jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados) exercem nas atividades de troca de alimento (trofalaxia) e limpeza (*grooming*), mostrando que há perfis mais flexíveis e outros mais restritivos dentro desses subgrupos. Além disso, também foi possível entender a importância da presença da rainha nessas dinâmicas. Os resultados dessa abordagem ainda dão subsídios para futuros estudos voltados a participação da trofalaxia e *grooming* na dispersão de hidrocarbonetos cuticulares em formigas-cortadeiras.

Referências

- Able, K. P. 1991. Common themes and variation in animal orientation systems. *American Zoology*, 31, 157-167.
- Alaux, C., Masonnasse, A., Le Conte, Y. 2010. Pheromones in a superorganism: from gene to social regulation. *Vitamins and Hormones Pheromones*, 83, 401–423.
- Andryszak, N. A., Payne, T. L., Dickens, J. C., Moser, J. C., Fisher, R. W. 1990. Antennal olfactory responsiveness of the texas leaf cutter ant (Hymenoptera: Formicidae) to trail and its two alarm substances. *Journal of Entomological Science*, 25(4), 593-599.
- Babu, M. J., Ankolekar, S. M., Rajashekhar, K. P. 2011. Castes of the weaver ant *Oecophyla smaragdina* (Fabricius) differ in the organization of sensilla on their antennae and mouthparts. *Current Science*, 101, 765-764.

Bestmann, H. J., Janssen, E., Kern, F., Liepold, B. 1995. *All-trans* Geranylgeranyl Acetate and Geranylgeraniol, Recruitment Pheromone Components in the Dufour Gland of the Ponerine Ant *Ectatomma ruidum*. *Naturwissenschaften*, 82, 334-336.

Billen, J., Beeckman, W., Morgan, E. D. 1992. Active trail pheromone compounds and trail following in the ant *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera Formicidae). *Ethology Ecology and Evolution* 4, 197-202.

Billen, J., Morgan, D. 1998. Pheromone communication in social insects: sources and secretions. In: Meer, R. K. V., Breed, M. D., Espelie, K. E., Winston, M. L. *Pheromone communication in social insects*. WestviemPress.

Bjostad, L. B., 1998. Electrophysiological Methods. In: Millar, J. G.; Haynes, K. F., 2nd edition, *Methods in Chemical Ecology*, vol. 1, Kluwer Academic Publishers, pp. 339-375.

Blum, M. S., Padovani, F., Amante, E. 1968. Alkanones and terpenes in the mandibular glands of *Atta* species (Hymenoptera: Formicidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26, 291-299.

Buffin, A., Mailleux, A. C., Detrain, C., Denebourg, J. L. 2011. Trophallaxis in *Lasius niger*: a variable frequency and constant duration for three food types. *Insectes Sociaux*, 58, 177-183.

Buschinger, V. A. 1976. Poison gland secretion as a sexual pheromone in the guest ant, *Formicoxenus nitidulus* (Nyl.). *Insectes Sociaux*, 23, 215-226.

Butenandt, V. A., Linzen, B., Lindauer, M. 1959. Über einen duftstoff aus der mandibeldrüse der Blattschneiderameise *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp*, 48, 13-20.

Coppée, A.; Mathy, T.; Cammaerts, M.C.; Verheggen, F.J.; Terzo, M.; Iserbyt, S.; Valterová, I.; Rasmont, P. 2011. Age-dependent attractivity of male's sexual pheromones in *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae). *Chemoecology*, 21, 75-82.

Cross, J. H., Byler, R. C., Ravid, U., Silverstein, R. M., Robinson, S. W., Baker, P. M., De Oliveira, J. S., Jutsum, A. R., Cherret, M. 1979. The major component of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa* FOREL. *Journal of Chemical Ecology*, 5, 187-203.

Czaczkes, T. J., Gruter, C., Ellis, L., Wood, E., Ratnieks, F. L.W. 2013. Ant foraging on complex trails: route learning and the role of trail pheromones in *Lasius niger*. *The Journal of Experimental Biology*, 216, 188-197.

De Oliveira, J. S., Martinez, O. M. M., Carnieri, N., Vilela, E. F., Reis, H. O. 1990. Components of the trail pheromone of the leaf-cutting ants *Atta laevigata* F. Smith and *Atta bisphaerica* Forel (Formicidae: Attini). *Ann. Soc. Entomol.* 19, 145-154.

Dahbi, A., Hefetz, A., Cerda, X., Lenoir, A. 1999. Trophallaxis mediates uniformity of colony odor in *Cataglyphis ibérica* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Behavior*, 12, 559-567.

Della Lucia, T. M. C. 1993. As formigas Cortadeiras. Folha de Viçosa, Viçosa.

Evershed, R. P., Morgan, E. D. 1983. The amounts of trail pheromone substances in the venom of workers of four species of attine ants. *Insect Biochemistry*, 13, 469-474.

Fowler, H. G., Silva, P., Forti, L. C. V., Saes, N. B. 1986. Economics of grass-cutting ants. In: Lofgren, C. S., Vander Meer, R. K. *Fire ants and leaf-cutting ants: Biology and management*. Westview Press, Boulder, p. 18-35.

Hernandez, J. V., Cabrera, A., Jaffe, K. 1999. Mandibular gland secretion indifferent castes of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 2433-2444.

Hernandez, J. V., Lopez, H., Jaffe, K. 2002. Nestmate recognition signals of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Journal of Insect Physiology*, 48, 287-295.

Holldobler, B., Wilson, E.O. 1990. *The ants*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.

Holman, L., Jorgensen, C. G., Nielsen, J., D'Ettorre, P. 2014. Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proceedings of The Royal Society B.*, 277, 3793-3800.

Hughes, W. O. H., Howse, P. E., Goulson, D. 2001. Mandibular Gland Chemistry of Grass-cutting Ants: Species, Caste, and Colony Variation. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 109-124.

Hunt, J. H., Richard, F. J. 2013. Intracolony vibroacoustic communication in social insects. *Insectes Sociaux*, 60, 403-417.

Jaffe, K., Howse, P.E. 1979. The mass recruitment system of the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes* (L.). *Animal Behavior*, 27(2), 930-939.

Janssen, E., Holldobler, B., Kern, F., Bestmann, H. J., Tsuji, K. 1997. Trail pheromone of myrmicine ant *Pristomyrmex pungens*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(4), 1025-1034.

- Kelber, C., Rossler, W., Kleineidam, C.J. 2009. Phenotypic plasticity in number of glomeruli and sensory innervation of the antennal lobe in leaf-cutting ant workers (*A. vollenweideri*). *Developmental Neurobiology*, 70, 222-234.
- Kleineidam, C., Romani, R., Tautz, J., Isidoro, N. 2000. Ultrastructure and physiology of the CO₂ sensitive sensillum ampullaceum in the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Arthropod Structure and Development*, 29, 43-55.
- Kocher, S. D., Grozinger, C. M. 2011. Cooperation, conflict, and the evolution of queen pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 1263-1275.
- Le Conte, Y., Hefetz, A. 2008. Primer pheromones in social Hymenoptera. *Annual Review*, 53, 523-542.
- Leal, W. S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58, 373–91. 2013.
- Mariconi, F. M. A. 1970. As saúvas. *Agronômica Ceres*, São Paulo.
- Marques-Silva, S., Matiello-Guss, C. P., Delabie, J. H. C., Mariano, C. S. F., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E. 2006. Sensilla and secretory glands in the antennae of a primitive ant: *Dinoponera lucida* (Formicidae: Ponerinae). *Microscopy Research and Technique*, 69, 885–890.
- Martin, G. F., Ramalho-Ortigao, J. M. 2012. Oenocitos in insects. *Invertebrates survival Journal*, 9, 139-152.
- Mehdiabadi, N. J.; Schultz, T. R. 2010. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Atinii). *Myrmecological News*, 13, 35-55.
- Morgan, E. D., Keegans, S. J., Tits, J., Wenseleers, T., Billen, J. 2006. Preferences and differences in the trail pheromone of the leaf-cutting ant *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). *European Journal of Entomology*, 103, 553-558.
- Morgan, E.D. 2009. Trail pheromone of ants. *Physiological Entomology*, 34, 1-17.
- Moser, J. C., Brownlee, R. C., Silverstein, R. 1968. Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. *Journal of Insect Physiology*, 14, 529-535.
- Mueller, U. G., Schultz, T. R., Currie, C. R., Adams, R. M. M., Malloch, D. 2001. The origin of the attine ant fungus mutualism. *The Quarterly Review of Biology*, 76(2), 169–197.

- Mysore, K., Shymala, B. V., Rodrigues, V. 2010. Morphological and developmental analysis of peripheral antennal chemosensory sensilla and central olfactory glomeruli in worker castes of *Camponotus compressus* (Fabricius, 1787). *Arthropod Structure and Development*, 39, 310-321.
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F., Nishikawa, M. 2009. Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell Tissue Research*, 338, 79–97.
- Nehring, V., Evison, S. E. F., Santorelli, L. A., D'Etorre, P., Hughes, O. H. 2011. Kin-recognition cues in ants. *Proceedings of The Royal Society B.*, 278, 1942-1948.
- Renthal, R., Velasquez, D., Olmo, D., Hampton, J., Wergin, W. P. 2003. Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron*, 34, 405-413.
- Richard, F. J.; Errard, C. Hygienic behavior, liquid-foraging, and trophallaxis in the leafcutting ants, *Acromyrmex subterraneus* and *Acromyrmex octospinosus*. *Journal of Insect Science*, 9: 1-9, 2009.
- Richard, F.-J., Hunt, J. H. 2013. Intracolony chemical communication in social insects. *Insectes Sociaux*, 60, 275-291.
- Riley, R. G., Silverstein, R. M., Moser, J. C. 1974a. Isolation, identification, synthesis and biological activity of volatile compounds from the heads of *Atta* ants. *Journal of Insect Physiology*, 20, 1629-1637.
- Riley, R. G., Silverstein, R. M., Carroll, B., Carroll, R. 1974b. Methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate: a volatile trail pheromone from the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. *Journal of Insect Physiology*, 20, 651-654.
- Robinson, S. W., Cherrett, J. M. 1978. The possible use of methyl 4-methylpyrrole-2-carboxylate, an ant trail pheromone, as a component of an improved bait for leaf-cutting ant (Hymenoptera: Formicidae) control. *Bull. Entomol. Res.*, 68, 159-170.
- Ruchty, M., Romani, R., Kuebler, L.S., Ruschioni, S., Roces, F., Isidoro, N., Kleineidam, C.J. 2009. The thermo-sensitive sensilla coeloconica of leaf-cutting ants (*Atta vollenweideri*). *Arthropod Structure and Development*, 38, 195-205.
- Salerno, G., Iacovone, A., Carlin, S., Frati, F., Conti, E., Anfora, G. 2012. Identification of sex pheromone components in *Trissolcus brochymenae* females. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1635-1642.
- Sandoval, E. L., Wajnberg, E., Esquievel, D. M. S., Barros, H. L., Acosta-Avalos, D. 2012. Magnetic orientation in *Solenopsis* sp. *Ants. Journal of Insect Behavior*, 25, 612-619.

- Schneider, D., Steinbrecht, R. A. 1968. Checklist of insect olfactory sensilla. Symposium of the Zoological Society of London, 23, 279–297.
- Schneider, S. S., Lewis, L. A. 2004. The vibration signal, modulatory communication and the organization of labor in honeybees, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 35, 117-131.
- Schwarz, S., Schultheiss, P., Cheng, K. 2012. Visual cues learning and odometry in guiding the search behavior of desert ants, *Melophorus bagoti*, in artificial channels. *Behavioural Processes*, 91, 298-303.
- Sonnet, P. E., Moser, J. C. 1972. Synthetic analogs of the trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta texana* (Buckley). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 20, 1191-1194.
- Soroker, V., Fresneau, D., Hefetz, A. 1998. Formation of colony odor in the ponerine ant *Pachycondila apicalis*. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 1077-1090.
- Soroker, V., Lucas, C., Simon, T., Hefetz, A., Fresneau, D., Durand, J.L. 2003. Hydrocarbon distribution and colony odour homogenization in *Pachycondila apicalis*. *Insectes Sociaux*, 50, 212-217.
- Tumlinson, J. H., Moser, J. C., Silverstein, R. M., Brownlee, R. G., Ruth, J. M. 1972. A volatile trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta texana*. *Journal of Insect Physiology*, 18, 809-814.
- Urlacher, E., Francés, B., Giurfa, M., Devaud, J-M. 2010. An alarm pheromone modulates appetitive olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4, 1-10.
- Villela, F. E., Della Lucia, T. M. C. 2001. *Feromônios de Insetos*. Ed. Holos, 206.
- Wensellers, T.; Billen, J.; Hefetz, A. 2002. Territorial marking in the desert ant *Cataglyphis niger*: does it pay to play bourgeois? *Journal of Insect Behavior*, 15, 86-92.
- Wilson, E.O. 1971. *The insect societies*. Harvard University Press: Cambridge.
- Wilson, E.O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern of *A. sexedens*. *Behaviour Ecology and Sociobiology*, 7, 143-156.
- Zacharuk, R.Y. 1980. Ultrastructure and Function of Insect Chemosensilla. *Annual Review of Entomology*, 25, 27–47.

2 SENSILAS, POLIMORFISMO E POLIETISMO EM FORMIGAS CORTADEIRAS

Fernando Ribeiro Sujimoto¹, Davi de Souza Fernandes¹, Camila Moreira Costa¹, José Maurício Simões Bento^{1*}

¹ Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Departamento de Entomologia e Acarologia, Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil.

*Autor correspondente: José Maurício Simões Bento, Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ/USP. Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil. E-mail: jmsbento@usp.br

Manuscrito em preparação para *Arthropod Structure & Development*

Resumo

Os tipos e número de sensilas em insetos podem indicar diversos aspectos fisiológicos e comportamentais. Para as formigas, esses órgãos, distribuídos especialmente nas antenas, também refletem a complexa e vital comunicação química e suas relações com as variações morfológicas encontradas nas colônias. Até o momento, as formigas-cortadeiras, no entanto, foram pouco exploradas quanto a esse cenário integrativo. Nós estudamos a diversidade, quantidade e distribuição de sensilas nas antenas das castas e sub castas na formiga-cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), buscando comparar os resultados com padrões polimórficos e com as variações de perfis comportamentais. Por meio de imagens das antenas obtidas por microscopia de varredura, e apoiando-se na literatura sobre sensilas em insetos, foi possível identificar nove diferentes estruturas olfativas na espécie: *Chaetica I, II e III*; *Tricoidea I e II*, *Basicônica*, *Coelocaptular*, *Coeloconica* e *Ampulacea*. A quantidade e diversidade desses órgãos variou entre os machos e rainha, mostrando um dimorfismo sexual associado à capacidade olfativa, funções biológicas e atividades comportamentais. Quanto às operárias, essas mostraram certas características em comum e nítidas discrepâncias, ambas, direta ou indiretamente, associadas com seus perfis etológicos. De modo geral, a diversidade e quantidade desses órgãos agruparam as jardineiras e generalistas em um extremo; as forrageiras e soldados em outro; enquanto as rainhas foram semelhantes as maiores operárias, mas com características olfativas únicas. As antenas dos machos foram as mais incomuns e majoritariamente relacionada às atividades reprodutivas. Dessa forma, os resultados obtidos possibilitaram uma melhor compreensão dos aspectos olfativos, polimorfismo e polietismo em formigas cortadeiras.

Palavras-chave: Órgãos olfativos; Castas; Sub castas; Comunicação Química; Attini; Comportamento

Abstract

The types and number of sensilla in insects can indicate many physiological and behavioral aspects. To the ants, these organs, distributed specially along the antennae, also reflect the complex and vital chemical communication and its relations with a morphological variation found in the colonies. So far, leaf cutter ants were not deeply explored concerning this scenario. We investigated the diversity, quantity and distribution of sensilla in the antenna of *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) castes and sub castes, aiming to compare the results with the polymorphic patterns and behavior profile variations. Supported by scanning electron microscope images of the antennae, and based on the literature about sensilla in insects, it was possible to identify nine olfactory structures in this species: Chaetica I, II e III; Tricoidea I and II, Basiconica, Coelocaptular, Coeloconica and Ampullacea. The quantity and diversity of these organs vary between males and the queens, showing a sexual dimorphism associated to the olfactory capacity, biological functions and behavior. About the workers, they showed some similar characteristics and others clearly different, all direct or indirectly associated to their ethological profiles. Altogether, the sensilla quantitative and qualitative aspects cluster the gardeners and generalists in one larger group; foragers and soldiers in another; while the queens are similar to the bigger workers, but they also have unique olfactory characteristics. The males are isolated, with their antennae majorly linked to reproductive activities. These results enabled a broad discussion, connecting the olfactory aspects, polymorphism and polyethism in leaf cutter ants.

Keywords: Olfactory organs; Castes; Sub castes; Chemical communication; Attini; Behavior

2.1.Introdução

Apesar de amplamente conhecidas pela interação simbiótica com fungos e diversas características etológicas conspícuas (Weber, 1979; Wilson, 1980a, b; 1983a, b; Mehdiabadi & Schultz, 2010), as formigas-cortadeiras ainda são pouco estudadas quanto a fatores proximais que direcionam seus perfis comportamentais. Dentre esses estão os processos fisiológicos da percepção olfativa e os caracteres morfológicos que permitem a interpretação da mensagem química e a consequente expressão comportamental. São vários os compostos químicos participantes dos repertórios comportamentais em Formicidae (Buschinger & Maschwitz, 1984; Billen & Morgan, 1998; Hernández et al., 2002; Morgan, 2009), os quais são, em primeira instância, capturados por pequenas estruturas sensoriais chamadas sensilas (Chapman, 1998). Formigas possuem um grande número desses órgãos, encontrados em diversos formatos, tamanhos e distribuição ao longo das antenas e também no aparelho bucal (Hashimoto, 1990).

Além de serem morfológicamente conservadas, as sensilas são classificadas de acordo com características externas e internas, que refletem funções sensitivas especializadas (Hashimoto, 1990; Renthal et al., 2003; Nakanishi et al., 2009). Aquelas que apresentam poros, geralmente estão relacionadas à olfação ou sensibilidade gustatória (Dumpert, 1972; Nakanishi et al., 2009; Ravaiano et al., 2014), enquanto as que não os possuem desempenham papel de

mecano-receptoras, sensibilidade térmica ou percepção a umidade (Renthal et al., 2003; Nakanishi et al., 2009; Ruchty et al., 2009). Além do mais, uma vez que cada tipo de sensila possui um papel sensitivo distinto, seus padrões de distribuição e densidade nas antenas influenciam o comportamento e a capacidade olfativa dos insetos (Polidori & Nieves-Audrey, 2014; Frasnelli & Vallortigara, 2017), incluindo as formigas (Mysore et al., 2010; Ramirez-Esquivel et al., 2014).

Essa correlação tem sido estudada em alguns representantes de diferentes subfamílias de Formicidae. Operárias da formiga carpinteira, *Camponotus japonicus*, apresentam uma diversidade e distribuição diferente de sensilas nas antenas quando comparadas com as rainhas e machos (Nakanishi et al., 2009). Em *Oecophylla smaragdina*, rainhas, operárias grandes e pequenas diferem quanto à quantidade desses órgãos nas antenas, mas são similares quanto aos tipos de sensilas responsáveis pela percepção química (Babu et al., 2011). Por outro lado, operárias de *Dinoponera lucida*, que não apresentam polimorfismo, possuem os mesmos padrões de sensilas nas antenas (Marques-Silva et al., 2006).

As castas e sub castas do gênero *Atta* seguem uma nítida distribuição polimórfica que acompanha certos padrões de determinação de tarefas executadas em prol da colônia (i.e., polietismo) (Wilson, 1980a). Esses grupos, portanto, não somente seriam definidos por medidas corpóreas semelhantes, mas também por características morfológicas intimamente ligadas com seus comportamentos e comunicação química. Dessa forma, sub castas como as forrageiras, por exemplo, relacionadas à exploração do ambiente externo, recrutamento e busca por alimento (Wilson, 1980a; 1983a), seriam semelhantes quanto a diversidade e distribuição dos órgãos olfativos ao longo da antena.

Ao compreender o mapa de sensilas de machos, rainhas, jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados de cortadeiras, seria possível associar a posição dos órgãos ao longo da antena, suas morfologias e funções com os perfis etológicos já descritos para o grupo. De maneira mais abrangente, essa perspectiva também traria a relação das variações morfofisiológicas com a ecologia química envolvida na vida social das formigas cortadeiras. Portanto, nosso objetivo foi descrever a diversidade e distribuição das sensilas nas antenas das castas e sub castas de *Atta sexdens*, correlacionando-as com a distribuição polimórfica e comportamental dentro da colônia.

2.2. Material e Métodos

Formigas

As operárias e rainhas de *A. sexdens*, utilizadas para a aquisição das micrografias das antenas, foram provenientes de ninhos mantidos no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, em condições controladas ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa). Foram diariamente cedidas às formigas: folhas de caramboleiras (*Averrhoa carambola*), *Acalypha* sp., *Hibiscus* sp., maçã e aveia em grãos. Os machos foram coletados após o voo nupcial no início do verão de 2015 em Piracicaba-SP, Brasil.

Determinação dos grupos polimórficos

Para identificar a sub casta a qual cada operária coletada pertencia, os indivíduos eram retirados dos ninhos no momento em que estavam executando atividades típicas ligadas aos seus perfis etológicos, como segue segundo Wilson (1980a): (a) jardineiras, introduzindo alimento no fungo simbionte; (b) generalistas, cuidando dos ovos e pupas; (c) forrageiras, cortando folhas na câmara de forrageio; e (d) soldados, não executando atividades específicas. Além dos padrões relacionados aos perfis comportamentais, a separação por sub casta ainda foi confirmada pela variação polimórfica, segundo as medidas da capsula cefálica também estabelecidas por Wilson (1980a), como segue: (i) jardineiras entre 0,8 e 1,0 mm; (ii) generalistas entre 1,1 a 1,4 mm; (iii) forrageadoras entre 1,5 e 2,9 mm; e (iv) soldados com 3,0 mm ou mais. As rainhas foram identificadas pelo seu maior tamanho, enquanto o macho, durante a coleta, pelo corpo menor e menos robusto comparado às fêmeas. As rainhas e operárias utilizadas nesse trabalho pertenciam a quatro colônias com aproximadamente dois anos de idade.

Morfometria

Antenas de todos os representantes de *A. sexdens* foram inicialmente retiradas ($N=4$) para a mensuração das macroestruturas. O órgão foi dividido em (a) escapo, (b) pedicelo e (c) flagelo, seguindo da posição mais basal para a mais apical (Snodgrass, 1993). Foram obtidos os comprimentos das estruturas listadas acima, além do comprimento (mm) e área (mm^2) de cada flagelômero (i.e., subdivisões do flagelo). Além disso, a fim de confirmar a distribuição polimórfica da espécie, foram coletadas as seguintes medidas corpóreas gerais (mm): comprimento da cabeça, tórax, abdome (pedúnculo e gáster) e corpo total; e largura entre os olhos seguindo os parâmetros estabelecidos por Wilson (1980a). Todas as medidas foram

obtidas por meio da câmera Leica Digital DFC450 no microscópio estereoscópico Leica MDG41 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland).

Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV), as formigas foram mortas em éter (24h) e suas cabeças destacadas e mantidas por um dia em 0,2 ml de tetróxido de ósmio para a fixação. Posteriormente, as antenas de cada casta e sub casta foram colocadas em uma fita adesiva de carbono, sob *stubs* de metal e mantidas em sílica para a secagem. As amostras foram então recobertas por ouro. Nas avaliações espaciais das sensilas de todos os grupos, foram utilizados os lados ventral e dorsal da antena, conforme demonstrado na Figura 1.

A fim de reconhecer e entender a diversidade das estruturas sensilares nas antenas dos grupos polimórficos, as amostras foram observadas e imagens coletadas em MEV de pressão variável, LEO 435VP e Phenom Pro.

Características e Distribuição das Sensilas

As contagens e medições das sensilas foram realizadas por meio do software livre, ImageJ. Foi obtido o número total de todos os tipos de sensila por segmento (i.e., flagelômero). Também foram calculadas as densidades relativas de cada tipo de sensila filiforme presentes no flagelômero mais distal de todas as castas e sub castas. Esse segmento da antena foi escolhido devido a maior diversidade de sensilas presentes quando comparado com os demais. A densidade foi calculada em número de sensilas por mm^2 .

Em todos os flagelos, cada tipo dessas estruturas foi pintado por meio de ferramentas do software, facilitando a contagem e montagem dos mapas. Em razão da maior representatividade, apenas os quatro segmentos mais distais das antenas de cada grupo de formigas foram utilizados para gerar os mapas. Entretanto, devido a curvatura da antena e, portanto, impossibilidade de análise, as sensilas encontradas nas faixas laterais foram desconsideradas, tanto para a confecção dos mapas, quanto para as contagens (Figura 1). Sendo assim, foi estabelecido um limite central (nos lados ventral e dorsal) para a coleta de dados.

Terminologia e Identificação das Sensilas

Todas as estruturas antenais descritas para as castas e sub castas de *A. sexdens* foram majoritariamente baseadas nos trabalhos de Hashimoto (1990), Rhental (2003) e Nakanish et

al. (2009). A Tabela 1 ilustra as sensilas encontradas, suas abreviações, características morfológicas, sensibilidades (funções) e literatura.

Estatística

Todos os dados analisados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Para análise do total de sensilas filiformes, os dados que não atenderam aos pressupostos foram transformados por boxcox, e então realizada ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para comparação de médias a 5% de significância. O total de sensilas de superfície foi analisado pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A comparação do número de sensilas entre os flagelômeros e sub castas foi ajustada ao modelo linear generalizado com distribuição de Poisson seguido por ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R©3.4.1. Adicionalmente, os dados foram submetidos a uma análise de componentes principais a fim de verificar se havia agrupamentos baseados na quantidade total de cada tipo de sensila e os grupos polimórficos.

Figura 1. Representação da cabeça de *Atta sexdens*, indicando os lados da antena (ventral e dorsal) em que as sensilas foram analisadas. Os cilindros da figura central correspondem aos segmentos do flagelo (F), sendo as faixas hachuradas nas laterais as áreas em que não foi possível avaliar as sensilas. A barra indica 1 mm.

Tabela 1. Compilação de informações gerais sobre as sensilas encontradas em espécies de Hymenoptera sociais.

Tipos de Sensilas	Abrev.	Características Morfológicas	Sensibilidade	Literatura
Chaetica I e II	ChI e ChII	Filiformes alongadas com dois tamanhos diferentes (ChI e ChII).	Possivelmente mecano e químico sensíveis	Nakanishi et al., 2009.

Chaetica III	ChIII	Filiforme achatada semelhante a uma cerda, com cerca de 7 μm de comprimento e 3 μm de diâmetro na base. Leve envergadura em direção a base da antena, contrapondo a posição das demais sensilas filiformes (paralelamente ao eixo da antena). Também chamada de Chaetica A.	Possivelmente sensível aos compostos químicos de contato	Nakanishi et al., 2009.
Tricoidea I	TrI	Filiforme alongada e achatada com formato semelhante a uma espada e comprimento de 6 a 30 μm . Diâmetro da base com cerca de 1,0 – 2,5 μm . Se direciona para a ponta da antena. Também chamada de Tricoidea Curvata.	Possivelmente sensível a compostos químicos mais voláteis, como os feromônios de alarme.	Dumpert, 1972; Hashimoto, 1990; Renthall et al., 2003; Nakanishi et al., 2009.
Tricoidea II	TrII	Filiforme alongada e com a ponta levemente achatada. Se direciona para a ponta da antena e possui cerca de 70 μm de comprimento. Também chamada apenas de Tricoidea.	Possivelmente químico sensível	Renthall et al., 2003; Nakanishi et al., 2009.
Basicônica	Ba	Estrutura filiforme semelhante a um dedo, com cerca de 13 - 20 μm de comprimento e 5 μm de largura medida na região central. Extremidade arredondada e maior diâmetro	Especialmente sensível aos hidrocarbonetos de cutícula em formigas.	Hashimoto, 1990; Renthall et al., 2003; Ozaki et al., 2005; Nakanishi et al., 2009.
Coelocapitular	Cc	Cova com uma protuberância central; região central semelhante a um cogumelo, com cerca de 2 μm de diâmetro. Abertura onde se insere essa estrutura com cerca de 5 μm de diâmetro.	Higro e termo sensível em abelhas.	Yokohari et al., 1982; Nakanishi et al., 2009.
Coeloconica	Co	Pequena abertura com cerca de 1, 2 – 3 μm de diâmetro, inserida em uma depressão oval com cerca de 5 μm de diâmetro.	Possivelmente químo sensível, mas termo em formigas e higro em abelhas.	Yokohari, 1983; Hashimoto, 1990; Renthall et al., 2003; Nakanishi et al., 2009; Ruchty et al., 2009.
Ampulacea	Ap	Pequena abertura com cerca de 1 - 2 μm de diâmetro inserida em uma depressão oval com aproximadamente 5 μm de diâmetro	Sensível ao CO_2 em formigas cortadeiras e possivelmente o mesmo para abelhas.	Lacher, 1964; Hashimoto, 1990; Kleineidam et al., 2000; Nakanishi et al., 2009.

2.3.Resultados

Descrição e Morfometria das Antenas

As medidas de comprimento das regiões do corpo das sub castas mostram nitidamente que elas possuem tamanhos médios diferentes (Figura 2). No entanto, a largura entre os olhos foi obtida para determinar precisamente a qual sub casta cada indivíduo pertencia, segundo Wilson (1980a) (Tabela 2).

A antena de *A. sexdens* é do tipo geniculada, caracteristicamente dividida em escapo, pedicelo e flagelo (Figura 2). Todas as operárias e rainha apresentaram 10 flagelômeros (F1 –

F10) em sua extensão, enquanto os machos 12 (F1 – F12) (Figura 2). A antena da menor sub casta, jardineira, possui um tamanho total de ~ 2,1 mm; enquanto as generalistas, forrageiras, soldados, macho e rainha possuem, respectivamente e aproximadamente, 4,3; 5; 6,5; 6 e 6,5 mm (Tabela 2). A área e comprimento médio de cada flagelômero foram diferentes para todas os grupos (Tabela 5 e 3). Os flagelômeros de 1 a 9 nas operárias e rainha, e de 1 a 11 nos machos possuíram um formato cilíndrico semelhante em todas as castas e sub castas (Figura 2). Apenas o flagelômero mais distal foi elipsoidal em todos os representantes (Figura 2).

Figura 2. Morfologia comparativa das antenas das castas e sub castas de *Atta sexdens*. A antena foi dividida em escapo, pedicelo e flagelo, sendo o pedicelo considerado o primeiro segmento flagelar (F1). Os segmentos (F) foram numerados no sentido basal-distal dos flagelos de rainhas (R), machos (M), soldados (S), forrageiras (F), generalistas (G) e jardineiras (J).

Tabela 2. Comprimento médio das estruturas corpóreas das castas e sub castas de *Atta sexdens* (N=4).

Estruturas		Comprimento (mm)					
		Rainha	Macho	Soldado	Forrageira	Generalista	Jardineira
Corpo	Entre os olhos	3,93 ± 0,20	1,67 ± 0,18	2,86 ± 0,54	2,06 ± 0,14	1,58 ± 0,20	0,85 ± 0,38

	Cabeça	$4,78 \pm 0,54$	$2,95 \pm 0,24$	$1,26 \pm 0,27$	$0,98 \pm 0,23$	$0,59 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,24$
	Tórax	$8,77 \pm 0,65$	$6,30 \pm 0,28$	$3,39 \pm 0,71$	$2,45 \pm 0,31$	$2,45 \pm 1,23$	$1,15 \pm 0,49$
	Pedúnculo	$3,29 \pm 0,62$	$2,02 \pm 0,21$	$1,15 \pm 0,22$	$0,98 \pm 0,07$	$0,74 \pm 0,21$	$0,44 \pm 0,22$
	Gáster	$8,67 \pm 0,42$	$7,33 \pm 0,24$	$1,94 \pm 0,81$	$1,26 \pm 0,10$	$1,13 \pm 0,17$	$0,88 \pm 0,17$
	Corpo	$25,52 \pm 0,98$	$18,62 \pm 0,65$	$7,84 \pm 1,83$	$5,76 \pm 0,39$	$4,58 \pm 0,58$	$3,06 \pm 0,78$
Antena	Flagelo	$3,56 \pm 0,57$	$3,92 \pm 0,08$	$3,71 \pm 0,29$	$3,02 \pm 0,14$	$2,43 \pm 0,39$	$1,30 \pm 0,56$
	Escapo	$2,94 \pm 0,30$	$1,66 \pm 0,25$	$2,75 \pm 0,23$	$2,17 \pm 0,25$	$1,83 \pm 0,28$	$0,83 \pm 0,45$
	Antena total	$6,51 \pm 0,15$	$5,99 \pm 0,32$	$6,58 \pm 0,44$	$5,31 \pm 0,39$	$4,32 \pm 0,67$	$2,18 \pm 1,03$
	F1	$0,34 \pm 0,11$	$0,80 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,03$
	F2	$0,29 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,04$
	F3	$0,34 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,05$
	F4	$0,34 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,008$	$0,31 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,06$
	F5	$0,32 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,05$
	F6	$0,32 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,05$
	F7	$0,32 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,04$	$0,10 \pm 0,06$
	F8	$0,34 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,07$
	F9	$0,32 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,06$	$0,15 \pm 0,06$
	F10	$0,58 \pm 0,08$	$0,25 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,07$	$0,47 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,07$
	F11		$0,27 \pm 0,008$				
	F12		$0,52 \pm 0,04$				

Tabela 3. Área média do flagelo e de seus segmentos nas castas e sub castas de *Atta sexdens* (N=4).

Flagelômeros	Áreas (mm ²)					
	Rainha	Macho	Soldado	Forrageira	Generalista	Jardineira
F1	0,057 ± 0,119	0,042 ± 0,007	0,046 ± 0,001	0,029 ± 0,007	0,018 ± 0,004	0,009 ± 0,005
F2	0,057 ± 0,029	0,036 ± 0,007	0,029 ± 0,05	0,025 ± 0,02	0,013 ± 0,05	0,005 ± 0,004
F3	0,069 ± 0,072	0,033 ± 0,001	0,041 ± 0,04	0,029 ± 0,05	0,016 ± 0,06	0,006 ± 0,005
F4	0,074 ± 0,046	0,031 ± 0,002	0,045 ± 0,03	0,032 ± 0,02	0,020 ± 0,03	0,006 ± 0,004
F5	0,066 ± 0,026	0,030 ± 0,001	0,046 ± 0,03	0,027 ± 0,01	0,017 ± 0,03	0,006 ± 0,006
F6	0,073 ± 0,030	0,030 ± 0,002	0,049 ± 0,06	0,035 ± 0,03	0,021 ± 0,05	0,007 ± 0,006
F7	0,077 ± 0,039	0,035 ± 0,002	0,051 ± 0,04	0,033 ± 0,02	0,022 ± 0,04	0,008 ± 0,007
F8	0,084 ± 0,055	0,039 ± 0,001	0,070 ± 0,02	0,042 ± 0,03	0,028 ± 0,04	0,009 ± 0,007
F9	0,105 ± 0,073	0,042 ± 0,006	0,083 ± 0,02	0,057 ± 0,04	0,044 ± 0,06	0,017 ± 0,011
F10	0,127 ± 0,085	0,045 ± 0,004	0,127 ± 0,05	0,094 ± 0,07	0,080 ± 0,04	0,039 ± 0,019
F11		0,050 ± 0,003				
F12		0,087 ± 0,01				
Flagelo	1,397 ± 0,02	0,824 ± 0,015	0,587 ± 0,29	0,403 ± 0,02	0,279 ± 0,02	0,112 ± 0,01

Tipos de Sensilas

Foram encontrados 9 tipos de sensilas, sendo essas divididas em filiformes e de superfície. As do tipo filiforme foram alongadas e se assemelharam a pelos, enquanto as de superfície não possuíram estruturas que se elevaram acima da cutícula. A descrição morfológica, distribuição na antena e quantidade por mm² de cada tipo de sensila são detalhadas abaixo:

Chaetica I e II. As sensilas filiformes *ChI* e *ChII* somente se diferenciaram pelo comprimento médio, sendo as do tipo I menores. Ambas se assemelharam aos pelos, tendo, portanto, o diâmetro gradativamente diminuído da base à ponta da estrutura. *ChI* (Figura 3A) e *ChII* (Figura 3B) acompanharam o contorno da antena e não apresentaram adornos em torno de suas bases. O comprimento de *ChI* variou entre 30 e 67 µm, enquanto as *ChII* vão de 19 a 45 µm, dependendo das castas e sub castas. Essas estruturas ocuparam 87% das sensilas em jardineiras, 88% em generalistas, 85% em forrageiras, 88% em soldados, 89% em rainhas e 79% em machos. Portanto, foram as sensilas mais abundantes nas antenas de todos os representantes de *A. sexdens*. Sensila *chaetica* do tipo I foi mais numerosa em generalistas (29%), seguido das jardineiras (18%), soldados (17%), rainhas (16%), forrageiras (15%) e machos (13%). Em jardineiras, generalistas, forrageiras, soldados e rainhas elas se acumularam em F10 (29-16%) e F9 (17-13%) (Figura 4), e foram mais igualmente distribuídas nos demais flagelômeros (11-

4%). Já nos machos, houve maior quantidade de *ChI* em F12 (19%) e F11 (12%) (Figura 4), com variação de 8-5% nos demais. As *ChI* em F10 são mais densas (número de sensilas por mm²) em rainhas e menos densas em generalistas, enquanto os outros grupos possuem uma densidade semelhante e intermediária (Tabela 5).

Sensila *chaetica* do tipo II totalizaram 69% em jardineiras, 59% em generalistas, 70% em forrageiras, 71% em soldados, 73% em rainhas e 66% em machos. Em todos os grupos, as sensilas *ChII* se acumularam no flagelômero mais apical (F10/F12) (Figura 4), chegando a aproximadamente 30% em jardineiras e generalistas, e variando entre 18 e 12% nas demais. Nas estruturas de F9 a F1, essas sensilas variaram de 14 a 5%. Os machos apresentaram maior quantidade de *ChII* em F12 (15%) (Figura 4), sendo que os demais variam de 9 a 7%. Os dois tipos de *chaetica*, portanto, acumularam-se nos dois últimos flagelômeros em todos os grupos. *ChII* encontradas em F10 foram mais densas em jardineiras e machos, e menos densas em soldados, enquanto generalistas, forrageiras e rainhas possuíram densidades semelhantes e intermediárias.

Chaetica III. As filiformes do tipo *ChIII* foram morfologicamente semelhantes às do tipo I e II. Seu comprimento médio se aproximou das do tipo I, mas se diferenciaram pelo direcionamento da ponta da estrutura, distribuída quase paralelamente ao plano da antena, e se assemelhando a um gancho (Figura 3A). As *ChIII* possuíram comprimentos entre 16 e 34 µm dentro da distribuição polimórfica. Totalizaram 4% em jardineiras, 2% em generalistas e forrageiras, e 1% em soldados, rainhas e machos. Diferentemente das sensilas descritas acima, *ChIII* não ocorreram em todos os flagelômeros. Em jardineiras, essas estruturas estavam majoritariamente agrupadas em F10 (89%), seguidos de F9-F8 (ambos 5%), e F7 (1%) (Figura 4), não aparecendo nas demais partes. Generalistas seguiram um padrão semelhante ao das jardineiras (85% em F10; 6% em F9; 5% em F8; e 2% em F7 e F6; sem representantes nos demais) (Figura 4). Forrageiras também apresentaram maior quantidade de *chaetica* III em F10 (71%), seguidos de F9-F7 (8%) e F5 (3%) (Figura 4). Nos soldados, essa sensila apareceu de F10 ao F4, com maior quantidade em F10 (74%), variando de 8 a 6% entre F9 e F6, e com apenas 1% em F5 e F4. Em ambas as castas reprodutivas, sensilas *ChIII* se acumularam no flagelômero mais apical (F10 em rainha e F12 em machos) (Figura 4). As rainhas apresentaram 9, 7, 4 e 4% nas partes F9, F8, F7 e F6, respectivamente; enquanto os machos possuíram 6, 8, 4, 5, 3, 1, 1, 1, 3 e 8% na sequência de flagelômeros F11-F2, não apresentando sensilas *chaetica* apenas no segmento mais basal (F1) (Figura 4). *ChIII* foram mais densas em F10 de jardineiras e generalistas, e

menos densas em machos e soldados, enquanto os outros grupos foram semelhantes e intermediários (Tabela 5).

Basicônica. Ba são sensilas também filiformes (semelhantes a pelos), contudo, são mais arredondadas, possuem um diâmetro maior da base até o meio quando comparada com ChI, II e III, afunilando-se gradativamente e, assim, assemelhando-se a um dedo (Figura 3A). Apesar de levemente se direcionarem seguindo o contorno da antena, elas possuem um ângulo tipicamente mais próximo dos 90°. O comprimento das basicônica variou entre 13 e 35 µm. Totalizaram 2% em jardineiras, generalistas e forrageiras, 1% em soldados, 0,5% em rainhas, e não apareceram nas antenas dos machos. Em jardineiras, *Ba* foram majoritariamente presentes em F10 (89%), com 8% em F9 e 3% em F8, não ocorrendo nos demais segmentos (Figura 4). Generalistas também acumularam essas estruturas em F10 (81%), mas apresentaram algumas ainda até F6 (F9-5%; F8-6%; F7 e F6 com 4%). Forrageiras apresentaram 64% de *Ba* em F10, variando de 10 a 8% nos segmentos F9, F8, F7 e F6 (Figura 4). Soldados seguiram um padrão de distribuição muito semelhante ao das forrageiras (F10-69%; F9-F6 variando de 10 a 5%) (Figura 4). As rainhas apresentaram 68% em F10, seguido de 16, 13 e 3% em F9, F8 e F7, respectivamente (Figura 4). *Ba* presentes em F10 foram mais densas em jardineiras e menos densas em rainhas e machos, enquanto generalistas, forrageiras e soldados foram semelhantes e intermediários (Tabela 5).

Tricoidea I. São sensilas filiformes com comprimento próximo ao das ChI, mas com espessura mais achatada e, portanto, assemelhando-se a uma foice (Figura 3B). Se direcionaram acompanhando o contorno da antena. Dependendo das castas e sub castas, as *TrI* possuíram comprimento variando de 19 a 27 µm. Essas sensilas totalizaram 5% em jardineiras, 6% em generalistas, 9% em forrageiras, 8% em soldados e rainhas, e 19% em machos. Em todos os grupos de *A. sexdens*, as sensilas *TrI* predominaram no flagelômero mais distal (79% em jardineiras; 71% em generalistas; 68% em forrageiras; 63% em soldados; 75% em rainhas; e 43% em machos) (Figura 4). Nas jardineiras elas ainda foram presentes em F9 (18%) e F8 (3%), não aparecendo, portanto, nos demais segmentos (Figura 4). O mesmo ocorreu com as generalistas (F9-9% e F8-11%) e rainhas (F9-20% e F8-5%) (Figura 4). Forrageiras apresentaram *TrI* em F9 (21%), F8 (9%) e F7 (1%) (Figura 4). Soldados seguiram um padrão semelhante ao das forrageiras, com 22% em F9, 14% em F8 e 1% em F7 (Figura 4). *TrI* em F10 foram mais densas em machos e menos densas em generalistas, enquanto os demais grupos foram semelhantes e intermediários.

Tricoidea II. Com um comprimento médio um pouco maior que as tricoidea do tipo I, essas, apesar de filiformes, também foram mais achatadas e com uma leve sinuosidade ao longo de sua estrutura (Figura 3B). Sua direção e angulação acompanharam o contorno da antena e foram predominantes na parte mais longitudinal dos flagelômeros. O comprimento dessas estruturas variou entre 18 e 34 μm . *TrII* totalizaram 1% de todas as sensilas em jardineiras, generalistas, forrageiras, soldados e rainhas, e apenas 0,5% do total das sensilas em machos. Em todos os grupos, assim como em *tricoidea I*, as do tipo II predominaram no flagelômero mais distal (F10: 81% de jardineiras, 93% de generalistas, 90% de forrageiras, 83% de soldados, 81% de rainhas, e F12: 67% de machos) (Figura 4). Em jardineiras elas ainda foram presentes em F9 (19%); enquanto em generalistas, forrageiras e soldados, elas apareciam nos segmentos F9 e F8 (sendo F9-6% e F8-1% em generalistas; F9-6% e F8-4% em forrageiras; F9-11% e F8-6% em soldados) (Figura 4). As rainhas possuíam 17% em F9, e 1% em F8 e F7 (Figura 4). Já as sensilas *TrII* de machos se estenderam de F12 a F9 (F11-14%, F10-10%, F9-9%) (Figura 4). *TrII* em F10 foram mais densas para forrageiras e menos densas em machos, enquanto os outros grupos foram semelhantes e intermediários (Tabela 5).

Coelocapitular. Essas estruturas foram caracterizadas por uma depressão circular maior contendo uma elevação também circular ao centro (Figura 3C). O diâmetro dessas sensilas variou de 0,9 a 2,5 μm , dependendo da casta e sub casta. Com relação somente às sensilas de superfície, *Cc* foram as que menos ocorreram nas antenas de todas os grupos. Elas somaram 22% em jardineiras, 14% em generalistas, 13% em forrageiras, 14% em soldados, 7% em machos e 27% em rainhas. Com exceção das rainhas, que acumularam todas as coleocaptular no flagelômero mais distal (F10), essas estruturas foram distribuídas ao longo da antena dos demais grupos (Figura 4).

Coeloconica. Estas estruturas foram caracterizadas por uma depressão circular na cutícula contendo uma abertura oval ao centro (Figura 3C e E). Os diâmetros das *Co* foram de 1,3 a 1,6 μm . Juntamente com as *ampulacea*, foram as sensilas de superfície que mais ocorrem ao longo da antena da maior parte dos grupos. Totalizaram 45% em jardineiras, 48% em generalistas, 74% em forrageiras, 29% em soldados, 8% em machos e 66% em rainhas. Em todas as castas e sub castas, essas estruturas se acumularam nos flagelômeros mais distais das antenas (Figura 4).

Ampulacea. As sensilas do tipo *ampulacea* foram semelhantes às *coeloconica*, morfológicamente diferenciando-se apenas pela menor abertura oval ao centro (Figura 2D e E).

O diâmetro das *ampulacea* variou de 0,6 a 1 μm . Dentre as de superfície, portanto, *Ap* totalizaram 33% em jardineiras, 38% em generalistas, 13% em forrageiras, 57% em soldados, 26% em machos e 65% em rainhas. Encontraram-se majoritariamente acumuladas nos segmentos medianos e distais das antenas de todos os grupos (Figura 4).

Além das sensilas já detalhadamente descritas na literatura, foram encontradas de 1 a 3 estruturas possivelmente olfativas na parte mais apical do primeiro segmento das antenas de todos os grupos polimórficos investigados (Figura 3G). Com um formato arredondado, apresentando uma depressão central e aparentando-se as *ampulacea* e *coeloconica* (Figura 3G), esse possível órgão assemelha-se às sensilas do tipo *placodea*. Aquelas com uma curvatura e dispostas na ponta do segmento mais distal das antenas das castas e sub castas foram consideradas *chaetica* do tipo II (Figura 3F).

Comparação entre os tipos de sensilas

Sensilas *ChI* foram mais presentes nas antenas de rainhas e menos nas de jardineiras, sendo os machos, soldados, forrageiras e generalistas com quantidades intermediárias ($df = 5$, $F = 14,98$, $P < 0,001$). As *ChII* foram mais presentes nas rainhas e machos, tendo os soldados e forrageiras como intermediários, e generalistas e jardineiras como as sub castas que menos apresentaram tais estruturas ($df = 5$, $F = 62,33$, $P < 0,001$). Já em *ChIII*, não houve diferença significativa quando comparada a quantidade dessas sensilas nas antenas das castas e sub castas ($df = 5$, $F = 1,73$, $P = 0,260$).

As sensilas basicônicas apareceram significativamente mais nas sub castas generalistas, forrageiras e soldados, seguido das rainhas e jardineiras como as de menor quantidade ($df = 5$, $F = 22,388$, $P < 0,001$). Machos não apresentaram essa estrutura. *TrI* ocorreu mais em jardineiras, seguido de generalistas, e do grupo forrageiras, soldados e rainhas ($df = 5$, $F = 316,36$, $P < 0,001$). Machos foram os que menos apresentaram *TrI*. Rainhas e jardineiras diferiram quanto ao número de *TrII* em suas antenas, havendo na primeira mais que na última ($df = 5$, $F = 5.5494$, $P = 0,0297$). Generalistas, forrageiras, soldados e machos ficaram em uma posição intermediária. Nas três sensilas de superfície, não houve diferenças estatísticas entre os grupos estudados (Co: $df = 5$, $\chi^2 = 8,879$, $P = 0,114$; Cc: $df = 5$, $\chi^2 = 6,695$, $P = 0,244$; Ap: $df = 5$, $F = 2,65$, $P = 0,132$). As comparações acima estão estatisticamente representadas na tabela 6.

Uma análise de componentes principais demonstrou certos agrupamentos quando comparadas as castas e quantidade dos diferentes tipos de sensilas encontrados. As relações

entre eles agrupam jardineiras com generalistas, forrageiras com soldados, e as rainhas e os machos separadamente (Figura 5).

Tabela 3. Quantidade total das sensilas filiformes encontradas nos segmentos do flagelo das castas e sub castas de *Atta sexdens* (N antenas=2).

Castas e Sub Castas	Sensilas	Segmentos do Flagelo												Σ
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	
Rainhas	ChI	55	71	73	75	61	94	123	150	218	381			1301
	ChII	516	571	736	711	590	547	493	375	404	835			5778
	ChIII	0	0	0	0	0	4	4	8	10	83			109
	Bas	0	0	0	0	0	0	1	5	6	23			35
	TrI	0	0	0	0	0	0	0	31	125	467			623
	TrII	0	0	0	0	0	0	0	2	16	73			91
	Σ	571	642	809	786	651	645	621	571	779	1862			7937
Machos	ChI	61	52	56	60	70	68	75	67	88	109	118	192	706
	ChII	448	397	459	438	415	373	376	349	337	339	379	808	3931
	ChIII	0	6	3	1	1	1	2	4	3	6	5	43	27
	Bas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TrI	0	0	0	0	0	0	32	97	134	250	339	643	1495
	TrII	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	18	5
	Σ	509	455	518	499	486	442	485	517	564	707	845	1704	6164
Soldados	ChI	77	57	52	53	56	70	79	106	152	287			989
	ChII	502	501	514	514	475	449	359	343	350	541			4548
	ChIII	0	0	1	1	1	6	6	3	9	70			97
	Bas	0	0	0	0	0	5	6	7	6	48			72
	TrI	0	0	0	0	0	1	2	73	115	322			513
	TrII	0	0	0	0	0	0	0	5	9	65			79
	Σ	579	558	567	568	532	531	452	537	641	1333			6298
Forrageiras	ChI	45	45	45	50	47	58	68	70	95	185			708
	ChII	311	318	377	314	306	332	293	270	287	578			3386
	ChIII	0	0	0	1	1	7	7	7	10	72			105
	Bas	0	0	0	0	0	6	8	7	8	49			78
	TrI	0	0	0	0	0	1	1	43	98	309			452
	TrII	0	0	0	0	0	0	0	4	5	66			75
	Σ	356	363	422	365	354	404	377	401	503	1259			4804
Generalistas	ChI	37	24	26	32	29	42	42	54	76	112			474
	ChII	177	137	131	127	136	135	143	143	229	558			1916
	ChIII	0	0	0	0	0	2	2	4	5	70			83
	Bas	0	0	0	0	0	2	2	4	4	44			56
	TrI	0	0	0	0	0	0	0	25	36	150			211
	TrII	0	0	0	0	0	0	0	1	3	37			41
	Σ	214	161	157	159	165	181	189	231	353	971			2781
Jardineiras	ChI	29	24	23	25	27	31	35	43	61	78			376
	ChII	101	87	95	86	73	90	90	114	180	409			1325
	ChIII	0	0	0	0	0	1	1	3	5	76			86
	Bas	0	0	0	0	0	0	0	2	3	33			38
	TrI	0	0	0	0	0	0	0	3	20	89			112
	TrII	0	0	0	0	0	0	0	5	21				26
	Σ	130	111	118	111	100	122	126	165	274	706			1963

Tabela 4. Quantidade total das sensilas de superfície encontradas nos segmentos do flagelo das castas e sub castas de *Atta sexdens* (N antenas=2).

Sensilas	Segmentos do Flagelo
----------	----------------------

Castas e Sub Castas		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	Σ
Rainhas	Cc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7			7
	Co	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			2
	Ap	0	0	0	0	0	0	1	2	1	13			17
	Σ	0	0	0	0	0	0	1	2	1	22			26
Machos	Cc	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
	Co	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	4	8	18
	Ap	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	4	7
	Σ	0	0	0	0	0	0	2	1	3	4	5	12	27
Soldados	Cc	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0			1
	Co	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1			2
	Ap	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0			4
	Σ	0	0	0	0	1	2	0	2	1	1			7
Forrageiras	Cc	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0			2
	Co	0	0	0	0	0	1	0	1	0	9			11
	Ap	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0			2
	Σ	0	2	0	0	0	2	1	1	0	9			15
Generalistas	Cc	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0			3
	Co	0	0	0	0	0	1	0	1	3	5			10
	Ap	0	0	0	0	0	0	0	2	0	6			8
	Σ	0	1	0	0	0	2	1	3	3	11			21
Jardineiras	Cc	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0			2
	Co	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1			4
	Ap	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0			3
	Σ	0	2	0	1	1	0	1	1	2	1			9

Tabela 5. Quantidade total de sensilas filiformes por μm^2 no flagelômero mais distal (F10 ou F12) das antenas das castas e sub castas de *Atta sexdens* (N antenas=2).

Castas e Sub Castas	Sensilas					
	ChI	ChII	ChIII	Bas	TrI	TrII
Rainhas	30	65	6	2	37	6
Machos	22	93	5	0	74	2
Soldados	22	42	5	4	25	5
Forrageiras	20	61	7	5	33	7
Generalistas	15	60	10	5	20	5
Jardineiras	20	105	20	10	20	5

Tabela 6. Quadro geral da quantidade total de sensilas ($\pm$ DP) por casta e sub casta de *Atta sexdens* (N=2)

Castas e Sub Castas	Sensilas						
	ChI	ChII	ChIII	Bas	TrI	TrII	
							Cc
							Co
							Ap

Rainha	1301 ± 103,2 ^a	5778 ± 80,6 ^a	109 ± 0,7 ^a	35 ± 4,9 ^b	623 ± 42,4 ^c	91 ± 31,1 ^a	7 ± 1,4 ^a	2 ± 5,6 ^a	17 ± 2,8 ^a
Macho	706 ± 14 ^{abc}	3931 ± 664,6 ^{ab}	27 ± 21,9 ^a	0 ^c	1495 ± 137,1 ^d	5 ± 6,3 ^a	2 ± 4,9 ^a	18 ± 1,4 ^a	7 ± 8,4 ^a
Soldado	989 ± 317,4 ^{ab}	4548 ± 9,8 ^{bc}	97 ± 17,6 ^a	72 ± 12 ^{ab}	513 ± 4,2 ^c	79 ± 12 ^a	1 ± 0,7 ^a	2 ^a	4 ± 0,7 ^a
Forrageira	708 ± 32,5 ^{bcd}	3386 ± 342,2 ^c	105 ± 5,6 ^a	78 ± 5,6 ^a	452 ± 16,9 ^c	75 ± 21,2 ^a	2 ± 0,7 ^a	11 ± 7 ^a	2 ± 1,4 ^a
Generalista	474 ± 37,4 ^{cd}	1916 ± 138,5 ^d	83 ± 27,5 ^a	56 ± 14 ^{ab}	211 ± 23,3 ^b	41 ± 2,8 ^a	3 ± 2,1 ^a	10 ^a	8 ± 1,4 ^a
Jardineira	376 ± 51,6 ^d	1325 ± 70,7 ^d	86 ± 1,4 ^a	38 ± 0,7 ^b	112 ± 4,2 ^a	26 ± 4,9 ^a	2 ± 1,4 ^a	4 ^a	3 ± 0,7 ^a

Letras iguais na coluna indicam que não houve diferença pelo teste de Tukey¹ a 5% de significância ou pelo teste de Kruskal-Wallis².

Figura 3. Sensilas filiformes encontradas nas antenas das castas e sub castas de *Atta sexdens*. As sensilas indicadas na imagem A são chamadas de *chaetica* I (ChI), *chaetica* III (ChIII) e *basicônica* (Ba). As indicadas na imagem B são denominadas *chaetica* II (ChII), *tricoidea* I (TrI) e *tricoidea* II (TrII). Em C há as sensilas de superfície do tipo *coeloconica* (Co) e *coelocaptular* (Cc), enquanto a imagem D mostra uma sequência de sensilas denominadas *ampulacea* (Am). As sensilas Co e Am são morfologicamente muito semelhantes, possuindo tamanhos diferentes de abertura, como mostrado na imagem E. As setas brancas na imagem F indicam as sensilas curvadas encontradas no flagelômero mais distal de todos os grupos e consideradas ChII. As setas em preto da imagem G mostram estruturas possivelmente classificadas como *placodea*. Todas as barras representam 20 μ m.

Figura 4. Mapa de todos os tipos de sensilas encontrados ao longo dos quatro segmentos mais distais das castas e sub castas de *Atta sexdens*. O número correspondente a cada segmento está representado por **F** e os grupos polimórficos pelas letras **J** (jardineira), **G** (generalista), **F** (forrageira), **S** (soldado), **R** (rainha) e **M** (macho). Os tons de azul se referem, como indicado na legenda, à quantidade de sensilas do tipo *chaetia* I (ChI) e *chaetia* II (ChII) encontradas na área representada pelo quadrado da figura 1. O restante das sensilas estão representados como mostra a legenda. A barra indica 150 µm.

Figura 5. Análise dos componentes principais comparando as sub castas e castas de *Atta sexdens* com o número médio de sensilas encontradas em suas antenas.

2.4. Discussão

Diversidade, quantidade e distribuição das sensilas

Formigas cortadeiras pertencem à tribo Attini e sub tribo Attina, o grupo mais derivado dentro de Formicidae (Mehdiabadi & Schultz, 2010). Além da intrínseca atividade de coleta de materiais vegetais e do cultivo de um fungo simbiote, os representantes desse grupo carregam, em sua maioria, uma nítida divisão de trabalho baseada no polimorfismo e no polietismo (Wilson, 1980a). Formigas do gênero *Atta*, constróem e mantêm seus ninhos por meio das constantes atividades das operárias, que, acompanhando padrões de tamanho corpóreo, são relativamente determinadas a realizarem tarefas específicas dentro e fora do ninho. Essas atividades, em alguma instância, dependem da comunicação química para serem executadas e preservadas (Holldobler & Wilson, 1990). Assim, a comparação quantitativa e qualitativa das estruturas olfativas encontradas nas antenas de todos os representantes de uma colônia de

formigas cortadeiras, reflete o quão restritivo ou flexível seriam os comportamentos desempenhados pelas castas e sub castas.

Como mostrado pelos resultados, as antenas de jardineiras, generalistas, forrageiras, soldados, rainhas e machos em *A. sexdens*, nitidamente possuem tamanhos diferentes, com comprimentos que seguem proporcionalmente seus tamanhos corpóreos. Da mesma forma, a quantidade total de sensilas diretamente acompanha o tamanho das antenas dentre estas castas. A rainha, por exemplo, possui uma das maiores antenas e maior quantidade dessas estruturas, e as jardineiras o oposto. Portanto, torna-se claro que a quantidade de sensilas acompanha o polimorfismo em formigas-cortadeiras.

Quanto à diversidade, *A. sexdens* possui nove tipos de sensilas em suas antenas. Embora seja um número menor quando comparado, por exemplo, com os treze tipos na abelha sem ferrão, *Melipona quadrifasciata* (Ravaiano et al., 2014), e os doze no grupo de vespas da galha Cynipoidea (Polidori & Neves-Aldrey, 2014), essa quantidade ainda é alta dentro de Formicidae. As espécies *Solenopsis invicta* (Renthal et al., 2003), *Dinoponera lucida* (Marques-Silva et al., 2006), *Camponotus japonicus* (Nakanishi et al., 2009) e *Myrmecia pyriformis* (Ramirez-Esquivel et al., 2014) apresentam, respectivamente, cinco, seis, oito e oito tipos de sensilas ao longo de suas antenas. Por outro lado, essas diferenças quantitativas podem ser resultado de uma incongruência de nomenclaturas encontradas na literatura e pelo recente descobrimento de novas estruturas.

A maior parte das castas e sub castas possuem os nove tipos de sensilas, em menor ou maior quantidade. Com exceção dos machos, em que não há sensilas basicônica, as estruturas filiformes ou de superfície mostraram padrões diferentes de distribuição ao longo da antena de todos os grupos. Esse resultado demonstra, portanto, que, ao menos dentro das operárias, o polimorfismo e polietismo encontrado em cortadeiras não se baseia fortemente na presença ou ausência de certos tipos de sensilas, mas sim em suas quantidades e distribuições.

Os resultados claramente mostraram que jardineiras possuem a menor quantidade de sensilas ($\cong 2000$), seguida na ordem crescente por generalistas, forrageiras, machos, soldados e rainhas ($\cong 8000$). Em *S. invicta*, por exemplo, as operárias possuem cerca de 860 sensilas em suas antenas. No entanto, diferente de *A. sexdens*, as antenas dos machos de *S. invicta* suportam mais estruturas olfativas ($\cong 2300$) do que as rainhas (1124) e operárias (Renthal et al., 2003). Por outro lado, em *Camponotus compressus*, as operárias de diferentes tamanhos possuem mais sensilas quando comparadas com os machos e fêmeas (Mysore et al., 2010).

As quantidades totais de cada tipo de sensila nas antenas dos grupos variou, ora mostrando fortes semelhanças, ora indicando significativas discrepâncias. As sensilas TrI, por

exemplo, separaram as jardineiras como as menos abundantes e os machos como os mais, agrupando as forrageiras, generalistas e rainhas como um grupo intermediário. Todavia, a comparação do número total de ChIII não indicou qualquer diferença entre os seis grupos estudados. O mesmo ocorre na antena de *M. quadrifasciata*, em que *tricoidea* III, IV e VI não se diferem quanto ao número total na comparação entre operárias e rainha, enquanto I, II e V são significativamente diferentes nessas duas castas (Ravaiano et al., 2014).

A distribuição espacial das sensilas em *A. sexdens* também apresentou padrões claros em certas sensilas, e agrupamentos variados em outras, como claramente mostra o mapa (Figura 4). As ChI e II, por exemplo, apesar da ocorrência em todos os segmentos da antena, se acumularam nos segmentos mais distais em todos os grupos. Em *C. japonicus* (Nakanishi et al., 2009), as *chaetica* são majoritariamente encontradas nos segmentos distais e basais de operárias, fêmeas não fecundadas e machos, mesmo havendo uma distribuição mais uniforme ao longo da antena quando comparado com *A. sexdens*. ChIII, conhecida como *chaetica A*, também são encontradas em *C. japonicus* (Nakanishi et al., 2009) e, assim como em *A. sexdens*, predominantemente se aglomeram no flagelômero apical.

Trichodea I, ou *trichodea curvata*, se acumulam diferentemente de acordo com a casta e sub casta de *A. sexdens*, variando entre os seis segmentos mais distais em machos, e os três em rainha, forrageira, generalista e jardineira. Um padrão semelhante ocorre nas antenas de machos, rainhas e operárias de *C. japonicus* (Nakanishi et al., 2009). Em *Oeophylla smaragdina*, operárias maiores e operárias menores possuem maior quantidade de *TrI* nos segmentos mais distais, enquanto essa é mais uniformemente distribuída na antena da rainha (Babu et al., 2011). Nas operárias, fêmeas aladas e machos de *S. invicta*, por outro lado, todas as *TrI* são encontradas nos dois segmentos mais distais (Renthal et al., 2003). *Trichodea do tipo II* em *A. sexdens* se acumulam, de maneira geral, nos três flagelômeros mais distais, havendo pouca variação entre as castas e sub castas. Apesar de mais uniformemente distribuídas em machos, rainhas não fecundadas e operárias de *C. japonicus*, essas estruturas ainda se aglomeram mais nos flagelômeros distais dos dois últimos grupos (Nakanishi et al., 2009).

As sensilas *basicônica* foram somente encontradas nos três segmentos mais distais de rainhas e jardineiras de *A. sexdens*, e nos cinco mais distais de soldados, forrageiras e generalistas. Nas operárias e rainhas de *O. smaragdina*, essas também se acumulam nos segmentos mais distais da antena, apesar de serem encontradas em todos os demais flagelômeros (Babu et al., 2011). O mesmo padrão é visto em operárias e fêmeas não fecundadas de *C. japonicus* (Nakanishi et al., 2009). As operárias e rainhas de *S. invicta*

somente possuem sensilas basicônica no segmento mais distal (F10), todos ainda acumulados em uma região mais achatada desse flagelômero (Renthal et al, 2003)

As sensilas *de superfície* foram as que mais variaram quanto às suas posições entre os segmentos em *A. sexdens*. Em jardineiras, as poucas *ampulacea*, *coeloconica* e *coelocaptular* encontradas, foram distribuídas ao longo da antena de maneira não uniforme. Já em rainhas e machos, essas se agruparam nos segmentos mais distais. Nos demais grupos, as sensilas estavam posicionadas em diferentes segmentos. Em *C. japonicus*, em contrapartida, as mesmas sensilas de superfície ocorrem em quase todos os segmentos das antenas de operárias, rainhas não fecundadas e machos, se agrupando nos mais distais e basais nas duas primeiras, e mais uniformemente distribuídas nas antenas dos machos (Nakanishi et al., 2009). *Ampulacea* e *coeloconica* se agrupam no flagelômero mais distal das antenas de operárias e rainha de *O. smaragdina*, havendo praticamente um representante de cada uma dessas sensilas nos demais segmentos (Babu et al., 2011).

Dimorfismo sexual

As antenas de machos e rainhas de *A. sexdens* são diferentes não somente pelo fato de os machos possuírem dois segmentos a mais, mas também pela diversidade e número de sensilas encontradas em suas cutículas. As rainhas, quando comparadas aos machos, possuíram cerca de 1600 sensilas a mais em suas antenas e as nove sensilas identificadas para a espécie. Os machos possuíram oito, e não apresentaram *basicônica* em qualquer um dos segmentos. A ausência dessa estrutura é comum em machos de outras espécies de formigas, como *C. compressus* (Mysore et al., 2010), *C. japonicus* (Nakanishi et al., 2009) e *S. invicta* (Renthal et al., 2003). Comprovadamente sensíveis aos hidrocarbonetos de cutícula (Ozaki et al., 2005), as sensilas *basicônica* seriam responsáveis pelo reconhecimento químico entre os indivíduos da colônia, garantindo a aceitação intraespecífica. Dessa forma, machos de *A. sexdens* podem ser menos sensíveis ao ‘*gestalt*’ químico da colônia.

Além disso, os machos ainda possuíram significativamente mais sensilas *trichodea I* do que as rainhas. Nas antenas de machos de *S. invicta*, essas estruturas são as mais abundantes (Renthal et al., 2003) e também ultrapassam as encontradas nas rainhas. O mesmo não ocorre em *C. compressus* e *C. japonicus*, em que os machos possuem a menor quantidade de *TrI* quando comparados com os diferentes tamanhos de operárias e a rainha na primeira espécie (Mysore et al., 2010); e um valor muito semelhante entre os machos e operárias, e maior nas rainhas da segunda espécie do gênero *Camponotus* (Nakanishi et al., 2009). *TrI* estariam

potencialmente ligadas à sensibilidade a compostos mais voláteis, como feromônios de alarme (Dumpeert, 1972; Nakanishi et al., 2009).

Todas as demais sensilas *filiformes* apareceram em menor quantidade nas antenas dos machos. Já as *de superfície*, os resultados mostraram uma tendência a diferenças morfofisiológicas entre os sexos. Machos possuem menos sensilas *coelocapitular* e *ampulacea*, mas muito mais *coeloconica* do que as rainhas. As variações, no entanto, não são encontradas em *C. japonicus* (Nakanishi et al., 2009), mas ocorrem da mesma forma ao menos para as *coeloconica* em machos de *S. invicta* (Renthall et al., 2003). Assim, como postulado por Renthall et al. (2003) para *S. invicta*, a maior abundância de *coeloconica* possivelmente se deve a sua função de percepção da umidade do ar (Jaisson, 1969) e da variação da temperatura (Ruchty et al., 2009). Ambas as espécies, ao menos indiretamente, dependem do aumento da temperatura e, conseqüentemente, da umidade do ar para promoverem o voo nupcial e, então, acasalar (Fowler et al., 1986). O mais intrigante, no entanto, seria o motivo pelo qual as rainhas de *A. sexdens rubropilosa* teriam tão poucas dessas estruturas em suas antenas, visto que aparentemente também se valeriam desses dois fatores ambientais para saírem do ninho e acasalar. No entanto, caso as *coelocapitular* nas cortadeiras tenham as mesmas funções encontradas nas abelhas (Yokohari et al., 1982; Yokohari, 1983), a sensibilidade à variação da temperatura e umidade das rainhas seria explicada por uma quantidade comparativamente maior dessas estruturas em suas antenas.

A menor quantidade de *ampulacea*, sensilas *de superfície* identificadas como receptoras de CO₂ em formigas cortadeiras (Kleineidam et al., 2000), indicam pouca percepção desse composto pelos machos, mas o suficiente para as rainhas. Com uma vida potencialmente muito mais longa que os machos e com a essencial função de oviposição (Wilson, 1980b; 1983b), as rainhas de *A. sexdens rubropilosa* possivelmente seriam sensíveis ao CO₂ devido a uma relação indicativa e reversa da oscilação desse composto e do O₂ dentro do ninho – fatores ambientais cruciais para a sobrevivência dos indivíduos da colônia (Kleineidam & Roces, 2000).

A pouca quantidade de sensilas como um todo nas antenas dos machos em *A. sexdens*, aparentemente, estaria realmente ligada com a função exclusiva desse sexo na reprodução. Como já exposto por Renthall et al. (2003) em *S. invicta*, os machos de *A. sexdens* não participam de atividades e comportamentos relacionados ao forrageio e defesa, por exemplo, e, portanto, expressariam genes de sensilas diretamente e majoritariamente ligadas à reprodução.

Funções das sensilas e polietismo

Assim como já descrito anteriormente para as castas reprodutivas de *A. sexdens*, as sensilas encontradas em insetos possuem sensibilidades diferentes, de acordo com seus formatos, poros e inervações. Há estruturas com sensibilidade a compostos químicos mais voláteis, como as *TrI*, e outras a compostos de cadeias mais longas, como as *basicônica* aos hidrocarbonetos de cutícula. Também há as higo e termo sensíveis, como *coelocapitular* e *coeloconica*, e ao CO₂, como as *ampulacea*. Dessa forma, é possível, em alguma instância, relacionar as funções dessas estruturas sensoriais com os diversos comportamentos encontrados nos grupos polimórficos de formigas-cortadeiras.

As *ChI* e *II*, sensilas filiformes de tamanhos diferentes, aparecem em maior quantidade nas antenas de rainhas e soldados, e são comparativamente as mais abundantes e distribuídas em todos os grupos. Segundo Nakanishi et al. (2009), as *chaetica* podem ser mecano ou quimio receptoras, dependendo de detalhes como presença e ausência de poros em suas cutículas. Dessa forma, e quanto à mecanopercepção, a grande quantidade ao longo de toda a antena de *A. sexdens* poderia indicar a importância do toque com esse apêndice, comportamento esse realizado durante diversas atividades fundamentais para as operárias em formigas, como recrutamento, ‘grooming’ e trofalaxia (Holldobler & Wilson, 1990; Camargo et al., 2017). Além disso, a possível sensibilidade química atribuída a elas pode estar ligada a percepções de mensagens diversas e de grande importância para a homeostase do ninho, como os feromônios (Moser et al., 1968; Tumlinson et al., 1972; Cross et al., 1979; Jaffe et al., 1979).

As *ChIII*, semelhante às *basicônica*, podem ser sensíveis aos compostos cuticulares (Nakanishi et al., 2009). O número total dessas estruturas não diferiu entre as castas mostrando que caso essa realmente seja a função de *ChIII*, ela teria a mesma importância para qualquer casta e sub casta, sendo parte do processo de reconhecimento dos indivíduos via hidrocarbonetos de cutícula. As *basicônica*, por outro lado, tiveram uma quantidade total semelhante e maior em forrageiras, soldados e generalistas, mas significativamente diferente de jardineiras e rainhas. O fato das três primeiras sub castas serem mais ativas e desempenharem papéis mais interativos dentro e fora do ninho, poderia ser uma explicação para esse resultado. Forrageiras executam tarefas como recrutamento, formação de trilha e busca por alimento (Wilson, 1980a; 1983a; Wetterer, 1994), o que as posicionam como formigas constantemente em contato com outros indivíduos, exigindo maior sensibilidade aos compostos de reconhecimento. O mesmo ocorreria com as generalistas, responsáveis por tarefas como cuidado com a prole, transporte e particularização de alimentos dentro do ninho, e com os soldados, sub casta quase exclusivamente responsável pela defesa (Wilson, 1980a) e, portanto, diferenciação dos indivíduos pertencentes ou não à colônia. Jardineiras, por outro lado, pouco

participam do recrutamento (Feener and Moss, 1990; Evison et al., 2008), e estão ativamente cuidando da prole, rainha e fungo (Wilson, 1990a), comportamentos esses que talvez requeiram menor capacidade de reconhecimento via hidrocarbonetos. Vale lembrar que em termos de densidades, houve valores muito altos para jardineiras. Esse fato pode ser representativo, considerando que muito se valem das antenas para manipular e incorporar material vegetal ao fungo. Desse modo o agrupamento e concentração das sensilas de contato em *clusters* no último segmento da antena, poderia estar relacionado a estes hábitos.

As jardineiras, seguidas das generalistas, foram as que menos apresentaram as sensilas *TrI*, sendo os soldados e forrageiras aqueles com maior número. Esses resultados são coerentes com a possível função da estrutura, visto que tal tipo de sensila estaria relacionado com a percepção de compostos de feromônio de alarme (DumPERT, 1972), liberados especialmente por forrageiras e soldados de formigas-cortadeiras em momentos de ameaça (Moser et al., 1968). Portanto, as mesmas sub castas que produzem e liberam os compostos de alarme seriam as potencialmente mais sensíveis aos mesmos, corroborando com a também participação direta de forrageiras e soldados na defesa do ninho (Wilson, 1980a; Salzemann & Jaffe, 1991). Já as jardineiras e generalistas, grupos quase inteiramente responsáveis por atividades ocorridas internamente, seriam menos sensíveis ao feromônio de alarme (Salzemann & Jaffe, 1991), e, como já descrito (Wilson, 1980a; Gerstner et al., 2011; Evison et al., 2008), pouco participariam de comportamentos agonísticos. As *trichodea do tipo II*, com provável sensibilidade a mensagens químicas em geral (Nakanishi et al., 2009), plausivelmente ocorreriam em quantidades semelhantes em todas as castas e sub castas, como mostraram os resultados. Essas estruturas, no entanto, necessitariam estudos adicionais para se compreender suas funções.

Apesar de não haver diferenças estatísticas para as sensilas *de superfície* nas castas e sub castas, algumas tendências em sua ocorrência em *A. sexdens* foram observadas. É o caso do grande número de *coeloconica* nas forrageiras e generalistas. Já comprovada como uma estrutura sensível às variações de temperatura em formigas-cortadeiras (Ruchty et al., 2009), as sensilas *coeloconica* seriam importantes para comportamentos como modificações na arquitetura e organização do ninho para maior ou menor ventilação, atividades desempenhadas majoritariamente por forrageiras (Wilson, 1980a). Além disso, tais operárias são intensas exploradoras do ambiente externo, sendo a todo momento expostas e, portanto, morfológica e fisiologicamente capazes de tomarem decisões potencialmente baseadas nas variações dos fatores abióticos (Kleineidam et al., 2007). As generalistas, por outro lado, são as mais ativas no transporte de larvas (Wilson, 1980a), por exemplo, mobilização possivelmente primordial quando há oscilações de temperatura nas diferentes câmaras dos ninhos de cortadeiras. Essa

correlação morfológica e etológica pode ainda ser corroborada pela também grande presença de *ampulacea* nessa sub casta. Responsáveis pela percepção de CO₂ (Kleineidam et al., 2000), composto diretamente relacionado à respiração e, portanto, metabolismo e sobrevivência dos indivíduos e do fungo simbiote (Kleineidam & Roces, 2000; Bollazi et al., 2012), o movimento com a prole em momentos de pouca ventilação pode complementarmente ser estimulado pela alta sensibilidade das variações desse gás pelas generalistas.

Com uma possível função de percepção da umidade e da variação da temperatura (Yokohari et al., 1982), as *coelocaptular* foram as sensilas que menos ocorreram nas sub castas de *A. sexdens*. Esse resultado pode simplesmente indicar que apenas poucos representantes do órgão são suficientes para capturar e interpretar tais oscilações abióticas em todas as sub castas. Roces & Kleineidam (2000) mostraram que as jardineiras da mesma espécie são capazes de detectar as diferenças de umidade entre as câmaras, encontrando os jardins de fungo por meio desse indicativo ambiental. Cortadeiras também são sensíveis ao peso causado pelas gotas de chuva durante o processo de forrageio (Farji-Brener et al., 2018), sugerindo a importância da sensibilidade à umidade, visto que seu aumento é um indicativo direto de precipitação. Quanto a sensibilidade às variações de temperatura, também relacionada com as *coeloconica*, forrageiras de *Atta vollenweideri* são capazes de distinguir gradientes de calor e se orientarem espacialmente baseadas em tal característica abiótica (Kleineidam et al., 2007).

Já os órgãos encontrados na base da antena de todos os grupos, se assemelharam às sensilas do tipo *placodea*, especialmente devido a depressão central circundada por uma borda sobressalente, já descrita em espécies de abelhas e mamangavas (Wcislo, 1995; Shang et al., 2010; Galvani et al., 2012; Jung, et al., 2014; Ravaiano, et al., 2014) e na formiga predadora *Dinoponera lucida* (Marques-Silva et al., 2006). Em *Apis* e espécies de abelhas Emphorini, as placodea parecem estar relacionadas com a percepção de feromônios sexuais devido a diferença na quantidade dessa estrutura entre os sexos (Brockmann and Brückner, 2001; Galvani et al., 2012). Em *A. sexdens*, no entanto, essas estruturas ainda necessitam exploração adicional.

Conclusão

Os órgãos sensoriais encontrados nas antenas dos grupos polimórficos da formiga cortadeira *A. sexdens* indicam, em primeiro momento, importantes parâmetros direcionadores aos seus perfis etológicos, sugerindo-as mais ou menos capazes de utilizar certas mensagens químicas e físicas para se comunicarem. Apesar de quase todas as castas e sub castas possuírem uma diversidade muito semelhante de sensilas, a quantidade e mesmo sua distribuição podem

interferir na participação das castas e sub castas em determinadas atividades desempenhadas dentro e fora do ninho.

De forma geral, os dados indicaram que jardineiras e generalistas, ambas sub castas quase totalmente confinadas ao ambiente interno do ninho, se agruparam quanto a quantidade das diferentes sensilas encontradas em suas antenas. O mesmo vale para os soldados e forrageiras, operárias com ativa participação em tarefas vinculadas ao ambiente externo. As rainhas, mesmo próximas às forrageiras e soldados, pareceram um grupo único, com seus órgãos olfativos parcialmente semelhantes às operárias maiores e, ao mesmo tempo, com certas peculiaridades que as distanciaram. Já os machos, grupo mais distante de todos os outros, se isolaram como os representantes com o aparelho olfativo mais único e potencialmente especializado à reprodução. Dessa forma, o ambiente em que vivem e exploram, seus padrões polimórficos e as atividades que exercem parecem ser importantes agentes influenciadores na configuração dos órgãos olfativos de formigas-cortadeiras.

Embora demonstrado que a variação quantitativa e qualitativa das sensilas acompanham os perfis etológicos em *A. sexdens*, ainda há outras perspectivas importantes a serem investigadas. Fatores como a expressão dos genes relacionados ao aparelho olfativo (proteínas receptoras e ligantes), os processos fisiológicos, conexões neurais e peculiaridades cognitivas devem ser melhor exploradas, gerando, assim, um panorama mais completo e real da interação entre polimorfismo, polietismo e comunicação química dentro da sub tribo Attina.

Referências

- Andryszak, N. A., Payne, T. L., Dickens, J. C., Moser, J. C., Fisher, R. W. 1990. Antennal olfactory responsiveness of the texas leaf cutter ant (Hymenoptera: Formicidae) to trail and its two alarm substances. *Journal of Entomological Science*, 25(4), 593-599.
- Babu, M. J., Ankolekar, S. M. and Rajashekhar, K. P., 2011. Castes of the weaver ant *Oecophylla smaragdina* (Fabricius) differ in the organization of sensilla on their antennae and mouthparts. *Current Science*, 10(6), 755-764.
- Billen, J. and Morgan, E. D., 1998. Pheromone Communication in Social Insects: Sources and Secretions. In: Vander Meer, R. K., Breed, M. D., Espelie, K. E. and Winston, M. L., ed, *Pheromone Communication in Social Insects, Ants, Wasps, Bees and Termites*, Westview Press, pp. 3-33.
- Bollazzi, M., Forti, L. C. and Roces, F., 2012. Ventilation of the giant nests of *Atta* leaf-cutting ants: does underground circulating air enter the fungus chambers? *Insectes Sociaux*, 59(4), 487-498.

- Brockmann, A. and Brückner, D., 2001. Structural differences in the drone olfactory system of two phylogenetically distant *Apis* species, *A. florea* and *A. mellifera*. *Naturewissenschaften*, 88, 78-81.
- Buschinger, A. and Maschwitz, U., 1984. Defensive behavior and defensive mechanisms in ants. In, H. R. Hermann, ed. *Defensive mechanisms in social insects*. Praeger, New York, pp. 95-150.
- Camargo, R. S., Puccini, C., Forti, L. C. and Matos, C. A. O., 2017. Allogrooming, self-grooming, and touching behavior: contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. *Insects*, 8(2), 59.
- Chapman, R. F., 1998. Chemoreception. In: Chapman, R. F. *The Insects, Structure and Function*, Cambridge University Press, New York, pp. 636-654.
- Cross, J. H., Byler, R. C., Ravid, U., Silverstein, R. M., Robinson, S. W., Baker, P. M., Oliveira, J. S., Jutsum, A. R. and Cherrett, J. M., 1979. 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*, 5(2), 187-203.
- Dumpert, K., 1972. Alarmstoffrezeptoren auf der Antenne von *Lasius fuliginosus* (Latr.) (Hymenoptera, Formicidae). *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 76, 403-425.
- Evison, S. E. F., Hart, A. G. and Jackson, D. E., 2008. Minor workers have a major role in the maintenance of leafcutter ant pheromone trails. *Animal Behaviour*, 75, 963-969.
- Farji-Brener, A.G., Dalton, M. C., Balza, U., Courtis, A., Lemus-Domínguez, I., Fernández-Hilario, R. and Cáceres-Levi, D., 2018. Working in the rain? Why leaf-cutting ants stop foraging when it's raining. *Insectes Sociaux*, 1-7.
- Feener, D. H. and Moss, K. A. G., 1990. Defense against parasites by hitchhikers in leaf-cutting ants: a quantitative assessment. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 26, 17-29.
- Frasnelli, E. and Vallortigara, G., 2017. Distribution of antennal olfactory and non-olfactory sensilla in different species of bees, *Symmetry*, 9(135), 135.
- Fowler, H. G., Pereira da Silva, V., Forti, L. C. and Saes, N. B., 1986. Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review. In: Lofgren, C. S. and Vander Meer, R. K., *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. Westview, Boulder, pp. 123- 145.
- Galvani G. L., González, A., Roig-Alsina, A. H. and Settembrini, B. P., 2012. Distribution and morphometric studies in Emphorini bees (Hymenoptera, Apoidea). *Micron*, 43, 673-687.
- Gerstner, A.T., Poulsen, M. and Currie, C.R., 2011. Recruitment of minor workers for defense against a specialized parasite of *Atta* leaf-cutting ant fungus gardens. *Ethology Ecology & Evolution*, 23, 61-75.
- Hashimoto, Y., 1990. Unique feature of sensilla on the antennae of Formicidae (Hymenoptera). *Applied Entomology and Zoology*, 4, 491-501.

- Hernández, J. V.; López, H. and Jaffe, K., 2002. Nestmate recognition signals of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Journal of Insect Physiology*, 48, 287-295.
- Holldobler, B. and Wilson, E. O., 1990. The ants. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Jaffé, K., Bazirjz-Benazéta M. and Howse, P. E., 1979. An integumentary pheromone-secreting gland in *Atta* sp: territorial marking with a colony specific pheromone in *Atta cephalotes*. *Journal of Insect Physiology*, 25, 833-839.
- Jaisson, P., 1969. Étude de la distribution des organes sensoriels del'antenne et de leurs relations possibles avec le comportement chez deux fourmis myrmicines: *Myrmica laevinodis* Nyl. et *Aphaenogaster gibbosa* Latr. récoltées dans la région des Eyzies. *Insectes Sociaux*, 16, 279-312.
- Jung, J. W., Park, K. W., Oh, H. W. and Kwon, H. W., 2014. Structural and functional differences in the antennal olfactory system of worker honey bees of *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17, 639-646.
- Kleineidam, C., Romani, R., Tautz, J. and Isidoro, N., 2000. Ultrastructure and physiology of the CO₂ sensitive sensillum ampullaceum in the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Arthropod Structure and Development*, 29, 43-55.
- Kleineidam, C., and Roces, F. Carbon dioxide concentrations and nest ventilation in nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. *Insectes sociaux*, 47, 241–248, 2000.
- Kleineidam, C.J., Ruchty, M., Casero-Montes, Z.A. and Roces, F., 2007. Thermal radiation as a learned orientation cue in leaf-cutting ants (*Atta vollenweideri*). *Journal of Insect Physiology*, 53, 478-487.
- Lacher, V., 1964. Elektrophysiologische Untersuchungen an einzelnen Rezeptoren für Geruch, Kohlendioxyd, Luftfeuchtigkeit und Temperatur auf den Antennen der Arbeitsbiene und der Dohne (*Apis mellifera*). *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 48, 587-623.
- Marques-Silva, S., Matiello-Guss, C. P., Delabie, J. H. C., Mariano, C. S. F., Zanuncio, J. C. and Serrão, J. E., 2006. Sensilla and Secretory glands in the antennae of a primitive ant: *Dinoponera lucida* (Formicidae: Ponerinae). *Mycroscopy Research and Technique*, 69, 885-890.
- Mehdiabadi, N. J. and Schultz, T. R., 2010. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological News*, 13, 37-55.
- Mysore, K., Shyamala, B. V. and Rodrigues, V., 2010. Morphological and developmental analysis of peripheral antennal chemosensory sensilla and central olfactory glomeruli in worker castes of *Camponotus compressus* (Fabricius, 1787). *Arthropod Structure and Development*, 39, 310-321.
- Morgan, E. D., 2009. Trail pheromone of ants. *Physiological Entomology*, 34, 1-17.

- Moser, J. C. and Brownlee, R. C., Silverstein, R., 1968. Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. *Journal of Insect Physiology*, 14, 529-535.
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F. and Nishikawa, M., 2009. Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell Tissue Research*, 338, 79-97.
- Ozaki, M., Wada-Katsumata, M., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nisimura, T. and Yamaoka, R., 2005. Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*, 309, 311-314.
- Polidori, C. and Nieves-Audrey, J. L., 2014. Diverse Filters to Sense: Great Variability of Antennal Morphology and Sensillar Equipment in Gall-Wasps (Hymenoptera: Cynipidae), *PLoS ONE*, 9(7), e101843.
- Ramirez-Esquivel, F., Zeil, J. and Narendra, A., 2014. The antennal sensory array of the nocturnal bull ant *Myrmecia pyriformis*. *Arthropod Structure and Development*, 43, 543-558.
- Ravaiano, S. V., Ferreira, R. P., Campos, L. A. O. and Martins, G. F., 2014. The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. *Naturwissenschaften*, 101, 603-611.
- Renthal, R., Velasquez, D., Olmos, D., Hampton, J. and Wergin, W. P., 2003. Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron*, 34, 405-413.
- Roces, F. and Kleineidam, C., 2000. Humidity preference for fungus culturing by workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Insectes Sociaux*, 47, 348-350.
- Rutchy, M. Romani, R., Kuebler, L. S., Ruschioni, S., Roces, F., Isidoro, N. and Kleineidam, C. J., 2009. The thermo-sensitive sensilla coeloconica of leaf-cutting ants (*Atta vollenweideri*). *Arthropod Structure and Development*, 38, 195-205.
- Salzemann, A. and Jaffe, K., 1991. Polyéthisme et défense de la société chez la fourmi champignoniste *Atta laevigata* (Fr. Smith). *Insectes Sociaux*, 38, 149-159.
- Shang, L., Wang, Y., Wang, P., Wang, S. and Ren, B., 2010. Application of rough set analysis and caste discrimination of bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) based on antennal sensilla. *Morphology. Histology and Fine Structure*, 103(4), 654-660.
- Snodgrass, R. E., 1993. The head appendages, In: *Principles of Insect Morphology*, Cornell University Press, Ithaca e Londres, pp. 130-156.
- Tumlinson, J. H., Moser, J. C., Silverstein, R. M., Brownlee, R. G. and Ruths, J. M., 1972. A volatile trail pheromone of the leaf-cutting ant, *Atta texana*. *Journal of Insect Physiology*, 18, 809-814.
- Wcislo, W. T., 1995. Sensilla numbers and antennal morphology of parasitic and non-parasitic bees (Hymenoptera: Apoidea). *International Journal of Insect Morphology and Embriology*, 24(1), 63-81.

- Weber, N. A., 1979. Fungus-culturing by ants. In: L. R. Batra, (ed.), Insect-fungus symbiosis: mutualism and commensalism, Allanheld and Osmun, Montclair, N.J, pp. 77-116.
- Wetterer, J. K., 1994. Forager polymorphism, size-matching, and load delivery in the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. Ecological Entomology, 19, 57-64.
- Wilson, E. O., 1980a. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*), I: The overall pattern in *A. sexdens*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 7(2), 143-156.
- Wilson, E.O., 1980b. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*), II: The ergonomic optimization of leaf cutting. Behavioral Ecology and Sociobiology, 7(2), 157-165.
- Wilson, E. O., 1983a. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*), III: Ergonomic resilience in foraging by *A. cephalotes*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 14(1), 47-54.
- Wilson, E. O., 1983b. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*), IV: Colony ontogeny of *A. cephalotes*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 14(1), 55-60.
- Yokohari, F., Tominaga, Y. and Tateda, H., 1982. Antennal hygrometers of the honeybee, *Apis mellifera* L. Cell and Tissue Research, 226, 63-73.
- Yokohari, F., 1983. The coelocapitular sensillum, an antennal hygrometric and thermoreceptive sensillum of the honeybee, *Apis mellifera*. Cell and Tissue Research, 233, 355-365.

3 VARIAÇÃO DAS RESPOSTAS ELETROFISIOLÓGICAS A FEROMÔNIOS NAS OPERÁRIAS E CASTAS REPRODUTIVAS DE *Atta sexdens*

Fernando Ribeiro Sujimoto¹, Davi de Souza Fernandes¹, Camila Moreira Costa¹, José Maurício Simões Bento^{1*}

¹ Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Departamento de Entomologia e Acarologia, Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil.

*Autor correspondente: José Maurício Simões Bento, Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ/USP. Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil. E-mail: jmsbento@usp.br

Manuscrito em preparação para *Journal of Insect Physiology*

Resumo

Os insetos sociais se comunicam de diversas maneiras, sendo as mensagens químicas a via mais comum de aquisição e envio de informações. As formigas-cortadeiras também se valem desse meio, interagindo com a colônia e o ambiente em que vivem por intermédio de diversos compostos, como os feromônios. Houve, portanto, o desenvolvimento, ao longo da evolução, de uma percepção olfativa complexa e possivelmente variável dentro dos padrões polimórficos encontrados em representantes de Attini. Assim, o presente trabalho teve como objetivo comparar as respostas eletroantegráficas das castas e sub castas de *A. sexdens* a conteúdos de diferentes glândulas exócrinas. Recorrendo a testes efetuados em um eletroantegráfo, foi possível estabelecer uma metodologia de montagem das antenas e execução dos sinais para as castas e sub castas, a fim de compreender as variações da sensibilidade a semioquímicos relevantes para a comunicação entre os indivíduos da colônia. As jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados foram comparados quanto ao conteúdo das glândulas de veneno (produtora do feromônio de trilha) e Dufour das forrageiras, e mandibular (feromônio de alarme) dos soldados. Todas as sub castas foram similarmente sensíveis a esses estímulos, mostrando pouca variação na comparação das amplitudes das respostas. Dessa forma, apesar dos diferentes perfis etológicos atribuídos a elas, todos os tipos de operárias foram potencialmente capazes de perceber os feromônios de trilha e alarme, sendo o conteúdo da glândula de Dufour em cortadeiras ainda não associado com funções específicas na colônia. Já os machos e fêmeas virgens foram comparados quanto às respostas ao conteúdo da glândula mandibular do sexo oposto. Ambos foram sensíveis ao estímulo do outro, mas os machos mostraram uma resposta significativamente maior ao órgão produtor do feromônio de alarme da fêmea do que o contrário. Os resultados como um todo demonstram que as divergências e congruências das respostas eletrofisiológicas dos grupos polimórficos podem ser aspectos importantes para a compreensão das relações entre a comunicação química, polimorfismo e polietismo nas formigas-cortadeiras.

Palavras-chave: Eletroantegrafia; Polimorfismo; Polietismo; Cortadeiras; Comunicação química

Abstract

Social insects communicate by different means, but the chemical messages are the main way to them acquiring and releasing information. Leaf cutter ants also rely on this mean, interacting with the colony and environment where they live by many different compounds, as the pheromones. There was, therefore, the development of a complex olfactory perception, which is possibly variable within the polymorphic patterns found in the Attini species. This investigation aimed to compare the electrophysiological responses of castes and sub castes of *A. sexdens* to different exocrine glands contents. By means of electroantennographic tests, it was possible to establish an antenna-mounting and signal-execution methodology to the castes and sub castes, in order to understand the relevant semiochemicals in the colony communication. The gardener, generalists, foragers and soldiers were compared the venom (trail pheromone producer) and Dufour glands from foragers, as well as mandibular (alarm pheromone) gland from the soldiers. All sub castes are similarly sensitive to these stimuli, showing few variations when the amplitudes of the responses were compared. In this way, despite their different ethological profiles, all workers are potentially able to perceive the trail and alarm pheromones, even for Dufour gland contents, which was not associated to any specific function for the colony communication so far. Males and queens were compared regarding their responses to the mandibular gland content of each other. Both were sensitive to the opposite stimulus, but the males showed a higher response to the female alarm pheromone. Therefore, the female mandibular gland is a candidate to be the origin of a possible sexual pheromone of the species. The results demonstrate that differences and congruences of the polymorphic group's electrophysiological responses could be important aspects for a better comprehension of the relation among chemical communication, polymorphism and polyethism in leaf cutter ants.

Keywords: Electroantennography; Polymorphism; Polyethism; Leaf cutter ants; Chemical communication

3.1.Introdução

A complexidade comportamental encontrada em formigas é, de certo modo, reflexo de uma alta dependência da comunicação química (Holldobler & Wilson, 1990). Todo e qualquer comportamento desempenhado dentro ou fora do ninho depende direta ou indiretamente de algum feromônio, como a formação de trilhas (Tumlinson et al., 1971; Czaczkes et al., 2015), ataque a inimigos (Moser et al., 1968; Bradshaw et al., 1979; Hughes et al., 2001) e reconhecimento entre os indivíduos (Soroker et al., 1998; Hernández et al., 2002; Richard et al., 2004; Hernández et al., 2006). Tendo em vista tal importância, esses semioquímicos, as glândulas que os produzem e mesmo os comportamentos que desencadeiam, são amplamente estudados nesses insetos sociais (Billen & Morgan, 1998; Conte & Hefetz, 2008; Morgan, 2009).

Quanto à percepção, as moléculas são captadas principalmente pelas sensilas encontradas nas antenas (Hashimoto, 1990; Steinbrecht, 1997) e, posteriormente, a mensagem é transformada em uma resposta eletrofisiológica via sistema nervoso (Schneider, 1964), para

então, ser interpretada em regiões específicas do cérebro e, finalmente, ser expressa em forma de comportamento (Mysore et al., 2010). Essa sensibilidade fisiológica é possível de ser capturada e mensurada por meio do eletroantenógrafo, aparelho capaz de detectar a resposta elétrica desencadeada pela antena, quando essa entra em contato com o composto químico alvo (Janssen et al., 1997; López-Riquelme et al., 2006).

As respostas eletrofisiológicas, no entanto, são pouco compreendidas nas formigas cortadeiras, grupo que apresenta uma distribuição polimórfica associada a perfis comportamentais essenciais para a manutenção da colônia. Assim, além da interação com o fungo simbiótico, espécies do gênero *Atta* e *Acromyrmex* apresentam castas e sub castas que, com certo grau de flexibilidade, desempenham atividades específicas (Wilson 1980; 1983). É conhecido que os maiores indivíduos da colônia, ou soldados, por exemplo, executam tarefas mais ligadas à defesa do ninho (Wilson, 1980). Sendo assim, indivíduos dessa sub casta seriam fisiologicamente sensíveis ao feromônio de alarme, compostos produzidos por suas glândulas mandibulares e relacionados a fuga ou ataque (Moser et al., 1968). Por outro lado, as forrageiras, operárias que constantemente transitam entre o interior do ninho e o meio externo, seriam muito sensíveis ao feromônio de trilha, produzido pela glândula de veneno e que possibilitam o recrutamento e forrageio (Tumlinson et al., 1971). No entanto, sabe-se que os soldados, em certos casos, também são recrutados e acabam sendo parte da trilha e do forrageio (Evison & Ratnieks, 2007), e que forrageiras devem sentir o alarme para então fugirem ou mesmo proteger o ninho (Salzemann & Jaffe, 1991). Sendo assim, todas as sub castas seriam potencialmente capazes de detectar todos os feromônios produzidos pela colônia. Porém, devido ao alto grau de polietismo encontrado nas cortadeiras, esses grupos seriam mais sensíveis a certos feromônios do que outros, dependendo do comportamento que os compostos desencadeiam.

Em formigas-cortadeiras, as glândulas de veneno e mandibular, produtoras de feromônio de trilha e alarme, respectivamente, já são bem caracterizadas. No entanto, considerada uma glândula de grande importância na comunicação química de Formicidae (Billen & Morgan, 1998; Morgan, 2009), a de Dufour ainda é uma incógnita na biologia de cortadeiras. Com diferentes funções dependendo da espécie de formiga, o conteúdo dessa glândula já foi descrito para o gênero *Atta* (Eversher & Morgan, 1980; 1981), mas sua função e comportamentos relacionados ainda não foram claramente elucidados. Acredita-se que possa ser parte do conjunto de feromônios encontrados em formigas-cortadeiras, sendo que possui o mesmo ducto de saída que a glândula de veneno (Holldobler & Wilson, 1990), levando a crer que as sub castas e castas seriam olfativamente sensíveis a ele.

Rainhas e machos, castas exclusivamente relacionadas às atividades reprodutivas da colônia, também possuem caracteres morfológicos (i.e., sensilas) que indicam sensibilidade a feromônios (Sujimoto et al., dados não publicados). No entanto, devido a exclusividade reprodutiva, esses seriam muito mais sensíveis a compostos caracterizados como atraentes sexuais. Ainda não há registros sobre glândulas restritamente produtoras de feromônio sexual em cortadeiras. Contudo, devido às características gerais desse grupo de semioquímicos em insetos, como alta volatilidade (Witzgal et al., 2010), uma glândula candidata a produzi-los seria a mandibular. Diretamente ligada ao feromônio de alarme nas operárias de cortadeiras, os compostos por ela liberado nas castas reprodutivas poderiam ser aproveitados como atraentes durante o voo nupcial, o que ainda não foi demonstrado.

Dessa forma, no contexto de variação polimórfica e o polietismo como componentes importantes na comunicação química de cortadeiras, o presente trabalho teve como objetivos: (i) comparar as respostas eletrofisiológicas das sub castas (i.e., jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados) aos extratos das glândulas de veneno e Dufour de forrageiras, e mandibular de soldados; e (ii) comparar a sensibilidade olfativa dos machos ao extrato da glândula mandibular da rainha, e da rainha ao extrato da glândula mandibular do macho, visando compreender a possível participação desse órgão como produtor do feromônio sexual em cortadeiras.

3.2. Material e Métodos

Formigas

Para a realização das análises eletroantegráficas, as formigas operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) foram retiradas de ninhos com aproximadamente três anos de idade, coletados em uma área de plantio de *Pinus* sp., em Itirapina, São Paulo, Brasil. Os ninhos foram mantidos em condições controladas ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ UR). As formigas foram alimentadas com folhas de *Acalypha* sp., maçã e flocos de aveia. Fêmeas virgens e machos foram retirados de dois ninhos durante a saída de ambos para o voo nupcial, fenômeno que ocorreu no início de outubro de 2017 em Piracicaba, São Paulo, Brasil. Ambas as castas reprodutivas também foram mantidas nas mesmas condições microclimáticas dos ninhos, mas alimentados somente com solução de mel a 10%. Os ninhos selvagens foram identificados como sendo de *A. sexdens* com base na morfologia dos soldados coletados durante a revoada (Wilson, 1980).

Determinação das castas e sub castas

A determinação das sub castas de *A. sexdens* foi realizada de duas maneiras. Primeiramente, no momento da coleta de cada operária, essas foram retiradas durante a execução de atividades típicas relacionadas com seus perfis etológicos, segundo Wilson (1980): (i) jardineiras, introduzindo partículas de alimento no fungo simbiote; (ii) generalistas, carregando ovos e pupas; (iii) forrageiras, cortando folhas na câmara de forrageio; e (iv) soldados, não executando atividades específicas. A fim de confirmar as sub castas, foram retiradas medidas da cabeça das operárias para a determinação da variação polimórfica, também segundo Wilson (1980), como segue: (a) jardineiras entre 0,8 e 1,0 mm; (b) generalistas de 1,1 a 1,4 mm; (c) forrageadoras entre 1,5 e 2,9 mm; e (d) soldados com 3,0 mm ou mais. As fêmeas retiradas antes do voo nupcial foram asseguradas como virgens devido a permanência das asas por mais de dez dias após a coleta. Os machos, no entanto, foram considerados como virgens somente por permanecerem vivos por aproximadamente cinco dias em condições de laboratório.

Respostas Eletrofisiológicas

As análises eletrofisiológicas das castas e sub castas foram todas realizadas por meio do eletroantenógrafo. Os testes foram efetuados valendo-se da técnica de fluxo de ar – ‘*puff*’, em que as antenas são retiradas, posicionadas em eletrodos, e sensibilizadas com o estímulo carregado por uma corrente de ar. Para tal, as formigas foram inicialmente mantidas em sala climatizada ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) e suas antenas destacadas com a ajuda de pinças de ponta fina. A ponta do último flagelômero (i.e., clava) foi retirada para estabelecer uma melhor conexão e fechamento do circuito elétrico exigido pela metodologia. A base da antena foi colocada em um capilar de vidro preenchido com solução de Ringer, enquanto a ponta conectada também a um capilar, igualmente preenchido com essa solução salina. Somente para as jardineiras, menores das sub castas, a antena não foi destacada, mas sim a cabeça foi removida e o capilar introduzido até alcançar a base do órgão sensitivo.

Ambos os capilares estiveram em contato com um fio de ouro. Tanto o ouro como o capilar, foram ligados a um amplificador de sinal, codificado pelo Software GC-EAD. Assim fechado o sistema, a antena foi testada com um leve ‘*puff*’ de hexano, confirmando sua sensibilidade. Em uma pipeta Paster, foi colocado um pequeno quadrado de papel filtro embebido com algum dos feromônios estudados. Dessa forma, o ar passou pelo fragmento, carregando os compostos até a antena, para verificar a sensibilização. O pulso de ar foi de 0,68 L/min com duração de 2 segundos, sempre acompanhado por um fluxo constante de ar puro de 0,85 L/min.

O primeiro estímulo testado nas antenas de todas as sub castas foi o extrato de glândulas de veneno de forrageiras de *A. sexdens*. As glândulas foram dissecadas, e isoladas em hexano, mantendo sempre uma concentração de 1 glândula para 1 µl de solvente durante a execução dos testes. Em cada fragmento de papel filtro, portanto, foram colocados 10 µl de extrato. Como comparação e controle, foram utilizados o ar puro e o solvente no mesmo volume do tratamento. Os mesmos procedimentos de dissecação, armazenamento, isolamento, concentração e execução dos testes foram realizados com a glândula de Dufour, também retiradas de forrageiras da mesma espécie. A glândula mandibular passou pelos processos de forma idêntica, com a única diferença na maneira em que foi extraída, no entanto. Seu conteúdo foi recolhido por meio de capilares posicionados e pressionados diretamente na boca de soldados e o extrato acumulado foi armazenado em hexano.

Os extratos da glândula mandibular das rainhas e dos machos também foram recolhidos por meio de capilares. Ambos foram isolados em hexano e utilizados na concentração de 1 glândula para 1 µl de solvente (10 µl de extrato no papel filtro). Todos os procedimentos de retirada da antena, montagem e aquisição das repostas eletrofisiológicas das castas reprodutivas foram os mesmos aplicados nas sub castas e descritos acima. As respostas de todos os testes foram avaliadas por meio da mensuração da amplitude dos picos resultantes da sensibilidade das antenas. Um total de oito repetições para todas as sub castas e castas, assim como para todos os tratamentos, foram acumulados e avaliados.

Estatística

Todos os dados analisados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Os dados que não atenderam aos pressupostos foram transformados por boxcox. A amplitude dos picos dos tratamentos para cada sub casta foi submetida a ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para comparação de médias a 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R©3.4.1.

3.3.Resultados

A metodologia de montagem da antena e obtenção de respostas eletrofisiológicas de rainhas, machos, jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados de *A. sexdens* foi estabelecida com sucesso, sendo que todos os grupos foram sensíveis a todos os estímulos testados (Figuras 1 e 2). Somente a rainha não respondeu ao estímulo ar puro (branco), em nenhuma das

repetições (Figura 2). De maneira geral, as respostas foram geradas em forma de picos de baixa amplitude, mas com constância e repetitividade nos tratamentos avaliados.

Os tratamentos glândula de veneno e de Dufour das forrageiras e glândula mandibular dos soldados tampouco mostraram diferenças entre si nas respostas das antenas de jardineiras, e tão pouco quando comparados com o ar puro (branco) e o solvente hexano (controle), mesmo havendo maior resposta a glândula de veneno ($df = 4$, $F = 1,613$, $P = 0,21$) (Figura 3A). A menor resposta eletrofisiológica foi ao ar puro; os três tratamentos também não mostraram diferenças entre si e com o controle e branco nas generalistas ($df = 4$, $F = 2,10$, $P = 0,1184$) (Figura 3B). O mesmo ocorreu para as forrageiras, com a resposta aos compostos da glândula de veneno levemente maior ($df = 4$, $F = 0,949$, $P = 0,457$) (Figura 3C). O estímulo ar foi a única resposta significativamente menor em soldados ($df = 4$, $F = 5,40$, $P = 0,004$), quando comparada aos tratamentos e hexano, mesmo havendo uma tendência à maior sensibilidade ao conteúdo da glândula mandibular (Figura 3D). Portanto, as respostas eletrofisiológicas aos compostos glandulares e aos controles não mostraram, em geral, diferenças estatísticas em nenhuma das sub castas de *A. sexdens*.

As antenas de rainhas, por outro lado, responderam significativamente mais aos compostos da glândula mandibular de machos do que ao hexano e ao ar puro ($df = 2$, $F = 13,20$, $P = 0,00156$) (Figura 4A). O mesmo ocorreu com os machos, que também responderam mais à glândula mandibular da rainha ($df=2$, $F = 35,78$, $P < 0,001$) (Figura 4B). Quando contrastadas as respostas de machos e rainhas ao conteúdo químico das glândulas do sexo oposto, estes últimos demonstraram ser significativamente mais sensíveis ($df = 1$, $F = 56,55$, $P < 0,001$) (Figura 5).

Figura 1. Respostas eletroantenográficas de jardineiras (A), generalistas (B), forrageiras (C) e soldados (D) de *Atta sexdens* aos conteúdos das glândulas mandibulares de soldados (M), Dufour (Du) e veneno (V) de forrageiras, além do ar puro (branco) (Ap) e do hexano (controle) (H). As barras verticais indicam a voltagem, enquanto as horizontais o tempo da resposta.

Figura 2. Respostas eletroantenográficas da rainha (A) e do macho (B) de *Atta sexdens* aos conteúdos das glândulas mandibular do sexo oposto. Os perfis em A são referentes às respostas das antenas de rainha ao ar puro (Ap), hexano (H) e ao conteúdo da glândula mandibular de machos da mesma espécie (MM). Enquanto em B, as respostas são das antenas de machos quanto ao ar, hexano e o conteúdo da glândula mandibular das rainhas (MR). As barras verticais indicam a voltagem e as horizontais o tempo da resposta.

Figura 3. Respostas (μV) das antenas de jardineiras (**A**), generalistas (**B**), forrageiras (**C**) e soldados (**D**) de *Atta sexdens* aos tratamentos: conteúdo da glândula de veneno e Dufour de forrageiras, das glândulas mandibulares de soldados, do ar puro (branco) e do solvente hexano (controle).

Figura 4. Respostas (μV) das antenas de *Atta sexdens* às glândulas mandibulares de machos e rainhas, do ar (branco) e do solvente hexano (controle). Os gráficos estão separados pelos sexos, sendo (**A**) as respostas eletrofisiológicas de machos ao conteúdo das glândulas mandibulares de rainhas, e (**B**) as respostas das rainhas ao conteúdo da glândula mandibular dos machos.

Figura 5. Comparação das respostas das antenas (μV) de machos e rainhas de *Atta sexdens* ao conteúdo da glândula mandibular do sexo oposto.

3.4. Discussão

Polimorfismo, Polietismo e Percepção Química

O fato de todas as castas e sub castas de *A. sexdens* terem, em menor ou maior intensidade, respondido aos estímulos testados, mostrou que a metodologia desenvolvida foi eficiente para essa espécie. Como uma ferramenta que permite obter resultados eletrofisiológicos comparativos, o estabelecimento da metodologia tornou possível estudos mais detalhados de características proximais envolvendo a comunicação química em formigas cortadeiras, considerando se tratar de um grupo de insetos ainda pouco explorado sob essa perspectiva. Além do mais, a determinação das montagens das antenas, adequações e detalhes dessa técnica para cada um dos grupos de formigas-cortadeiras, permitirá estudos mais aprofundados da relação entre polimorfismo, polietismo e comunicação química nesses insetos.

Andryszak et al. (1990) já haviam investigado e comparado as respostas eletroantenográficas a certos feromônios em operárias, rainha e macho de *A. texana*. No entanto, não trataram das subdivisões encontradas dentro das operárias e, tampouco compararam as respostas fisiológicas com os perfis etológicos e interações com o ambiente. Já em *A. mexicana*, López-Riquelme et al. (2006), apesar de não terem explorado todos os possíveis grupos polimórficos de operárias, testaram a sensibilidade de forrageiras, carregadoras de cadáveres e soldados ao ácido oleico. Produto da decomposição de formigas e, consequentemente, atraente para as operárias carregadoras de cadáveres, as respostas eletrofisiológicas indicaram que os soldados são as operárias mais especializadas, devido, entre

outros fatores, a pouca sensibilidade a esse composto. Assim, tal trabalho já indica a relação da comunicação química com a formação das castas em cortadeiras.

O fato da maior parte das respostas das sub castas de *A. sexdens* não terem sido significativamente diferentes entre os tratamentos corrobora duas propriedades atribuídas às formigas-cortadeiras que merecem ser destacadas. A primeira diz respeito a morfologia do aparelho olfativo, dos compostos e proteínas envolvidas na percepção química, e de características neurofisiológicas presentes nesse contexto. O principal apêndice olfativo das formigas são as antenas, basicamente compostas por pequenos órgãos denominados sensilas (Chapman, 1998). Essas estruturas podem se assemelhar a pelos ou configurarem aberturas diretamente distribuídas pela cutícula da antena, e ainda são classificadas de acordo com sua anatomia (e.g., ausência e presença de poros) e suas funções (Hashimoto, 1990; Renthal et al., 2003; Nakanishi et al., 2009). Há as chamadas *chaetica*, por exemplo, longas estruturas sensíveis a estímulos mecânicos e químicos (Nakanishi et al., 2009). Já as *basicônicas*, também filiformes, são órgãos responsáveis pela percepção de compostos mais longos e pesados, como os hidrocarbonetos de cutícula (Ozaki et al., 2005). Apesar de serem diversas entre as operárias de formigas-cortadeiras, não há diferenças qualitativas entre as sub castas de *A. sexdens*. Em outras palavras, as jardineiras, generalistas, forrageiras e soldados possuem os mesmos nove tipos de sensilas: *chaetica I, II e III*; *basicônica*; *tricoidea I e II*; *ampulacea*, *coeloconica* e *coelocaptular*. A maior diferença está na quantidade dessas em suas antenas (Sujimoto et al., dados não publicados). Assim, mesmo que haja, como mostraram os resultados, tendências a maior ou menor sensibilidade aos diferentes tratamentos, todas as sub castas seriam capazes de detectar o conteúdo das glândulas de veneno e Dufour de forrageiras, e das mandibulares de soldados, sendo que igualmente possuem as sensilas necessárias para essas percepções. Portanto, haveria um número mínimo de tais estruturas para alcançar um limiar neurofisiológico de resposta para os estímulos testados. Acima desse número, seria possível uma maior resposta aos estímulos.

De qualquer forma, uma candidata a sensibilidade aos feromônios de trilha (produzido pela glândula de veneno) seriam as sensilas *chaetica* (Nakanishi et al., 2009), as quais, mesmo quantitativamente se diferindo quando comparadas as antenas das sub castas, ainda assim foram as mais abundantes em todas elas (Sujimoto et al., dados não publicados). O fato de todas as variações de operárias serem igualmente sensíveis ao feromônio de trilha, traz a importância desses compostos como mensagens químicas não somente presentes nas trilhas de forrageio, locais majoritariamente dominados por indivíduos de tamanho médio (Wilson, 1980). Esses compostos estão presentes no meio externo, assim como potencialmente podem ser parte das

atividades internas, agindo como marcadores de caminhos entre as câmaras e túneis, parte das atividades de descarte de lixo, e outras tarefas. Em todos esses processos, virtualmente há a participação das quatro sub castas, corroborando com a comum percepção a esses compostos. Quando comparadas as sensibilidades ao feromônio de trilha em operárias, machos e rainhas de *A. texana*, ambos os sexos são mais sensíveis a esse estímulo (Andryszak et al., 1990). Esse dado, no entanto, para *A. sexdens*, diferiu dos perfis comportamentais de tais grupos.

O conteúdo da glândula mandibular dos soldados, compostos químicos formadores do feromônio de alarme em cortadeiras (Moser et al., 1968), possivelmente são percebidos pelas sensilas *tricoidea do tipo I* (DumPERT, 1972). Essas ocorreram em grande quantidade nas antenas de todas as sub castas de *A. sexdens*, mas são significativamente mais abundantes em forrageiras e soldados. Tal abundância explicaria ao menos a tendência à maior sensibilidade ao feromônio de alarme nessas operárias tão especializadas. Apesar da conotação levada pelo nome, os soldados podem ser, como em *A. laevigata* (Salzemann & Jaffe, 1991), auxiliados pelas forrageiras em ataques aos ninhos, mostrando a importância da sensibilidade aos compostos de alarme também por tal grupo. De qualquer modo, as propriedades físico-químicas desse feromônio o definem como muito volátil (Wilson & Bossert, 1963), caracterizando uma mensagem mais eficiente no ambiente externo do que dentro dos ninhos de cortadeiras, tendo em vista a baixa circulação de ar entre as câmaras (Bollazzi et al., 2012). No entanto, as menores sub castas, predominantemente responsáveis pelo cuidado com a prole, fungo e rainha (Wilson, 1980), foram sensíveis ao feromônio de alarme. Em *A. sexdens*, as jardineiras são as menos sensíveis ao conteúdo da glândula mandibular, o que estaria relacionado com seus papéis quase exclusivamente executados no ambiente interno do ninho, e a atividades inicialmente não ligadas a comportamentos agonísticos (Wilson, 1980). Já as generalistas, percebem o feromônio de alarme a semelhança do que detectam as forrageiras e soldados. Portanto, elas seriam potencialmente capazes de o utilizarem como mensagem química mediadora de comportamentos como o transporte da prole em momentos de distúrbio e invasão (Wilson, 1980), mesmo sendo fisicamente mais difícil a dispersão desse semioquímico nas câmaras e túneis do ninho.

O conteúdo da glândula de Dufour, já quimicamente caracterizado (Evershed, 1981), ainda não foi diretamente relacionado a comportamentos específicos em cortadeiras, como a glândula de veneno e a formação de trilha (Tunlinsom et al., 1971). Entretanto, em algumas espécies de formigas, essa mesma glândula produz feromônios de trilha (*Monomorium pharaonis*, Ritter et al., 1977; *Solenopsis invicta*, Vander Meer et al., 1981, 1988; Alvarez et al., 1987), enquanto em outras o seu conteúdo é caracterizado como feromônio de alarme

(*Formica* spp., Regnier & Wilson, 1971; Löfqvist, 1976; Dlussky & Chernyshova, 1975; *Lasius* spp., Regnier & Wilson, 1969; Dumpert, 1972; *Camponotus ligniperda*, Bergström & Löfqvist, 1972; *Acanthomyops claviger*, Regnier & Wilson, 1968). Também não foram descritas estruturas olfativas, como as sensilas, relacionadas à percepção desses conteúdos em formigas cortadeiras. Mesmo frente a um cenário desconhecido, os resultados mostraram que todas as sub castas em *A. sexdens* foram capazes de fisiologicamente detectar esses compostos.

Além das sensilas, a percepção química ainda é dependente de uma maquinaria bioquímica e molecular inicialmente presente no lúmen dos órgãos olfativos. Em um primeiro momento, as moléculas entram pelos poros ou aberturas das sensilas e passam a ser carregadas por proteínas ligantes, denominadas OBPs ('*odorant binding proteins*'). Quando já atravessado o lúmen das sensilas, essas proteínas se conectam à receptores olfativos, ORs, ('*odorant receptors*'), que então iniciam a transdução de um sinal nos dendritos dos neurônios ali presentes (Leal, 2013). Além da variação da quantidade de neurônios associados às sensilas (Nakanishi et al., 2009; Mysore et al., 2010), os grupos taxonômicos ou mesmo espécies possuem quantidades de OBPs e ORs variáveis (Zhou et al., 2012; Slone, et al., 2017). Esse é o caso da formiga-cortadeira *A. vollenweideri*, o qual apresenta variações entre as operárias maiores e menores nos genes que expressam os ORs, até mesmo indicando uma possibilidade de dois candidatos a receptores de feromônio de trilha (Koch et al., 2013). O mesmo ocorre entre os sexos da mesma espécie, em que machos possuem dois genes candidatos a receptores de feromônio sexual (Koch et al., 2013). Portanto, seria plausível afirmar que as mesmas diferenças possam ocorrer entre as operárias e mesmo entre os sexos de *A. sexdens*, adicionando mais uma provável perspectiva proximal para explicar as discrepâncias e semelhanças eletrofisiológicas entre as operárias.

Quanto à segunda propriedade, muitas espécies de formigas, mesmo aparentando possuir certos padrões polimórficos acompanhados por um polietismo pouco flexível, comumente realizam alocações de tarefas (Gordon & Mehdiabadi, 1999), ou simplesmente participam de mais atividades do que se acreditava. É o caso das jardineiras de *A. cephalotes*, que frequentemente são encontradas nas trilhas de forrageio. As menores formigas dessa espécie, portanto, não somente são responsáveis pelo cuidado com o fungo, prole e rainha, mas também participam na manutenção das trilhas, depositando feromônio ao longo do substrato (Evison et al., 2008). Em *A. colombica*, por outro lado, as mesmas mínimas integram-se às trilhas, mas sendo carregadas pelas forrageiras e livrando-as de ovos de parasitoides (Feener & Moss, 1990). Também as forrageiras também atuam na defesa em *A. laevigata* (Salzemann & Jaffe, 1991) e soldados no transporte de materiais vegetais mais pesados na mesma espécie e

também em *A. sexdens* (Evison & Ratnieks, 2007). Com a importância da comunicação química e frente a essas flexibilidades nos comportamentos dos grupos polimórficos de cortadeiras, as operárias, de fato, seriam fisiologicamente capazes de responderem a uma gama de compostos maior do que aqueles esperados pelos seus perfis etológicos clássicos. Os resultados, portanto, corroboram com o gradual movimento de flexibilização na compreensão da relação polimorfismo e polietismo em formigas cortadeiras.

Dimorfismo Sexual

Em muitas espécies de insetos, a atração e corte entre os sexos são mediadas por compostos químicos diversos, denominados feromônios sexuais (Tillman et al., 1999). Em formigas, essas mensagens também fazem parte de sua biologia reprodutiva, mas ainda são pouco exploradas (Billen & Morgan, 1998), possivelmente devido à dificuldade em estudá-los durante o voo nupcial. O primeiro relato de feromônio sexual em formigas foi para *Xenomyrmex floridanus*, no qual Hölldobler (1971) demonstrou que a fonte desse semioquímico é a glândula de veneno, sendo produzido pela fêmea para atrair os machos. Em cortadeiras, ainda não houve a descrição de um feromônio sexual, mas os resultados mostraram que os compostos da glândula mandibular, com a função de alarme nas operárias, podem também ser utilizados como sexuais pelas castas reprodutivas. Algumas evidências mostram que há diferenças no conteúdo da glândula mandibular entre os sexos em formigas, corroborando com a possível função desses compostos como feromônio sexual (Do Nascimento et al., 1993; Billen & Morgan, 1998). As fêmeas da espécie de formiga escravizadora, *Polyergus rufescens*, utilizam os compostos da glândula mandibular como atraentes aos machos (Grasso et al., 2003). Em machos de *Camponotus thoracicus fellah*, a mesma glândula pode ser produtora de feromônio sexual (Lloyd et al., 1984). Em *A. sexdens*, não somente as sub castas possuem conteúdos da glândula mandibular diferentes, mas também as rainhas (virgens e fecundadas) e os machos, mostrando um dimorfismo sexual relativo a esse órgão já no nível bioquímico (Do Nascimento et al., 1993).

Os dois sexos responderam ao conteúdo da glândula do oposto, ficando claro que podem percebê-lo. No entanto, a resposta do macho foi significativamente maior que a da fêmea, sugerindo que seria o conteúdo das fêmeas quem atrairia os machos. Machos e fêmeas de *A. texana* também são sensíveis a compostos caracterizados como feromônio de alarme, sendo as fêmeas mais sensíveis que os machos (Andrzejak et al., 1990). No entanto, os testes eletrofisiológicos aparentemente não foram realizados com o conteúdo extraído diretamente da

glândula de cada sexo, não sendo possível, portanto, relacionar a ação do feromônio de alarme como também sexual em *A. texana*.

A sensila candidata a perceber feromônios de alarme são as *tricoidea do tipo I* (Dumpert, 1972), presentes em ambos os sexos, mas com um número maior que o dobro nas antenas dos machos (Sujimoto et al., dados não publicados). Baseando-se na ideia do limiar neurofisiológico de resposta e as sensilas, ambos são capazes de detectar tal estímulo químico por possuírem um número mínimo de *tricoidea*. No entanto, o fato dos machos possuírem o dobro, potencialmente aumentaria a sensibilidade ao feromônio de alarme.

Conclusão

As respostas eletrofisiológicas das antenas das castas e sub castas de *A. sexdens* aos semioquímicos testados, foram de grande valia para uma melhor compreensão da biologia e comportamento destas formigas-cortadeiras. Do mesmo modo, mas de maneira mais específica, dão subsídios para estudos holísticos das peculiaridades e a inegável dependência das formigas da comunicação química. A semelhança nas respostas claramente mostra que, apesar dos padrões de tamanho corpóreo variáveis de cortadeiras, todas as operárias apresentaram condições fisiológicas de percepção dos conteúdos das três glândulas exócrinas testadas. Consequentemente, isso reflete nos variados papéis comportamentais que desempenham dentro e fora do ninho. Contudo, testes variando as concentrações dos tratamentos ainda devem ser realizados, possibilitando entender o quão dependente as respostas eletroantenográficas são para as mudanças desse fator, caracterizando limiares neurofisiológicos para cada estímulo em cada grupo de formigas. Ainda, seria válido investigar a sensibilidade das antenas das operárias a outros semioquímicos, como os hidrocarbonetos cuticulares.

Quanto ao dimorfismo sexual, a alta sensibilidade do macho ao conteúdo da glândula mandibular da fêmea corrobora com a atribuição desse órgão como um possível produtor de feromônio sexual em *A. sexdens*. Os próximos passos, no entanto, seriam testar eletrofisiologicamente outras fontes produtoras de candidatos a feromônio sexual, como a de veneno e Dufour de ambos os sexos, e diferentes concentrações dos mesmos. Além do mais, serão necessários ensaios comportamentais para demonstrar e descrever a atividade sexual mediado pelo possível feromônio, comprovando sua efetividade.

Tendo em vista a importância das formigas-cortadeiras como pragas, estudos eletrofisiológicos são válidos em abordagens mais aplicadas, como as descobertas de potenciais

atraentes, por exemplo, em iscas formicidas. Já quanto aos aspectos mais básicos, essa perspectiva muito soma por auxiliar a desvendar o complexo cenário envolvendo a comunicação química, polimorfismo e polietismo no grupo *Attina*.

Referências

- Alvarez, F. M.; Vander Meer, R. K.; Lofgren, C. S. Synthesis of homofarnesenes: trail pheromone components of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Tetrahedron*, 43: 2897-2900. 1987.
- Andryszak, N. A., Payne, T. L., Dickens, J. C., Moser, J. C., Fisher, R. W. Antennal olfactory responsiveness of the texas leaf cutter ant (Hymenoptera: Formicidae) to trail and its two alarm substances. *Journal of Entomological Science*, 25(4), 593-599. 1990.
- Bergström, G.; Löfqvist, J. Similarities between the Dufour gland secretions of the ant *Camponotus ligniperda* (Latr.) and *Camponotus herculeanus* (L.) (Hym.). *Entomologica Scandinavica*, 3(2): 225-238. 1972.
- Billen, J.; Morgan, E. D. Pheromone Communication in Social Insects: Sources and Secretions. In: Vander Meer, R. K., Breed, M. D., Espelie, K. E., Winston, M. L. , ed, *Pheromone Communication in Social Insects, Ants, Wasps, Bees and Termites*, pp. 3-33. Westview Press. 1998.
- Bjostad, L. B., 1998. Electrophysiological Methods. In: Millar, J. G.; Haynes, K. F., 2nd edition, *Methods in Chemical Ecology*, vol. 1, Kluwer Academic Publishers, pp. 339-375.
- Bollazzi, M., Forti, L. C. and Rocas, F., 2012. Ventilation of the giant nests of *Atta* leaf-cutting ants: does underground circulating air enter the fungus chambers? *Insectes Sociaux*, 59(4), 487-498.
- Bradshaw, J. W. S.; Baker, R.; P. E. Howse. Multicomponent alarm pheromones in the mandibular glands of major workers of the African weaver ant, *Oecophylla longinoda*. *Physiological Entomology*, 4:15-25. 1979.
- Chapman, R. F., 1998. Chemoreception. In: Chapman, R. F. *The Insects, Structure and Function*, Cambridge University Press, New York, pp. 636-654.
- Conte, Y. L.; Hefetz, A. Primer pheromones in social hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 53:523-42. 2008.
- Czaczkes, T. J.; Grüter, C.; Ratnieks, F. L. W. Trail pheromones: an integrative view of their role in social insect colony organization. *Annual Review of Entomology*, 60: 581-99. 2015.

- Dlussky, G. M.; Chernyshova, N. B. Alarm pheromone of the ant *Formica aquilonia* Yarrow (Hymenoptera: Formicidae). Vestnik Moskovskogo Gosudarstvennogo Universiteta, 30: 41-46. 1975.
- Do Nascimento, R. R.; Morgan, E. D.; Billen, J.; Schoeters, E.; Della Lucia, T. M. C.; Bento, J. M. S. 1993. Variation with caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. Journal of Chemical Ecology, 19, 907-918.
- Dumpert, K. Alarmstoffrezeptoren auf der Antenne von *Lasius fuliginosus* (Latr.) (Hymenoptera, Formicidae). Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 76: 403-425. 1972.
- Evershed, R. P.; Morgan, E. D. A chemical study of the Dufour glands of two attine ants. Insect Biochemistry, 10: 81-86. 1980.
- Evershed, R. P.; Morgan, E. D. Chemical investigations of the Dufour gland contents of attine ants. Insect Biochemistry, 11(3): 343-351. 1981.
- Evison, S. E. F.; Hart, A. G.; Jackson, D. E. Minor workers have a major role in the maintenance of leafcutter ant pheromone trails. Animal Behaviour, 75: 963-969. 2008.
- Evison, S. E. F.; Ratnieks, F. L. W. New role for majors in *Atta* leafcutter ants. Ecological Entomology, 32: 451-454. 2007.
- Feener, D. H.; Moss, K. A. G. Defense against parasites by hitchhikers in leaf-cutting ants: a quantitative assessment. Behavioral Ecology and Sociobiology, 26: 17-29. 1990.
- Gordon, M.; Mehdiabad, N. J. Encounter rate and task allocation in harvester ants. Behavioral Ecology and Sociobiology, 45: 370-377. 1999.
- Grasso, D. A.; Visicchio, R.; Castracani, C.; Mori, A.; Le Moli, F. The mandibular glands as a source of sexual pheromones in virgin queens of *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae). Italian Journal of Zoology, 70: 229-232. 2003.
- Hashimoto, Y., 1990. Unique feature of sensila on the antennae of Formicidae (Hymenoptera). Applied Entomology and Zoology, 4, 491-501.
- Hernández, J. V.; López, H.; Jaffe, K. Nestmate recognition signals of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. Journal of Insect Physiology, 48: 287-295. 2002.
- Hernández, J. V.; Goitía, W.; Osio, A.; Cabrera, A.; Lopez, H.; Sainz, C.; Jaffe, K. Leaf-cutter ant species (Hymenoptera: *Atta*) differ in the types of cues used to differentiate between self and others. Animal Behaviour, 71: 945-952. 2006.
- Holldobler, B. Sex pheromone in the ant *Xenomyrmex floridanus*. Journal of Insect Physiology, 17: 1497-1499. 1971.

- Holldobler, B. and Wilson, E. O., 1990. The ants. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Hughes, W. O. H.; Howse, P. E.; Vilela, E. F.; Goulson, D. The response of grass-cutting ants to natural and synthetic versions of their alarm pheromone.
- Janssen, E.; Hölldobler, B.; Kern, F.; Bestmann, H. J.; Tsuji, K. Trail Pheromone of Myrmicine Ant *Pristomyrmex pungens*. Journal of Chemical Ecology, 4: 1025–1034. 1997.
- Koch, S. I.; Groh, K.; Vogel, H.; Hannson, B. S.; Kleineidam, C. J.; Wilde, E. G. Caste-specific expression patterns of immune response and chemosensory related genes in the leaf-cutting ant, *Atta vollenweideri*. PLOS One, 8, 1-17, 2013.
- Leal, W. S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. Annual Review of Entomology, 58: 373–91. 2013.
- Lloyd, H. A.; Schmuff, N. R.; Hefetz, A. Chemistry of the male mandibular gland secretion of the carpenter ant, *Camponotus thoracicus fellah* Emery. Comparative Biochemistry and Physiology, 78(3): 687-689. 1984.
- Löfqvist, J. Formic acid and saturated hydrocarbons as alarm pheromones for the ant *Formica rufa*. Journal of Insect Physiology, 22(10): 1331-1346. 1976.
- López-Riquelme, G. O.; Malo, E. D.; Cruz-López, L.; Fanjul-Moles, M. L. Antennal olfactory sensitivity in response to task-related odours of three castes of the ant *Atta mexicana* (Hymenoptera: Formicidae). Physiological Entomology, 31: 353–360. 2006.
- Morgan, E. D. Trail pheromone of ants. Physiological Entomology, 34: 1–17. 2009.
- Moser, J. C.; Brownlee, R. C.; Silverstein, R. Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. Journal of Insect Physiology, 14: 529-535. 1968.
- Mysore, K.; Shyamala, B. V.; Rodrigues, V. Morphological and developmental analysis of peripheral antennal chemosensory sensilla and central olfactory glomeruli in worker castes of *Camponotus*. Arthropod Structure and Development, 39: 310-321. 2010.
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F. and Nishikawa, M. Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. Cell Tissue Research, 338, 79-97. 2009.
- Ozaki, M., Wada-Katsumata, M., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nisimura, T. and Yamaoka, R. Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. Science, 309, 311-314. 2005.
- Regnier, F. E.; Wilson, E. O. The alarm-defense system of the ant *Acanthomyops claviger*. Journal of Insect Physiology, 14(7): 955-970. 1968.

Regnier, F. E.; Wilson, E. O. The alarm defense system of the ant *Lasius alienus*. *Journal of Insect Physiology*, 15(5): 893-898. 1969.

Regnier, F. E.; Wilson, E. O. Chemical communication and “propaganda” in slave-maker ants. *Science*, 172: 267-269. 1971.

Renthal, R., Velasquez, D., Olmos, D., Hampton, J. and Wergin, W. P. Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron*, 34, 405-413. 2003.

Richard, F. J.; Hefetz, A.; Christides, J. P.; Errard, C. Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Chemoecology*, 14:9–16. 2004.

Ritter, F. J.; Bruggemann-Rotgans, I. E. M.; Verwiel, P. E. J.; Persoons, C. J.; Talman, E. Trail pheromone of the pharaoh’s ant, *Monomorium pharaonic*: isolation and identification of faranal, a terpenoid related to juvenile hormone II. *Tetrahedron Letters*, 30: 2616-2618. 1977.

Schinider, D. Insect antennae. *Annual Review of Entomology*, 9: 103-122. 1964.

Salzemann, A.; Jaffe, K. Polyéthisme et défense de la société chez la fourmi champignoniste *Atta laevigata* (Fr. Smith). *Insectes Sociaux*, 38: 149-159. 1991.

Slone, J. S.; Pask, G. M.; Ferguson, S. T.; Millar, J. G.; Berger, S. L.; Reinberg, D.; Liebig, J.; Ray, A.; Zwiebel, L. Functional characterization of odorant receptors in the ponerine ant, *Harpegnathos saltator*. *PNAS*, doi 10.1073, 1704647114. 2017.

Soroker, V.; Fresneau, D.; Hefetz, A. Formation of Colony Odor in Ponerine Ant *Pachycondyla apicalis*. *Journal of Chemical Ecology*, 6: 1077–1090. 1998.

Steinbrecht, R. A. Pore structures in insect olfactory sensilla: a review of data and concepts. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 26: 229-245. 1997.

Tillman, J. A.; Seybold, S. J.; Jurenka, R. A.; Blomquist, G. J. Insect pheromones: an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 481–514. 1999.

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*, 234: 348-349. 1971.

Vander Meer, R. K. Williams, F. D.; Lofgren, C. S. Hydrocarbon components of the trail pheromone of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*. *Tetrahedron Letters*, 22: 1651-1654. 1981.

Vander Meer, R. K.; Alvarez, F.; Lofgren, C. S. Isolation of the trail recruitment pheromone of the *Solenopsis invicta*. *Journal of Chemical Ecology*, 14: 825-838. 1988.

Wilson, E. O.; Bossert, W. H. Chemical communication among animals. *Recent Progress in Hormone Research*, 19: 673-716.

Wilson, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*), I: The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 7(2): 143-156. 1980.

Wilson, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*), IV: Colony ontogeny of *A. cephalotes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 14(1): 55-60. 1983.

Witzgall, P.; Kirsch, P.; Cork, A. Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 80–100. 2010.

Zhou, X.; Slone, J.; Rokas, A.; Berger, S.; Liebig, J.; Ray, A.; Reinberg, D.; Zwiebel, L. J. Phylogenetic and transcriptomic analysis of chemosensory receptors in a pair of divergent ant species reveals sex-specific signatures of odor coding. *PLOS Genetics*, 8: e1002930. 2012.

4 PAPEL DAS SUB CASTAS E IMPORTÂNCIA DA RAINHA NOS COMPORTAMENTOS DE TROFALAXIA E *GROOMING* EM *Atta sexdens*

Fernando Ribeiro Sujimoto¹, Camila Moreira Costa¹, José Maurício Simões Bento^{1*}

¹ Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Departamento de Entomologia e Acarologia, Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil.

*Autor correspondente: José Maurício Simões Bento, Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ/USP. Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil. E-mail: jmsbento@usp.br

Manuscrito em preparação para *Insectes Sociaux*

Resumo

A manutenção de uma colônia de formigas depende de atividades contínuas, como a troca de alimento e limpeza entre os indivíduos. A trofalaxia auxilia na alimentação da colônia como um todo, garantindo a nutrição do formigueiro; enquanto o *grooming* assegura a higienização dos indivíduos. As formigas do grupo Attini também executam essas atividades, sendo o alto caráter polimórfico um possível fator de importância para essas dinâmicas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi compreender a participação das sub castas e a presença da rainha nas dinâmicas de trofalaxia, *self-grooming* e *allogrooming* em *Atta sexdens*. Além disso, buscou-se correlacionar os resultados com seus perfis comportamentais e a provável participação dessas atividades na dispersão de compostos cuticulares de reconhecimento. Por meio de observações comportamentais, foi possível concluir que houve variações quantitativas entre os tipos de operárias que receberam e doaram o alimento. O mesmo padrão foi observado para a limpeza mútua (*allogrooming*) e a autolimpeza (*selfgrooming*). Com relação à rainha, as mínimas foram as mais frequentes sob seu corpo, e sua presença nas câmaras não foi relevante para os comportamentos estudados. Tendo em vista todos os dados coletados quanto ao *grooming* e trofalaxia, e levando em conta o polimorfismo e polietismo de formigas-cortadeiras, as duas atividades parecem ser partes importantes no cenário de dispersão e manutenção do *gestalt* químico da colônia.

Palavras-chave: Limpeza; Troca de alimento; Formigas-cortadeiras; Reconhecimento; Polimorfismo; Polietismo

Abstract

The maintenance of an ant colony depends on many continuous activities, as the food exchange and grooming. The trophallaxis assists the colony feeding as a whole, ensuring the nutrition of the nest; while the grooming provides the hygiene of the individuals. The derived ants belonged to Attina subtribe execute these activities, and the high polymorphic features are likely important factors to these dynamics. The aim of this work was to comprehend the role of

each sub caste and the presence of the queen in the trophallaxis and grooming dynamics of *Atta sexdens*. Furthermore, it searched for a correlation among the results, the ants' ethological profiles and a possible participation of these activities in the cuticular compounds dispersion. Behavioral observations, made possible to conclude that there are quantitative variations among the types of workers, which received and donated food. The same occurred for the self- and allogrooming. Minor workers were the most frequent over the queen's body, and her presence was not relevant for the studied activities. Analysis of all the collected data about grooming and trophallaxis, and the addition of polymorphism and polyethism in leaf cutter ants, results seemed to be an important part in the scenario of dispersion and conservation of the colony chemical gestalt.

Keywords: Hygiene; Food exchange; Leaf cutter ants; Recognition; Polymorphism; Polyethism

4.1.Introdução

A manutenção de uma colônia de insetos sociais está ligada a uma grande variedade de comportamentos que os tornam únicos no reino animal. A trofalaxia está entre os mais importantes fenômenos. Identificado pelo comportamento de troca de alimento líquido entre indivíduos da mesma colônia via ânus ou aparelho bucal, é caracteristicamente encontrada em muitos representantes de Hymenoptera sociais (Holldobler & Wilson, 1990). Essa dinâmica, no entanto, é variável dentro de Formicidae, ocorrendo significativamente mais em alguns grupos do que em outros (Wilson, 1971). Sua grande importância, além da nutrição direta, parece estar relacionada com a troca de informações alimentares entre os indivíduos (Sendova-Franks et al., 2010; Grenwald et al., 2015). Mais especificamente, esse processo informaria e atualizaria as operárias sobre o *status* alimentar da colônia, visto que na maioria dos casos são poucas aquelas envolvidas diretamente no forrageio (Pinter-Wollman et al., 2013; Greenwald et al., 2015).

O comportamento de limpeza, assim como a trofalaxia, também se tornou outro fator determinante na evolução da socialidade em muitos grupos de insetos, como abelhas e formigas (Hunt, 1982; Holldobler & Wilson, 1990). O surgimento de uma constante limpeza do ninho e dos indivíduos que nele habitam, foi essencial para a formação do conceito de imunidade social, sendo uma das razões que possibilitou a consolidação e diversificação dos insetos eusociais (Walker & Hughes, 2009). Quanto a higienização dos indivíduos, essa é denominada *grooming* e dividida em duas categorias: *self* e *allogrooming*. A primeira designa a autolimpeza promovida pelas operárias; enquanto a segunda a limpeza entre elas. Dentro do *allogrooming* inclui-se a higienização da rainha pelas operárias (Holldobler & Wilson, 1990).

O *grooming* e trofalaxia, além da função direta de higienização dos corpos dos indivíduos, também estão relacionados com a dispersão dos hidrocarbonetos de cutícula (HCs) em algumas espécies (Dahbi et al., 1999; Boulay et al., 2004). A limpeza das partes do corpo é

primordialmente realizada pela boca, local onde se encontra a glândula pós-faringeana, produtora e acumuladora de HCs. Quando promovem a autolimpeza, portanto, as formigas concentram os hidrocarbonetos da própria cutícula nessa estrutura (Soroker et al., 1994). O mesmo fazem para o *allogrooming*, mas reunindo os compostos cuticulares das outras operárias. Portanto, por meio de ambos os tipos de limpeza, essas passam os compostos umas às outras, muitas vezes auxiliado pela trofalaxia. Dessa forma, tais comportamentos são essenciais para a manutenção da identidade química da colônia (Soroker et al., 1994, 1995, 1998).

Em muitas espécies ainda, a rainha produz compostos cuticulares únicos (Liebig et al., 2000; Tentschert et al., 2002; D'Ettorre et al., 2004), os quais podem ser utilizados como feromônio que afetam o comportamento das operárias (Klobuchar & Deslippe, 2002; Holman et al., 2010). Esses possivelmente seriam, como nas operárias, também dispersos por meio dos comportamentos de trofalaxia e *grooming*, ou mesmo pelo simples contato com a rainha (Sorensen et al., 1984), aumentando a importância da compreensão de como essa dinâmica ocorre dentro do ninho.

Em formigas-cortadeiras, no entanto, a complexidade dos repertórios comportamentais é biologicamente notória devido ao intenso e contínuo cuidado com o fungo simbiote, e pelo incomparável polimorfismo e polietismo evidente nas castas e sub castas (Wilson, 1980). Entre esses repertórios, fazem parte a trofalaxia e as limpezas entre os indivíduos (Richard & Errard, 2009). Apesar do já conhecido alto grau de complexidade desses dois comportamentos em Formicidae, ainda pouco se sabe sobre a frequência com que ocorrem em ninhos de formigas Attini e a participação de cada sub casta, tanto na troca de alimento, quanto nas limpezas. É frente ao polimorfismo e polietismo, que o objetivo deste trabalho visou compreender os papéis de cada sub casta e da rainha da formiga cortadeira *Atta sexdens* nos comportamentos de trofalaxia e *grooming*.

4.2. Material e Métodos

Formigas

Para as observações, quatro colônias de *A. sexdens* foram separadas, todas com a mesma idade (aproximadamente 4 anos), alimentadas com as mesmas fontes (folhas de *Averrhoa carambola*, *Acalypha* sp., maçãs e flocos de aveia) e com seus ninhos organizados em potes plásticos (compostos por uma câmara de forrageio, uma de fungo sem a rainha, uma de fungo

com a rainha, e uma de lixo) conectados por mangueiras. Os ninhos foram mantidos em uma sala climatizada com fotoperíodo de (L: E) 12:12, temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$; $50 \pm 10\%$ UR.

Observações

Três caixas de acrílico transparentes de germinação (11 cm x 11 cm x 3,5 cm) para cada colônia foram utilizadas nos experimentos. As caixas, portanto, representavam as seguintes câmaras: (i) de fungo sem a rainha; (ii) de fungo com a rainha; e (iii) de lixo. Em (i) e (ii) foram adicionadas 120 formigas da sub casta jardineira, 60 generalistas, 16 forrageiras, e 2 soldados. Essa proporção de formigas dentro do ninho está de acordo com o encontrado em Wilson (1983). As sub castas foram estabelecidas pelas atividades que estavam exercendo no momento em que foram retiradas do ninho original, de acordo com Wilson (1980): (a) jardineiras em limpeza de outros indivíduos, na introdução de fragmentos de alimentos no fungo ou em cuidado da prole; (b) generalistas em limpeza de outros indivíduos e cuidado com o fungo; (c) forrageiras em atividade de corte nas câmaras de forrageio; e (d) soldados em qualquer câmara do ninho, não havendo uma atividade em específico. Além disso, as quatro sub castas a serem avaliadas foram determinadas e confirmadas de acordo com o tamanho da cápsula cefálica conforme Wilson (1980): (a) jardineiras entre 0,8 e 1,0 mm; (b) generalistas de 1,1 a 1,4 mm; (c) forrageadoras entre 1,5 e 2,9 mm; e (d) soldados com 3,0 mm ou mais.

Além das formigas, dentro de (i) foram adicionados 10 g de fungo (com coloração escura, condição demonstrando que o fungo foi recentemente alimentado) provenientes da respectiva câmara do ninho original; e um pequeno pote de água para manter ideal a umidade dentro da caixa (condição necessária para sobrevivência do simbionte). A mesma quantidade de formigas, fungo e água foram colocadas em (ii), com a única diferença que a rainha estava presente nessa caixa. Em (iii), por outro lado, foram adicionados 20 g de lixo e 10 formigas ainda vivas presentes na câmara de lixo no momento da montagem do experimento.

Figura 1. Ilustração da montagem do experimento de observação de trofalaxia e *grooming* em formigas cortadeiras de *Atta sexdens*. Esse esquema correspondeu ao tratamento com “câmara de fungo com a rainha”. As demais câmaras foram a “sem a rainha” e “de lixo” com apenas uma porção do descarte e algumas formigas (vide Material e Métodos para maiores detalhes).

As análises de trofalaxia e *grooming* foram realizadas ao mesmo tempo. Ambas seguiram a mesma montagem detalhada acima. As observações foram divididas em manhã, tarde e noite; duraram 30 minutos por colônia em cada um desses períodos; e foram feitas em quatro dias alternados durante uma semana. Ao longo dos 30 minutos foram observados os comportamentos de trofalaxia/*grooming* das três câmaras de todas as colônias, sendo 10 minutos por caixa.

A definição e estabelecimento do comportamento de trofalaxia e *grooming* seguiu a descrição feita em Hölldobler & Wilson (1990). Assim, somente foi caracterizado como trofalaxia quando havia um indivíduo com as mandíbulas abertas e outro em frente coletando líquido do aparelho bucal do anterior. O *grooming* foi determinado como limpeza (com a boca ou pernas) e dividido em dois tipos: *self-grooming* e *allogrooming*. O primeiro é reconhecido pela autolimpeza das partes do corpo; e o segundo pela limpeza de uma outra formiga.

Para a trofalaxia, os seguintes comportamentos foram registrados: a sub casta a que o receptor e emissor pertencem, o local da caixa onde ocorreu a troca de alimento líquido, o tempo estimado de troca, e se houve o toque com as antenas pelo emissor e/ou receptor. Para o *self-grooming* foram anotados: a sub casta do indivíduo, local do corpo em que foi limpo, local da câmara onde ocorreu a limpeza e o tempo estimado. O mesmo foi feito para o *allogrooming*, com o acréscimo das seguintes informações: sub casta em que pertencem o efector e receptor, e a posição do efector no corpo do receptor.

Além dessas relações entre as operárias, também foram anotados o número total de indivíduos por sub casta que limpavam a rainha em cada período do dia observado, nos quatro dias e as quatro colônias.

Estatística

Modelos lineares generalizados de efeitos mistos de Poisson com medidas repetidas (pacote *lme4*) foram ajustados a cada conjunto de dados de *self-grooming*, *allogrooming* efetor/receptor, trofalaxia efetor/receptor e limpeza da rainha para as câmaras da rainha e do fungo. A casta e os dias de observação foram incluídos como fatores fixos e a colônia como fator aleatório. Com exceção dos dados de *self-grooming* na câmara da rainha, todos os modelos foram ajustados para *overdispersion*. A adequação do modelo foi avaliada utilizando gráficos de semi-normalidade com envelopes de simulação e pela normalidade do resíduo usando o teste de Shapiro-Wilk. A significância da casta foi avaliada utilizando a Anova (pacote *car*) e comparações múltiplas foram realizadas utilizando o pacote ‘multcomp’ a 95% de intervalo de confiança. Os dados do total de formigas observadas no *self-grooming*, *allogrooming* efetor/receptor e trofalaxia efetor/receptor, independente da casta, entre as câmaras da rainha e do fungo foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias utilizando o teste de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Os dados de *allogrooming* efetor/receptor foram transformados via Box-Cox sendo elevados ao λ (lambda) de -1.350871 e -1.669426. A significância da câmara para todos os dados foram avaliados utilizando Teste t de Student a 95% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R® versão 3.4.1.

4.3.Resultados

Trofalaxia

O comportamento de trofalaxia, ocorreu em ambas as câmaras de fungo, com e sem a rainha. Não houve diferença entre as sub castas que doaram o alimento líquido na câmara de fungo com a rainha ($df = 2, \chi^2 = 5,55, P = 0,062$). No entanto, nessa câmara, as forrageiras foram as que mais receberam o conteúdo, em oposição aos soldados (*soldado vs. forrageira* $df = 3, Z = 3,22, P = 0,0065$; Figura 2A). As jardineiras e generalistas não se diferenciaram em relação a essas duas maiores sub castas (*generalista vs. forrageira* $df = 3, Z = 1,43, P = 0,472$; *generalista vs. soldado* $df = 3, Z = 2,14, P = 0,137$; *jardineira vs. forrageira* $df = 3, Z = 2,24, P = 0,110$; *jardineira vs. soldado* $df = 3, Z = 1,41, P = 0,482$; *jardineira vs. generalista* $df = 3, Z =$

0,84, $P = 0,829$; Figura 2A). O maior número de operárias que adquiriram conteúdo foi no primeiro dia, sendo menor no quarto e último dia (*dia 1 vs. dia 4* $df = 3$, $Z = 2,67$, $P = 0,028$; *dia 1 vs. dia 2* $df = 3$, $Z = 0,47$, $P = 0,965$; *dia 1 vs. dia 3* $df = 3$, $Z = 0,896$, $P = 0,804$; *dia 2 vs. dia 3* $df = 3$, $Z = 0,42$, $P = 0,973$; *dia 2 vs. dia 4* $df = 3$, $Z = 2,37$, $P = 0,080$; *dia 3 vs. dia 4* $df = 3$, $Z = 2,02$, $P = 0,178$; Figura 2B). Não houve diferença no processo de troca de alimento líquido na câmara de fungo, tanto para as operárias que doaram ($df = 2$, $\chi^2 = 5,87$, $P = 0,053$), quanto para aquelas que receberam ($df = 3$, $\chi^2 = 5,32$, $P = 0,149$). Na câmara de lixo não foi observada a troca de alimento em qualquer um dos dias.

Figura 2. Eventos de trofalaxia em *Atta sexdens* na câmara de fungo com a rainha. Em **A**, as barras mostram o número de indivíduos das quatro sub castas que receberam o conteúdo trocado durante o comportamento de trofalaxia. Já em **B**, as barras correspondem a quantidade de receptores ao longo do tempo (horas).

Grooming

Durante os 4 dias avaliados (8 dias em sequência no total), todas as sub castas promoveram o *self-grooming* nas câmaras de fungo com e sem rainha (Figura 3A). Houve interação entre os dias de avaliação e as sub castas avaliadas apenas para o comportamento de *self-grooming* ocorrido na câmara de fungo ($df = 9$, $\chi^2 = 32,13$, $P < 0,001$). Na presença do simbionte e ausência da rainha, as forrageiras foram as operárias que mais se auto limpam nos dias observados, com exceção do dia 2 (Figura 3A) (ver tabela em anexo). Para a forrageira, houve uma diferença mais clara e significativa entre a quantidade de eventos de *self-grooming*, somente entre dias 1 e 2 (*dia 1 vs. dia 2* $df = 3$, $Z = 2,60$, $P = 0,04$; *dia 1 vs. dia 3* $df = 3$, $Z = 0,50$, $P = 0,958$; *dia 1 vs. dia 4* $df = 3$, $Z = 1,308$, $P = 0,557$; *dia 2 vs. dia 3* $df = 3$, $Z = 2,12$, $P = 0,145$; *dia 2 vs. dia 4* $df = 3$, $Z = 1,34$, $P = 0,533$; *dia 3 vs. dia 4* $df = 3$, $Z = 0,81$, $P = 0,849$).

Na câmara onde a rainha esteve presente, somente o primeiro dia se diferenciou com a maior quantidade de autolimpezas (*dia 1 vs. dia 2* $df = 3$, $Z = 2,60$, $P = 0,045$; *dia 1 vs. dia 3* $df = 3$, $Z = 3,97$, $P < 0,001$; *dia 1 vs. dia 4* $df = 3$, $Z = 4,76$, $P < 0,001$; *dia 2 vs. dia 3* $df = 3$, $Z = 1,44$, $P = 0,470$; *dia 2 vs. dia 4* $df = 3$, $Z = 2,31$, $P = 0,094$; *dia 3 vs. dia 4* $df = 3$, $Z = 0,88$, $P = 0,811$; Figura 3C). O *self-grooming* foi também maior para as forrageiras e menor para os soldados, estando as jardineiras e generalistas em uma posição intermediária (*soldado vs. forrageira* $df = 3$, $Z = 5,83$, $P < 0,001$; *generalista vs. forrageira* $df = 3$, $Z = 5,83$, $P < 0,001$; *generalista vs. soldado* $df = 3$, $Z = 8,52$, $P < 0,001$; *jardineira vs. forrageira* $df = 3$, $Z = 6,78$, $P < 0,001$; *jardineira vs. soldado* $df = 3$, $Z = 2,94$, $P = 0,0165$; *jardineira vs. generalista* $df = 3$, $Z = 1,16$, $P = 0,644$; Figura 3B). Em todas as câmaras de lixo observadas, os poucos indivíduos que permaneceram vivos durante os experimentos não realizaram autolimpeza.

Figura 3. Eventos de *self-grooming* em *Atta sexdens*. Em **A**, as barras mostram o número de indivíduos das quatro sub castas que auto limpam ao longo do tempo (horas) na câmara de fungo sem a rainha. Em **B**, as barras correspondem a quantidade de indivíduos das diferentes operárias que se auto limpam dentro da câmara de fungo com a rainha; enquanto em **C**, são os números de indivíduos que realizaram o *self-grooming* ao longo do tempo na câmara de fungo com a rainha.

O *allogrooming* também ocorreu nas câmaras com e sem rainha. As jardineiras foram as operárias que significativamente mais efetuaram limpeza mútua dentro da câmara onde havia o fungo sem a rainha, sendo o número de generalistas e forrageiras muito próximo (*generalista vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 2,05$, $P = 0,100$; *jardineira vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 4,65$, $P < 0,001$; *generalista vs. jardineira* $df = 2$, $Z = 2,73$, $P = 0,017$; Figura 4A). Na câmara onde a rainha esteve presente, as jardineiras também foram as que mais realizaram o *allogrooming*, sendo as generalistas intermediárias e as forrageiras as que menos participaram na limpeza mútua (*generalista vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 1,82$, $P = 0,161$; *jardineira vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 3,72$, $P < 0,001$; *generalista vs. jardineira* $df = 2$, $Z = 0,41$, $P = 0,121$; Figura 4B). Soldados não realizaram *allogrooming* em ambas as câmaras.

Em relação às operárias que receberam a limpeza, em todos os dias de observação, jardineiras, generalistas e forrageiras foram as que mais receberam limpeza na câmara de fungo, sendo os soldados os que menos passaram por esse comportamento (*soldado vs. forrageira* $df = 3$, $Z = 4,36$, $P < 0,001$; *generalista vs. forrageira* $df = 3$, $Z = 2,07$, $P = 0,159$; *generalista vs. soldado* $df = 3$, $Z = 2,57$, $P = 0,049$; *jardineira vs. forrageira* $df = 3$, $Z = 0,23$, $P = 0,995$; *jardineira vs. soldado* $df = 3$, $Z = 4,19$, $P < 0,001$; *jardineira vs. generalista* $df = 3$, $Z = 1,83$, $P = 0,253$; Figura 5A). Não havendo interação entre dias e sub castas na câmara em que a rainha esteve presente, foi observado um padrão semelhante do ocorrido na câmara de fungo (*soldado vs. forrageira* $df = 3$, $Z = 3,92$, $P < 0,001$; *generalista vs. forrageira* $df = 3$, $Z = 1,95$, $P = 0,204$; *generalista vs. soldado* $df = 3$, $Z = 2,07$, $P = 0,160$; *jardineira vs. forrageira* $df = 3$, $Z = 1,18$, $P = 0,632$; *jardineira vs. soldado* $df = 3$, $Z = 2,77$, $P = 0,0285$; *jardineira vs. generalista* $df = 3$, $Z = 0,74$, $P = 0,879$; Figura 5B).

Figura 4. Eventos de *allogrooming* em *Atta sexdens*. Em **A**, as barras mostram o número de indivíduos por sub castas que realizaram a limpeza em outras formigas na câmara de fungo sem a rainha. Em **B**, as barras correspondem a quantidade de indivíduos das diferentes sub castas que efetuaram a limpeza dentro da câmara de fungo com a rainha.

Figura 5. Gráficos dos eventos de *allogrooming* em *Atta sexdens*. Em **A**, as barras mostram o número de indivíduos das quatro sub castas que receberam a limpeza na câmara de fungo sem a rainha. Em **B**, as barras correspondem a quantidade de indivíduos das diferentes sub castas que foram limpas dentro da câmara de fungo com a rainha.

Os resultados das quantidades de operárias possivelmente limpando a rainha mostraram interação entre os dias e as sub castas ($df = 6$, $\chi^2 = 19,43$, $P < 0,001$, Figura 6). Nas primeiras 48 horas, as jardineiras e generalistas foram as que mais estiveram presentes sob a rainha, seguido das forrageiras (*generalista vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 1,51$, $P = 0,284$; *jardineira vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 3,23$, $P < 0,001$; *generalista vs. jardineira* $df = 2$, $Z = 1,84$, $P = 0,154$; Figura 6). Nas 72 horas, as jardineiras foram as mais presentes, não havendo diferença entre as generalistas e forrageiras (*generalista vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 0,34$, $P = 0,936$; *jardineira vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 2,37$, $P = 0,046$; *generalista vs. jardineira* $df = 2$, $Z = 2,55$, $P = 0,029$; Figura 6). Em 96 e 120 horas, no entanto, não houve diferenças estatísticas entre as três sub castas (96h: *generalista vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 0,98$, $P = 0,587$; *jardineira vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 0,18$, $P = 0,981$; *generalista vs. jardineira* $df = 2$, $Z = 1,16$, $P = 0,472$; 120h: *generalista vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 0,25$, $P = 0,966$; *jardineira vs. forrageira* $df = 2$, $Z = 1,82$, $P = 0,163$; *generalista vs. jardineira* $df = 2$, $Z = 2,02$, $P = 0,107$; Figura 6). Soldados, em nenhuma circunstância, foram observados sob as rainhas.

Figura 6. Número médio de formigas das quatro sub castas de *Atta sexdens* presentes sobre o corpo da rainha.

Na comparação entre as câmaras do número total de indivíduos que realizaram os comportamentos de trofalaxia (*efetor*: $t = -1,665$, $P = 0,181$; *receptor*: $t = -2,321$, $P = 0,070$), *self-grooming* ($t = -0,685$, $P = 0,527$) *allogrooming* (*efetor*: $t = -0,212$, $P = 0,839$; *receptor*: $t = -0,016$, $P = 0,987$), não houve diferenças estatísticas para qualquer um deles (Figura 7). Todos os eventos, portanto, ocorrem igualmente nas câmaras de fungo e rainha.

Figura 7. Comparação de todos os comportamentos avaliados durante as observações nas câmaras de fungo com a rainha e sem a rainha em *Atta sexdens*.

4.4.Discussão

A constante interação entre os indivíduos dentro da colônia de formigas-cortadeiras é essencial para a manutenção de diversas atividades, que vão desde o cuidado com a prole e rainha, até o cultivo do fungo simbiote (Wilson, 1980a; Wilson, 1980b; 1983). Entre estas interações destacam-se a trofalaxia e o *grooming* (Holldobler & Wilson, 1990). Frente a essa importância social, os resultados obtidos neste trabalho mostram, portanto, que as sub castas em *A. sexdens* realizaram as atividades de troca de alimento via oral e limpeza corporal de modo diferentes, ora acompanhando os padrões polimórficos, ora mostrando certa flexibilidade comportamental independente da variação dos tamanhos corporais. Desse modo, ambos os comportamentos sugerem fazer parte do processo de dispersão dos compostos cuticulares entre os indivíduos da colônia.

Formigas-cortadeiras primordialmente se alimentam das estruturas do fungo simbiote e dos produtos de sua digestão (Quinlan & Cherret, 1979), complementando a dieta por meio da seiva coletada durante o corte, transporte e limpeza do material vegetal forrageado (Littledyke & Cherret, 1976). Dessa forma, é de se esperar que haja a troca de alimento líquido entre as operárias de formigas-cortadeiras. Em *A. sexdens rubropilosa*, a trofalaxia ocorreu nas câmaras de fungo com e sem a presença da rainha, não havendo diferenças na quantidade de eventos observados entre elas. Trofalaxia, portanto, não parece ser um comportamento dependente da presença da rainha nas colônias dessa espécie, ao menos durante o tempo em que durou o experimento. Caracterizada como monogínicas, as formigas-cortadeiras essencialmente dependem da rainha para oviposição (Hölldobler & Wilson, 1990), sendo pouca ou mesmo nenhuma a participação dessa casta permanente em fenômenos como controle da fertilidade das operárias (Hughes & Boomsma, 2008), mas talvez sim no reconhecimento químico da colônia. Assim, na presença da rainha, a ocorrência da trofalaxia como processo de transferência de alimento seria plausível, visto que tal comportamento se faria fisiologicamente necessário, independente da câmara em que ocorra. Sob o ponto de vista da comunicação química, e considerando a possível participação de compostos cuticulares da rainha no *gestalt* químico da colônia, esse comportamento também poderia ser um dos responsáveis pelo transporte dessas mensagens. Além disso, o fato de todos os tipos de operárias virtualmente participarem da trofalaxia corrobora com o seu potencial papel como atividade dispersora de possíveis compostos cuticulares.

Todas as operárias distribuíram o alimento líquido em frequências semelhantes em ambas as câmaras, independente de seus tamanhos e perfis comportamentais. Em relação a obtenção do alimento, as forrageiras foram as que mais receberam dentro da câmara de fungo

com a rainha, levando a crer que essa sub casta teria um papel importante na transferência de informações químicas ao longo do ninho, mais especificamente aos potenciais compostos da rainha. Devido ao seu papel interno (e.g., levando alimento até as câmaras) e externamente ativo (e.g., participando do recrutamento e formação de trilha) as forrageiras virtualmente alcançariam uma maior quantidade de indivíduos e também locais mais distantes. Assim, seriam capazes de maximizar a distribuição de compostos de reconhecimento, fundamentais para a manutenção e controle do fluxo de indivíduos interno e externo. Por outro lado, os soldados receberam menos alimento, sugerindo uma menor importância desse grupo nas interações que permitem a distribuição dos compostos. As generalistas e jardineiras, como indicado pelos dados, intermediariam o transporte no ambiente interno do ninho. Esse levantamento, portanto, demonstra que o comportamento de fornecer alimento via oral seria de igual importância para todas as sub castas, corroborando com a hipótese de que a trofalaxia contribuiria para o *gestalt* químico (Srooker et al., 1995; 1998). No entanto, nas espécies de formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus* e *Acromyrmex octospinosus*, a trofalaxia parece não estar envolvida nessa via de comunicação, visto que os comportamentos de troca de alimento entre formigas não forrageiras em suas colônias pouco foram observados (Richard & Errard, 2009).

Tendo em vista o constante forrageio (e.g., contato com o meio externo), intensa interação entre os indivíduos e mesmo com o fungo, as atividades de limpeza ocorreram com maior frequência entre as operárias das diferentes sub castas, quando comparada com a trofalaxia. A auto e mútua limpeza são, além de essenciais para remoção de detritos e patógenos, comportamentos potencialmente relacionados à dispersão de compostos ao longo da colônia (Srooker et al., 1995). Em *A. sexdens rubropilosa*, a maior frequência de *self-grooming* nas forrageiras estaria possivelmente associada com a sua intensa atividade externa. Em outras palavras, as tarefas como formação de trilha e coleta de alimento exporia essas forrageadoras a um constante risco de contaminação por patógenos, e consequentemente, a dispersão entre os indivíduos da colônia, levando-as a se autolimparem com mais frequência. Apesar de também acessar o meio externo, os soldados pouco se limpam, provavelmente devido ao seu maior tamanho corpóreo e cefálico, dificultando a auto-higienização.

Quanto ao *allogrooming*, as operárias de menor tamanho em *A. sexdens* foram as que mais limpam outros indivíduos em ambas as câmaras, pois são virtualmente capazes de alcançar qualquer parte do corpo de todas as outras sub castas. Esse resultado também explicaria a menor participação no *self-grooming*, visto que foram também constantemente limpadas por outras de seus grupos. As forrageiras pouco exerceram essa tarefa, possivelmente pela majoritária participação em tarefas externas e pelo intenso *self-grooming*. Os soldados, por sua

vez, foram limpos principalmente pelas pequenas formigas, mas não participam ativamente da limpeza, talvez pelos mesmos motivos especulados para a auto-higienização. Com exceção dos soldados, todas as sub castas receberam igualmente a higienização, claramente mostrando a relevância desse comportamento em uma dinâmica eusocial.

A presença da rainha em todas as atividades de limpeza não foi relevante, assim como ocorreu para a trofalaxia. Dessa forma, mesmo que as rainhas realmente produzam feromônios do tipo *primer* que interfiram no desenvolvimento e atividades das operárias, ou que simplesmente seus compostos cuticulares sejam parte relevante do *gestalt* químico, sua presença não modificaria as atividades de dispersão. No entanto, a maior frequência das pequenas formigas sob a rainha poderia indicar que essas seriam as primeiras a adquirirem qualquer mensagem química produzida em sua cutícula. Consequentemente, e baseado nas suas intensas participações no *allogrooming*, também seriam as responsáveis pelo transporte aos demais integrantes da colônia.

De maneira abrangente, a compreensão da participação de cada sub casta de *A. sexdens* na dinâmica de limpeza e troca de alimento corrobora com o fato de que esses comportamentos seriam os principais responsáveis pela dispersão de compostos de reconhecimento dentro do ninho. Estudos direcionados para a identificação e diferenciação dos compostos cuticulares encontrados na rainha e em cada tipo de operária são necessários para integrar as similaridades e diferenças entre os grupos polimórficos da espécie. Além disso, seriam essenciais as aplicações de abordagens com marcadores, capazes de indicar se há um centro de origem para esses feromônios e suas taxas de dispersão ao longo do tempo e do espaço.

Referências

- Boulay, R., Katzav-Gozansky, T., Hefetz, A., Lenoir, A. 2004. Odour convergence and tolerance between nestmates through trophallaxis and grooming in the ant *Camponotus fellah* (Dalla Torre). *Insectes Sociaux*, 51, 55–61.
- D’Ettorre, P., Heinze, J., Schulz, C., Franck, W., Ayasse, M. 2004. Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbon signal in the ant *Pachycondyla inversa*. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 1085-1091
- Dahbi, A., Hefetz, A., Cerda, X., Lenoir, A. 1999. Trophallaxis mediates uniformity of colony odor in *Cataglyphis ibérica* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Behavior*, 12, 559-567.

- Greenwald, E., Segre, E., Feinerman, O. 2015. Ant trophallactic networks: simultaneous measurement of interaction patterns and food dissemination. *Scientific Reports*, 5.
- Hölldobler, B. and Wilson, E. O., 1990. *The ants*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Holman, L., Jørgensen, C. G., Nielsen, J., D'Ettorre, P. 2010. Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proceedings of the Royal Society B*, 277, 3793–3800.
- Hughes, W. O. H., Boomsma, J. J. 2008. Genetic royal cheats in leaf-cutting ant societies. *PNAS*, 105(13), 5150–5153.
- Hunt, J. H. 1982. Trophallaxis and the evolution of eusocial Hymenoptera. In, *The Biology of Social Insects*, ed, Breed, M. D., Michener, C. D., Evans, H. E. Westview Press, Colorado, pp. 201-205.
- Klobuchar, E. A., Deslippe, R. J. 2002. A queen pheromone induces workers to kill sexual larvae in colonies of the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*). *Naturwissenschaften*, 89, 302–304.
- Liebig, J., Peeters, C., Oldham, N. J., Markstädter, C. Hölldobler, B. 2000. Are variations in cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of fertility in the ant *Harpegnathos saltator*? *PNAS*, 97(8), 4124–4131.
- Littledyke, M., Cherret, J. M. 1976. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae: Attini). *Bulletin of Entomological Research*, 66(2), 205-217.
- Pinter-Wollman, N., Bala, A., Merrell, A., Queirolo, J., Stumpe, M. C., Holmes, S., Gordon, D. M. 2013. Harvester ants use interactions to regulate forager activation and availability. *Animal Behavior*, 86(1), 197–207.
- Quinlan, R. J., Cherret, J. M. 1979. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology*, 4(2), 151-160.
- Richard, F-J, Errard, C. 2009. Hygienic behavior, liquid-foraging and trophallaxis in the leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* and *Acromyrmex octospinosus*. *Journal of Insect Science*, 9, 63.
- Sendova-Franks, A. B., Hayward, R. K., Wulf, B., Klimek, T., James, R., Planqué, R., Britton, N. F., Franks, N. R. 2010. Emergency networking: famine relief in ant colonies. *Animal Behavior*, 79, 473–485.
- Sorensen, A. A., Busch, T. M., Vinson, S. B. 1984. Behavioral flexibility of temporal subcastes in the fire ant, *Solenopsis invicta* in response to food. *Psyche*, 91, 320-331.

Soroker, V., Vienne, C., Hefetz, A. 1994. The postpharyngeal gland as a “gestalt” organ for nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*. *Naturwissenschaften*, 81, 510-513.

Soroker, V., Catherine, V., Hefetz, A. 1995. Hydrocarbon dynamics within and between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Chemical Ecology*, 21(3), 365-377.

Soroker, V., Fresneau, D., Hefetz, A. 1998. Formation of colony odor in the ponerine ant *Pachycondila apicalis*. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 1077-1090.

Tentschert, J., Bestmann, H. J., Heinze, J. 2002. Cuticular compounds of workers and queens in two *Leptothorax* ant species – a comparison of results obtained by solvent extraction, solid sampling, and SPME. *Chemoecology*, 12, 15–21.

Walker, T. N., Hughes, W. O. H. 2009. Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. *Biology Letters*, 5, 446–448.

Wilson, E.O. 1971. *The insect societies*. Harvard University Press: Cambridge.

Wilson, E. O., 1980a. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*), I: The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 7(2), 143-156.

Wilson, E.O., 1980b. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*), II: The ergonomic optimization of leaf cutting. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 7(2), 157-165.

Wilson, E. O., 1983b. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*), IV: Colony ontogeny of *A. cephalotes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 14(1), 55-60.