

KÁTIA KAELLY ANDRADE SOUSA

RESPOSTA COMPORTAMENTAL DAS OPERÁRIAS DE *Atta sexdens*
rubropilosa FOREL, 1908 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE) A SUBSTÂNCIA
QUÍMICA INSETICIDA E FUNGICIDA

BOTUCATU

2019

KÁTIA KAELLY ANDRADE SOUSA

RESPOSTA COMPORTAMENTAL DAS OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa*
FOREL, 1908 (HYMENOPTERA, FORMICIDAE) A SUBSTÂNCIA QUÍMICA
INSETICIDA E FUNGICIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Luiz Carlos Forti

Coorientador: Roberto da Silva Camargo

BOTUCATU

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S725r Sousa, Kátia Kaelly Andrade, 1992-
Resposta comportamental das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae) a substância química inseticida e fungicida / Kátia Kaelly Andrade Sousa. - Botucatu: [s.n.], 2019
81 p.: fots. color., grafs., ils. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2019
Orientador: Luiz Carlos Forti
Coorientador: Roberto da Silva Camargo
Inclui bibliografia

1. Formiga-cortadeira - Comportamento. 2. Insetos - Comunicação. 3. Fungicidas. 4. Simbiose. I. Forti, Luiz Carlos. II. Camargo, Roberto da Silva. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: **“RESPOSTA COMPORTAMENTAL DAS OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) A SUBSTÂNCIA QUÍMICA INSETICIDA E FUNGICIDA”**

AUTORA: KÁTIA KAEELY ANDRADE SOUSA

ORIENTADOR: LUIZ CARLOS FORTI

COORIENTADOR: ROBERTO DA SILVA CAMARGO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LUIZ CARLOS FORTI
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP



Pós-Doutoranda NADIA CALDATO
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu



Prof.ª Dr.ª IVONE PASCHOAL GARCIA
./ Etec Dona Sebastiana de Barros - Colégio Agrícola de São Manuel

Botucatu, 30 de janeiro de 2019.

*Às meus pais por sempre me apoiarem em todas as
circunstâncias.*

*À minha amada avó e avô (in memoriam), minha família e
amigos por tanto carinho, força, amizade e união,*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e saúde.

Aos meus pais, meus irmãos e minha amada avó pelo incentivo, carinho, respeito e amor.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Botucatu, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas), pela oportunidade de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Forti, pela confiança, orientação e apoio para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Roberto da Silva Camargo, pela amizade, apoio, coorientação nos experimentos, pela ajuda e orientação no desenvolvimento dos capítulos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP, Câmpus de Botucatu pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Insetos Sociais-Praga pela amizade, parceria nos experimentos, nas disciplinas, eventos e confraternizações.

Aos amigos do Departamento de Proteção Vegetal.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial aos meus amigos.

The evidence for communication between a fungal symbiont and an animal has implications for evolutionary sociobiology (Ridley et al., 1996).

RESUMO

As formigas cortadeiras *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) são apontadas como as principais pragas de ecossistemas florestais e agrícolas, em razão dos prejuízos que causam ao cortarem as folhas das plantas para o cultivo do fungo simbiote. Esse material vegetal selecionado é transportado para a câmara de fungo, onde passa por várias fases de processamento, desde o corte, à incorporação no jardim do fungo. Tal seleção feita pelas operárias forrageiras é influenciada pelas necessidades nutricionais do jardim de fungo e/ou a ausência de substâncias potencialmente nocivas a colônia. Conhecendo este, evidenciado em estudos que observaram a rejeição de plantas palatáveis quando essas apresentaram substâncias nocivas a colônia, como a cicloheximida (CHX), substância conhecida como fungicida em estudos realizados com formigas cortadeiras. As formigas não são capazes de detectar tal fungicida, mas observa-se uma rejeição retardada, quando o fungicida é incorporado ao jardim de fungo. Esse reconhecimento retardado, hipotetizou que um semioquímico emitido pelo jardim de fungo regula a seleção de plantas por operárias, sendo interpretado como uma comunicação entre o fungo simbiote e as operárias de formigas cortadeiras. Assim, alguns questionamentos são importantes como: as operárias respondem a ação do fungicida alterando seus comportamentos dentro da colônia e quais são? Qual o efeito ocasionado pela a CHX em formigas cortadeiras? Existe uma comunicação através de um volátil semioquímico liberado pelo fungo para promover a rejeição do substrato pelas forrageiras? Visto esses questionamentos, o objetivo desse estudo foi avaliar as alterações comportamentais das operárias de formigas cortadeiras, tempo de carregamento, deposição de lixo, quando sujeitas a presença da CHX, o efeito na mortalidade de formigas cortadeiras por via oral pela ação da CHX e identificar os compostos voláteis liberados pelo jardim de fungo em resposta a CHX, bem como a resposta comportamental das operárias em relação a jardins de fungos saudáveis e não saudáveis. Como resultado o fungicida afetou negativamente e estruturalmente as colônias de formigas cortadeiras. Os comportamentos sofreram aumento nas frequências de lambar o pellet e a limpeza entre as formigas, além disso, ocorreu aumento do tempo de carregamento e mortalidade de operárias encontradas na câmara de lixo no decorrer da incorporação com CHX. Para o estudo da mortalidade observou-se que a CHX em altas concentrações promove a

mortalidade de operárias de formigas cortadeiras por ingestão. No entanto, a CHX não pode ser considerado um potencial formicida, devido a sua baixa mortalidade em alta concentração (menor 50%), modo de ação desconhecido para esses insetos, não apresentar ação retardada como a sulfluramida, e ser tóxica ao ser humano e a outros organismos. Além disso, nenhum semioquímico volátil foi emitido pelo jardim de fungo sob a ação de substâncias deletérias. Portanto, o presente estudo concluiu que os comportamentos realizados durante a incorporação, sofrem alterações quando presente uma substância nociva a colônia, e a não presença de um semioquímico volátil presente para a comunicação fungo-formigas, além do mais, fato importante é a CHX ocasionar mortalidade em formigas cortadeiras.

Palavras-Chave: formigas cortadeiras, comportamentos, comunicação.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants *Atta* (saúvas) and *Acromyrmex* (quenquéns) are indicated as the main pests of forest and agricultural ecosystems, due to the damage they cause when cutting the leaves of the plants for the cultivation of the symbiotic fungus. This selected plant material is transported to the fungus chamber, where it goes through various stages of processing, from the cutting, incorporation into the fungus garden. Such selection made by forage workers is influenced by the nutritional needs of the fungus garden and / or the absence of substances potentially harmful to the colony. This knowledge, evidenced in studies that observed the rejection of palatable plants when they presented substances harmful to the colony, such as cycloheximide (CHX), a substance known as fungicide in studies with leaf cutting ants. Ants are not able to detect such fungicide, but a delayed rejection is observed when the fungicide is incorporated into the fungus garden. This delayed recognition hypothesized that a semiochemical emitted by the fungus garden regulates the selection of plants by fodder, being interpreted as a communication between the symbiotic fungus and the workers of cutter ants. Thus, some questions are important as: the workers respond to the action of the fungicide by changing their behavior within the colony and what are? What effect does CHX have on leaf cutting ants? Is there a communication through a volatile semiochemical released by the fungus to promote substrate rejection by forages? Considering these questions, the objective of this study is to evaluate the behavioral alterations of cutter ant workers, loading time, garbage deposition, when subjected to the presence of CHX, the effect on mortality of leaf cutting ants by the action of CHX and to identify the volatile compounds released by the fungal garden in response to CHX, as well as the behavioral response of workers to healthy and unhealthy fungal gardens. As a result, the fungicide adversely and structurally affected the cutting ant colonies. The behaviors were affected by changes in the frequency of pellet licking and cleaning among the ants. In addition, there was an increase in the loading time and mortality of workers found in the trash chamber during the incorporation with CHX. For the study of mortality it was observed that CHX in high concentrations promotes the moderate mortality of cutter ant workers through ingestion. However, CHX can not be considered a potential formicide, due to its low mortality in high concentration (lower 50%), unknown mode of action for insects, no delayed action such as sulfluramide, and being toxic to humans and other

bodies. In addition, no volatile semiochemical was emitted by the fungus garden under the action of deleterious substances. Therefore, the present study concludes that the behaviors realized during the incorporation, undergo alterations when a substance harmful to the colony present, and the presence of a volatile semioquímico present for the communication fungus-ants, in addition, important fact is the CHX to cause mortality in leaf cutting ants.

Keywords: leaf-cutting ants, behaviors, communication.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1 - COMUNICAÇÃO OU TOXICIDADE: QUAL É O EFEITO DA CICLOHEXIMIDA EM OPERÁRIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS?	21
Resumo.....	22
Abstract.....	22
1. Introdução.....	23
2. Materiais e Métodos.....	24
2.1. Colônias estudadas.....	24
2.1.1. Preparação de pellets.....	25
2.1.2. Preparação das colônias.....	25
2.1.3. Experimento 1.....	25
2.1.4. Experimento 2.....	26
2.1.5. Análise estatística.....	26
3. Resultados.....	27
3.1. Experimento 1.....	27
3.3. Experimento 2.....	30
4. Discussão.....	32
5. Conclusão.....	34
Referências.....	34
CAPÍTULO 2 - EFEITO DA CICLOHEXIMIDA NA MORTALIDADE EM FORMIGAS CORTADEIRAS ATTA SEXDENS	38
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
Colônia estudada.....	42
Formulação da pasta.....	42
Preparação e aplicação da pasta em grupos de operárias.....	43
Análises Estatísticas.....	44
Referências.....	47

CAPITULO 3 – EXISTE UM SEMIOQUÍMICO VOLÁTIL LIBERADO PELO JARDIM DE FUNGO DE FORMIGAS CORTADEIRAS ?	52
Resumo	53
Abstract.....	54
Introdução	55
Materiais e Métodos.....	56
COLÔNIAS	56
PREPARAÇÃO DOS PELLETS A BASE DE POLPA CÍTRICA	56
VOLÁTEIS LIBERADOS PELO JARDIM DE FUNGO	57
ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA	59
BIOENSAIOS DE ESCOLHA	59
Respostas de formigas ao jardim de fungo saudável e não saudável: sistema de escolha em forma de Y	59
Respostas das formigas a extratos de fungo saudável e não saudável: escolha simultânea.....	60
ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
Resultados.....	61
Discussão	65
Referências.....	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO GERAL

As formigas pertencem à Família Formicidae, a qual é dividida em várias subfamílias. Dentre elas, a subfamília Myrmicinae que abrange as formigas da Tribo Attini, grupo este, que são cultivadores de fungo simbiote, do qual se alimentam. As formigas Attini vivem em simbiose obrigatória com fungo *Leucocoprinus gongylophorus* (*Leucocoprini*, *Agaricales*) (= *Leucoagaricus gongylophorus* [Agaricales, Basidiomycot]) (MUELLER; REHNER; SCHULTZ, 1998; MUELLER et al., 2018). Essa relação mutualística se originou há aproximadamente 50 milhões de anos e garantiu às formigas maior sucesso no processo de adaptação ao ambiente, grande versatilidade nutricional e alta eficiência na competição com outros herbívoros na colonização de diversos habitats (VASCONCELOS; FOWLER, 1990; SCHULTZ; BRADY, 2008).

A tribo Attini é encontrada somente no continente americano, porém abrangendo uma ampla área geográfica, desde o norte da Argentina até o sul dos Estados Unidos. Dentro dessa faixa, as formigas dessa tribo ocorrem nos mais diversos biomas, como, por exemplo, a floresta amazônica e em ambientes extremos, como o deserto (WEBER, 1972a; SOLOMON et al., 2008).

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex*, são conhecidas popularmente como “saúvas” e “quenquéns”, respectivamente, sendo no Brasil, reconhecidas como pragas na agricultura, em florestas plantadas e na pecuária (CHERRETT, 1986a b c). O sucesso desse grupo e o seu difícil controle está relacionado tanto com a organização social existente dentro da colônia, como também, pela a interação formiga - planta – fungo (CHERRETT, 1968; FORTI, 1985; DEJEAN; OLMSTED; CAMAL, 1992; GARCIA et al., 2003). Diversos estudos são focados em métodos de controle eficientes para as formigas cortadeiras, pois são insetos complexos para o controle por causa de suas características biológica e social. Dentre os métodos existentes, o químico é o mais efetivo, sendo a sulfluramida o principal princípio ativo utilizado na fabricação de iscas formicidas, para o controle dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (FORTI et al., 1993; NAKANO et al., 1993; PINHÃO et al., 1993; ZANUNCIO et al., 1993; ZANUNCIO et al., 1993). Para ser eficaz o ingrediente ativo deve atender a algumas especificações como: não ocorrer rejeição inicial, a ação retardada deve ocorrer no tempo certo para que

desenvolva toda a contaminação da colônia, e apresentar especificidade. Além do mais, a atratividade é o ponto vital na eficiência das iscas granuladas, onde ela deve ser atrativa mesmo distante do ninho (ETHERIDGE; PHILLIPS, 1976; FORTI; NAGAMOTO; PRETTO, 1998; NAGAMOTO et al., 2004; VERZA et al., 2006).

O gênero *Atta* é considerado um grupo de insetos eusociais por apresentarem sobreposição de gerações, divisão de trabalho e cuidado com a prole (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). A organização social caracteriza-se pelo polimorfismo acentuado e divisão das tarefas entre os indivíduos (OLIVEIRA, 2006). Sendo essa divisão de tarefas organizada relativamente como: as operárias jardineiras são responsáveis pelo cuidado com a prole e manutenção do jardim de fungo; as operárias generalistas exploram novos recursos alimentares, cortam e transportam o substrato vegetal e escavam os ninhos; os soldados defendem a colônia por apresentarem mandíbulas bem desenvolvida e grande tamanho e; as formas aladas içás (fêmeas) e bitús (machos) aparecem somente na época de reprodução (DELLA-LUCIA; OWLER; ARAÚJO, 1993; BRITTO et al., 2016).

A fundação de uma nova colônia se inicia com a revoada das formas sexuadas. A revoada, ocorre após as primeiras chuvas da primavera, sendo que uma grande parte das formas sexuadas dos ninhos, saem dos ninhos para iniciar seu voo nupcial. Ao saírem da colônia, as içás carregam uma pequena porção do fungo simbiote em sua cavidade inflabucal (JUSTI JÚNIOR et al., 1996). Durante o voo os machos fecundam as fêmeas que regressam ao solo, arrancam as asas e começam a buscar um local para a construção de um novo ninho (AUTUORI, 1957; CAETANO; ZARA; JAFFÉ, 2002). Uma vez escolhido o local, a rainha começa a perfurar com as mandíbulas um canal para formar uma pequena câmara, na qual o fragmento do fungo simbiote é regurgitado e depois de cultivado, servirá de alimento para o saueiro (JUSTI et al., 1996).

As formigas cortadeiras desenvolveram uma série de mecanismos e comportamentos que promove a proteção de seu fungo simbiótico (OI; PEREIRA, 1993), como também, fornecem condições favoráveis para o crescimento do seu fungo (WEBER, 1972b). Esses comportamentos são realizados para a atividade de incorporação de substrato no fungo, que passa por etapas que são principalmente o corte da folha. As operárias cortam em pedaços menores e posteriormente, é

adicionado ao material, saliva e gotículas do líquido proveniente do intestino posterior (reto) das mesmas (WEBER, 1972). As operárias apresentam também o comportamento de “lamber” as folhas contribuindo para retirada de epicutículas e microrganismos presente na folha (QUINLAN; CHERRETT, 1977). Este comportamento está relacionado com a estrutura denominada de cavidade infrabucal que atua como filtro, impedindo a entrada de partículas sólidas, incluindo os esporos de fungos coletados durante a limpeza das folhas, do ninho e do próprio corpo das operárias. O material retido é posteriormente regurgitado no “lixo” (QUINLAN; CHERRETT, 1978). Esse regurgito é reunido em pilhas que forma o lixo, e que aparentemente, essas pilhas auxiliariam na defesa do jardim contra microrganismos indesejáveis. Portanto, as formigas exercem um papel fundamental na contínua proteção do fungo mutualístico (WEBER, 1957; BASS; CHERRETT, 1994), realizando uma série de atividades que levam ao estabelecimento de um ambiente propício para o desenvolvimento do fungo e saúde da colônia (QUINLAN; CHERRETT, 1977; ANDRADE et al. 2002; GARRETT et al. 2016).

A relação simbiótica entre o fungo e as formigas proporciona benefícios a ambos (SCHULTZ et al., 2005). Devido à ação enzimática, o fungo degrada os polissacarídeos vegetais do substrato, resultando dessa hidrólise açúcares simples que servirão de alimento para o próprio fungo e para as operárias (SILVA et al., 2003; RICHARD et al., 2005), enquanto que as larvas se alimentam do próprio fungo (KNAPP; HOWSE; KERMARREC, 1990; CAETANO; ZARA; JAFFÉ, 2002). Essa relação obrigatória, promoveu que as operárias aprendessem a rejeitar material que contenha substâncias prejudiciais ao fungo simbiote. Para a observação dessa atividade de rejeição, vários estudos foram feitos utilizando uma substância chamada de cicloheximida.

A cicloheximida é um antibiótico produzido por *Streptomyces griseus* que inibe a síntese proteica, conhecido também como inibidor de crescimento de muitas leveduras e fungos. No entanto, essa substância também é utilizada em diferentes insetos com diversos focos de estudo como, que envolvem a formação de memória a longo prazo, genótipos resistentes, alteração da morfologia, alteração em níveis de proteínas e destruição de neurônios (KENNE; BOMAN, 1980; AKAHANE; AMAKAWA, 1983; OBERLANDER; LEACH; LYNN, 1981; FLYG; NOURI; FALLON, 1987; FAHRBACH; CHOI; TRUMAN, 1994; SOLTANI-MAZOUNI; SOLTANI, 1995).

Estudos evidenciaram que as formigas cortadeiras recusam plantas palatáveis quando essas apresentam a cicloheximida, porém, as operárias não são capazes de detectar tal fungicida no primeiro contato, mas observa-se uma rejeição retardada, quando o fungicida é incorporado no jardim de fungo (RIDLEY; HOWSE; JACKSON, 1996). Essa observação sugere que pode ocorrer um aprendizado por meio da recusa das operárias à forragear uma planta palatável, embora o mecanismo para essa rejeição não tenha ainda sido elucidado (RIDLEY; HOWSE; JACKSON, 1996; HERZ; HÖLLDOBLER; ROCES, 2008; SAVERSCHEK; ROCES, 2011). Além disso, o ato de promover a rejeição de materiais contendo substâncias nocivas para a colônia, influenciou na hipótese que haveria algum semioquímico volátil que serviria de comunicação entre as formigas e o fungo, fato que influenciaria na seleção de plantas (NORTH; JACKSON; HOWSE, 1999). Com esse cenário exposto, algumas questões surgem: As operárias respondem a ação do fungicida alterando seus comportamentos? Qual o efeito ocasionado pela a cicloheximida nas operárias? Existe uma comunicação através de um volátil semioquímico liberado pelo fungo para promover a rejeição do substrato pelas forrageiras?

Para responder a esses questionamentos foi estudado os comportamentos das operárias de formigas cortadeiras frente a contaminação do fungo, com um fungicida veiculado em pellets a base de polpa cítrica, o efeito na mortalidade de operárias por ingestão de cicloheximida, como também a diferença de voláteis emitidos pelo jardim de fungo quando presente uma substância nociva a colônia.

CAPÍTULO 1

COMUNICAÇÃO OU TOXICIDADE: QUAL É O EFEITO DA CICLOHEXIMIDA EM OPERÁRIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS?

Kátia Kaelly Andrade Sousa, Roberto da Silva Camargo e Luiz Carlos Forti

Laboratório de Insetos Sociais-Praga, Departamento de Proteção Vegetal,
Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP, Caixa Postal 237, Botucatu, SP
18603-970, Brasil; katiakaelly@gmail.com (K.K.A.S.); luizforti@fca.unesp.br (L.C.F.)

Editor Acadêmico: Michael D. Breed

Submetido: 11 Agosto 2017

Aceito: 14 Novembro 2017

Artigo: Insects

Resumo: As formigas cortadeiras são insetos que utilizam material vegetal para cultivarem o fungo do qual se alimentam. Essas formigas cultivadoras de fungo desempenham diversas atividades comportamentais para estabelecer um ambiente propício ao fungo. Dentro desses comportamentos estão as atividades que podem servir detecção de matérias prejudiciais a colônia, como o comportamento de lambar, raspagem, repicagem, etc., no entanto existem substâncias que podem ao primeiro contato não serem detectadas como prejudiciais ao fungo, como é o caso da cicloheximida (CHX), descrito como fungicida que inibi a síntese de proteínas em eucariotos. Embora seja o mecanismo de ação ainda não esclarecido. Tendo em vista outros estudos com utilização dessa substância com formigas o presente estudo teve como objetivo de avaliar as alterações comportamentais das operárias de formigas cortadeiras, tempo de carregamento, deposição de lixo e mortalidade, quando sujeitas a sete dias com pellets incorporados com CHX e mais sete dias com pellets sem CHX. O fungicida afetou negativamente e estruturalmente as colônias de formigas cortadeiras. Os comportamentos sofreram alterações como principalmente o aumentado das frequências de lambar o pellet e a limpeza entre as formigas a partir do terceiro dia do experimento, além disso, ocorreu aumento do tempo de carregamento e mortalidade de operárias no decorrer da incorporação com CHX.

Palavras-chaves: Comunicação; formigas cortadeiras; fungicida

Abstract: Leaf-cutting ants are insects that use plant material to grow fungus from which they feed. These fungus-growing ants perform various behavioral activities to establish an environment conducive to the fungus. Among these behaviors are activities that can serve to detect materials harmful to the colony, such as licking, scraping, chopping, etc. However, there are substances that may not be detected as harmful to the fungus on first contact. Cycloheximide (CHX) is one such substance, described as a fungicide that inhibits the synthesis of proteins in eukaryotes, although its mechanism of action remains unclear. The present study aimed at evaluating the behavioral changes of worker ants, time carrying orange pellets, waste deposition and mortality, when subjected to seven days of CHX-incorporated pellets and another seven days of CHX-free pellets. The fungicide adversely and structurally affected the leaf-cutter ant colonies. Their behavior went through changes, such as an increase in pellet-licking frequencies and cleaning among the ants from the third day onward. Moreover, there was an increase in time carrying orange pellets, as well as in the mortality of workers during CHX incorporation.

Keywords: communication; leaf-cutter ant; fungicide

1. Introdução

As formigas cortadeiras são insetos sociais da região Neotropical que apresentam uma relação simbiótica com o fungo que cultivam, em que as formigas fornecem condições favoráveis para o crescimento do fungo simbiótico, e este como fonte de alimento para a colônia, sendo esta uma relação benéfica [1,2]. As formigas cortadeiras usam diversas estratégias para fornecer um crescimento saudável ao jardim do fungo. Uma vez que o material da planta foi selecionado e transportado para as câmaras de fungo, este material passa por várias fases de processamento, desde o corte, até a incorporação no jardim do fungo [3].

Essa relação obrigatória promoveu que as operárias aprendessem a rejeitar qualquer material que contenha substâncias prejudiciais ao fungo simbiote, isso foi observado experimentalmente em laboratório com o fornecimento de pellet com cicloheximida (CHX), um antibiótico produzido por *Streptomyces griseus* que inibe a síntese proteica, conhecido também como inibidor de crescimento de muitas leveduras e fungos. Em estudos com colônias de *Atta laevigata* Smith, o fornecimento de pellets com CHX apresentaram uma aceitação de aproximadamente 48 horas e em seguida rejeição do mesmo material sem a presença do fungicida [4]. Segundo os autores, existe uma comunicação entre as operárias de não aceitação do material forrageado, sendo uma resposta produzida pelo fungo “estressado”, produzindo um semioquímico que impede qualquer incorporação do material forrageado ao jardim de fungo. Em contraposição, um estudo com *Atta sexdens rubropilosa* Forel não foi observado essa comunicação, somente uma possível comunicação entre operárias [5]. Com a espécie *Acromyrmex lundii* Guering, o fornecimento de CHX juntamente as folhas conduziu a um resultado similar, em que a rejeição do material tratado ocorreu em 10 horas após a incorporação e mantido por 9 semanas [6].

Posteriormente a CHX passou a ser utilizada para estudos com formigas cortadeiras que envolvesse processo de memória olfativa a longo prazo, estudos que abrangem a seleção de plantas pelas jardineiras, em que partículas de resíduos removidas do jardim ao lixo, poderiam conter pistas provenientes de planta inadequada ou de fungo danificado [7–11]. Para estudo referente a memória olfativa a longo prazo, foi experimentalmente induzido a infiltração de fungicida na folha, e oferecido para colônia de *Atta colombica* Guerin e observado que as formigas

passam a rejeitar o material por até 18 semanas, indicando o envolvimento da aprendizagem forte de rejeição a longo prazo para as operárias forrageiras [10]. Também comprovou-se que após dois dias de aprendizagem, operárias da espécie *Acromyrmex ambiguus* Emery apresentam um aumento da massa de complexos sinápticos, entretanto, no quarto ao decimo quinto dia a massa reduziu para o estado inicial, ou seja, ocorrendo um remodelamento estrutural no cérebro onde essa reorganização foi desencadeada pela evitação da formação de memória de longo prazo, sendo que espécie também rejeita o material com CHX posteriormente incorporado no fungo [11,12].

A CHX é bastante utilizada em insetos como moscas, grilos, lepidópteros, coleópteros entre outros, para estudos que envolve formação de memória a longo prazo, toxicidade de genótipos resistentes, alteração da morfologia, alteração em níveis de proteínas e destruição de neurônios [13–20]. Dentro desse amplo campo de estudo, a ação da substância tende a ter grande variação de resultados que se manifestam de maneiras diferentes dependendo da ordem estudada, porém a toxicidade nas operárias de formigas cortadeiras é ocultada em todos os estudos [4–12]

Dado ao exposto, sobre a relação intrínseca entre as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote, surge à questão: Qual o efeito da cicloheximida nas operárias de formigas cortadeiras? Para tanto, o estudo propôs identificar as alterações de comportamentos das operárias durante o cultivo do jardim de fungo com iscas contendo o fungicida sintético CHX. Além disso, foi estudado a mortalidade das operárias, produção do lixo e a taxa de carregamento e devolução dos pellets.

2. Material e Métodos

2.1. Colônias estudadas

Foram utilizadas oito colônias de *Atta sexdens rubropilosa* de aproximadamente um ano, coletadas em março de 2016 e mantidas no Laboratório de Insetos Sociais-Praga, LISP, UNESP, Botucatu. Cada colônia continha um recipiente de jardim de fungo, e estes foram alimentados com *Acalypha* spp. e *Ligustrum* spp. As colônias foram mantidas a uma temperatura de 24 ± 2 °C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12 h.

2.1.1. Preparação de pellets

Os pellets consistiram em pequenos grânulos feitos de polpa de laranja desidratadas a 50 °C por 72 h. A polpa foi retirada de laranjas provenientes de cultivos orgânicos, onde foram desidratadas e moídas até pó, num processo de moagem, foi misturado de forma homogênea 1,8 g deste pó, 0,2 g de carboximetilcelulose e acrescentado 0,025 g CHX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolvido em 2,5 mL de água para produzir grânulos de laranja com cicloheximida. A matriz foi colocada em seringa de 20 ml para produzir os grânulos. Os grânulos foram então deixados secar a 25 °C durante 24 h. O mesmo método foi utilizado para produção de pellets sem o fungicida, ou seja, sem acrescentar a CHX. Finalizando com as repicagens dos pellets em tamanhos aproximadamente iguais e armazenados em freezer dentro de potes de plástico até quando requeridos (metodologia adaptada) [4].

2.1.2. Preparação das colônias

As colônias de *Atta sexdens rubropilosa*, foram mantidas em laboratório, e utilizadas quando apresentaram volume médio de 350 cm³. Após crescimento, o fungo junto com as jardineiras foram transferidos para caixas de vidro com aproximadamente 500 cm³ de volume, fechada com uma tampa de vidro transparente para evitar a fuga das formigas, esta caixa que proporciona a fácil observação dos comportamentos realizados na colônia. A caixa de vidro foi conectada com mais duas câmaras, uma de forrageamento do material fornecido e outro para depósito do lixo, sendo essa conexão feita por mangueiras (diâmetro interno: 12,7 mm, espessura da parede: 2,0 mm e comprimento: 5 cm) que permitia o fluxo das formigas entre as câmaras.

2.1.3. Experimento 1

Foram utilizadas 4 colônias para registrar os comportamentos executados na preparação e incorporação dos pellets no jardim de fungo. As observações foram realizadas durante 8 horas por dia, totalizando 14 dias de observação. As colônias receberam 5 pellets com CHX durante 7 dias seguidos e 5 pellets sem CHX pelos próximos 7 dias, 14 dias de observação no total. Cada tratamento correspondeu a 8 horas de observação, em um intervalo de tempo de dez minutos cada. Os comportamentos relacionados ao processamento dos pellets de polpa cítrica,

limpeza mútua e autolimpeza foram quantificados. Para esta amostragem foi realizado o sistema do tipo varredura com observação livre, sem utilização de microscópio estereoscópico, onde um grupo de indivíduos é observado rapidamente e os comportamentos de cada um foi registrado com intervalo de tempo regular. Os comportamentos realizados pelas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* durante o processamento e incorporação dos pellets no jardim de fungo foram classificados e, posteriormente, calculadas as frequências de ocorrência desses atos e seus percentuais.

2.1.4. Experimento 2

Foram comparados 2 grupos experimentais a fim de estudar o efeito da CHX nas colônias: a) 4 colônias receberam pellets com CHX; b) 4 colônias receberam pellets sem CHX; As variáveis estudadas foram: tempo de carregamento dos pellets para o jardim de fungo, feito de acordo com metodologia referida na experimento 1 ao longo de oito horas de observação; devolução dos pellets na câmara de lixo, avaliado pela quantidade de pellets devolvidos após 24 h do fornecimento; produção de lixo, avaliado pelo peso seco do material depositado na câmara de lixo após 24 h do fornecimento dos pellets; e mortalidade de operárias, que foi avaliada pela quantidade de formigas depositadas na câmara de lixo após 24h do fornecimento de pellets.

2.1.5. Análise estatística

Os dados de frequência de comportamento foram analisados de duas formas: a) comparando-se os comportamentos nos 7 dias iniciais (pellets com CHX) com os 7 dias subsequentes (pellets sem CHX) por meio do teste G; b) comparando-se todos os atos comportamentais nos 14 dias de observação por meio do teste Kruskal Wallis (ANOVA não paramétrica, dada a distribuição não normal dos dados), e com o pós-teste de Student-Newman-Keuls (5 % de significância).

As variáveis de carregamento de pellets, devolução dos pellets na câmara de lixo, produção de lixo e mortalidade de operárias foram comparados com colônias que receberam pellets CHX com colônias que receberam pellets sem CHX por meio do teste T Student (5 % de significância). Essas mesmas variáveis foram comparadas nos 7 dias iniciais (pellets com CHX) com os 7 dias subsequentes (pellets sem CHX) por meio do teste T Student (5 % de significância).

3. Resultados

3.1. Experimento 1

Encontrou-se diferenças significativas na estrutura do fungo (Figura 1). Com relação as frequência dos atos comportamentais, também foi encontrado diferença estatística nos 7 dias iniciais (pellets com CHX) e com os 7 dias subsequentes (pellets sem CHX), sendo elas: transporte dos pellets para a superfície do fungo (Teste G, $G = 515,23$, $GL=6$, $p < 0,0001$), lambr os pellets (Teste G, $G = 452,40$, $GL = 6$, $p < 0,0001$), segurar os pellets no jardim de fungo (Teste G, $G = 428,09$, $GL = 6$, $p < 0,0001$), repicar os pellets (Teste G, $G = 980,47$, $GL = 6$, $p < 0,0001$), mastigar fragmento após estar repicado (Teste G, $G = 792,42$, $GL = 6$, $p < 0,0001$), incorporar fragmento no jardim de fungo (Teste G, $G = 416,56$, $GL = 6$, $p < 0,0001$), lambr superfície dos fragmentos recém incorporados (Teste G, $G = 2606,5$, $GL = 6$, $p < 0,0001$), depositar tufo de hifas nos fragmentos incorporados (Teste G, $G = 215,10$, $GL = 6$, $p < 0,0001$), limpeza entre formigas (Teste G, $G = 1574,08$, $GL = 6$, $p < 0,0001$) e transportar fragmento para o lixo (Teste G, $G = 147,85$, $GL = 6$, $p < 0,0001$) (Tabela 1). Também foi detectado diferenças significativas quando se comparou as frequências dos atos comportamentais entre si (Kruskal Wallis test, $H = 87,67$, $GL = 9$, $p < 0,001$).

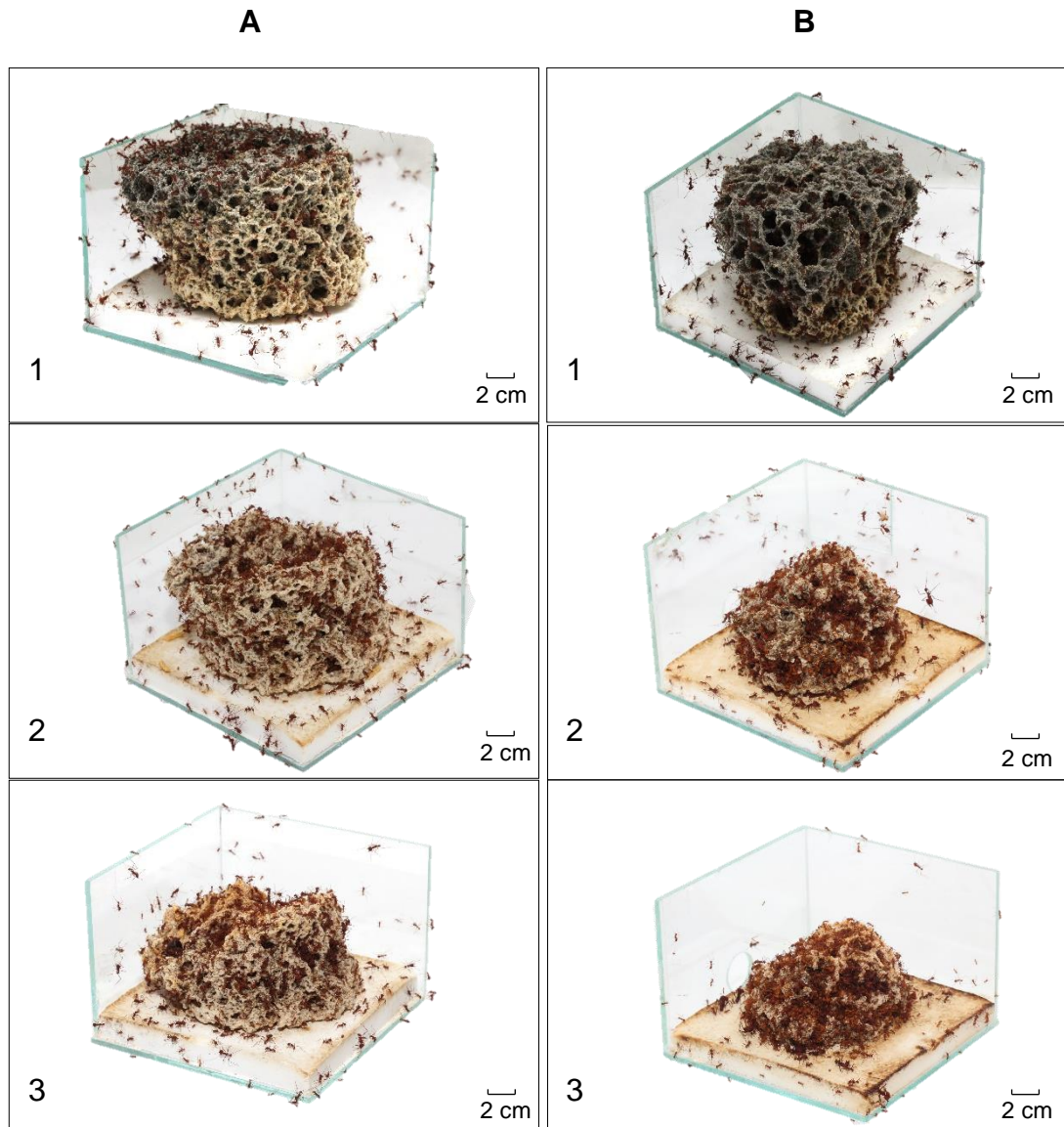


Figura 1. Jardim de fungo durante o experimento 1. (A) Colônia A; e (B) Colônia B. Foto 1: fungo saudável; Foto 2: 7^o dia do experimento (Com fornecimento de pellets com cicloheximida (CHX)); e Foto 3: 14^o dia do experimento.

Tabela 1. Média (\pm EP) dos comportamentos das operárias. Nos sete primeiros dias com fornecimento de pellets com CHX e os sete dias seguintes com fornecimento de pellets sem CHX. Comportamentos: (1) Transporte dos pellets para a superfície do fungo; (2) lambar pellet; (3) segurar os pellets no jardim de fungo; (4) repicar de pellet; (5) mastigar os fragmentos após o corte; (6) incorporando fragmentos no jardim de fungo; (7) lambar os fragmentos recém-incorporados; (8) depositar tufo de hifas nos fragmentos incorporados; (9) limpeza de formigas; e (10) transporte de fragmentos para a câmara de lixo. Experimento 1.

Média dos comportamentos														
Comportamentos	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia	6º Dia	7º Dia	8º Dia	9º Dia	10º Dia	11º Dia	12º Dia	13º Dia	14º Dia
1	2,5 \pm 1,0	34,8 \pm 16,6	83 \pm 31,6	51,3 \pm 6,0	64,5 \pm 28,8	29,3 \pm 21,0	16,8 \pm 15,1	4,8 \pm 30,4	40 \pm 31,1	56 \pm 43,7	11,8 \pm 6,8	6,0 \pm 3,5	5,7 \pm 2,5	5,7 \pm 1,8
2	268,75 \pm 29,0	389,3 \pm 63,6	543,8 \pm 112,3	601,3 \pm 88,3	438,5 \pm 60,6	314,8 \pm 136,3	163,8 \pm 95,2	262,5 \pm 154,6	463 \pm 216,5	397,8 \pm 168,8	303,8 \pm 101,0	290,8 \pm 67,4	308 \pm 72,6	258,3 \pm 101,2
3	13,75 \pm 2,3	7 \pm 3,5	4,8 \pm 1,7	4,5 \pm 2,6	1,3 \pm 0,9	0,0	0,0	0,0	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3	0,8 \pm 0,5	1,3 \pm 0,8	0,7 \pm 0,6
4	39,75 \pm 7,0	38 \pm 26,0	18 \pm 14,3	7,5 \pm 4,5	0,3 \pm 0,3	0,5 \pm 0,5	0,3 \pm 0,3	1,3 \pm 1,3	6,3 \pm 3,7	28,5 \pm 17,0	48,5 \pm 28,1	32,8 \pm 19,6	74,7 \pm 35,6	67,7 \pm 29,3
5	30 \pm 3,7	27,3 \pm 16,0	16,8 \pm 12,8	10,5 \pm 6,3	0,0	0,0	1,0 \pm 1,1	0,8 \pm 0,8	5 \pm 3,0	34,3 \pm 22,0	43 \pm 25,5	36,3 \pm 0,5	57,7 \pm 25,0	73,3 \pm 31,8
6	47 \pm 12,8	5 \pm 3,0	11,8 \pm 9,6	4,8 \pm 3,3	0,0	0,0	0,5 \pm 0,5	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3	7,3 \pm 5,4	7 \pm 4,4	9,3 \pm 6,6	16,7 \pm 7,2	12,3 \pm 5,3
7	266,25 \pm 65,4	36,3 \pm 28,3	21,8 \pm 12,6	10,5 \pm 6,1	0,0	0,0	1,5 \pm 1,5	0,5 \pm 0,5	0,0	3,3 \pm 2,1	100,3 \pm 60,2	83 \pm 4,2	136 \pm 62,0	111,7 \pm 54,5
8	11,25 \pm 2,9	3,8 \pm 2,4	4 \pm 2,6	2,3 \pm 1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0 \pm 1,8	4,8 \pm 2,8	11,3 \pm 5,8	8,7 \pm 3,9
9	226,75 \pm 76,6	245 \pm 75,8	287,3 \pm 82,8	377 \pm 109,4	473,3 \pm 135,6	517,3 \pm 201,4	590,3 \pm 162,9	593 \pm 127,5	505 \pm 169,6	609 \pm 57,7	591,8 \pm 84,9	545,3 \pm 122,8	441 \pm 53,9	526 \pm 132,0
10	37,25 \pm 6,7	42,3 \pm 11,8	45,3 \pm 11,9	60,3 \pm 8,2	40,3 \pm 5,2	71 \pm 64,6	43,8 \pm 2	38 \pm 7,1	32,3 \pm 6,1	16,8 \pm 1,1	10,8 \pm 3,8	7 \pm 3,8	25,7 \pm 11,0	43 \pm 13,0

3.3. Experimento 2

Foi encontrado diferenças significativas nas variáveis: carregamento de pellets (Teste t, $t = -5,0898$, $Gl = 13$, $p < 0,0001$), devolução dos pellets na câmara de lixo (Teste t, $t = 3,5664$, $Gl = 13$, $p < 0,001$) (Figura 2), produção de lixo úmido (teste t, $t = 2,2051$, $Gl = 13$, $p < 0,05$) e seco (teste t, $t = 4,0943$, $Gl = 13$, $p < 0,001$) (Figura 3), e finalmente, mortalidade de operárias pequenas (Teste t, $t = 5,0370$, $Gl = 13$, $p < 0,001$) e médias (Teste t, $t = 4,5115$, $Gl = 13$, $p < 0,001$) em colônias que receberam pellets com CHX comparado com colônias que receberam pellets sem CHX (Figura 4). Também foi observado e analisado o tempo médio gasto de carregamento de pellets durante o fornecimento de pellets com ou sem CHX incorporado, este apresentou um aumento no tempo gasto para o carregamento de pellets após o terceiro dia de experimento (Tabela 2).

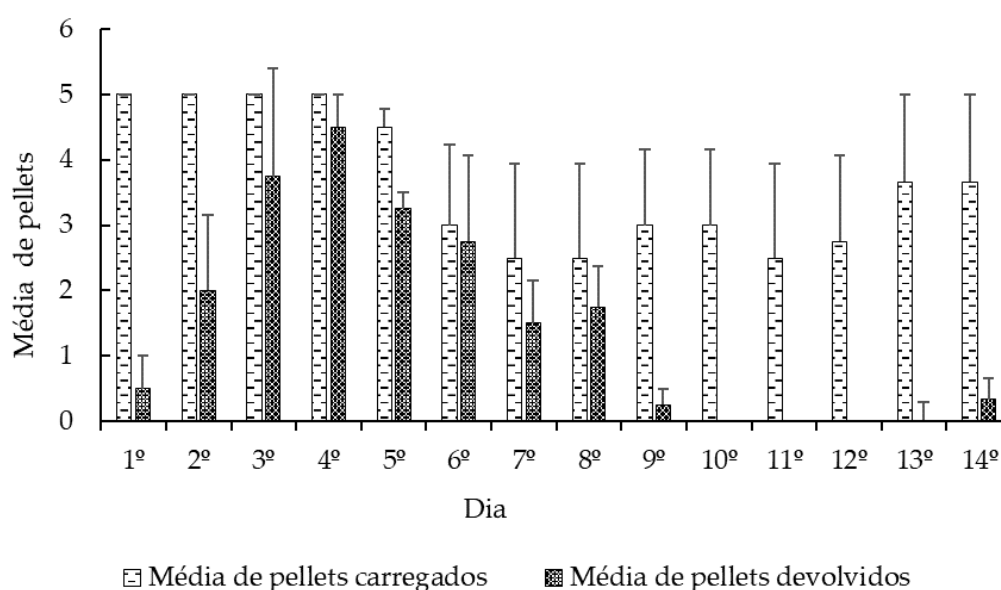


Figura 2. Média ($\pm EP$) de pellets carregados em relação a média de pellets devolvidos.

Quando se compara essas variáveis nos 7 dias iniciais (pellets com CHX) com os 7 dias subsequentes (pellets sem CHX) observou-se diferenças significativas em: carregamento dos pellets (Teste t, $t = 3,7146$, $Gl=6$, $p < 0,05$), devolução dos pellets na câmara de lixo (Teste t, $t = 3,9375$, $Gl=6$, $p < 0,001$), produção de lixo úmido (Teste t, $t = 2,3567$, $Gl=6$, $p < 0,05$) e seco (Teste t, $t = 2,5205$, $Gl=6$, $p < 0,05$), e finalmente, mortalidade de operárias pequenas (Teste t, $t = 3,8907$, $Gl=6$, $p < 0,001$) e médias (Teste t, $t = 3,2122$, $Gl=6$, $p < 0,05$).

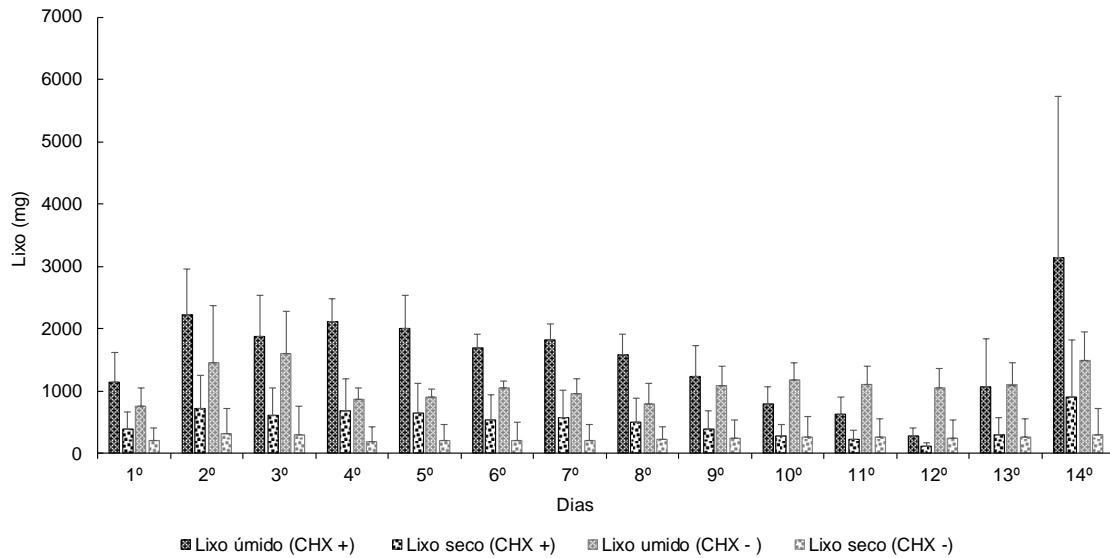


Figura 3. Peso médio (\pm EP) dos resíduos depositados na câmara de lixo pelas operárias. CHX +: com cicloheximida; CHX -: Sem cicloheximida.

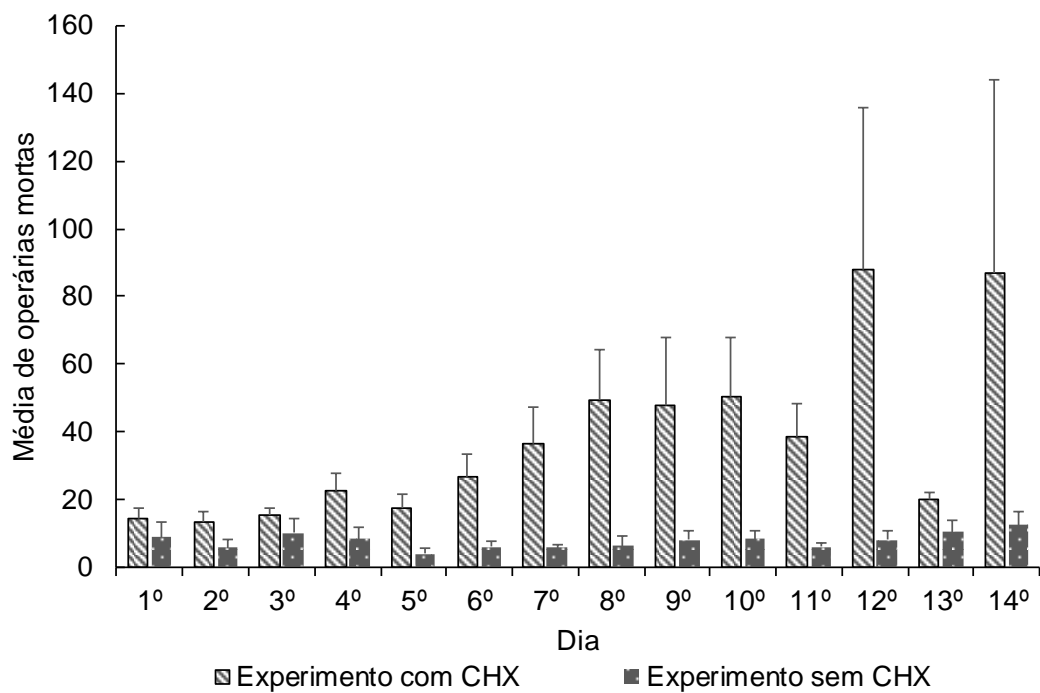


Figura 4. Número médio (\pm EP) de operárias mortas durante os 14 dias de experimento.

Tabela 2. Número médio (\pm EP) de pellets carregados e o tempo médio gasto para carregamento. Com cicloheximida (CHX +) e sem cicloheximida (CHX -).

Dia	Média de pellets carregados		Tempo médio (min) gasto carregando	
	CHX +	CHX -	CHX +	CHX -
1 ^o	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	5,5 \pm 0,5	5,0 \pm 0,0
2 ^o	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	14,3 \pm 8,6	5,0 \pm 0,0
3 ^o	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	24,8 \pm 12,2	5,0 \pm 0,0
4 ^o	3,8 \pm 1,3	5,0 \pm 0,0	21,5 \pm 8,5	5,0 \pm 0,0
5 ^o	3,8 \pm 0,9	5,0 \pm 0,0	246,5 \pm 134,8	5,0 \pm 0,0
6 ^o	3,0 \pm 1,2	5,0 \pm 0,0	260,3 \pm 127,3	5,0 \pm 0,0
7 ^o	2,5 \pm 1,4	5,0 \pm 0,0	266,8 \pm 123,2	5,0 \pm 0,0
8 ^o	3,8 \pm 1,3	5,0 \pm 0,0	138,5 \pm 114,9	5,0 \pm 0,0
9 ^o	3,0 \pm 1,2	5,0 \pm 0,0	252 \pm 131,6	5,0 \pm 0,0
10 ^o	2,5 \pm 1,4	5,0 \pm 0,0	124 \pm 118,7	5,0 \pm 0,0
11 ^o	2,5 \pm 1,4	5,0 \pm 0,0	125,8 \pm 118,1	5,0 \pm 0,0
12 ^o	2,8 \pm 1,3	5,0 \pm 0,0	125,8 \pm 118,1	5,0 \pm 0,0
13 ^o	3,7 \pm 1,3	5,0 \pm 0,0	165 \pm 157,5	5,0 \pm 0,0
14 ^o	3,7 \pm 1,3	5,0 \pm 0,0	165 \pm 157,5	5,0 \pm 0,0

4. Discussão

Indubitavelmente, a CHX afetou desfavoravelmente as colônias de formigas cortadeiras (Figura 1), em especial, os atos comportamentais das operárias durante o carregamento, preparo e incorporação dos pellets no jardim de fungo. O resultado de carregamento corrobora ao observado por Ridley et al. 1996, em que ocorre um carregamento inicial com posterior recusa dos pellets de polpa cítrica, embora o autor não tenha observado os atos comportamentais durante o cultivo do fungo simbiote. Essas observações sobre os atos comportamentais durante o processamento dos pellets evidência claramente a tomada de decisão das formigas em mudar seu comportamento forrageiro. Essa mudança de comportamento, já foi estudada quanto a resistência física do material forrageado como um critério de pós-seleção no interior do ninho, entretanto a pós-seleção foi apenas uma mudança comportamental [22,23]. Nesse estudo, podemos atribuir uma possível comunicação fungo-operária [5] ou apenas, uma reposta à toxicidade da CHX as operárias.

Durante os 14 dias, as frequências dos comportamentos das operárias variaram de acordo com a presença da CHX nos pellets (Tabela 1). No primeiro dia de fornecimento dos pellets, os comportamentos apresentaram uma frequência normal, ou seja, no primeiro contato com o fungicida não ocorreu alterações bruscas nos comportamentos, em comparação aos outros dias. Seguindo os sete dias de fornecimento de pellets com CHX, ocorrem alterações nas frequências nos comportamentos, principalmente aumentando as frequências em lambar o pellet e a limpeza entre as formigas, a partir do terceiro dia do experimento, tal aumento da frequência já observada em outros trabalhos [24,25]. Dessa forma pode-se sugerir que ocorre um aumento do preparo dos pellets antes da incorporação, visto que algumas formigas cortadeiras apresentem propriedades antifúngicas e antibióticas na saliva que podem promover uma assepsia nos pellets para incorporação [26], o mesmo pode estar relacionado ao aumento da limpeza entre as formigas, onde possivelmente aumente a assepsia entre as operárias contaminadas.

Esse fato, das formigas não detectarem tal fungicida é análogo aos inseticidas empregados atualmente em seu controle [27], ou seja, ocorre o carregamento das iscas formicidas com ingrediente ativo de ação retardada, demorando dias para a contaminação da colônia como um todo. Em alguns casos, ocorre a devolução de iscas ao exterior do ninho [28], similar a taxa de devolução dos pellets observado em nossos resultados (Figura 2). Porém, naturalmente, determinadas plantas podem conter substâncias deletérias ao fungo, promovendo o não carregamento ou rejeição [29]. Tais substâncias são detectadas pelas formigas, provavelmente através de um alomônio produzido pelo fungo que atua como um reforço negativo a elas [4]. Uma vez que a colônia tenha recebido tal efeito, a planta é rejeitada por dias ou até mesmo semanas [29]. Desta forma, não apenas materiais com substâncias deletérias ao fungo são recusadas ou descartadas, mas também, materiais inadequados para o cultivo do jardim de fungo [23]. Alguns autores sugerem um aprendizado por meio da recusa das operárias à forragear uma planta palatável, até mesmo memória a longo prazo [10], embora o mecanismo de ação da substância ainda não tenha sido elucidado [12]. Recentemente, verificou-se que essa memória a longo prazo de evitação está associado com um aumento transitório da massa

de complexos sinápticos em formigas cortadeiras [11], sendo possível no nosso estudo observar um aumento do tempo de carregamento dos pellets para câmara de fungo após o terceiro dia (Tabela 2), visto que, possivelmente foi formado essa memória de longo prazo para evitação desse material, após a detecção pelas operárias dos danos na colônia ocasionados pelo substrato incorporado, o que pode ter provocado o aumento do tempo gasto para o carregamento dos pellets para a câmara de fungo (Tabela 2).

Embora essa memória a longo prazo seja aplicada para explicar a dinâmica de forrageamento e seleção de plantas pelas formigas cortadeiras, os autores [4–12] sempre utilizam a CHX como um agente indutor do colapso colonial. Os autores supracitados excluem a possibilidade de a CHX causar toxicidade as operárias, além de atuar no fungo simbiote. A CHX é tóxica a muitos insetos, como moscas, grilos, lepidópteros, coleópteros entre outros, como diversas consequências, como formação de memória a longo prazo, toxicidade de genótipos resistentes, alteração da morfologia, alteração em níveis de proteínas e destruição de neurônios [13–20]. No foi estudo observado uma elevada mortalidade das operárias que receberam os pellets com CHX (Figura 4), diferindo significativamente do grupo controle sem CHX.

5. Conclusão

Conclui que a cicloheximida altera as frequências dos atos comportamentais das operárias de formigas cortadeiras quando homogeneizados em pellets, ocorrendo principalmente aumento das frequências de lambar o pellets e limpeza entre as operárias, além disso, ocorre alta mortalidade das formigas e a observação do declínio do jardim de fungo no decorrer da incorporação com cicloheximida.

Referências

1. Weber, N.A. Gardening Ants, the Attines. *Science* 1972, 178, 856.
2. Schultz, T.R.; Mueller, U.G.; Currie, C.R.; Rehner, S.A. *Reciprocal Illumination a Comparison of Agriculture in Humans*; Oxford University Press: England, UK, 2005.

3. Weber, N.A. Treatment of substrate by fungus-growing ants. *Anat. Rec.* **1956**, 125, 604–605.
4. Ridley, P.; Howse, P.E.; Jackson, C.W. Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their “symbiotic” fungus. *Experientia* **1996**, 52, 631–635.
5. North, R.D.; Jackson, C.W.; Howse, P.E. Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. *Physiol. Entomol.* **1999**, 24, 127–133.
6. Herz, H.; Hölldobler, B.; Roces, F. Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Behav. Ecol.* **2008**, 19, 575–582.
7. Arenas, A.; Roces, F. Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. *Anim. Behav.* **2016**, 115, 167–174.
8. Arenas, A.; Roces, F. Learning through the waste: Olfactory cues from the colony refuse influence plant preferences in foraging leaf-cutting ants. *J. Exp. Biol.* **2016**, 219, 2490–2496.
9. Arenas, A.; Roces, F. Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants: Learning can take place entirely at the colony dump. *PLoS ONE* **2017**, 12, e0171388.
10. Saverschek, N.; Herz, H.; Wagner, M.; Roces, F. Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus: Learning and long-term memory in leaf-cutting ants. *Anim. Behav.* **2010**, 79, 689–698.
11. Falibene, A.; Roces, F.; Rössler, W. Long-term avoidance memory formation is associated with a transient increase in mushroom body synaptic complexes in leaf-cutting ants. *Front. Behav. Neurosci.* **2015**, 9, 1–13.
12. Saverschek, N.; Roces, F. Foraging leafcutter ants: Olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Anim. Behav.* **2011**, 82, 453–458.

13. Akahane, R.; Amakawa, T. Stable and unstable phase of memory in classically conditioned fly, *Phormia regina*: Effects of nitrogen gas anaesthesia and cycloheximide injection. *J. Insect Physiol.* **1983**, 29, 331–337.
14. Flyg, B.C.; Kenne, K.; Boman, H.G. Phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J. Gen. Microbiol.* **1980**, 120, 173–181.
15. Matsumoto, Y.; Hirashima, D.; Terao, K.; Mizunami, M. Roles of NO Signaling in long-term memory formation in visual learning in an insect. *PLoS ONE* **2013**.
16. Fahrbach, S.E.; Choi, M.K.; Truman, J.W. Inhibitory effects of actinomycin D and cycloheximide on neuronal death in adult *Manduca sexta*. *Dev. Neurobiol.* **1994**, 25, 59–69.
17. Oberlander, H.; Leach, C.E.; Lynn, D.E. Effects of Cycloheximide on Cellular Elongation in a *Manduca sexta* Cell Line. *Dev. Genes Evol.* **1981**, 190, 60–61.
18. Soltani-Mazouni, N.; Soltani, N. Protein synthesis in the fat body of *Tenebrio molitor* (L.) during oocyte maturation: Effect of diflubenzuron, cycloheximide and starvation. *J. Stored Prod. Res.* **1995**, 31, 117–122.
19. Nouri, N.; Fallon, A.M. Pleiotropic changes in cycloheximide-resistant insect cell clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **1987**, 23, 175–180.
20. Wittstock, S.; Kaatz, H.H.; Menzel, R. Inhibition of brain protein synthesis by cycloheximide does not affect formation of long-term memory in honeybees after olfactory conditioning. *J. Neurosci.* **1993**, 13, 1379–1386.
21. Martin, P.; Bateson, P. *Measuring Behaviour: An Introctory Guide*; Cambridge University Press: New York, NY, USA, **1986**.
22. Camargo, R.S.; Forti, L.C.; De Matos, C.A.O.; Lopes, J.F.; De Andrade, A.P.P.; Ramos, V.M. Post-selection and return of foraged material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* **2003**, 42, 93–102.

23. Camargo, R.S.; Forti, L.C.; De Matos, C.A.O.; Lopes, J.F.; De Andrade, A.P.P. Physical resistance as a criterion in the selection of foraging material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entomol.* **2004**, 128, 329–331.
24. Camargo, S.; Camargo, S.; Puccini, C.; Forti, L.C.; Alberto, C.; Matos, O. Behaviors in fungus Garden cultivation: Routes of contamination of leaf cutting ant workers with fat-soluble tracer dye. *Int. J. Agric. Innov. Res.* **2017**, 5, 555–560.
25. Silva, L.C.; Camargo, R.S.; Forti, L.C.; Matos, C.A.O.; Travaglini, R.V. Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? *Sociobiology* **2015**, 62, 484–493.
26. Garrett, R.W.; Carlson, K.A.; Goggans, M.S.; Nesson, M.H.; Shepard, C.A.; Schofield, R.M.S. Leaf processing behaviour in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. *R. Soc. Open Sci.* **2016**.
27. De Britto, J.S.; Forti, L.C.; de Oliveira, M.A.; Zanetti, R.; Wilcken, C.F.; Zanuncio, J.C.; Loeck, A.E.; Caldato, N.; Nagamoto, N.S.; Lemes, P.G.; et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int. J. Res. Environ. Stud.* **2016**, 3, 11–92.
28. Lopes, J.F.S.; Forti, L.C.; Boaretto, M.A.; Camargo, R.S.; Andrade, A.P.; Ramos, V.M.; Nagamoto, N.S. Devolution rates of grass by *Atta capiguara* (Hymenoptera, Formicidae) in field conditions. *Pasturas Trop.* **2003**, 25, 42–45.
29. Knapp, J.J.; Howse, P.E.; Kermarrec, A. Factors controlling foraging patterns in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich). In *Applied Myrmecology: A World Perspective*; Westview Press: Boulder, CO, USA, **1990**; pp. 382–409.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA CICLOHEXIMIDA NA MORTALIDADE EM FORMIGAS *CORTADEIRAS ATTA SEXDENS*

Kátia Kaelly Andrade Sousa, Roberto da Silva Camargo, Luiz Carlos Forti, Nadia
Caldato

Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas,
Departamento de Proteção Vegetal, Laboratório de Insetos Sociais-Praga,
Botucatu, SP, Brasil.

Editor: Mariane A. Nickele

Submetido: 16 Outubro 2017

Aceito: 16 Abril 2018

Nota comunicativa: Revista Brasileira de Entomologia

RESUMO

As formigas cortadeiras cortam as plantas para cultivar um fungo simbiote do qual elas se alimentam. Compreender o mecanismo de seleção de plantas desperta o interesse de muitos pesquisadores, visto os inúmeros estudos que tratam essa questão. Muitos estudos clássicos apontam que as plantas são selecionadas de acordo com necessidade nutricional do jardim de fungo, e ausência de substâncias que sejam potencialmente nocivos a ele. Essa hipótese pode está apoiada em experimentos comportamentais que utilizam “fungicida” veiculado com pellets de polpa cítrica ou plantas de alta aceitabilidade pelas forrageiras. De acordo com a hipótese, o fungo sob a ação do fungicida emitiria um alomônio que informaria as operárias que o alimento não é propicio para o seu crescimento. Embora os autores afirmem que o “fungicida” empregado é de ação específica e atóxico as formigas, nos encontramos resultados contraditórios. Para chegar a essa conclusão, foi administrado via oral diferentes concentrações de cicloheximida (CHX) para operárias de formigas cortadeiras, via uma dieta pastosa a base de polpa cítrica. Após o período de ingestão, essas foram isoladas e alimentadas com fungo simbiote por 21 dias, avaliando sua mortalidade no período. Como esperado, observou-se que o tratamento CHX 0,01% apresentou uma baixa mortalidade (8,86%), CHX 0,1% apresentou uma mortalidade leve (27,85%) e o tratamento CHX 1% apresentou a mortalidade moderada (45,57%). Já o padrão, sulfluramida 0,1%, apresentou uma elevada mortalidade (91,14%). Dessa forma, concluiu-se que a CHX em altas concentrações promove moderada mortalidade de operárias de formigas cortadeiras por ingestão em comparação ao ingrediente ativo sulfluramida a 0,1%.

Palavras-chaves: Formigas cortadeiras; Cicloheximida; Mortalidade; Formicidae “screening”

ABSTRACT

Leaf-cutting ants live symbiotically with a fungus that they cultivate on the plant leaves that they cut. The innumerable studies on the plant selection mechanism used by leaf-cutting ants show the researchers' interest in this issue. Many classical studies propose that plants are selected according to the fungus garden nutritional needs and the absence of potentially harmful substances. This hypothesis is corroborated by behavioral experiments using cycloheximide (fungicide) with citric pulp or forage plants greatly accepted by leaf-cutting ants. According to this hypothesis, under the action of a fungicide, the fungus emits an allomone that informs worker ants that some food is inadequate to its growth. Although some authors state that the cycloheximide "fungicide" used is specific and non toxic to ants, our findings are distinct. In our study, various concentrations of cycloheximide were administered orally to leaf-cutting worker ants in a citric pulp paste diet. After the ingestion period, the ants were isolated and offered the symbiotic fungus for 21 days and the mortality rate was evaluated. As expected, the treatment with 0.01% cycloheximide showed a low mortality rate (8.86%). At 0.1%, the mortality rate was mild (27.85%), and treatment with 1% cycloheximide resulted in moderate mortality (45.57%). In contrast, the positive control with 0.1% sulfluramid showed a high mortality rate (91.14%). Therefore, we concluded that the ingestion of high concentrations of cycloheximide results in a moderate mortality rate in leaf-cutting worker ants.

Keywords: Leaf-cutter ant; Cycloheximide; Mortality; Formicidae "screening"

As formigas cortadeiras são insetos da região Neotropical, são conhecidas principalmente como pragas em algumas culturas, mas também pelo seu mutualismo com fungo simbiote, *Leucocoprinus gongylophorus* (Heim) Moeller, que é a base da alimentação da colônia (Hölldobler and Wilson, 1990; Schultz et al., 2005). Muitos estudos clássicos propõem que as plantas são selecionadas de acordo com as necessidades nutricionais do jardim de fungo e a ausência de substâncias potencialmente nocivas (Britto et al., 2016). Essa hipótese corroborada em experimentos comportamentais utilizando cicloheximida (CHX), substância essa conhecida por inibir a síntese proteica, entretanto, seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Conhecida também como “fungicida” em estudos com formigas cortadeiras, especialmente em estudos comportamentais sobre comunicação fungo-formiga para seleção de plantas.

Os primeiros estudos observaram que a CHX modifica o comportamento forrageiro das operárias de formigas cortadeiras, causando um reconhecimento retardado da substância às operárias, uma vez que, a CHX não é identificada como prejudicial a colônia no primeiro contato. Entretanto, ao longo tempo, a incorporação de CHX cessa, e tal comportamento foi hipoteticamente justificada por uma comunicação através de um semioquímico volátil liberado pelo fungo das formigas cortadeiras (Ridley et al., 1996). Além disso, estudos comportamentais relatam a existência hipotética da comunicação fungo-formiga através de processos semioquímicos voláteis, ainda a serem identificados e aprendidos (Ridley et al., 1996; North et al., 1999).

Recentemente, Sousa et al. (2017), observaram alterações nos comportamentos de forrageamento e cultivo do jardim de fungo pelas operárias de formigas cortadeiras, quando ofertado pellets a base de polpa cítrica com CHX, em colônias mantidas em laboratório. Os autores relataram um aumento significativo na mortalidade de operária na câmara de lixo, sugerindo uma potencial mortalidade de formigas cortadeiras devido a CHX. Muitos estudos foram conduzidos com CHX para analisar as células responsáveis pela memória de longo e curto prazo em insetos. No entanto, poucos estudos demonstraram o efeito e a toxicidade da CHX para as formigas cortadeiras (Akahane e Amakawa, 1983; Jaffé, 1980; Fahrbach et al., 1994; Nouri e Fallon, 1987; Wittstock et al.,

1993; Matsumoto et al., 2013), para outros insetos Marcos et al. (1982), relataram efeito tóxico sobre ovos, larvas e adultos de *Drosophila melanogaster* Meigen, causando uma acentuada mortalidade nos indivíduos, efeito notoriamente esperado, visto que essa substância é altamente tóxica em muitos animais (Bennett et al., 1972).

Com base na literatura supracitada, observamos a inexistência de estudos sobre o efeito do CHX em operárias de formigas cortadeiras. Para tanto, este estudo avaliou-se o efeito da CHX em diferentes concentrações administrado via oral em operárias de formigas cortadeiras.

Colônia estudada

Foi utilizado operárias de colônia de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, com aproximadamente 9 anos de idade, mantida no Laboratório de Insetos Sociais-Praga, LISP, UNESP, Botucatu, SP, Brasil. A colônia consiste de treze recipientes transparentes contendo, nove câmaras de jardim de fungo, com 2 cm de gesso para manter a umidade na câmara de fungo; dois para forrageamento e dois para deposição de resíduos, cada recipiente com diâmetro e altura de 18 cm. Os recipientes são mantidos interligados por tubos plásticos transparente entre ambas câmaras descrita. Foi oferecido a colônia folhas de *Acalypha* spp., *Ligustrum* spp. e *Citrus* spp. como substrato para o fungo simbiote. A manutenção da colônia foi mantida em temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12 h de luz.

Formulação da pasta

Para a avaliação da mortalidade por ingestão de substância via oral, foi utilizado a metodologia de Nagamoto et al. (2004), protocolo desenvolvido e estabelecido no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA/SDA) (Brasil, 2011) do Brasil. Protocolo desenvolvido para identificação de produtos efetivos no controle de formigas cortadeiras, onde apresenta métodos para a observação da mortalidade de operárias, ocasionada por ingestão de substância via oral. Este método (screening) consiste na utilização de pastas atrativas à base de polpa cítrica em pó, sacarose p.a e água destilada para o fornecimento ao um grupo de operárias

de formigas cortadeiras (Nagamoto et al. 2004). Cada experimento foi constituído de uma testemunha (ausência de ingrediente ativo), padrão (Sulfuramida [Griffin, USA] 0,01%) e três concentrações de CHX (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (1%, 0,1% e 0,01%), totalizando 5 tratamentos com 4 repetições. As concentrações utilizadas foram estabelecidas por base dos estudos realizados por Ridley et al. (1996) e Sousa et al. (2017), que utilizaram uma concentração de 1,25% de CHX.

Todas as formulações foram preparadas na relação p/p (peso/peso). Os ingredientes ativos, sulfluramida e CHX, foram primeiramente dissolvidos em acetona p.a., em seguida, adicionou-se polpa cítrica, misturou uniformemente e esperou a evaporação total do solvente, e com um bastão de vidro misturou essa pré-formulação uniformemente, e finalizou com adição de solução aquosa de glicose (10%), de modo que formasse uma pasta atrativa, uniforme e úmida. Para a testemunha, realizou o mesmo tratamento, mas sem a adição de ingrediente ativo (CHX e sulfluramida).

Preparação e aplicação da pasta em grupos de operárias

Os recipientes utilizados para os ensaios foram potes plásticos transparente com diâmetro de 7,5 cm e 5,5 cm de altura, com tampas herméticas. Cada pote foi forrado com 1 cm de gesso e secado por 24 h à 50°C. Após esse período, os potes foram umedecidos com água destilada, antes de receberem as operárias médias, formigas com largura da cabeça aproximadamente de 2,2 mm. Então, em cada pote foram colocadas 20 operárias médias e deixadas isoladas por 24 h sem o fungo e o substrato. Logo após esse período, foi fornecido 2 g de pasta formulada por 24 h, e retirado após este período. Em seguida à retirada da pasta, cada grupo de operárias recebeu aproximadamente 2,5 cm³ de esponja de fungo e cerca de 20 operárias mínimas, formigas com largura de cabeça aproximadamente 0,8 a 1,0 mm (jardineiras), pois as operárias médias não são capazes de cuidarem eficientemente do fungo (Bass and Cherrett, 1995). Feito isso, avaliou-se a mortalidade no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º, 14º, 17º e 21º dia após o fornecimento da pasta, metodologia de Nagamoto et. al. (2004). A correção da mortalidade das operárias foi feita pela

fórmula de Abbott (Abbott, 1925), tem a finalidade de subtrair o efeito da mortalidade natural, como também, unificar os resultados entre os ensaios.

Análises Estatísticas

Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk, a fim de detectar se havia ou não uma distribuição normal. Confirmado essa distribuição, realizou-se uma análise de variância (ANOVA), com comparações pareadas (pós-teste Tukey) entre os tratamentos, ao nível de significância de 5%.

Como esperado, foi detectado diferença significativa entre os tratamentos para a mortalidade das operárias (ANOVA, $F_{4;15}=41,85$, $P < 0,0001$). A sulfluramida 0,1% apresentou uma elevada mortalidade (91,14%), diferindo significativamente da testemunha ($P < 0,01$), CHX 0,01% ($P < 0,01$), CHX 0,1% ($P < 0,01$) e CHX 1% ($P < 0,01$). O tratamento CHX 0,01% apresentou uma baixa mortalidade (8,86%) não diferindo da testemunha ($P > 0,05$). O tratamento CHX 0,1% apresentou uma mortalidade leve (27,85%), diferindo da testemunha ($P < 0,05$), porém não diferindo dos tratamentos CHX 0,01% e CHX 0,1%. O tratamento CHX 1% apresentou a mortalidade mais elevada (45,57%) dentre os tratamentos com CHX, diferindo significativamente da testemunha ($P < 0,01$) e CHX 0,01% ($P < 0,01$). Porém a mortalidade das operárias do tratamento CHX 1% não diferiu do tratamento CHX 0,1% (Tabela 1 e Fig.1)

Tabela 1. Porcentagem da mortalidade de operárias de formigas cortadeiras

Tratamentos	Taxa da Mortalidade (%)
0,1% Sulfluramida	91,14 a
1% CHX	45,58 b
0,1% CHX	27,85 b
0,01% CHX	8,86 bc
Controle	1,25 c

O tratamento que compartilha a mesma letra não é significativamente diferente, no nível de significância de 5%.

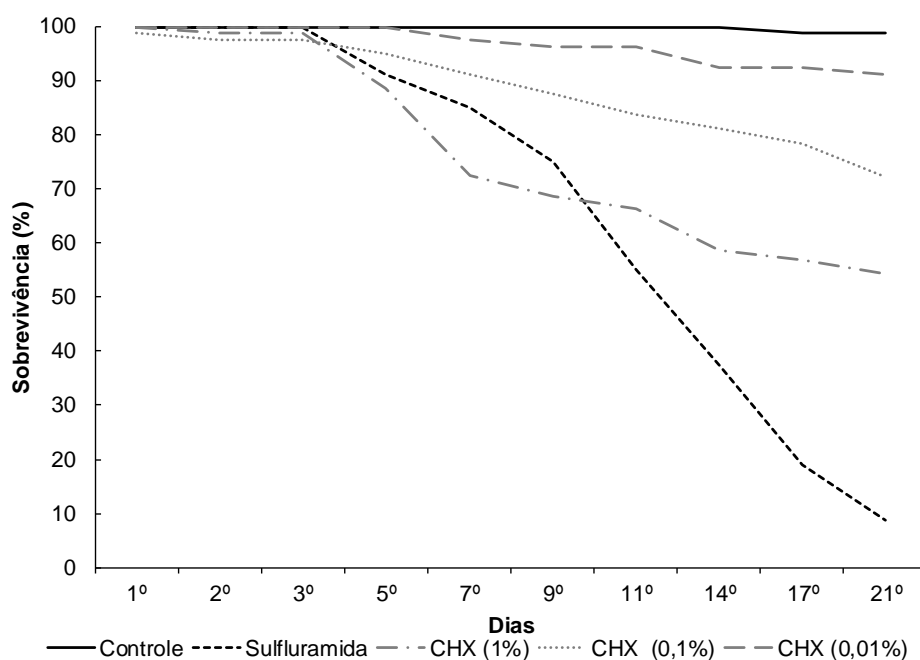


Fig 1. Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* durante 21 dias.

No estudo observou-se que a ingestão de CHX (em concentrações de 0,1 e 1%) por *A. sexdens* resultou em um aumento na taxa de mortalidade das operárias, corroborando com o relatado por Sousa et al. (2017). Além disso, Sousa et al. (2017) observaram mudanças nos comportamentos de forrageamento e cultivo de fungo, quando foi oferecida a colônia pellets de polpa cítrica contendo CHX, bem como a degradação do jardim de fungo.

Quando utilizadas concentrações mais baixas de CHX (0,01, 0,1 e 1%) na formulação da dieta, nesse estudo, em comparação ao encontrado na literatura. Por exemplo, Sousa et al. 2017 utilizaram uma concentração de 1,25% de CHX em pellets de polpa cítrica, oferecido a colônia durante sete dias consecutivos. Provavelmente, o fato dos pesquisadores administrar CHX nas colônias em dias consecutivos potencializou a sua ação, e dessa forma, ocorreu um aumento a dosagem aplicada nas operárias, conseqüentemente, uma mortalidade acentuada. Esse procedimento foi similar ao realizado por Ridley et al. (1996) e North et al. (1999), porém, os autores não relatam a mortalidade das operárias nas formigas cortadeiras. Apesar de sua identificação como inibidor de síntese de proteínas e RNA, a CHX também foi rotulada como fungicida em estudos conduzidos com formigas cortadeiras (Ridley et al., 1996; North et al.,

1999). Embora se saiba que CHX também afeta o crescimento de muitas leveduras e fungos, mas com pouco efeito sobre o crescimento de bactéria (Ennis & Lubin, 1964).

Outra questão é o modo de ação da CHX, sabe-se que essa molécula é um antibiótico produzido por *Streptomyces griseus* (Obrig et al., 1971, Schneider-Poetsch et al., 2010), porém esta apresenta uma ampla aplicação em pesquisas pioneiras. Em insetos, essa molécula tem sido utilizada em estudos que envolvem a formação de memória a longo prazo, genótipos resistentes, alteração da morfologia, alteração em níveis de proteínas e destruição de neurônios (Flyg et al. 1980, Oberlander, 1981, Akahane & Amakawa, 1983, Nouri and Fallon, 1987, Fahrbach et al. 1994, Soltani-Mazouni, and Soltani, 1995,). Por outro lado, Marcos et al. (1982), relataram o efeito tóxico em ovo, larva e adultos de *D. melanogaster*, causando uma acentuada mortalidade nos indivíduos, efeito notoriamente esperado, visto que essa substância é altamente tóxica em muitos animais (Bennett et al., 1972). Embora para as formigas cortadeiras, como dito anteriormente, os estudos não relatam a mortalidade das operárias e afirmam que a CHX é atóxica as formigas e com ação fungicida específica (Ridley et al. 1996).

Embora tenha sido observado uma mortalidade de aproximadamente 46% das operárias na concentração mais alta de CHX, essa pode ser considerada baixa quando comparado ao padrão, sulfluramida 0,01%. O princípio ativo sulfluramida é utilizado no Brasil, como ingrediente ativo na fabricação de iscas formicidas, para o controle de formigas cortadeiras do gênero *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), que são os insetos que causam danos à agricultura nacional. O uso de iscas tóxicas à base de sulfluramida, é hoje o principal produto que apresenta as características: (I) possuir ação retardada em operárias adultas (Nagamoto, 1998, 2003; Nagamoto et al., 2004; 2007); (II) não é repelente (Forti et al., 1998, Nagamoto, 2003); (III) é bem dispersada nas colônias (Pretto and Forti 1993, 1995, Forti et al., 2007); (IV) possui suficiente estabilidade quando exposto ao ambiente (Cameron, 1990); e (V) não é tóxica ao ser humano nem a outros organismos, sendo essas as características esperadas quando se busca um i.a. para formigas cortadeiras. Adicionalmente,

observou-se que padrão (sulfluramida 0,1%) afetou significativamente a sobrevivência das operárias no período estudado, com redução de 50% das operárias no 14º dia e quase 100% no 21º dia, sendo uma característica do ingrediente ativo essencial para o emprego em na formulação de iscas formicidas. De acordo com Nagamoto et al. (2004), a sulfluramida apresenta classe III com aparente indicação de maior amplitude de concentrações, se aproximando da classe IV. Para melhor entendimento, os inseticidas são agrupados em classes distintas para servir como "screening" de formicidas (Stringer et al., 1964; Lofgren et al., 1967; Vander Meer et al., 1985), sendo: a) Classe I: os compostos causam mortalidade menor que 90% no final do período teste. b) Classe II: os compostos matam rapidamente em altas concentrações (mortalidade acima de 15% após 24 horas e maior que 90% no final do período testado), e causa mortalidade total abaixo de 90% em baixas concentrações. c) Classe III: os compostos apresentam ação retardada com mortalidade menor que 15% após 24 horas, mas acima de 90% no final do período teste, sobre uma amplitude de concentrações de 1 a 9 vezes. d) Classe IV: são similares à classe III, diferindo destes por ter ação retardada sobre uma amplitude de concentrações de 10 a 99 vezes. e) Classe V: são compostos raros, apresentando ação retardada sobre uma amplitude de concentrações acima de 100 vezes.

Como discutido anteriormente, a CHX não pode ser considerado um potencial formicida, devido a sua baixa mortalidade em alta concentração (menor que 50%), modo de ação desconhecido para insetos, não apresentar ação retardada como a sulfluramida, e ser tóxica ao ser humano e a outros organismos. Contudo, essa molécula causa mortalidade as operárias, levando a dúvida sobre os resultados de estudos comportamentais com formigas cortadeiras. Com isso, este estudo tem como conclusão que a CHX em altas concentrações promove moderada mortalidade em operárias de formigas cortadeiras por ingestão.

Referências

Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J.Econ. Entomol.* 18 (2), 265–267.

- Akahane, R., Amakawa, T., 1983. Stable and unstable phase of memory in classically conditioned fly. *Phormia regina*: effects of nitrogen gas anaesthesia and cycloheximide injection. *J. Insect Physiol.* 29 (4), 331–337.
- Bass, M., Cherrett, J.M., 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leafcutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entomol.* 20 (1), 1–6.
- Bennett, E.L., Orme, A., Hebert, M., 1972. Cerebral protein synthesis inhibition and amnesia produced by scopolamine, cycloheximide, streptovitacin A, anisomycin and emetine in rat. *Fed. Proc.* 31 (2), 838.
- Brasil, 2011. Instrução normativa n. 42, de 05 de dezembro de 2011, Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF, pp.4–5, Seção 1.
- Britto, S.L., Forti, L.C., Oliveira, M.A., Zanetti, R., Wilcken, C.F., Zanuncio, J.C., Loeck, A.E., Caldato, N., Nagamoto, N.S., Lemes, P.G., Camargo, R.S., 2016. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int. J. Res. Environ. Stud.* 3, 11–92.
- Cameron, R.S., 1990. Potential baits for control of the Texas leaf-cutting and *Atta texana* (Hymenoptera: Formicidae). In: Vander Meer, R.K., Jaffe, K., Cedeno, A. (Eds.), *Applied Myrmecology: A World Perspective*. Westview Press, pp. 628–637.
- Ennis, H.L., Lubin, M., 1964. Cycloheximide: aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science* 146 (3650), 1474–1476.
- Fahrbach, S.E., Choi, M.K., Truman, J.W., 1994. Inhibitory effects of actinomycin D and cycloheximide on neuronal death in adult *Manduca sexta*. *J. Neurobiol.* 25(1), 59–69.
- Farber, J.L., Farmar, R., 1973. Differential effects of cycloheximide on protein and RNA synthesis as a function of dose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51 (3), 626–630.

- Flyg, B.C., Kenne, K., Boman, A.N.D.H.G., 1980. Phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J. Gen. Microbiol.* 120, 173–181.
- Forti, L.C., Pretto, D.R., Nagamoto, N.S., Padovani, C.R., Camargo, R.S., Andrade, A.P.P., 2007. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology* 50 (3), 1–15.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge, pp. 732.
- Jaffé, K., 1980. Effect of cycloheximide on protein synthesis and memory in praying mantis. *Physiol. Behav.* 25 (3), 367–371.
- Lofgren, C.S., Stringer, C.E., Banks, W.A., Bishop, P.M., 1967. Laboratory Tests with Candidate Bait Toxicants Against the Imported Fire Ant. ARS 81-14.
- Marcos, R., Lloberas, J., Creus, A., Xamena, N., Cabré, O., 1982. Effect of cycloheximide on different stages of *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Lett.* 13 (1–2), 105–112.
- Matsumoto, Y., Hirashima, D., Terao, K., Mizunami, M., 2013. Roles of NO signaling in long-term memory formation in visual learning in an insect. *PLOS ONE* 8 (7), e68538.
- Nagamoto, N.S., Forti, L.C., Andrade, A.P.P., Boaretto, M.A.C., Wilcken, C.F., 2004. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 44 (2), 413–431.
- Nagamoto, N.S., Forti, L.C., Raetano, C.G., 2007. Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity. *J. Pest. Sci.* 80, 9–13.
- North, R.D., Jackson, C.W., Howse, P.E., 1999. Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. *Physiol. Entomol.* 24 (2), 127–133.

- Nouri, N., Fallon, A.M., 1987. Pleiotropic changes in cycloheximide resistant insect cell clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23 (3), 175–180.
- Oberlander, H., Leach, C.E., Lynn, D.E., 1981. Effects of cycloheximide on cellular elongation in a *Manduca sexta* cell line. *Roux's Arch.* 190, 60–61.
- Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L., Hardesty, B., 1971. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* 246, 174–181.
- Ridley, P., Howse, P.E., Jackson, C.W., 1996. Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their 'symbiotic' fungus. *Experientia* 52 (6), 631–635.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyley, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., Liu, J.O., 2010. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* 6 (3), 209–217.
- Schultz, T.R., Mueller, U.G., Currie, C.R., Rehner, S.A., 2005. Reciprocal illumination: a comparison of agriculture in humans and ants. In: Vega, F., Blackwell, M. (Eds.), *Ecological and Evolutionary Advances in Insect-Fungal Associations*. Oxford University Press, New York, pp. 149–190.
- Soltani-Mazouni, N., Soltani, N., 1995. Protein synthesis in the fat body of *Tenebrio molitor* (L.) during oocyte maturation: effect of diflubenzuron, cycloheximide and starvation. *J. Stored Prod. Res.* 31, 117–122.
- Sousa, K.K.A., Camargo, R.S., Forti, L.C., 2017. Communication or toxicity: what is the effect of cycloheximide on leaf-cutting ant workers? *Insects* 8, 126.
- Stringer, C.E., Lofgren, C.S., Bartley, F.J., 1964. Imported fire ant toxic studies: evaluation of toxicants. *J. Econ. Entomol.* 57 (6), 941–945.
- Vander Meer, R.K., Lofgren, C.S., Williams, D.F., 1985. Fluoroaliphatic sulfones: a new class for delayed-action insecticides for control of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 78 (6), 1190–1197.

Wittstock, S., Kaatz, H.H., Menzel, R., 1993. Inhibition of brain protein synthesis by cycloheximide does not affect formation of long-term memory in honeybees after olfactory conditioning. *J. Neurosci.* 13 (4), 1379–1386.

CAPITULO 3

EXISTE UM SEMIOQUÍMICO VOLÁTIL LIBERADO PELO JARDIM DE FUNGO DE FORMIGAS CORTADEIRAS?

K. K. A. Sousa¹, G. C. Catalani¹, T. M. R. Gianeti², R. S. Camargo³, N. Caldato¹,
V. M. Ramos³, e L. C. Forti¹

¹Universidade Estadual de São Paulo/UNESP, Departamento de Proteção Vegetal, Laboratório de Insetos Sociais-Praga, Botucatu-SP, Brasil; E-mail: katiakaelly@gmail.com (K. K. A. S.); gchristalcatalani@yahoo.com.br (G. C. C.); nachiol@gmail.com (N. C.); luizforti@fca.unesp.br (L. C. F.)

²Universidade Estadual de São Paulo/UNESP, Laboratório Central - Faculdade de Ciências Agrônômicas UNESP, Botucatu-SP, Brasil; E-mail: gianeti@gmail.com (T. M. R. G.)

³Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Faculdade de Ciências Agrárias, Laboratório de Entomologia Agrícola, Departamento de Agronomia, Presidente Prudente-SP, Brasil; camargobotucatu@yahoo.com.br (R. S. C.); vaniaramos@unoeste.br (V. M. R.)

Editor: Dr. Gadi V. P. Reddy

Submetido: 18 Junho 2018

Aceito: 17 Julho 2018

Artigo: Florida Entomologist

Resumo:

A simbiose entre o fungo e as formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) tem despertado interesse nos pesquisadores sobre o mecanismo utilizado pelas formigas para selecionar as plantas. As necessidades nutricionais do jardim de fungo e/ou a ausência de substâncias potencialmente nocivas a colônia, são critérios para essa seleção de plantas por operárias forrageiras. Isto é apoiado por experimentos comportamentais usando fungicida nas iscas (polpa cítrica) ou plantas forrageiras altamente aceitas pelas formigas cortadeiras. Portanto, o jardim de fungo poderia emitir um semioquímico volátil em resposta ao fungicida, que informa às formigas que uma planta ou material é inadequada para o seu crescimento. O objetivo deste estudo foi identificar os compostos voláteis liberados pelo jardim de fungo de formigas cortadeiras em resposta a um fungicida, bem como a resposta comportamental das operárias em relação a jardins de fungos saudáveis e não saudáveis. Os resultados não apresentaram diferença na proporção de compostos liberados pelo jardim de fungo saudáveis e não saudáveis. A análise das respostas de formigas ao jardim de fungo saudáveis e não saudáveis no experimento de escolha dupla revelou uma forte atração para o fungo, independentemente do seu estado de saúde. Portanto esse estudo concluí que nenhum semioquímico volátil foi emitido pelo jardim de fungo sob a ação de substâncias deletérias.

Palavras-chave: Formicidae; *Atta*; fungo simbiótico

Abstract:

The symbiosis between fungi and leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) has aroused the interest of researchers in the mechanism used by ants to select plants. The nutritional needs of the fungus garden and the absence of potentially deleterious substances from plants are criteria for selection by foraging workers. This is supported by behavioral experiments using fungicide with baits (citrus pulp) or forage plants highly accepted by leaf-cutting ants. The fungus garden emits a volatile semiochemical in response to a fungicide, which informs ants that a plant is unsuitable for its growth. The aim of our study was to identify the volatile compounds released by the fungus garden of leaf-cutting ants in response to a fungicide, as well as the behavioral response of workers towards to healthy and unhealthy fungus gardens. The results showed no difference in the proportion of compounds released by healthy and unhealthy fungus gardens. Analysis of the responses of ants to healthy and unhealthy fungus gardens in a dual-choice experiment revealed a strong attraction to the fungus garden, regardless of its health status. We therefore conclude that no volatile semiochemicals emitted by the fungus garden under the action of deleterious substances.

Keywords: Formicidae; *Atta*; symbiotic fungus

Introdução

As formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) têm um mutualismo com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Heim) Moeller, o qual, serve de principal fonte de alimento para a colônia (Schultz et al. 2005; Hölldobler & Wilson 2009). Essas formigas selecionam e cortam várias espécies de plantas para o cultivo de seu fungo simbiótico (Weber, 1972). Consequentemente, algumas espécies de formigas são conhecidas principalmente como pragas de algumas culturas na região Neotropical (Della Lucia & Souza 2011). A seleção de material vegetal envolve a escolha adequada de espécies de plantas que são adequadas para o desenvolvimento do fungo simbiótico (Hölldobler & Wilson 1990), embora a existência de uma comunicação formiga-fungo para a seleção correta de plantas seja apenas hipotetizada (Ridley et al. 1996; North et al., 1999; Green e Kooij, 2018).

Estudos que investigaram a existência dessa comunicação utilizaram um inibidor da síntese proteica, a cicloheximida (CHX) (Obrig et al., 1971; Schneider-Poetsch et al., 2010). Esta substância, relatada como fungicida, tem sido aplicada em estudos comportamentais em formigas cortadeiras. Verificou-se que o efeito da CHX no jardim de fungo é responsável por mudanças no comportamento de forrageamento de operárias de formigas cortadeiras, uma vez que a CHX não é identificada como um composto prejudicial para a colônia no primeiro contato com as operárias (Ridley et al. 1996). North et al. 1999 hipotetizou que um semioquímico emitido pelo jardim de fungo regula a seleção de plantas por forrageiras, sendo interpretado como uma comunicação entre o fungo simbiote e as operárias de formigas cortadeiras. Os autores mostraram que as formigas aprendem a rejeitar o material vegetal que contém substâncias químicas nocivas ao fungo. Após um período inicial de aceitação, as formigas de ninhos de laboratório pararam de carregar pellets contendo o agente fungicida (cicloheximida) com polpa cítrica. Posteriormente, muitos estudos comportamentais utilizaram a CHX para compreender os efeitos sobre a memória olfativa de longo prazo das formigas cortadeiras. Alguns desses estudos apoiam a existência de uma comunicação entre a formiga e o fungo através de um composto volátil semioquímico que ainda não foi identificado e

cuja presença é apenas hipotetizada (Cazin et al. 1989; Ridley et al. 1996; North et al. 1999; Herz et al., 2008; Saverschek et al., 2010; Saverschek & Roces, 2011; Thiele et al., 2014; Falibene, A., Roces, F., Rössler, 2015; Arenas & Roces, 2016, 2017; Arenas, A. Roces, 2016).

O presente estudo tem como objetivo testar a hipótese proposta por North et al. 1999. Essa hipótese sugere que um semioquímico volátil emitido pelo jardim de fungo regula a seleção de plantas por forrageiras de formigas cortadeiras, o que é interpretado como uma comunicação entre o fungo simbiótico e as operárias de formigas cortadeiras. Portanto, o objetivo foi identificar os compostos voláteis liberados pelo jardim de fungo de formigas cortadeiras, bem como a resposta comportamental das operárias ao jardim de fungo saudável e não saudável.

Materiais e Métodos

COLÔNIAS

Colônias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae), conhecidas como saúvas, foram utilizadas nos experimentos, mantidas no Laboratório de Insetos Sociais-Praga da Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, Brasil. As colônias com rainha foram coletadas em março de 2016, com aproximadamente dois anos de idade no início dos experimentos. Cada colônia tem um recipiente (comprimento: 15 cm, largura: 15 cm e altura: 15 cm) com o jardim de fungo e fornecido as plantas *Acalypha* spp. e *Ligustrum* spp. (folhas e caules). O recipiente de jardim de fungo foi conectado a duas câmaras adicionais, uma para forrageamento das plantas fornecidas e outra para deposição de lixo. As colônias foram mantidas a uma temperatura de 24 ± 2 °C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 14: 10h L: D em laboratório.

PREPARAÇÃO DOS PELLETS A BASE DE POLPA CÍTRICA

Os pellets consistiram em pequenos grânulos feitos a base de polpa de laranja. Para o preparo da polpa da laranja, foi utilizado frutas providenciadas de culturas orgânicas. As laranjas foram descascadas e foi utilizado sua polpa, mais especificamente a parte do mesocarpo da fruta, zona mediana do um fruto, entre

a epiderme e o núcleo. A polpa foi desidratada por 72 horas a 50 °C e moídas em pó em um processo de moagem. Em seguida, misturaram-se homogeneamente 1,8 g deste pó com 0,2 g de carboximetilcelulose e adicionou-se 0,025 g de CHX (Sigma-Aldrich) dissolvida em 2,5 mL de água para produzir os pellets de laranja com CHX. A matriz foi transferida para uma seringa de 20 mL para produzir os pellets, que foram deixados secar por 24 horas a 25 °C. O mesmo método foi usado para produzir pellets sem o fungicida. Os pellets foram cortados em pedaços iguais e armazenados em um freezer dentro de potes de plástico até o momento do uso (método adaptado de Ridley et al. 1996 e Sousa et al. 2017).

VOLÁTEIS LIBERADOS PELO JARDIM DE FUNGO

Para avaliação dos voláteis liberados pelo jardim de fungo, comparou-se dois grupos experimentais: a) colônias que receberam pellets com CHX por 7 dias, seguidos de pellets sem CHX por mais 7 dias, totalizando 14 dias (N = 6); b) colônias que receberam pellets sem CHX por 14 dias (N = 6). Amostras do jardim de fungo (0,75 g) foram coletadas em dias diferentes dos dois grupos: 1^o dia (início do experimento), 7^o e 14^o dia. Segundo Souza et al. 2017, o declínio e a redução no volume do jardim de fungo indicam que o fungo está insalubre, devido aos efeitos CHX (Fig. 1). As amostras de jardim de fungo coletados (saudáveis e insalubres) foram submetidas à análise cromatográfica.

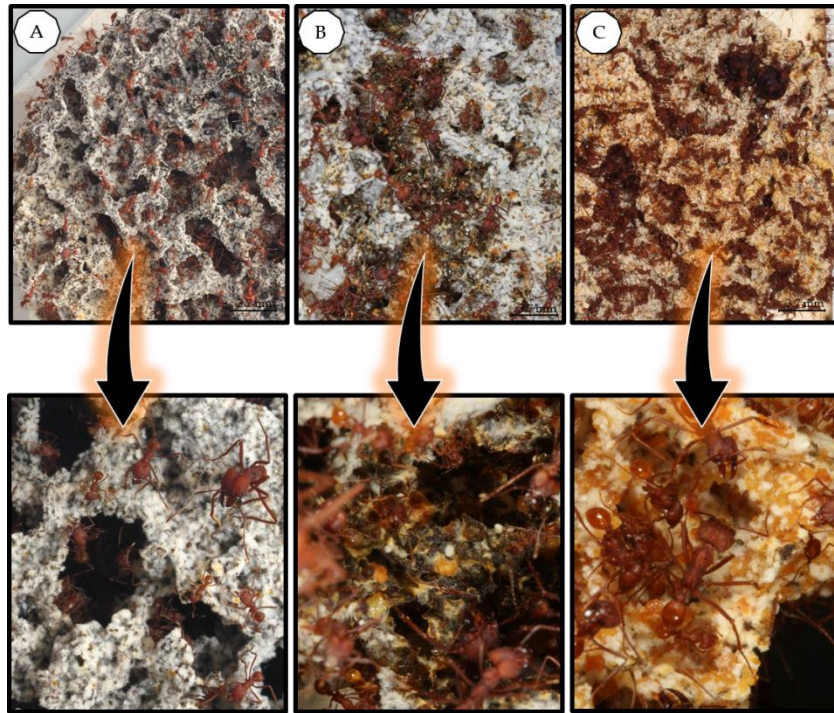


Fig. 1. Jardim de fungo: A - Fungo saudável; B - Fungo com incorporação de pellets com CHX; C - Fungo no 14º dia do experimento.

ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA

O estudo químico do jardim de fungo foi realizado no Laboratório Central do Departamento de Agricultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, Brasil. Foi usado para este experimento o PerkinElmer TurboMatrix™, conectado a um PerkinElmer SQ 8 T GC / MS, operando no modo headspace sem o trap. As condições do espaço livre foram: equilíbrio do frasco a 80 °C por 5 minutos, temperatura da agulha de 90 °C, temperatura da linha de transferência de 125 °C e hélio como gás carreador a 20 psi. As condições do espectrômetro de massa foram: faixa de varredura de 30 a 300 Daltons, tempo de varredura de 0,1 segundos, temperatura da fonte de 180 °C e temperatura de entrada de 200 °C. Utilizou-se uma coluna Elite 5 ligeiramente polar (5% de fenil-silicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Essa coluna de película espessa proporcionou retenção suficiente para separar os componentes mais voláteis eluídos no início e forneceu a faixa dinâmica necessária para separar os componentes de alto nível e de baixo nível presentes na matriz.

BIOENSAIOS DE ESCOLHA

Respostas de formigas ao jardim de fungo saudável e não saudável: sistema de escolha em forma de Y

Para determinar se as operárias de formigas cortadeiras são atraídas por jardim de fungo saudável e não saudável, monitoramos a escolha das operárias em seis bioensaios experimentais, 12 vezes por bioensaio: 1) Fungo saudável do 1º dia versus fungo saudável; 2) Fungo saudável do 1º dia versus nenhum fungo; 3) Fungo não saudável do 7º dia versus fungo saudável; 4) Fungo não saudável do 7º dia versus nenhum fungo; 5) Fungo não saudável do 14º dia versus fungo saudável; 6) Fungo não saudável do 14º versus nenhum fungo.

Utilizou-se um sistema de escolha simples, em forma de Y, de vidro transparente, que consistia em ramos de comprimento igual (40 cm) e largura (3 cm), com os ramos superiores dispostos em um ângulo de 60° (Fig. 2). No ramo da base do sistema de Y foi instalado uma câmara para liberação das operárias.

Nos ramos superiores do sistema de Y foram instaladas as câmaras, onde as escolhas foram fornecidas aleatoriamente.

Cinquenta formigas com uma largura média da cabeça de aproximadamente 2,2 mm foram introduzidas na câmara da base do sistema de Y para permitir escolhas entre os bioensaios contendo 0,5 g (500 mg) de fungos limpos com remoção de formigas, ovos, larvas e pupas. O número de operárias foi contado em intervalos de 5 minutos por 30 minutos, correspondendo à escolha da operária em cada câmara contendo os bioensaios. Cada bioensaio foi repetido 12 vezes.

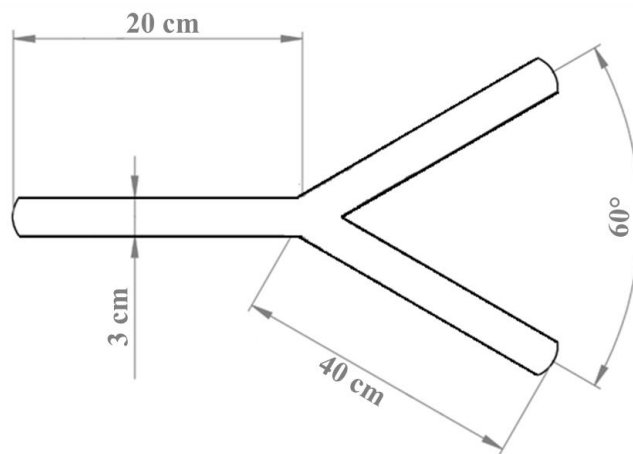


Fig. 2. Modelo olfatométrico utilizado no experimento de respostas de formigas a fungos saudável ou não saudável no sistema de escolha em forma de Y.

Respostas das formigas a extratos de fungo saudável e não saudável: escolha simultânea

Os extratos de fungo foram obtidos utilizando pedaços do fungo das colônias que receberam pellets com CHX e pellets sem CHX como descrito acima. Os pedaços de fungo foram limpos, removida toda a cria e operárias, e 500 mg de fungos foram utilizados (adaptado ao Viana et al. 2001). Este jardim de fungo foi imerso em 5 mL de diclorometano por 2 horas, filtrado com papel filtro (Qualy®) e mantido em baixa temperatura. Esses extratos foram utilizados nos bioensaios.

Para determinar se as operárias de formigas cortadeiras são atraídas por extratos de fungo saudável e não saudável, foram oferecidos discos de papel de filtro (Qualy®) (diâmetro: 0,6 cm) contendo o extrato do fungo na área de

fORAGEAMENTO em cinco tratamentos: 1) 10 discos com extrato de fungo saudável; 2) 10 discos com extrato de fungo não saudável do 7º dia; 3) 10 discos com extrato de fungo não saudável do 14º dia; 4) 10 discos com diclorometano; 5) 10 discos sem diclorometano e sem extratos, como controle.

Quatro colônias foram utilizadas e sete ensaios foram realizados por colônia, totalizando 350 discos oferecidos por colônia. O bioensaio foi encerrado quando o tratamento foi completamente transportado por forrageiras para a colônia. O número total de discos transportados foi contado para cada tratamento.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiro, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para determinar se os dados eram normalmente distribuídos ou não. A proporção de compostos de aldeído nos 1º, 7º e 14º dias foi comparada entre colônias que receberam pellets com CHX e aquelas que receberam pellets sem CHX usando o teste de Mann-Whitney para amostras independentes. O mesmo teste foi utilizado para comparação dos dados do sistema de escolha no sistema de Y. O número total de discos transportados foi submetido ao teste de Kruskal-Wallis e ao teste de Student-Newman-Keuls como pós-teste. Um nível de significância de 1% foi adotado para todos os testes. As análises foram feitas através do programa BioEstat 5.0, Manaus, Brasil.

Resultados

O jardim de fungo emitiu quatro substâncias voláteis, 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, pentanal e hexanal, pertencentes à classe dos aldeídos (Fig. 3). A proporção de aldeídos foi semelhante nas quatro colônias que receberam os pellets com CHX e nas colônias que receberam pellets sem CHX (Fig. 4). Não encontramos diferenças significativas na proporção de 2 metilpropanal [1º dia (U = 1,29, n = 4, p > 0,01), 7º dia (U = 2,16, n = 4, p > 0,01), 14º dia (U = 1,87, n = 4, p > 0,01)], 3-metilbutanal [1º dia (U = 1,01, n = 4, p > 0,01), 7º dia (U = 2,02, n = 4, p > 0,01), 14º dia (U = 1,88, n = 4, p > 0,01)], pentanal [1º dia (U = 2,30, n = 4, p > 0,01), 7º dia (U = 0,86, n = 4, p > 0,01), 14º dia (U = 0,86, n = 4, p > 0,01)], ou hexanal [1º dia (U = 0,57, n = 4, p > 0,01), 7º dia (U = 0,10, n = 4, p > 0,01), 14º

dia ($U = 1,29$, $n = 4$, $p > 0,01$)] entre colônias que receberam pellets com e sem CHX.

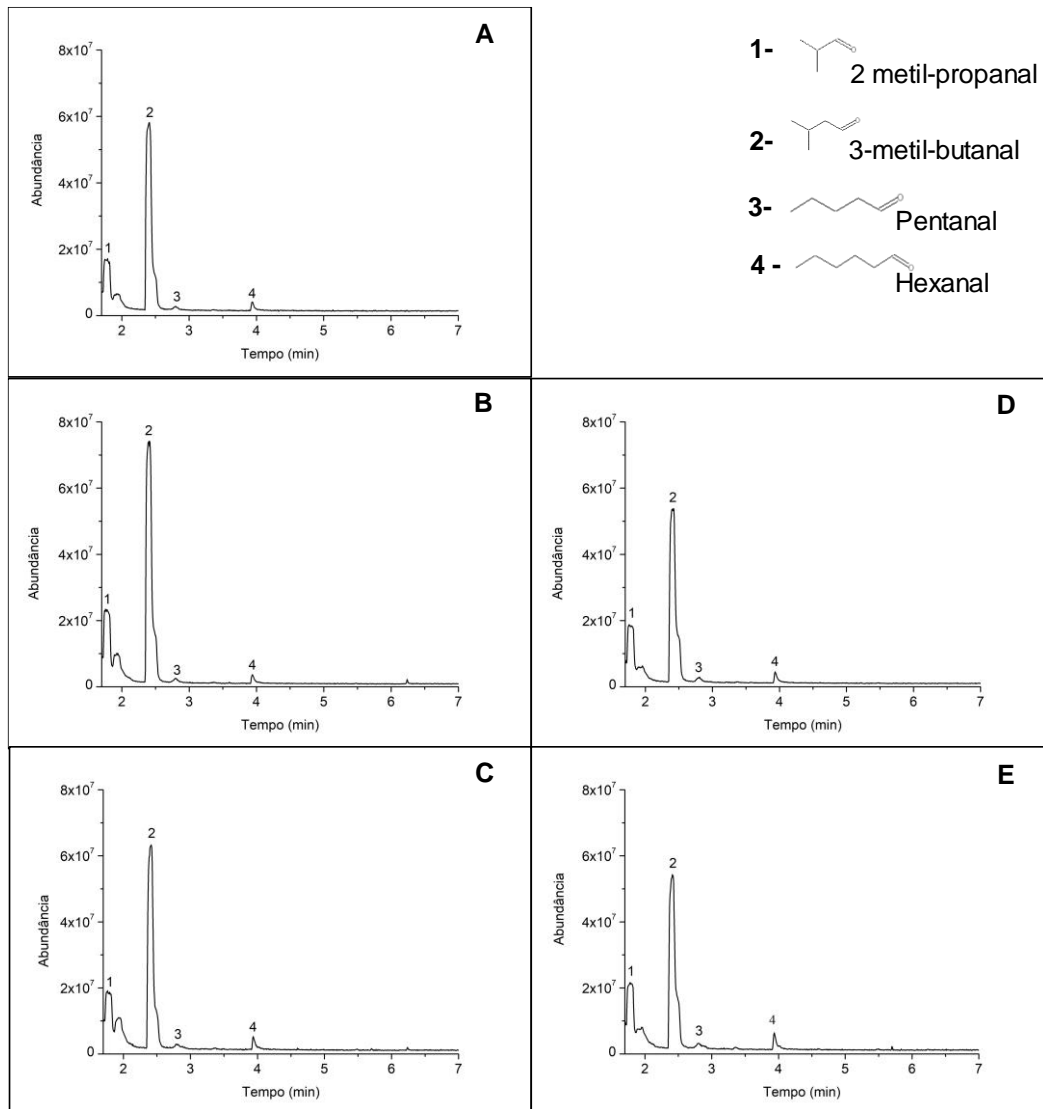


Fig. 3. Voláteis emitidos pelo fungo. A - fungo saudável; B - fungo sem CHX por 7 dias; C - fungo sem CHX por 14 dias; D - fungo com CHX por 7 dias; E - fungo com CHX por 14 dias.

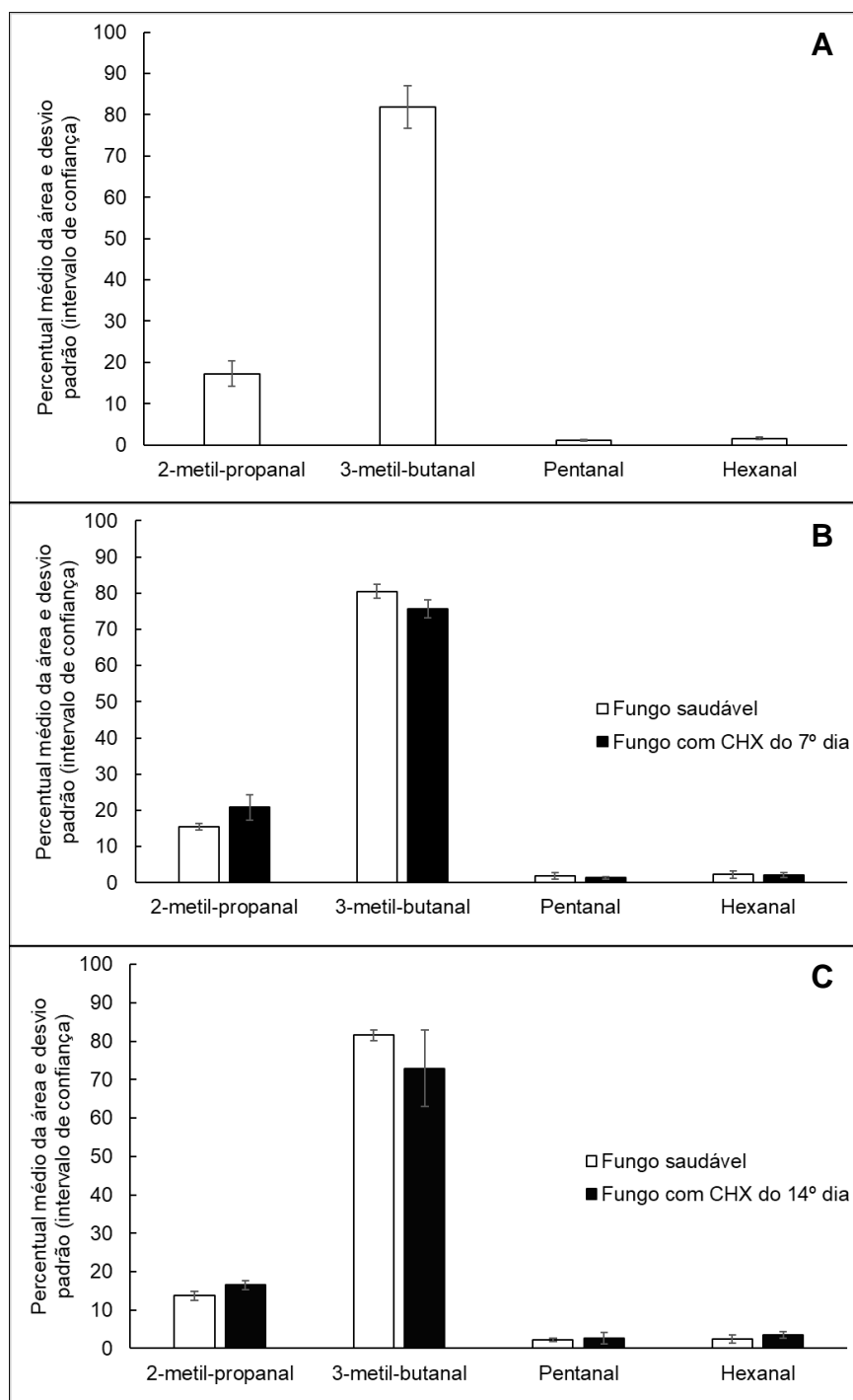


Fig. 4. Porcentagem da área média e desvio padrão (intervalo de confiança) de voláteis emitidos pelo fungo; A - Fungo saudável; B - fungo saudável e fungo com CHX do 7º dia; C - fungo saudável e fungo com CHX do 14º dia.

A análise das respostas das formigas ao jardim de fungo saudável e não saudável usando o sistema de escolha em forma de Y (Fig. 2) revelou uma atração para o jardim de fungo, independentemente do seu estado de saúde (Fig. 5). Observamos diferenças significativas entre o fungo saudável versus

nenhum fungo ($U = 42$, $n = 12$, $p < 0,01$), entre fungo não saudável do 7º dia versus nenhum fungo ($U = 28,8$, $n = 12$, $p < 0,01$) e entre o fungo não saudável do 14º dia versus nenhum fungo ($U = 41,5$, $n = 12$, $p < 0,01$). Por outro lado, não houve diferenças significativas entre fungo saudável do versus fungo saudável ($U = 0,54$, $n = 12$, $p > 0,01$), entre fungos não saudáveis do 7º dia e fungos saudável ($U = 24,8$, $n = 12$, $p > 0,01$), ou entre fungo não saudável o 14º dia versus fungo saudável ($U = 0,054$, $n = 12$, $p > 0,01$).

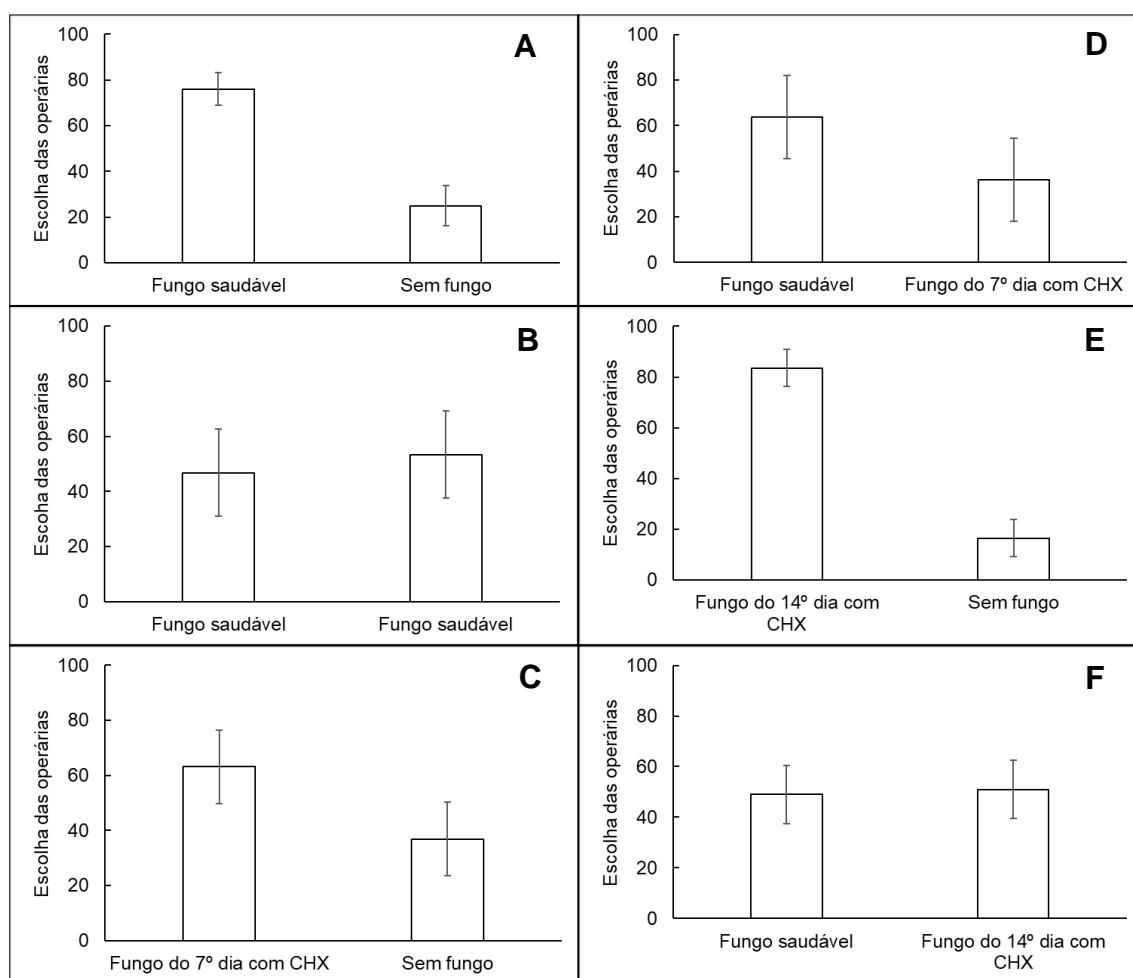


Fig. 5. Percentual e intervalo de confiança da escolha de operárias de formigas no sistema de escolha em forma de Y. A - Câmara com fungo saudável e câmara sem fungo; B - Câmara com fungo saudável e câmara com fungo saudável; C - Câmara contendo fungo do 7º dia com CHX e câmara sem fungo; D - Câmara com fungo saudável e câmara contendo fungo do 7º dia com CHX ; E - Câmara contendo fungo do 14º dia com CHX e câmara sem fungo; F - Câmara com fungo saudável e câmara contendo fungo do 14º dia com CHX.

Foi detectado uma diferença significativa entre os tratamentos com extratos de fungos saudável e não saudável (Fig. 6) (teste de Kruskal-Wallis, $H = 27,15$, g.l. = 4, $p < 0,001$). Os discos com extrato de fungo saudável foram altamente transportados por forrageiras (175 discos), com uma diferença significativa em comparação com discos com extrato de fungo não saudável do 7º dia (59 discos, $p < 0,001$) e discos com extrato de fungo não saudável do 14º dia (89 discos, $p < 0,001$). No entanto, o número de discos transportados com extrato de fungo saudável não foi significativamente diferente do número de discos com diclorometano (155 discos, $p = 0,5542$) ou de discos sem diclorometano e extratos (182 discos, $p = 0,7858$).

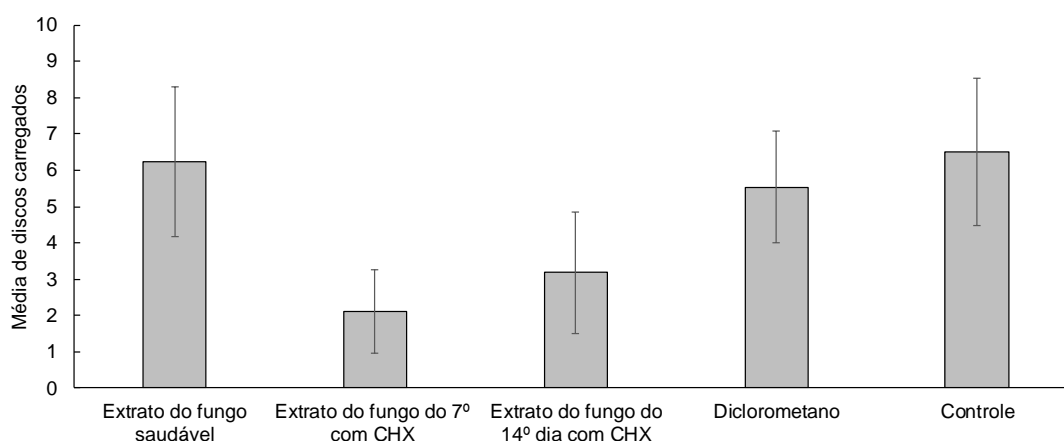


Fig. 6. Média e intervalo de confiança de carregamento de discos contendo extrato de fungo saudável e não saudável para a colônia.

Discussão

Uma das principais descobertas deste estudo é que os compostos de aldeído liberados pelo jardim de fungo, foram os mesmos em colônias que receberam pellets com CHX e que receberam pellets sem CHX nos 1º, 7º e 14º dia (Fig. 3). Esse resultado não corrobora com o estudo sugerido por North et al. 1999, que sugere que um semioquímico volátil emitido pelo jardim de fungo regula a seleção de plantas por forrageiras de formigas cortadeiras, o que é interpretado como uma comunicação entre o fungo simbiótico e as operárias. Eles mostraram que as formigas aprendem a rejeitar plantas que contêm substâncias químicas prejudiciais ao fungo. Após um período inicial de aceitação, formigas de ninhos de laboratório pararam de colher isca granular contendo um agente fungicida (CHX) com polpa de laranja. Em contraste,

estudos mostram que a CHX causa mortalidade nas operárias de formigas cortadeiras e ao fungo e, portanto, pode promover a rejeição de pellets devido à mortalidade das operárias e pela morte do jardim de fungo (Sousa et al. 2017).

Aproximadamente 250 compostos orgânicos voláteis foram identificados em 129 espécies de fungos (126 Macromycetes e 3 Micromycetes patogênicos para plantas: *Puccinia*) onde ocorrem como aldeídos, cetonas, álcoois, fenóis, entre muitos outros (Chiron & Michelot 2005). Entretanto, em nosso estudo, o jardim de fungo emitiu quatro substâncias voláteis, 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, pentanal e hexanal, pertencentes à classe dos aldeídos. Sabe-se que as flores, partes vegetativas e raízes das plantas liberam mais de 1.000 compostos orgânicos voláteis, principalmente aldeídos de 6 carbonos, álcoois, ésteres e vários terpenóides (Pichersky et al. 2006). Em alguns casos, as plantas liberam compostos voláteis quando danificadas por herbívoros (Tumlinson et al., 1999). No caso de formigas cortadeiras, as folhas das plantas são cortadas, processadas em uma polpa e incorporadas na superfície do jardim de fungo pelas operárias (Camargo et al. 2007; Garrett et al. 2016). Provavelmente, estes fragmentos de folhas no jardim de fungo emitem substâncias voláteis, como observado em folhas danificadas mecanicamente de estacas de álamo (*Populus simonii* e *P. pyramidalis*) (Hu et al. 2008). Esses autores identificaram 16 aldeídos: acetaldeído, butanal, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, undecanal, dodecanal, tetradecanal, (Z) -3-hexenal, (E) -2-hexenal, (E) -2- nonenal, benzaldeído e furfural. Curiosamente, a maioria dessas substâncias foi liberada 24 horas após o oferecimento (Hu et al. 2008), sugerindo que o mesmo possa ocorrer nas folhas fragmentadas do jardim de fungo das formigas cortadeiras.

Sabe-se que partes de plantas insalubres, danos mecânicos, infecções por patógenos e lesões de herbívoros podem induzir a rápida síntese de compostos voláteis, como hexenais e hexanal (Arimura et al., 2000). Analogamente, o fungo simbiótico degrada as folhas como substrato para sua colonização e pode induzir a liberação de alguns aldeídos. *Leucoagaricus gongylophorus* é um fungo basidiomiceto que produz hifas especializadas (gongylídios) para alimentar formigas e larvas (Hölldobler & Wilson 2009), bem

como enzimas para a degradação da lignocelulose (Boyd & Martin 1975; Martin et al. 1975; Schiøtt et al. 2008, 2010; Aylward et al., 2013; Grell et al., 2013; Kooij et al., 2014, 2016). A degradação da lignina pelos basidiomicetos produz uma variedade de metabólitos aromáticos extracelulares (Jong et al. 1994), especialmente aldeídos (Gallois et al. 1990), tais como hexanal, heptanal, 2-butenal, 2-metil-2-butenal, 4-nonenal e 2,4-decadienal. Estes resultados apoiam a produção de alguns aldeídos pelo jardim de fungo durante a degradação da lignocelulose.

As respostas das operárias ao jardim de fungo saudável e não saudável indicaram uma atração para o jardim de fungo (Fig. 5). Essa atração pode ser atribuída à presença de hidrocarbonetos de formigas e grandes quantidades de n-alcenos no jardim de fungo que constituem um sinal para as operárias de formigas cortadeiras (Viana et al., 2001). Este fato também pode explicar por que as operárias não distinguiram entre jardim de fungo saudável e não saudável (Fig. 5), embora a operária em uma colônia possa levar o fungo não saudável para a câmara de lixo (Sousa et al. 2017). Esta observação foi corroborada quando os extratos fúngicos saudáveis e não saudáveis foram testados, sugerindo que as operárias não podem distinguir o estado de saúde do fungo (Fig. 6). Provavelmente, os resultados comportamentais reforçam a falta de um semioquímico volátil emitido pelo jardim de fungo, como sugerido por North et al. 1999, pois as operárias devem evitar produtos de decomposição de fungos não saudáveis ou mortos. Além disso, a escolha dessas formigas poderia ter sido afetada por muitos outros fatores, como a escolha da operária, a forma como os extratos foram produzidos, a maneira como as partes saudáveis e não saudável foram selecionadas, etc.

Realizando experimentos comportamentais, o estudo de North et al. 1999, concluiu que compostos altamente voláteis emitidos pelo jardim de fungo afetam diretamente o comportamento de forrageamento das operárias de formigas cortadeiras. A principal falha em seu estudo é que eles não identificaram quaisquer compostos voláteis de fungo não saudável ou morto por causa do efeito da CHX. Em altas concentrações, como usado por Ridley et al. 1996, CHX provoca a morte as operárias e ao jardim de fungo (Sousa et al. 2017, 2018). O

comportamento de forrageamento é provavelmente afetado pela toxicidade da CHX nas operárias e ao jardim de fungo e assim, não sendo uma resposta comportamental ao semioquímico volátil.

Em conclusão, foi observado que o jardim de fungo saudável e não saudável emitiram quatro substâncias voláteis na mesma proporção e que as operárias não discriminaram entre elas. Assim, poderíamos hipotetizar que semioquímicos não voláteis podem estar envolvidos.

Referências

- Arenas, A, Roces F. 2016. Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. *Animal Behaviour* 115: 167–174.
- Arenas A, Roces F. 2016. Learning through the waste: olfactory cues from the colony refuse influence plant preferences in foraging leaf-cutting ants. *The Journal of Experimental Biology*: jeb.139568.
- Arenas A, Roces F. 2017. Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants: Learning can take place entirely at the colony dump. *Plos One* 12: e0171388.
- Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406: 512.
- Aylward FO, Burnum-Johnson KE, Tringe SG, Telling C, Tremmel DM, Moeller JA, Scott JJ, Barry KW, Piehowski PD, Nicora CD. 2013. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. *Applied and environmental microbiology* 79: 3770–3778.
- Boyd ND, Martin MM. 1975. Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana*: properties, significance and possible origin. *Insect Biochemistry* 5: 619–635.
- Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS, Andrade APP, Ottati ALT. 2007. Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus*

- Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *Journal of Applied Entomology* 131: 139–145.
- Cazin J, Wiemer DF, Howard JJ. 1989. Isolation, growth characteristics, and long-term storage of fungi cultivated by *Attine* ants. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1346–1350.
- Chiron N, Michelot D. 2005. Odeurs des champignons: chimie et rôle dans les interactions biotiques-une revue. *Cryptogamie, Mycologie* 26: 299–364.
- Falibene, A., Roces, F., Rössler W. 2015. Long-term avoidance memory formation is associated with a transient increase in mushroom body synaptic complexes in leaf-cutting ants. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9: 1–13.
- Gallois A, Gross B, Langlois D, Spinnler H-E, Brunerie P. 1990. Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic basidiomycetes. *Mycological Research* 94: 494–504.
- Garrett RW, Carlson KA, Goggans MS, Nesson MH, Shepard CA, Schofield RMS. 2016. Leaf processing behaviour in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. *Royal Society Open Science* 3: 150111.
- Green PWC, Kooij PW. 2018. The role of chemical signalling in maintenance of the fungus garden by leaf-cutting ants. *Chemoecology* 28: 101–107.
- Grell MN, Linde T, Nygaard S, Nielsen KL, Boomsma JJ, Lange L. 2013. The fungal symbiont of *Acromyrmex* leaf-cutting ants expresses the full spectrum of genes to degrade cellulose and other plant cell wall polysaccharides. *BMC genomics* 14: 928.
- Herz H, Hölldobler B, Roces F. 2008. Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Behavioral Ecology* 19: 575–582.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. *The ants*. Harvard University Press.

- Hölldobler B, Wilson EO. 2009. The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies. WW Norton & Company, New York.
- Hu Z, Shen Y, Luo Y, Shen F, Gao H, Gao R. 2008. Aldehyde volatiles emitted in succession from mechanically damaged leaves of poplar cuttings. *Journal of Plant Biology* 51: 269–275.
- Jong ED, Field JA, Bont JAM. 1994. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 153–187.
- Kooij PW, Pullens JWM, Boomsma JJ, Schiøtt M. 2016. Ant mediated redistribution of a xyloglucanase enzyme in fungus gardens of *Acromyrmex echinator*. *BMC microbiology* 16: 81.
- Kooij PW, Rogowska-Wrzesinska A, Hoffmann D, Roepstorff P, Boomsma JJ, Schiøtt M. 2014. *Leucoagaricus gongylophorus* uses leaf-cutting ants to vector proteolytic enzymes towards new plant substrate. *The ISME journal* 8: 1032.
- Della Lucia TMC, Souza DJ. 2011. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. Della Lucia, TMC Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo. Viçosa-MG: UFV: 13–26.
- Martin MM, Boyd ND, Gieselmann MJ, Silver RG. 1975. Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. *Journal of Insect Physiology* 21: 1887–1892.
- North RD, Jackson CW, Howse PE. 1999. Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. *Physiological Entomology* 24: 127–133.
- Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B. 1971. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* 246: 174–181.
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808–811.

- Ridley P, Howse PE, Jackson CW. 1996. Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their 'symbiotic' fungus. *Experientia* 52: 631–635.
- Saverschek N, Herz H, Wagner M, Roces F. 2010. Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus: learning and long-term memory in leaf-cutting ants. *Animal Behaviour* 79: 689–698.
- Saverschek N, Roces F. 2011. Foraging leafcutter ants: olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Animal behaviour* 82: 453–458.
- Schiøtt M, Licht HHDF, Lange L, Boomsma JJ. 2008. Towards a molecular understanding of symbiont function: identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. *BMC microbiology* 8: 40.
- Schiøtt M, Rogowska-Wrzesinska A, Roepstorff P, Boomsma JJ. 2010. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. *BMC biology* 8: 156.
- Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, Liu JO. 2010. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature chemical biology* 6: 209.
- Schultz TR, Mueller UG, Currie CR, Rehner S. 2005. Reciprocal illumination: a comparison of agriculture in humans and in fungus-growing ants, pp. 149–190 In F V, M B [eds.], *Ecological and Evolutionary Advances in Insect-fungal Associations*. Oxford Univ Press, New York.
- Sousa KKA, da Silva Camargo R, Forti LC. 2017. Communication or Toxicity: What Is the Effect of Cycloheximide on Leaf-Cutting Ant Workers? *Insects* 8: 126.
- Sousa KKA, Silva Camargo R, Forti LC, Caldato N. 2018. Effects of cycloheximide on the motility of *Atta sexdens* leaf-cutting worker ant. *Rev. Brasil. Entomol.* In Press.

- Thiele T, Kost C, Roces F, Wirth R. 2014. Foraging Leaf-Cutting Ants Learn to Reject *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* Plants that Emit Herbivore-Induced Volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 40: 617–620.
- Tumlinson JH, Paré PW, Lewis WJ. 1999. Plant production of volatile semiochemicals in response to insect-derived elicitors., pp. 95–105 In Chadwick DJ, Goode J [eds.], *Insect-Plant Interactions and Induced Plant Defence* (Novartis Foundation Symposium 223). Wiley, Chicester.
- Viana AMM, Frézard A, Malosse C, Della Lucia TMC, Errard C, Lenoir A. 2001. Colonial recognition of fungus in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology* 11: 29–36.
- Weber NA. 1972. Gardening ants: the Attines. *The American Philosophical Society*: 146.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As formigas cortadeiras são pertencentes um grupo de insetos eusociais, conhecidas principalmente como cultivadora de fungo, o qual é mantido em condições favoráveis para seu crescimento pelas formigas cortadeiras através de incorporações de substrato nutritivo que favorecendo o seu desenvolvimento, e na manutenção de entrada de microrganismos nocivo ao fungo. Portanto, a seleção de plantas por operárias forrageiras pode seguir esses critérios para a seleção de plantas. Desse modo, estudos apontaram que o jardim de fungo poderia emitir um semioquímico volátil em resposta a incorporação de materiais nocivos ao seu crescimento, que informaria às formigas que tal material incorporado é inadequado para o seu crescimento.

Sendo assim, o primeiro estudo teve a finalidade de agregar conhecimentos sobre os comportamentos realizados, o tempo de carregamento, a deposição de lixo pela colônia quando fornecido um material conhecido como nocivo ao fungo, sendo tal substância não detectada ao primeiro contato pelas formigas cortadeiras. Assim, este primeiro estudo constatou que a cicloheximida (CHX), conhecida nos estudos com formigas cortadeiras como fungicida afeta negativamente e estruturalmente as colônias de formigas cortadeiras. Os comportamentos sofrem alterações como principalmente o aumento das frequências de lambar o pellet e a limpeza entre as formigas, aumento do tempo de carregamento, e além disso, o presente estudo observou o aumento da mortalidade de operárias no decorrer da incorporação da substância.

Dessa forma, com o resultado de mortalidade de operárias no estudo anterior, o segundo estudo teve o objetivo de estudar o efeito na CHX na mortalidade de operárias, administrado diferentes concentrações de CHX as operárias de formigas cortadeiras. Como esperado, observou-se que o tratamento de CHX a 1% apresentou uma mortalidade nas formigas. Embora tenha sido observado essa mortalidade moderada na concentração mais alta de CHX, a substância não pode ser considerada como um potencial formicida, devido a sua baixa mortalidade em alta concentração, menor 50% visto a sulfloramida apresenta um potencial de 91,14% de mortalidade a 0,1% de concentração. Além disso, o modo de ação da CHX ainda é desconhecido para

insetos, por não apresenta ação retardada como a sulfluramida, e ser tóxica ao ser humano e a outros organismos. E assim, levando a dúvida sobre os resultados de estudos comportamentais em relação ao fato da alteração dos atos comportamentais ser influenciados por um semioquímico volátil, que pode está sendo também, influenciado pela mortalidade das operárias.

Dessa maneira, o terceiro estudo teve a finalidade de identificar os voláteis que são emitidos pelo jardim de fungo quando incorporado a CHX, bem como a resposta comportamental das operárias em relação a jardim de fungo saudáveis e não saudáveis. Os resultados não apresentaram diferença na proporção de compostos liberados pelo jardim de fungo saudáveis e não saudáveis, sendo identificado 4 substâncias presentes nos dois tratamentos, além disso observou-se forte a atração para o fungo, independentemente do seu estado de saúde. Assim, poderíamos hipotetizar que um semioquímico não voláteis podem estar também envolvidos.

Portanto, esse estudo atendeu aos objetivos traçados para o conhecimento das respostas comportamentais das operárias de formiga cortadeiras às substâncias químicas, trazendo contribuições importantes como o primeiro estudo que demonstrou o efeito na mortalidade de formigas cortadeiras pela substância cicloheximida. Além disso, também, o primeiro estudo que identificou voláteis emitidos pelo jardim de fungo de formigas cortadeiras.

CONCLUSÃO

- A cicloheximida altera as frequências dos comportamentos das operárias de formigas cortadeiras quando homogeneizados em pellets, ocorrendo principalmente aumento das frequências de lambar o pellets e limpeza entre as operárias, além disso, ocorre alta mortalidade das formigas e a observação do dano no jardim de fungo no decorrer da incorporação com cicloheximida.
- A cicloheximida em altas concentrações causa mortalidade em operárias de formigas cortadeiras por ingestão.
- Foi observado que o jardim de fungo saudável e não saudável emitiram quatro substâncias voláteis na mesma proporção e que as operárias não discriminaram entre elas. Assim, poderíamos hipnotizar que semioquímicos não voláteis podem estar envolvidos.

REFERÊNCIAS

- AKAHANE, R.; AMAKAWA, T. Stable and unstable phase of memory in classically conditioned fly, *Phormia regina*: effects of nitrogen gas anaesthesia and cycloheximide injection. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, n. 4, p. 331–337, 1983.
- ANDRADE, A. P. P. et al. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, v. 40, p. 293–306, 2002.
- AUTUORI, M. A saúva e seu combate. **Revista Ahembi**, v. 25, n. 74, p. 18, 1957.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology**, v. 19, n. 3, p. 215–220, 1994.
- BRITTO, J. S. et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v. 3, p. 11–92, 2016.
- CAETANO, F. H.; ZARA, F. J.; JAFFÉ, K. **Formigas: biologia e anatomia**. FHC, 2002.
- CHERRETT, J. M. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera, Formicidae). I. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. **The Journal of Animal Ecology**, v. 37, p. 387–403, 1968.
- CHERRETT, J. M. History of the leaf-cutting ant problem. *In*: LOFGREN, C. S.; MEER, R. K. VANDER (Eds.). **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder, Colorado, USA: Westview Press, 1986a. p. 10–17.
- CHERRETT, J. M. The economic importance and control of leaf-cutting ants. *In*: VINSON, S. (Ed.). **Economic impact and control of social insects**. New York: Praeger, 1986b. p. 165–192.
- CHERRETT, J. M. The biology, pest status and control of leaf-cutting ants. **The biology, pest status and control of leaf-cutting ants.**, p. 1–37, 1986c.
- DEJEAN, A.; OLMSTED, I.; CAMAL, J. F. Interaction between *Atta cephalotes* and arboreal ants in the Biosphere Reserve Sian Ka'an (Quintana Roo, Mexico): efficient protection of the trees (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology (USA)**, 1992.
- DELLA-LUCIA, T. M. C.; OWLER, H. G.; ARAÚJO, M. S. Castas das formigas cortadeiras. *In*: DELLA-LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: UFV, 1993. p. 43–3.

- ETHERIDGE, P.; PHILLIPS, F. T. Laboratory evaluation of new insecticides and bait matrices for the control of leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 66, n. 4, p. 569–578, 1976.
- FAHRBACH, S. E.; CHOI, M. K.; TRUMAN, J. W. Inhibitory effects of actinomycin D and cycloheximide on neuronal death in adult *Manduca sexta*. **Journal of Neurobiology**, v. 25, n. 1, p. 59–69, 1994.
- FLYG, B. C.; KENNE, K.; BOMAN, A. N. D. H. G. Phage-resistant Mutants with a Decreased Resistance to *Cecropia* Immunity and a Decreased Virulence to *Drosophila*. **Journal of General Microbiology**, v. 120, n. 1980, p. 173–181, 1980.
- FORTI, L. C. Relação entre plantas atacadas e a saúva *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae: Hymenoptera). **Boletim Grupo trabalho formigas Cortadeiras**, v. 2, p. 11–13, 1985.
- FORTI et al. **Trofalaxia entre operárias-operárias e operárias-larvas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae)**. Congresso Brasileiro de Entomologia. **Anais...**1993
- FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S.; PRETTO, D. R. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. **Anais do Simpósio sobre formigas cortadeiras dos países do Mercosul, Anais. Piracicaba: FEALQ**, p. 113–132, 1998.
- FORTI et al. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 50, n. 3, p. 1149–1164, 2007.
- GARCIA et al. Ecological interaction between *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and the vegetation of a mesophyll semideciduous forest fragment in Botucatu, SP, Brazil. **Sociobiology**, p. 265–283, 2003.
- GARRETT, R. W. et al. Leaf processing behaviour in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. **Open Sci.** v. 3, p. 150111, 2016.
- HERZ, H.; HÖLLDOBLER, B.; ROCES, F. Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. **Behavioral Ecology**, v. 19, n. 3, p. 575–582, 2008.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Harvard University Press, 1990.
- JUSTI, J. et al. Formigas cortadeiras. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, v. 4, p. 5–31, 1996.
- KNAPP, J. J.; HOWSE, P. E.; KERMARREC, A. Factors controlling foraging patterns in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich). **Applied Myrmecology—A World Perspective**, p. 382–409, 1990.

KOST, C.; TREMMEL, M.; WIRTH, R. Do leaf cutting ants cut undetected? Testing the effect of ant-induced plant defences on foraging decisions in *Atta colombica*. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22340, 2011.

MUELLER et al. Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. **Molecular ecology**, 2018.

MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2034–2038, 1998.

NAGAMOTO et al. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 44, n. 2, p. 413–432, 2004.

NAKANO et al. **Novo método de controle de saúvas através do fungicida Bunema 330 CS**. Congresso Brasileiro de Entomologia. **Anais...**1993

NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. **Physiological Entomology**, v. 24, n. 2, p. 127–133, 1999.

NOURI, N.; FALLON, A. M. Pleiotropic changes in cycloheximide-resistant insect cell clones. **In vitro cellular & developmental biology**, v. 23, n. 3, p. 175–180, 1987.

OBERLANDER, H.; LEACH, C. E.; LYNN, D. E. Effects of cycloheximide on cellular elongation in a *Manduca sexta* cell line. **Wilhelm Roux's archives of developmental biology**, v. 190, n. 1, p. 60–61, 1981.

OI, D. H.; PEREIRA, R. M. Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera: Formicidae). **Florida Entomologist**, p. 63–74, 1993.

OLIVEIRA, M. F. S. S. **Controle de formigas cortadeira**. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

PINHÃO et al. Mirex-S (sulfluramid): uma sulfona fluoroalifática para o controle de *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). **14º cong. Brasil. Entomol. Piracicaba**. **51p**, 1993.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, v. 2, n. 2, p. 161–170, 1977.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym., Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 25, n. 3, p. 237–245, 1978.

RICHARD, F. J. et al. Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 175, n. 5, p. 297–303, 2005.

RIDLEY, P.; HOWSE, P. E.; JACKSON, C. W. Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their 'symbiotic' fungus. **Experientia**, v. 52, n. 6, p. 631–635, 1996.

SAVERSCHEK, N.; ROCES, F. Foraging leafcutter ants: Olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. **Animal Behaviour**, v. 82, n. 3, p. 453–458, 2011.

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

SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R.; REHNER, S. Reciprocal illumination: a comparison of agriculture in humans and in fungus-growing ants. *In*: F, V.; M, B. (Eds.). **Ecological and Evolutionary Advances in Insect-fungal Associations**. New York: Oxford Univ Press, 2005. p. 149–190.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 4, p. 307–313, 2003.

SOLOMON, S. E. et al. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2738, 2008.

SOLTANI-MAZOUNI, N.; SOLTANI, N. Protein synthesis in the fat body of *Tenebrio molitor* (L.) during oocyte maturation: Effect of diflubenzuron, cycloheximide and starvation. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 2, p. 117–122, 1995.

VASCONCELOS, H. L.; FOWLER, H. G. Foraging and fungal substrate selection by leaf-cutting ants. **Applied myrmecology—a world perspective**. Westview Press, Boulder, p. 411–419, 1990.

VERZA, S. S. et al. Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 47, n. 2, p. 391–400, 2006.

WEBER, N. A. **Weeding as a factor in fungus culture by ants**. Anatomical Record. **Anais...WILEY-LISS DIV JOHN WILEY & SONS INC**, 605 THIRD AVE, NEW YORK, NY 10158-0012, 1957.

WEBER, N. A. Gardening ants: the Attines. **The American Philosophical Society**, v. 92, p. 1–146, 1972a.

WEBER, N. A. Gardening ants: the attines (Memoirs of the American

Philosophical Society, vol. 92). **The American Philosophical Society, Independence Square Philadelphia**, 1972b.

WEBER, N. A. The attines: the fungus-culturing ants. **American Scientist**, v. 60, p. 448–456, 1972.

ZANUNCIO, J. C. et al. Eficiência da isca Mirex-S (sulfluramida 0, 3%) no controle de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) em três dosagens. **Acta Amazônica**, v. 26, n. 1/2, p. 115–120, 1993.

ZANUNCIO, J. C. et al. **Eficiência da isca Mirex-S (sulfluramid 0, 3%) no controle de *Acromyrmex crassispinus* (Hymenoptera; Formicidae)** Congresso Brasileiro de Entomologia. **Anais...**1993