

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

CAROLINA DE LIMA PUCCINI

**ROTAS DE CONTAMINAÇÃO DE FORMIGAS CORTADEIRAS POR CONTATO
DIRETO E INDIRETO COM CORANTE TRAÇADOR LIPOSSOLÚVEL**

**Botucatu
2016**

CAROLINA DE LIMA PUCCINI

**ROTAS DE CONTAMINAÇÃO DE FORMIGAS CORTADEIRAS POR CONTATO
DIRETO E INDIRETO COM CORANTE TRAÇADOR LIPOSSOLÚVEL**

Monografia correspondente ao Trabalho de Conclusão de Curso, apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS FORTI

COORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO DA SILVA CAMARGO

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Puccini, Carolina de Lima.

Rotas de contaminação de formigas cortadeiras por
contato direto e indireto com corante traçador
lipossolúvel / Carolina de Lima Puccini. - Botucatu, 2016

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Carlos Forti

Coorientador: Roberto da Silva Camargo

Capes: 20404000

1. Formiga-cortadeira - Comportamento. 2. Avaliação de
comportamento. 3. Inseto - Controle. 4. Contaminação
biológica. 5. Glândulas.

Palavras-chave: Comportamento; Contaminação; Corante Sudan
III; Glândula pós-faríngea; Isca formicida.

CAROLINA DE LIMA PUCCINI

**ROTAS DE CONTAMINAÇÃO DE FORMIGAS CORTADEIRAS POR
CONTATO DIRETO E INDIRETO COM CORANTE TRAÇADOR
LIPOSSOLÚVEL**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

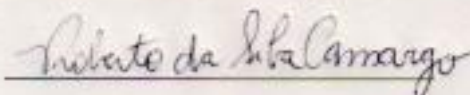
ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS FORTI

Comissão examinadora



Prof. Dr. Luiz Carlos Forti

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"



Prof. Dr. Roberto da Silva Camargo

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"



Prof. Dr. Ricardo Benine

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Botucatu, 08 de dezembro de 2016.

Resumo

As formigas cortadeiras são conhecidas por cortar material vegetal para cultivo do fungo simbiote utilizado como base em sua alimentação. Por esse motivo, plantações são prejudicadas por esses insetos. Como forma de controle, iscas formicidas são utilizadas. A partir desse estudo buscamos demonstrar que os comportamentos de contato direto (comportamentos relacionados ao processamento do material vegetal) e indireto (auto-limpeza, limpeza mútua ou toques) com iscas formicidas promovem a contaminação de operárias. Para o contato direto, foram realizadas observações e contabilizadas as frequências dos comportamentos realizados por operárias no processamento de pellets a base de polpa cítrica. Obtivemos que os comportamentos de segurar e lambe as iscas são os mais recorrentes. Para o contato indireto, procedeu-se a aplicação tópica de traçador (corante, Sudan III) em operária, posteriormente, estudaram-se as interações sociais entre a operária com traçador e as operárias sem traçador. Adicionalmente, as cabeças das operárias foram dissecadas para visualizar a presença de corante na glândula pós-faríngea. Os resultados foram que de 50 a 70 % das operárias estavam com a glândula pós faríngea corada, dependendo do tamanho do grupo. A análise comportamental mostrou uma interação crescente de acordo com o aumento de indivíduos, sendo os toques entre as operárias o comportamento mais frequente. Provavelmente a rota do corante traçador ocorreu pelos toques excessivos entre as operárias, com posterior auto limpeza e limpeza mútua. Os comportamentos de contato direto e indireto analisados são responsáveis em dispersar rapidamente uma substância entre os membros da colônia, como verificamos em nosso experimento. Dessa forma, corroboramos a hipótese que o contato direto e indireto promove a contaminação das companheiras do ninho.

.Palavras-chaves: Isca formicida, comportamento, corante Sudan III, glândula pós-faríngea, contaminação.

Abstract

Leaf-cutting ants are known to cut plants for cultivating the symbiotic fungus used as a food. For this reason, plantations are harmed by these insects. As a control, toxic baits are used. From this study we aim to demonstrate that direct contact behaviors (behaviors related to the processing of plant material) and indirect (self-grooming, allogrooming or touches) with toxic baits promote the contamination of workers. For the direct contact, observations were made and counted the frequencies of worker behavior in the processing of pellets based on citrus pulp. We found that the behaviors of holding and licking the baits are the most recurrent. For indirect contact, topical application of tracer (dye, Sudan III) was performed on the worker, and social interactions were then studied between the worker with tracer and without tracer. Additionally, the workers' heads were dissected to visualize the presence of dye in the post-pharyngeal gland. The results were that from 50 to 70% of the workers had their pharyngeal gland stained, depending on the size of the group. The behavioral analysis showed an increasing interaction according to the increase of individuals, with the touches among the workers being the most frequent behavior. Probably the route of the tracer dye occurred by the excessive touching between the workers, with self-grooming and allogrooming. The direct and indirect contact behaviors analyzed are responsible for rapidly dispersing a substance among the members of the colony, as we have seen in our experiment. Thus, we corroborate the hypothesis that the direct and indirect contact promotes the contamination of nestmates.

Key word: Formicidal baits, behavior, Sudan III dye, post-pharyngeal gland, contamination.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	9
2. CAPÍTULO 1 - COMPORTAMENTOS DO CULTIVO DO JARDIM DE FUNGO: ROTA DE CONTAMINAÇÃO DE OPERARIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS POR TRAÇADOR LIPOSSOLÚVEL	11
2.1. RESUMO	12
2.2. ABSTRACT	13
2.3. INTRODUÇÃO	14
2.3.1. Cultivo do fungo simbiote com pellets a base de polpa cítrica: contato direto?	14
2.4. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.5. RESULTADOS	18
2.6. DISCUSSÃO	20
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
2.8. TABELAS	26
3. CAPÍTULO 2 – COMPORTAMENTOS DE LIMPEZA MÚTUA, AUTO LIMPEZA E TOQUES: ROTAS DE CONTAMINAÇÃO DAS OPERÁRIAS EM FORMIGAS CORTADEIRAS POR CORANTE TRAÇADOR LIPOSSOLÚVEL”	29
3.1. RESUMO	30
3.2. ABSTRACT	31
3.3. INTRODUÇÃO	32
3.3.1. Comportamentos de limpeza e autolimpeza: contato indireto?	32
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.5. RESULTADOS	35
3.6. DISCUSSÃO	36

3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
3.8. FIGURAS E TABELAS	43
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46

1. APRESENTAÇÃO

O objetivo desse estudo foi analisar os comportamentos mais frequentes realizados por operárias de formigas cortadeiras no processamento de iscas formicidas e nos comportamentos de contato indireto com a isca, como os toques entre as companheiras de ninho, auto-limpeza e limpeza-mutua, que podem estar relacionados com a contaminação das operárias. Para comprovar a hipótese de que os comportamentos de contato direto e indireto com os componentes tóxicos de iscas formicidas promovem a contaminação de operárias, dois experimentos foram realizados e organizados em dois capítulos. Uma explicação breve do que foi feito está descrito a seguir:

O primeiro capítulo intitula-se “Comportamentos do cultivo do jardim de fungo: rotas de contaminação de formigas cortadeiras por traçador lipossolúvel”. O experimento consistiu em observar os comportamentos de processamento de pellets de polpa cítrica realizados por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. A partir dos resultados, obtivemos que os comportamentos de segurar a isca na superfície do fungo e lambe a isca foram os mais frequentes e consideramos que estão envolvidos de forma mais significativa com a entrada de substâncias tóxicas presentes em iscas formicidas no corpo das operárias.

O segundo capítulo intitula-se “Comportamentos de limpeza mútua, auto limpeza e toques: rotas de contaminação das operárias em formigas cortadeiras por corante traçador lipossolúvel”. O experimento realizado consistiu na aplicação de corante traçador lipossolúvel (corante Sudan III) aplicado no pronoto de uma operária e posteriormente foram analisadas as interações entre a operária com presença de corante e operárias sem a presença de corante. Tratamentos com diferentes quantidades de operárias foram realizados com três repetições cada e os comportamentos de interação entre elas foram identificados e contabilizados por meio de observação de vídeos. Os comportamentos de toques entre operárias foram os mais frequentes, seguidos da auto-limpeza e limpeza mútua. A cabeça das operárias foram dissecadas para visualizar a presença de corante na glândula pós-faríngeal. 50 a 70% das operárias apresentaram a glândula corada. Desta forma, foi possível comprovar pelos experimentos, que os comportamentos de contato indireto com as substâncias tóxicas presentes em iscas formicidas provocam a contaminação de operárias.

A partir dos resultados obtidos nos dois experimentos, concluímos que os comportamentos de contato direto mais recorrentes foram “segurar a isca na superfície do fungo” e “lambe a isca”, e os comportamentos de contato indireto com a isca, listados em

ordem de frequência de ocorrência foram toques entre operárias, auto-limpeza e limpeza mútua. Através de experimentos adicionais de dissecação da cabeça das operárias pudemos observar a presença de corante na glândula pós faringeal de parte significativa dos indivíduos, e, dessa forma, corroboramos a hipótese de que os comportamentos de contato direto e indireto são responsáveis pela contaminação das operárias.

2. CAPÍTULO 1 – COMPORTAMENTOS DO CULTIVO DO JARDIM DE FUNGO: ROTA DE CONTAMINAÇÃO DE OPERARIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS POR TRAÇADOR LIPOSSOLÚVEL.

CAPÍTULO 1 – COMPORTAMENTOS DO CULTIVO DO JARDIM DE FUNGO: ROTA DE CONTAMINAÇÃO DE OPERÁRIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS POR TRAÇADOR LIPOSSOLÚVEL.

2.1. Resumo

As formigas cortadeiras cultivam no interior de seus ninhos um fungo simbiote utilizado como base em sua alimentação. Para isso, material vegetal, como folhas e brotos são cortados pelas operárias que realizam uma série de comportamentos para incorporá-los no jardim de fungo, promovendo seu crescimento. Por esse motivo, plantações de algumas culturas acabam sendo prejudicadas por esses insetos. Como forma de controle, iscas formicidas são utilizadas. A partir desse estudo buscamos demonstrar que os comportamentos de contato direto com as iscas promovem a contaminação de operárias. Através dos experimentos realizados, obtivemos que os comportamentos de segurar e lamber as iscas são os mais recorrentes. Concluímos que esses atos comportamentais são vias de entrada dos agentes tóxicos de iscas no organismo das operárias promovendo a sua contaminação.

Palavras-chave: contato direto, isca formicida, operárias, contaminação, agentes tóxicos.

BEHAVIORS OF FUNGUS GARDEN CULTIVATION: CONTAMINATION ROUTE OF LEAF-CUTTING ANT WORKERS USING A FAT-SOLUBLE TRACER DYE

2.2. Abstract

Leaf-cutting ants cultivate inside their nests a symbiotic fungus used as a base in their diet. For this, material plant, such as leaves and shoots are cut by workers who perform a series of behaviors to incorporate them in the fungus garden, promoting their growth. For this reason, plantations of some crops end up being harmed by these insects. As a form of control, toxic baits are used. From this study, we tried to demonstrate that direct contact behaviors with the baits promoted the contamination of workers. Through the experiments performed, we obtained that the behaviors of holding and licking the baits are the most recurrent. We conclude that these behavioral acts are ways of entering the toxic agents of baits in the workers' organism promoting their contamination.

Key words: direct contact, toxic bait, workers, contamination, toxic agents.

2.3. INTRODUÇÃO

2.3.1. Cultivo do fungo simbiote com pellets a base de polpa cítrica: contato direto?

As formigas cortadeiras são notórias em cortar folhas para o cultivo do fungo simbiote, base de sua alimentação (WEBER, 1972). Durante esse cultivo, uma série de comportamentos estereotipados e sequenciais são realizados visando a preparação adequada do material vegetal (DINIZ; BUENO, 2009).

Garrett et al. 2015, identificaram e descreveram todos os comportamentos realizados por operárias de *Atta cephalotes* durante o processamento e incorporação de folhas, sendo a seguinte sequência: Após os discos foliares serem levados para o jardim de fungo, uma ou mais operárias seguram o substrato com suas mandíbulas elevando-o e estabilizando-o; outras operárias realizam uma série de comportamentos, como lambem, raspar e repicar o substrato: a superfície e extremidades dos discos foliares são lambidos pelas operárias promovendo sua limpeza e liberando em toda sua extensão agentes fungicidas e bactericidas, algumas vezes passam por um processo de raspagem, em que a mandíbula das operárias abrem e fecham no disco, possivelmente para aumentar a superfície de contato e facilitar o acesso do fungo, e posteriormente são repicados em pedaços menores; os fragmentos de folhas tem as suas bordas mastigadas pelas operárias provocando cicatrizes que facilitam a entrada dos agentes digestivos liberados pelo fungo; de forma menos recorrente e ainda pouco estudado, algumas operárias depositam fluídos fecais no fragmento de folha durante seu processamento, o que pode estar relacionado com o processo de decomposição; após serem repicados, os fragmentos de folha são depositados temporariamente em uma região do fungo e aos poucos são recolhidos pelas operárias e inseridos no jardim de fungo; por fim, operárias pequenas inoculam hifas nos fragmentos inseridos no jardim de fungo, facilitando o processo de decomposição das folhas.

Os comportamentos acima citados estão relacionados a características morfológicas das operárias. De acordo com Wilson, 1980, 1983, as diferenças nas características morfológicas de *Atta sexdens rubropilosa*, especificamente em relação ao tamanho do corpo das operárias, com variação da largura da cabeça entre 0,8mm e 3,0mm, estão relacionadas com a divisão de tarefas no processamento do substrato. Esses resultados foram comprovados por Andrade et al. (2002); Wilson (1980); Fowler (1983); Lopes et al. (2004); Camargo (2007); Diniz e Bueno (2009); (2010), porém deram enfoque no tamanho das operárias e suas respectivas funções: as operárias generalistas, com largura da cabeça entre 1,3 a 1,6 mm, lambem e repicam as folhas; operárias menores, com largura da cabeça

entre 0,8 a 1,2 mm, mastigam as bordas das folhas e inoculam os fragmentos no jardim de fungo. Por fim, são depositados tufo de hifas na superfície dos fragmentos de folha (WEBER, 1956; LOPES et al., 2004).

De forma geral tanto folhas como iscas passam pelas mesmas etapas de processamento: o tratamento físico, que envolve os comportamentos de segurar e lamber o substrato; o tratamento químico, em que as operárias depositam fluido fecal, prensam e repicam o substrato; e a incorporação, quando as operárias incorporam os fragmentos de substrato no fungo e inoculam as hifas (DINIZ; BUENO, 2009).

De acordo com Silva et al. (2015), o processamento de pellets a base de polpa cítrica comparado ao processamento de folhas é mais demorado devido a sua natureza física, sendo um material mais resistente em comparação as folhas, passando por um processo de hidratação para possibilitar a sua incorporação. Os fatores físicos do substrato a ser processado influenciam tanto no tempo de processamento, quanto na quantidade de operárias envolvidas neste processo (SILVA et al., 2015).

Na conclusão de seu estudo, Silva et al. (2015) demonstrou que as operárias de *A. S. rubropilosa*, durante o cultivo do jardim de fungo com os pellets de polpa cítrica, trabalham mais em seu processamento em comparação as folhas, ocasionando a contaminação das operárias da colônia pelo ingrediente ativo, principalmente as operárias jardineiras e generalistas. O contato direto consiste nos comportamentos realizados pelas formigas cortadeiras que estão envolvidos na manipulação do substrato durante o seu processamento e incorporação no jardim de fungo (BRITTO et al., 2016).

A partir do exposto, pode-se considerar que a preparação de substrato do tipo iscas tóxicas e a incorporação do mesmo no jardim de fungo está relacionado com a contaminação das operárias dentro da colônia por meio do contato direto. Para comprovar essa hipótese de que o contato direto com a isca promove a contaminação das operárias, pellets de polpa cítrica foram oferecidos para colônias de laboratório. Assim, comportamentos realizados pelas operárias foram identificados e suas frequências foram contabilizadas afim de descobrir os comportamentos mais recorrentes durante o processamento e incorporação dos pellets de polpa cítrica e que estão envolvidos de forma mais direta com a contaminação das operárias.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

As colônias utilizadas nesse experimento foram coletadas no município de Botucatu-SP e armazenadas no Laboratório de Insetos Sociais-Praga (LISP) da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP de Botucatu.

Para a realização das observações, três colônias com capacidade de armazenar 1 L de fungo foram utilizadas. Para manutenção da umidade elas continham uma camada de gesso de 1 cm no compartimento central onde se encontrava o fungo. Além disso, continham conexões para recipientes destinados ao forrageamento e deposição do lixo exaurido em suas extremidades opostas (LOPES, 2004). A temperatura ambiente foi mantida aproximadamente a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa em torno de $70 \pm 20\%$.

Para realizar as observações, com o auxílio de um estereomicroscópio com ocular micrométrica, indivíduos de variados tamanhos foram retirados de suas colônias para medição da largura da cabeça. As castas foram definidas de acordo com o proposto em Wilson (1980). As observações foram feitas com base no comportamento das operárias jardineiras (largura da cabeça entre 0,8 a 1,2 mm) e generalistas (largura da cabeça entre 1,3 a 1,6 mm), categorizadas, respectivamente, como operárias pequenas e médias.

O substrato oferecido às colônias para as observações foi constituído por pellets feitos com farelo de polpa cítrica e formulada sem princípio ativo, com superfície padronizada em $62,86 \text{ mm}^2$.

Em cada uma das 3 colônias foram realizadas 8 horas de observações cada para registrar os comportamentos executados na preparação e incorporação dos pellets a base de polpa cítrica, totalizando 24 horas de observação. Foram realizadas duas horas de observação por dia até totalizar as 8 horas de cada tratamento. As observações foram feitas a cada dez minutos e os comportamentos relacionados ao processamento de pellets a base de polpa cítrica, limpeza mútua e auto limpeza foram contabilizados. O sistema de observação foi do tipo varredura, adaptado ao descrito por Martin e Bateson (1986), em que um grupo de indivíduos é escaneado de forma rápida e o comportamento de cada um deles é registrado em intervalos regulares.

Os comportamentos executados pelas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* durante o processamento e incorporação dos pellets a base de polpa cítrica no jardim de fungo foram classificados e posteriormente foram calculadas as frequências de ocorrência desses atos e suas porcentagens. Esses cálculos também foram feitos de acordo com a classe de tamanho das operárias que realizavam os comportamentos.

Foi feita uma tabela de contingência com aplicação de teste Qui quadrado levando em consideração o tamanho das operárias. Os resíduos foram julgados usando a distribuição normal padrão (CONOVER, 1999; CONOVER; IMAN, 1979). A análise dos resíduos padronizados avaliou se a frequência dos comportamentos realizados por operárias pequenas e médias estavam dentro dos padrões normais. A partir do teste qui quadrado obteve-se que os comportamentos com valores de Z entre -1,96 e 1,89 estão dentro do padrão de ocorrência (tabela 4); $Z < -1,96$ (em itálico) são identificados como escassez de ocorrências significativas dos comportamentos (tabela 4) e $Z > 1,89$ (em negrito) são identificados como excesso de ocorrências significativas dos comportamentos (tabela 4).

Para testar a hipótese de que os 8 comportamentos (1,2,3, 4,5,6,7,8) têm a mesma distribuição, uma “anova não paramétrica” foi realizado (Kruskal-Wallis). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis rejeitou a hipótese de que todos os comportamentos têm a mesma distribuição = 20,373 valor $P > 0,05$ (CONOVER, 1999; CONOVER; IMAN, 1979). Para saber se houve diferença entre as frequências de ocorrência dos comportamentos, análises de comparações pareadas foram realizadas utilizando o teste de Conover para comparação múltipla de amostras independentes e valores Bonferroni P método de ajuste (CONOVER, 1999; CONOVER; IMAN, 1979). Na tabela 5 os valores de $P < 0,05$ (em negrito) representam diferença significativa entre a frequência de ocorrência dos comportamentos, sendo que um deles tem maior frequência de ocorrência comparado ao outro.

Um experimento adicional foi realizado para estudar a ação da glândula pós-faríngeal na digestão dos compostos lipídicos presentes nos pellets a base de polpa cítrica. Para isso, foi adicionado a formulação desse substrato um corante traçador que cora a glândula durante a absorção das moléculas de lipídeo. Para realizar esse experimento, foram utilizadas 3 colônias, aplicando-se pellets de polpa cítrica, contendo 10% do corante traçador Sudan III. Após 24 horas da aplicação, as colônias foram abertas e coletadas 50 operárias de cada colônia, totalizando 150 operárias. Essas operárias foram dissecadas e categorizadas de acordo com a presença do corante na glândula pos faríngeal, portanto, coradas e não coradas. Um teste de Qui quadrado foi aplicado aos resultados, onde H_0 as proporções eram iguais entre o observado e esperado, com $\alpha=5\%$ (tabela 6).

As análises foram realizadas utilizando o programa R 3.1.1 (R CORE TEAM, 2015).

2.5. RESULTADOS

O processamento e incorporação de pellets de polpa cítrica envolvem diversas etapas, que de forma geral são muito similares em relação as folhas: Segurar o substrato na superfície do fungo, lambear o substrato, raspagem de substrato, repicar o substrato, depositar fluídos fecais, inserir o substrato na superfície do fungo e inocular hifas no fragmento de substrato inserido no fungo.

Alguns comportamentos descritos acima não foram observados no experimento, como raspar o substrato e depositar fluídos fecais. A sequência de comportamentos observados estão relatados a seguir: os pellets foram carregados no interior da colônia pelas operárias, e logo depositados na superfície do jardim de fungo. Algumas operárias seguravam o substrato na superfície do fungo enquanto outras operárias lambiam. Após essa etapa, as operárias repicavam os pellets, que por sua vez eram mastigados, promovendo seu amolecimento e umedecimento. A partir disso, as operárias incorporavam os fragmentos de pellets já processados no jardim de fungo e depositavam hifas em sua superfície.

O comportamento com maior frequência de observação foi o de segurar o pellet na superfície do fungo, que representou 49,67% (Tabela 1) de todos os comportamentos executados. A classe de tamanho mais registrada executando esse comportamento foi aquela representada pelas operárias médias, responsáveis por 95,83% (Tabela 2) ($Z_1 = 1,869867$; $Z_2 = 6,335226$; $Z_3 = -5,16939$), seguidas das pequenas 4,17% ($Z_1 = -4,91235$; $Z_2 = -3,89842$; $Z_3 = -2,85388$).

O comportamento de lambear o pellet foi o segundo maior em frequência, representando 26,79% (Tabela 1) de todos os comportamentos executados. As operárias médias foram as que mais executaram esse ato, com 89,65% (Tabela 2) ($Z_1 = 7,794788$; $Z_2 = -6,81778$; $Z_3 = -2,28958$), seguidas das pequenas 10,35% ($Z_1 = 2,633788$; $Z_2 = 1,031894$; $Z_3 = 1,393092$).

Os comportamentos de repicar o pellet, morder as laterais do pellet e incorporar o fragmento de pellet no fungo, tiveram, respectivamente, frequências de 16,56%, 3,44%, 2,5% (Tabela 1). Observou-se que as operárias médias tiveram uma frequência maior na execução do comportamento de repicar o pellet 92,69% (Tabela 2) ($Z_1 = -8,77159$; $Z_2 = 2,050101$; $Z_3 = 7,527665$), enquanto que as pequenas realizaram 7,31% desse ato ($Z_1 = -3,49144$; $Z_2 = 1,988575$; $Z_3 = 0,094049$). Em relação a atividade de morder as laterais do pellet, as operárias médias tiveram maior frequência na realização desse ato, com 94,32% (Tabela 2) ($Z_1 = -$

2,51003; $Z_{12} = -2,36097$; $Z_{13} = 6,115607$) enquanto que as pequenas realizaram 5,68% ($Z_{11} = -0,76143$; $Z_{12} = 0,194791$; $Z_{13} = -1,1237$). O comportamento de incorporar o fragmento de pellet no fungo foi realizado com maior frequência pelas operárias médias 73,44% (Tabela 2) ($Z_{11} = -2,663$; $Z_{12} = -0,18344$; $Z_{13} = -0,53046$), enquanto que as pequenas realizaram 26,56% desse ato ($Z_{11} = -0,41797$; $Z_{12} = 5,307338$; $Z_{13} = 4,498051$).

Por fim, o comportamento observado com a menor frequência foi o de incorporar hifas no fragmento de pellet depositado no fungo, com 1,1% (Tabela 1). Apenas nessa atividade, as operárias pequenas realizaram esse comportamento com maior frequência, com 88,89% (Tabela 2) ($Z_{11} = 27,3306$; $Z_{12} = -1,08545$; $Z_{13} = 2,717899$), enquanto que as médias realizaram 11,11% ($Z_{11} = -2,48335$; $Z_{12} = -4,42169$; $Z_{13} = -2,25726$).

Foi realizado um teste de Kruskal-Wallis para analisar se houve diferença de frequência entre os oito comportamentos estudados. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis rejeitou a hipótese de que todos os comportamentos têm a mesma distribuição ($\chi^2_{7 g.l.} = 20,373$, $P < 0,05$). Na tabela 3 observa-se que alguns comportamentos tiveram diferença significativa quando comparado aos demais comportamentos, como lambear o pellet na superfície do fungo, segurar o pellet na superfície do fungo, auto limpeza e limpeza mútua.

De acordo com as análises, lambear o pellet na superfície do fungo teve diferença significativa e maior frequência de ocorrência em relação ao comportamento de incorporar hifas no fragmento de pellet depositado no fungo (Tabela 3). O comportamento de segurar o pellet na superfície do fungo teve diferença significativa e maior frequência de ocorrência em relação aos comportamentos de morder as laterais do pellet; incorporar fragmento de pellet no fungo e incorporar hifas no fragmento de pellet depositado no fungo (Tabela 3). O comportamento de repicar o pellet teve diferença significativa e menor frequência de ocorrência em relação ao comportamento de limpeza mútua (Tabela 3). Os comportamentos de auto limpeza e limpeza mútua tiveram diferença significativa e maior frequência de ocorrência em relação aos comportamentos de morder as laterais do pellet, incorporar fragmento de pellet na superfície do fungo e incorporar hifas no fragmento de pellet depositado no fungo (Tabela 3).

Em relação ao experimento adicional com corante traçador Sudam III (Tabela 4), observou-se que em uma concentração mais elevada dessa substância, houve diferença significativa entre operárias com a glândula pós faríngeal corada e não corada. Foi observado

que 88,7% das operárias amostradas estavam com a glândula pos faringeal corada e 11,3% sem a presença do corante, sendo significativo estatisticamente ($\chi^2=44,85$, $p<0,05$).

2.6. DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos em nosso estudo, corroboramos a hipótese de que o contato direto com a isca promove a contaminação das operárias, visto o repertório comportamental das operárias realizados durante o processamento dos pellets a base de polpa cítrica, e posteriormente, a frequência de operárias marcadas com o corante traçador lipossolúvel.

A partir do experimento de processamento dos pellets a base de polpa cítrica, o ato comportamental mais recorrente foi o de segurar o pellet na superfície do fungo. De acordo com Garrett et al. (2015), em relação ao processamento de folhas, o ato de segurar os fragmentos ou discos foliares promove a sua estabilidade, diminuindo a movimentação e promovendo uma tensão para o corte ou outros comportamentos de processamento, podendo reduzir o gasto energético.

O segundo comportamento mais frequente foi o de lamber o pellet de polpa cítrica (Tabela 1). Garrett et al. (2015) demonstraram que em formigas cortadeiras existe a presença de propriedades antibióticas e antifúngicas na saliva das operárias advindas de secreções das glândulas metapleurais e mandibulares, que são transferidas para as folhas quando elas lambem a sua superfície, promovendo a assepsia que beneficia o fungo simbiote. Também foi proposto que o ato de lamber a folha promove a remoção de cera epicuticular (Garrett et al 2015). Além disso, Silva (2014) inferiu que o ato de lamber torna-se frequente em pellets a base de polpa cítrica, pois promove hidratação e posterior amolecimento do mesmo, facilitando o seu processamento.

O terceiro comportamento mais frequente foi o de repicar a isca. Esse ato comportamental foi o único observado em *Atta cephalotes* no processamento de folhas responsável pela diminuição desse substrato em fragmentos (GARRETT et al., 2015). Podemos inferir que ao diminuir os substratos em fragmentos menores, as operárias terão maior facilidade de realizar os outros comportamentos de processamento.

Em relação a tabela de resíduos padronizados e frequência de comportamentos em relação ao tamanho das operária que os realizaram (Tabela 2), observamos que dos seis atos

comportamentais relacionados ao contato direto, cinco deles tem maior frequência de ocorrência por parte das operárias médias e esses comportamentos foram: segurar o pellet na superfície do fungo, lambe o pellet na superfície do fungo, repicar o pellet, morder as laterais do pellet e incorporar fragmento de pellet no fungo. As operárias de tamanho pequeno, realizaram com maior frequência o comportamento de incorporar hifas no fragmento de pellet depositado no fungo em relação as formigas médias.

Com os resultados obtidos a partir da teste de Kruskal-Wallis (Tabela 3), observou-se que os atos que tiveram diferença significativa em relação a frequência de ocorrência foram: segurar o pellet na superfície do fungo, lambe a superfície do pellet, auto limpeza e limpeza mútua. A partir disso, conjecturamos que esses comportamentos estão relacionados de forma significativa com a contaminação das operárias nas colônias estudadas.

Em relação ao experimento da glândula pós faringeal, os pellets oferecidos para as colônias foram preparados com a mesma base de ingredientes de iscas formicidas, mas nesse caso, sem a presença do agente tóxico que promove a morte das operárias. Após 24 horas que os pellets de polpa cítrica preparados com corante Sudam III foram introduzidos nas colônias, as operárias dissecadas pós processamento desse substrato apresentaram em sua maioria glândula pós-faringeal coradas (Tabela 4). Peregrine e Mudd; Cherret, 1973; Vinson e Phillips; Willians, 1980 apud Decio (2013) demonstraram que no lúmen da glândula foram encontrados “líquidos de aspecto oleoso amarelado” e que estes poderiam ter origem da alimentação das operárias. Assim, durante a manipulação dos pellets, as operárias podem ter ingerido o corante traçador, e devido a presença de óleo nesse substrato e a digestibilidade de lipídeos da glândula pos faringeal, esta acabou corada. O mesmo mecanismo pode ocorrer com as iscas tóxicas, promovendo a contaminação das operárias pelos comportamentos de processamento desse substrato.

A partir do estudo realizado, concluímos que durante o processamento de pellets a base de polpa cítrica os dois comportamentos que ocorreram em maior frequência e com diferença significativa em relação aos demais foram: segurar os pellets na superfície do fungo e lambe os pellets. Desta forma, existe a possibilidade de que quando iscas formicidas são utilizadas como forma de controle de formigas cortadeiras, esses dois comportamentos, juntamente com outros fatores, podem estar envolvidos de forma mais significativa com a contaminação de operárias. Assim, conclui-se nesse estudo que o contato direto com as iscas

formicidas promove a contaminação das operárias dentro da colônia durante o cultivo do fungo simbiote.

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, n. 2, p. 293-306, 2002.

CAMARGO, R. S. **Polietismo etário e produção de machos em colônia sem rainha da formiga cortadeira, *Acromyrmex subterraneus brunneus* forel, 1911 (Hymenoptera: Formicidae).** 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics.** 3. ed. New York: Wiley, 1999.

CONOVER, W. J.; IMAN, R. L. **On multiple-comparison procedures.** Los Alamos: Los Alamos Scientific Laboratory, 1979. Technical Report.

DECIO, P. **Análise comparativa da expressão protéica em glândulas pósfaríngeas de saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidas à suplementação lipídica – Rio Claro – SP.** 2013. 55 f. Dissertação - (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/87725>>.

DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Substrate preparation behaviors for the cultivation of the symbiotic fungus in leaf-cutting ants of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 53, p. 651-666, 2009.

DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Evolution of substrate preparation behaviors for cultivation of symbiotic fungus in Attine ants (Hymenoptera: Formicidae). **J. Insect Behav.**, v. 23, p. 205-214, 2010.

DINIZ, E. A. **Evolução dos comportamentos de preparação do substrato para o cultivo do fungo simbiote e cuidados com a cria, rainha e alados em formigas da tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae).** 2008. vi, 93 f. Tese (doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/106563>>.

FORTI, L. C. et al. Alloethism in *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel (Hymenoptera, Formicidae), during foraging, fungus-garden cultivation and devolution of foraged materials. **Rev. Bras. Entomol.**, v. 48, n. 1, p. 59-63, 2004. doi:<https://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262004000100011>.

FOWLER, H. G. Distribution patterns of Paraguayan leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Formicidae: Attini). **Stud. Neotrop. Fauna Environ.**, v. 18, p. 121-138, 1983.

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. **R. Soc. Open Sci.**, v. 3, p. 150111, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150111>.

LOPES, J. F. S.; FORTI, L.C.; CAMARGO, R. S. The influence of the scout upon the decision-making process of recruited workers in three *Acromyrmex* species (Formicidae: Attini). **Behav. Proces.**, v. 67, p. 471-476, 2004.

MARTIN, P.; BATESON, P. **Measuring behaviour**: an introductory guide. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

R. CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 7 set. 2016.

SCHNEIDER, M. O. **Comportamento de cuidado da prole da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, formicidae)**. 2003. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/88529>>. Acesso em: 3 jul. 2016.

SILVA, L. C. **Preparação e incorporação do substrato em *Atta sexdens rubropilosa* forel, 1908 (Hymenoptera: formicidae) e morfofuncionalidade mandibular em espécies de *Atta***. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/110969>>. Acesso em: 3 jul. 2016.

WEBER, N. A. Gardening ants. The Attines. **Mem. Am. Philos. Soc.**, v. 17, n. 92, p.146, 1972.

WEBER, N. A. Treatment of substrate by fungus-growing ants. **Anat. Rec.**, v. 125, n. 3, p. 604-605, 1956.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). IV: Colony ontogeny of *A. cephalotes*. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 14, p. 55-60, 1983.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae). I: The overall pattern in *A. sexdens*. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 7, p. 143-156, 1980a.

2.8. TABELAS

Tabela 1 – Frequência total e porcentagem total dos comportamentos realizados pelas operárias nas colônias analisadas.

Comportamentos	Frequência absoluta	%
Lambendo o pellet na superfície do fungo	686	26,79
Segurando o pellet na superfície do fungo	1272	49,67
Repicando o pellet	424	16,56
Mordendo as laterais do pellet	88	3,44
Incorporando fragmento de pellet no fungo	64	2,5
Incorporando hifa no fragmento de pellet depositado no fungo	27	1,1
Total	2561	100

Tabela 2 – Resíduos padronizados no contingenciamento dos comportamentos efetuados por *Atta sexdens rubropilosa*, durante a preparação e incorporação do substrato composto por pellets de polpa cítrica.

Comportamentos	Largura da cabeça (mm)	Frequência observada	%	Resíduos padronizados de cada colônia		
				Z _{1.1}	Z _{1.2}	Z _{1.3}
Lambendo o pellet na superfície do fungo	0.8 - 1.2	71	10,35	2,633788	1,031894	1,393092
	1.3 - 1.6	615	89,65	7,794788	-6,81778	-2,28958
Total		686	100			
Segurando o pellet na superfície do fungo	0.8 - 1.2	53	4,17	-4,91235	-3,89842	-2,85388
	1.3 - 1.6	1219	95,83	1,869867	6,335226	-5,16939
Total		1272	100			
Repicando o pellet	0.8 - 1.2	31	7,31	-3,49144	1,988575	0,094049
	1.3 - 1.6	393	92,69	-8,77159	2,050101	7,527665
Total		424	100			
Mordendo as laterais do pellet	0.8 - 1.2	5	5,68	-0,76143	0,194791	-1,1237
	1.3 - 1.6	83	94,32	-2,51003	-2,36097	6,115607
Total		88	100			
Incorporando fragmento de pellet no fungo	0.8 - 1.2	17	26,56	-0,41797	5,307338	4,498051
	1.3 - 1.6	47	73,44	-2,663	-0,18344	-0,53046
Total		64	100			
Incorporando hifa no fragmento de pellet depositado no fungo	0.8 - 1.2	24	88,89	27,3306	-1,08545	2,717899
	1.3 - 1.6	3	11,11	-2,48335	-4,42169	-2,25726

Tabela 3 – Valor da probabilidade da análise Comparação múltipla de amostras independentes, com teste de Conover, com 5% de significância.

Comportamentos	Lambendo o o pellet na superfície do fungo	Segurar o pellet na superfície do fungo	Repicando o pellet	Mordendo as laterais do pellet	Incorporando fragmento de pellet no fungo	Incorporando hifa no fragmento de pellet depositado no fungo	Auto Limpeza	Limpeza Mútua
Segurar o pellet na superfície do fungo	1	*	*	*	*	*	*	*
Repicando o pellet	1	0,24123	*	*	*	*	*	*
Mordendo as laterais do pellet	0,17906	0,00282	1	*	*	*	*	*
Incorporando fragmento de pellet no fungo	0,05383	0,00092	0,43498	1	*	*	*	*
Incorporando hifa no fragmento de pellet depositado no fungo	0,00671	0,00014	0,05383	1	1	*	*	*
Auto Limpeza	0,5815	1	0,07274	0,00092	0,00031	5.3e-05	*	*
Limpeza Mútua	0,32435	1	0,03985	0,00053	0,00019	3.3e-05	1	*

Valores em negrito representam diferença significativa da frequência de ocorrência entre os comportamentos.

Tabela 4 – Frequência total de operárias com corante traçador Sudam III presente na glândula pós faringeal. Teste Qui quadrado aplicado aos resultados.

Colônias	Operárias coradas	Operárias não coradas	Total
Colônia 1	45	5	50
Colônia 2	46	4	50
Colônia 3	42	8	50
Total	133	17	150
(%)	88,66	11,34	100

Figura 1- Porcentagem de cada ato comportamental de *Atta sexdens rubropilosa* durante a preparação e incorporação no jardim de fungo do substrato de pellets de polpa cítrica (1: Lamber o pellet na superfície do fungo; 2: Segurar o pellet na superfície do fungo; 3: Repicar o pellet; 4: Morder as laterais do pellet; 5: Incorporar fragmentos de pellets no fungo; 6: Incorporar hifa no fragmento de pellet depositado no fungo).



3. CAPÍTULO 2 COMPORTAMENTOS DE LIMPEZA MÚTUA, AUTO LIMPEZA E TOQUES: ROTAS DE CONTAMINAÇÃO DAS OPERÁRIAS EM FORMIGAS CORTADEIRAS POR CORANTE TRAÇADOR LIPOSSOLÚVEL

CAPÍTULO 2 – COMPORTAMENTOS DE LIMPEZA MÚTUA, AUTO LIMPEZA E TOQUES: ROTAS DE CONTAMINAÇÃO DAS OPERÁRIAS EM FORMIGAS CORTADEIRAS POR CORANTE TRAÇADOR LIPOSSOLÚVEL

3.1. Resumo

O presente estudo visou elucidar se os comportamentos de auto-limpeza, limpeza mutua ou toques entre as operárias promove a dispersão de substâncias entre os membros da colônia. Para tanto, procedeu-se a aplicação tópica de traçador (corante, Sudan III) em operária, posteriormente, estudou-se as interações sociais entre a operária com traçador e as operárias sem traçador. Adicionalmente, as cabeças das operárias foram dissecadas para visualizar se a glândula pos faringeal estava corada ou não. Os resultados foram que de 50 a 70 % das operárias estavam com a glândula pos faringeal corada, dependendo do tamanho do grupo. A análise comportamental mostrou uma interação crescente de acordo com o aumento de indivíduos, sendo os toques entre as operárias o comportamento mais frequente. Provavelmente a rota do corante traçador ocorreu pelos toques excessivos entre as operárias, com posterior auto limpeza e limpeza mutua. Esses comportamentos são responsáveis em dispersar rapidamente uma substâncias entre os membros da colônia, como verificamos em nosso experimento. Dessa forma, corroboramos a hipótese que o contato indireto promove a contaminação das companheiras do ninho, servindo como um modelo para estudos adicionais com contaminação das operárias com ingredientes ativos de inseticidas.

Palavra chave: *Atta sexdens*, formigas cortadeiras, limpeza mutua, auto limpeza.

CHAPTER 2 - Allogrooming, self-grooming and touching behavior: contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye

3.2. Abstract

The aim of this study was to determine whether worker self-grooming, allogrooming and touching each other promotes the dispersal of substances among members of the colony. For this purpose, a tracer (Sudan III dye) was applied topically to a worker ant and the social interactions between the worker with the tracer and workers without the tracer were studied. Additionally, the worker heads were dissected to visualize whether or not the postpharyngeal gland was stained. The postpharyngeal gland was stained from 50 to 70% of workers depending on the size of the group. Behavioral analysis showed a growing interaction with increasing number of individuals, with workers touching each other being the most frequent behavior. The tracer dye was probably passed on by excessive touches between workers, followed by self-grooming and allogrooming. These behaviors are responsible for the rapid dispersal of substances among colony members as observed in our experiment. The results therefore support the hypothesis that indirect contact promotes the contamination of nestmates, serving as a model for further studies on the contamination of workers with the active ingredients of insecticides.

Keywords: *Atta sexdens*, leaf-cutting ants, allogrooming, self-grooming

3.3. INTRODUÇÃO

3.3.1. Comportamentos de limpeza e autolimpeza: contato indireto?

A contaminação das operárias pode ocorrer de forma direta, ou seja, durante o processamento da isca formicida para o cultivo do fungo simbionte (BRITO et al., 2016), embora, não se conhece ao certo como ocorre a dispersão de substâncias (por exemplo, inseticidas) entre os membros da colônia. Uma eficiente forma de veicular o i.a. de um inseticida é através de iscas a base de polpa cítrica, a qual é altamente atrativa as forrageiras.

No interior do ninho essa isca é processada para o cultivo do jardim de fungo, e postula-se que nesse momento, as operárias se contaminam com tal inseticida (FORTI et al., 1993). Depois que os pellets começam a ficar hidratados, são depositados sobre o jardim de fungo e então as operárias começam a retirar pequenos pedaços e incorporá-los no jardim de fungo. Esse processo de incorporação pode-se iniciar 6 horas após serem ofertadas as iscas e prolonga-se até 18 horas depois (FORTI et al., 1993). Durante esse processo 70% das operárias ficam contaminadas com o inseticida como comprovado por Forti et al. (2007) através de um corante traçador. Os autores supõe que as formigas contaminadas dispersam o sulfluramida através da trofalaxia entre adultos, como uma reação em cadeia (Forti et al., 1993). Dai a importância do inseticida matar em baixas concentrações, pois no processo de trofalaxia a diluição é bastante acentuada. Porém, a trofalaxia oral é altamente discutida entre adultos em formigas cortadeiras sendo uma questão bastante contraditória entre os mirmecologistas.

Sabe-se que as espécies de formigas são altamente variáveis na taxa de trofalaxia, de forma que reflete a sua posição filogenética e hábitos alimentares (WILSON, 1971). Por exemplo, em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* verificou-se que operárias mínimas cederam alimento para as operárias de mesmo tamanho e maior a elas, provavelmente através de trofalaxia oral (SAMUELS et al., 2004).

Porém em um estudo mais detalhado, Paul e Roces (2003), compararam quantitativamente a taxa de absorção de fluidos em espécies de diferentes hábitos alimentares. Eles verificaram que as operárias de espécies de formigas que se alimentam de néctar e “honeydew” de homópteras, *Camponotus rufipes* (Formicidae) e *Pachycondyla villosa* (Ponerinae), coletam fluido com maiores taxas de absorção, enquanto as operárias de formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Myrmicinae) e a formiga predadora do complexo de

Rhytidoponera impressa com menores taxas. Considerando os hábitos alimentares, verifica-se que em espécies que coletam fluidos (néctar) durante o forrageamento, como o gênero *Camponotus*, possuem um papo bem desenvolvido, adaptado a esta estratégia de forrageamento. Quando a forrageira retorna ao ninho com o papo preenchido ela regurgita e distribui o alimento através da trofalaxia oral para os companheiros do ninho (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Enquanto, a baixa taxa de absorção de fluidos reflete outras estratégias de forrageamento. Em *Atta sexdens*, as operárias coletam folhas para o cultivo do fungo simbiote, ingerem apenas líquidos extravasados no momento do corte e processamento vegetal, e raramente visitam fontes de néctar (LITTLEDYKE; CHERRETT, 1976).

De acordo com estas evidências, nos habilitamos a conjecturar de que a trofalaxia ocorra em baixa frequência ou até mesmo ausente neste grupo. Andrade et al. (2002) argumentam que a trofalaxia não é o maior agente desencadeador da contaminação das operárias com inseticidas na colônia, e que a intoxicação deva ocorrer através do contato direto com as iscas tóxicas durante o seu processamento e incorporação no jardim de fungo, e também durante a limpeza mútua e auto-limpeza. Desta forma, conclui-se que a trofalaxia oral entre adultos em formigas cortadeiras é uma questão bastante contraditória e uma rota pouco confiável para as trocas de substâncias entre os companheiros do ninho.

Dado ao exposto, surge a pergunta: Como ocorre a contaminação das operárias? Primeiramente, o contato direto com a isca formicida e o processamento desta para o cultivo do fungo simbiote. Outra hipótese é contato indireto com a molécula de i.a., ou seja, indivíduo-indivíduo por auto-limpeza, limpeza mútua ou toques. Para testar essa hipótese, um experimento foi realizado com grupos de operárias. Para tanto, procedeu-se a aplicação tópica de traçador (corante, Sudan III) em operária, posteriormente, estudou-se as interações sociais entre a operária com traçador e operárias sem traçador. Adicionalmente, as cabeças das operárias foram dissecadas para visualizar se a glândula pos faríngeal estava corada ou não. Espera-se que possa elucidar como ocorre a dispersão do substâncias no interior do ninho, por meio de um corante traçador.

3.4. MATERIAL E METODOS

Pouco se sabe a forma de contaminação das operárias de formigas cortadeiras, como ocorre a dispersão do inseticida no interior da colônia, hipotetizamos que o contato indireto promove a contaminação, ou seja, indivíduo-indivíduo por limpeza mutua ou toques. Para testar a hipótese, realizou-se a aplicação tópica de cortante traçador (Sudan III, Sigma-Aldrich) na concentração de 5 % (peso/peso) no pronoto de uma operária, com posterior estudo detalhado das interações sociais entre a contaminada e o grupo não contaminado. As operárias foram alocadas em foram acondicionadas em um pote plástico de 250 ml de capacidade, contendo 1 cm de gesso no fundo e uma pequena quantidade (3 g de fungo simbionte) do fungo pertencente a colônia que foram retiradas, em que uma câmera de filmagem foi posicionada acima do aparato durante 24 horas. O delineamento experimental foi de 4 tratamentos com 3 repetições, sendo:

- 1- **Grupo 1:1** - 1 operária + 1 operária com traçador;
- 2- **Grupo 4:1** - 4 operárias + 1 operária com traçador;
- 3- **Grupo 9:1** - 9 operárias + 1 operária com traçador;
- 4- **Grupo 19:1** - 19 operárias + 1 operária com traçador;

As operárias retiradas dos ninhos foram separadas pela sua classe de tamanho, através do comprimento da cabeça de 1,2 a 2,2 mm. Posteriormente, foi realizada a marcação do pronoto do indivíduo com o traçador, assim diferenciado por cor. A marcação das operárias será realizada com as canetas (Marca EDDING®), nas cores rosa, branco e prata, devido a sua ótima aderência, secagem rápida e boa visibilidade. Esta técnica foi amplamente utilizada para formigas cortadeiras por Camargo et al. (2007) e detalhes podem ser obtidos. As formigas serão recolhidas nas colônias com auxílio de pinças. Com um pincel de ponta fina, o pronoto será marcado com um pequeno ponto de tinta. Após a marcação, as operárias permaneceram por 2 horas acondicionadas em copos plásticos com as bordas untadas com Fluon (resina de fluoretileno), produto que impossibilita a fuga das formigas, e em seguida, será solta em suas respectivas colônias. Após as 24 horas de filmagem, as operárias foram congelada para posterior dissecação.

A dissecação da cabeça das operárias foi feita com auxílio de tesoura e pinça entomológica em solução fisiológica sob um microscópio estereoscópio. As operárias foram categorizadas de acordo com a coloração ou não de sua glândula pós faríngea. Para ter acuidade na dissecação, prévias foram feitas com operárias de formigas em 3 situações

experimentais (figura 1), para notificar se a glândula seria corada por uma substância lipossolúvel (Sudan III, Sigma- Aldrich).

As variáveis estudadas foram: a) análise comportamental (frequência de autolimpeza, limpeza mútua e toques); b) frequência das operárias com a glândula pos faringeal corada;

O modelo de regressão logística de frequência de operárias coradas e não coradas foi testado usando modelos lineares generalizados com variância binomial e função de ligação log. Adicionalmente, o modelo de regressão logística frequência de indivíduos corados em função da proporção de indivíduo que recebeu o corante, foi testado usando modelos lineares generalizados com variância Poisson e função de ligação log. Em contraposição, o modelo de regressão logística frequência de indivíduos não corados em função da proporção de indivíduo que recebeu o corante, foi testado usando modelos lineares generalizados com variância Poisson e função de ligação log (CORDEIRO, 2008).

3.5. RESULTADOS

De forma geral: grupo 1:1 apresentou 4 operárias com as glândulas coradas (66,7 %) e 2 não coradas (33,3%); grupo 4:1 apresentou 11 operárias com as glândulas coradas (73,4 %) e 4 não coradas (26,6%); grupo 9:1 apresentou 18 operárias com as glândulas coradas (60 %) e 12 não coradas (40 %); grupo 19:1 apresentou 32 operárias com as glândulas coradas (53,4 %) e 28 não coradas (46,6 %);

O modelo de regressão logística frequência de operárias com glândula corada e não corada foi testado usando modelos lineares generalizados com variância binomial e função de ligação log. A deviance (medida da qualidade do ajuste) do modelo não foi significativa ($p > 0,05$) o que indica a não existência de evidências contra este modelo. Não foram observados efeitos significativos das proporções de operárias com glândula não coradas em relação a proporção de operárias com a glândula corada, nos grupos 19:1 (z value=-0.654, $\Pr(>|z|)=0.536$), 9:1 (z value=-0.272, $\Pr(>|z|)=0.760$), 4:1 (z value=0.305, $\Pr(>|z|)=0.760$).

Já o modelo de regressão logística frequência de indivíduos corados em função da proporção de indivíduo que recebeu o corante, foi testado usando modelos lineares generalizados com variância Poisson e função de ligação log. A deviance (medida da qualidade do ajuste) do modelo (4,5212, g.l.=8) não foi significativa ($p > 0,05$) o que indica a não existência de evidências contra este modelo. Foram observados efeitos significativos das

proporções de indivíduos corados nos grupos 19:1 (z value=3.921, $\Pr(>|z|)=8.82e-05$) (2,0794 vezes maior) e 9:1 (z value=2.721, $\Pr(>|z|)=0.00651$) (1,5041 vezes maior) em relação a proporção de indivíduo marcado ($p<0,05$). O grupo 4:1 não foi significativo (z value=1.733, $\Pr(>|z|)=0.08317$).

O mesmo ocorreu para o modelo de regressão logística frequência de indivíduos não corados em função da proporção de indivíduo que recebeu o corante, usando modelos lineares generalizados com variância Poisson e função de ligação log. A deviance (medida da qualidade do ajuste) do modelo (9,7118, g.l.= 8) não foi significativa ($p>0,05$) o que indica a não existência de evidências contra este modelo. Foram observados efeitos significativos das proporções de indivíduos não marcados grupo 19:1 (z value=3.606, $\Pr(>|z|)=0.0003$) (2,6391 vezes maior) e 9:1 (z value=2.346, $\Pr(>|z|)=0.0189$) (1,7918 vezes maior) em relação a proporção de indivíduo marcado ($p<0,05$). O grupo 4:1 não foi significativo (z value=0.800, $\Pr(>|z|)=0.4234$).

Em relação aos atos comportamentais executados foram: toques – compreende de toques entre a operaria com traçador e as demais; auto limpeza – compreende a autolimpeza da operaria com traçador; limpeza mutua - compreende da limpeza mutua da operaria com traçador pelas demais. Toques 2 - compreende de toques entre as operarias sem traçador; auto limpeza – compreende da autolimpeza das operarias sem traçador; limpeza mutua - compreende da limpeza mutua entre as operarias sem traçador. Quando se comparou os grupos em cada comportamento, verificou-se que o grupo 19:1 diferiu significativamente em relação aos demais grupos, 9:1, 4:1, e finalmente, 1:1 (Tabela 5). Quando se comparou os comportamentos entre os grupos, os atos comportamentais toques 2 e auto limpeza 2 foram os mais frequentes e diferiu estatisticamente dos demais nos grupos 19:1, 9:1 e 4:1 (Figura 3, tabela 5). Já no grupo 1:1, os atos comportamentais auto limpeza e toques foram mais frequentes e diferiram dos demais (Figura 3, tabela 5).

3.6. DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos corrobora-se a hipótese que o contato indireto promove a contaminação, ou seja, comportamento de limpeza mutua e autolimpeza, bem como, os toques entre as operarias. A glândula pos faringeal marcada com o corante lipossolúvel Sudan III, é um resultado positivo da ingestão de substâncias lipossolúveis, como muitos inseticidas (FORTI et al., 1993; BRITTO et al., 2016). De acordo com Ayre (1967) e Amaral e Caetano (2006) as glândulas pós faringeal estão envolvidas na produção de enzimas digestivas.

Embora descrita como sendo uma glândula do sistema salivar a glândula pós-faríngea, apresenta-se com características de divertículo do intestino anterior. Este fato é apoiado pela presença de nematóides parasitas no seu lúmen (JANET, 1893; CAETANO et al., 1990).

Adicionalmente, Hefetz et al. (1992) mostrou que o produto da secreção desta glândula atuava como determinante no odor da colônia. Embora, Caetano (1998) mostrou em estudos enzimológicos e ultra-estruturais que esta glândula possui características de células produtoras de hormônios estereóides, sendo ricas em mitocôndrias em divisão, peroxissomos, sítios com citocromo P450 (junto ao retículo liso de dois tipos), muitas gotas lipídicas e mitocôndrias derivadas, que se transformavam em depósitos de lipídios (CAETANO, 1998; CAETANO et al., 2002; VIEIRA; BUENO, 2015). Recentemente, Decio et al. (2016) sugerem que este órgão é especializado para a nutrição lipídica dos adultos formigas cortadeiras e caracterizada como um divertículo do intestino anterior, o qual tem a capacidade de absorver, armazenar, metabolizar e mobilizar lipídios à hemolinfa. Dado essa deposição continua de lipídeos, o corante Sudan III foi facilmente observável nas dissecções do presente estudo (Figura 2).

Em relação aos atos comportamentais, verificou-se uma interação crescente de acordo com o aumento de indivíduos, sendo os toques entre as operárias o comportamento mais frequente (Figura 3). Provavelmente a rota do corante traçador ocorreu pelos toques excessivos entre as operárias, com posterior auto limpeza e limpeza mutua. Os insetos sociais são famosos pela notável higiene demonstrada por muitas espécies para remover organismos potencialmente patogênicos que estão na superfície de seu corpo e companheiros do ninho, por meio da comportamentos de auto limpeza e limpeza mutua (WILSON, 1971). Por exemplo, a limpeza mutua é eficaz na remoção de parasitas, tais como *Metarhizium* da cutícula, sendo dirigido para indivíduos expostos a parasitas (ROSENGAUS et al., 1998; HUGHES et al., 2002; YANAGAWA et al., 2008). Curiosamente, no entanto, verificou-se que as formigas tendem a se tornar imune ao microorganismo, como *Metarhizium*, por meio de sua exposição e contato por limpeza mutua (WALKER; HUGHES, 2009). Porém, o comportamento de auto-limpeza é proactivo, consequentemente, estimulados por formigas de detecção na presença de indivíduos com microorganismos (MORELOS-JUÁREZ et al., 2010).

Uma outra questão sobre tais comportamentos é a sua utilidade na discriminação entre as companheiras e não-companheiras de ninho. O reconhecimento é baseado em um

perfil compostos específicos da colônia, comum a todos os membros da dela, o qual chamamos de "gestalt" (CROZIER; DIX, 1979; FLETCHER; MICHENER, 1987). Esta "gestalt" colonial é mantida pela contínua troca de sinais de reconhecimento via trophallaxis e limpeza mutua (SOROKER et al., 1994), e é afetado, por exemplo, por variação sazonal na dieta (NIELSEN et al. 1999; SILVERMAN; LIANG, 2001; RICHARD et al., 2007a) e substrato de nidificação (HEINZE et al., 1996; RICHARD et al., 2007b). O comportamento de limpeza parece ser fundamental para a passagem do odor no interior da colônia (MESKALI et al., 1995) através de transferência de substâncias entre as operárias, como, por exemplo, em *A. subterraneus brunneus* (CAMARGO et al., 2006).

Com o exposto acima, verifica-se que os comportamentos de auto-limpeza, limpeza mutua e toques entre as operária tem diferentes funções na sociedade desses insetos, ora na higiene e proteção contra microorganismos, ora não reconhecimento entre os membros da colônia. Porém, esses comportamentos são responsáveis em dispersar rapidamente uma substancias entre os membros da colônia, como verificamos em nosso experimento. Dessa forma, corroboramos a hipótese que o contato indireto promove a contaminação das companheiras do ninho, servindo como um modelo para estudos adicionais com contaminação das operárias com ingredientes ativos de inseticidas.

3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, J. B.; CAETANO F.H. The intramandibular gland of leaf-cutting ants (*Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908). **Micron**, v. 37, p. 154-160, 2006.

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.

AYRE, G. L. The relationships between food and digestive enzymes in five species of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Can. Entomol.**, v. 99, p. 408-411, 1967.

BRITO, S. L. 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.**, v. 3, n. 2, p. 11-92, 2016.

CAETANO, F. H. Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operárias de formigas (Hymenoptera:Formicidae). **Naturalia**, v. 13, p. 129-174, 1988.

CAETANO, F. H. Morphology of the digestive tract and associated excretory organs of ants. In: VANDER MEER, R. K.; JAFFÉ, K.; CEDENO, A. (Eds.). **Applied myrmecology: a world perspective**. Boulder: Westview Press, 1990. 741 p.

CAETANO, F. H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F. J. **Formigas: biologia e anatomia**. Rio Claro: Editora Topázio, 2002. 131 p.

CAMARGO, R. S. et al. The role of workers in transferring queen substances and the differences between worker castes in the leaf-cutting ant, *Acromyrmex subterraneus brunneus*. **Sociobiology**, v. 48, p. 503-513, 2006.

CAMARGO, R. S. et al. Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). **J. Appl. Entomol.**, v. 131, p. 139-145, 2007.

CORDEIRO, G. M.; DEMÉTRIO, C. G. B. **Modelos lineares generalizados e extensões**. Piracicaba: ESALQ, 2010.

CROZIER, R. H.; DIX, M. W. Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 4, p. 217-224, 1979.

DECIO, P. et al. The postpharyngeal gland: specialized organ for lipid nutrition in leaf-cutting ants. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0154891, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0154891.

FLETCHER, D. J. C.; MICHENER, C. D. **Kin recognition in animals**. New York: John Wiley, 1987.

FORTI, L. C. et al. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 50, p. 1149-1163, 2007.

FORTI, L. C. et al. Trofalaxia entre operárias-larvas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SEB, 1993.

HEFETZ, A.; ERRARD, C.; COJOCARU, M. Heterospecific substances in the postpharyngeal gland secretion of ants reared in mixed groups. **Naturwissenschaften**, v. 79, p. 417-420, 1992.

HEINZE, J. et al. Apparent dear-enemy phenomenon and environment-based recognition cues in the ant *Leptothorax nylanderi*. **Ethology**, v. 102, p. 510-522, 1996.

HÖLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990.

HUGHES, W. O. H.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J. J. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 269, p. 1811-1819, 2002.

JANET, M. C. H. **Sur les nématodes des glandes pharyngiennes des fourmis (*Pelodora* sp.)**. Paris: Gauthier-Villars et fils, 1893. v.117, p. 700-703.

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bull. Entomol. Res.**, v. 66, p. 205-17, 1976.

MESKALI, M. et al. Mechanism underlying cuticular hydrocarbon homogeneity in the ant *Camponotus vagus* (Scop.) (Hymenoptera: Formicidae): Role of postpharyngeal glands. **J. Chem. Ecol.**, v. 21, p. 1127-1148, 1995.

MORELOS-JUÁREZ, C. et al. H. Ant farmers practice proactive personal hygiene to protect their fungus crop. **Curr. Biol.**, v. 20, n. 13, p. R553-R554, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.04.047>.

NIELSEN, J. et al. Colony-level and season-specific variation in cuticular hydrocarbon profiles of individual workers in the ant *Formica truncorum*. **Insect. Soc.**, v. 46, p. 58-65, 1999.

PAUL, J.; ROCES, F. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. **J. Insect Physiol.**, v. 49, p. 347-357, 2003.

RICHARD, F. J. et al. Specificity in chemical profiles of workers, brood and mutualistic fungi in *Atta*, *Acromyrmex* and *Sericomyrmex* fungus-growing ants. **J. Chem. Ecol.**, v. 33, p. 2281-2292, 2007a.

RICHARD, F. J. et al. The origin of chemical profiles of fungal symbionts and their significance for nestmate recognition in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 61, p. 1637-1649, 2007b.

ROSENGAUS, R. B. et al. Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 44, p. 125-134, 1998.

SAMUELS, R. I.; ERTHAL, M.; MOREIRA, D. D. O. Ocorrência de trofalaxia oral entre operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., 2004, Gramado, Rio Grande do Sul. **Anais...** Gramado: SEB, 2004. p. 459.

SILVA, L. et al. Are bait pellets and leaves submitted to the same process of substrate preparation for symbiotic fungus culture by *Atta sexdens rubropilosa* workers?. **Sociobiology**, v. 62, p. 484-493, 2015.

SILVERMAN, J.; LIANG, D. Colony disassociation following diet partitioning in a unicolonial ant. **Naturwissenschaften**, v. 88, p. 73-77, 2001.

SOROKER, V. et al. The postpharyngeal gland as a “Gestalt” organ for nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*. **Naturwissenschaften**, v. 81, p. 510-513, 1994.

VIEIRA, A. S.; BUENO, O. C. Mitochondrial and peroxisomal population in postpharyngeal glands of leaf-cutting ants after lipid supplementation. **Micron**, v. 68, p. 8-16. 2015; doi: 10.1016/j.micron.2014.08.004. pmid:25203360.

WALKER, T. N.; HUGHES, W. O. H. Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. **Biol. Lett.**, v. 5, p. 446-448, 2009. doi: 10.1098/rsbl.2009.0107.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, 1971. 548 p.

YANAGAWA, A.; YOKOHARI, F.; SHIMIZU, S. Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 97, p. 165-170, 2008.

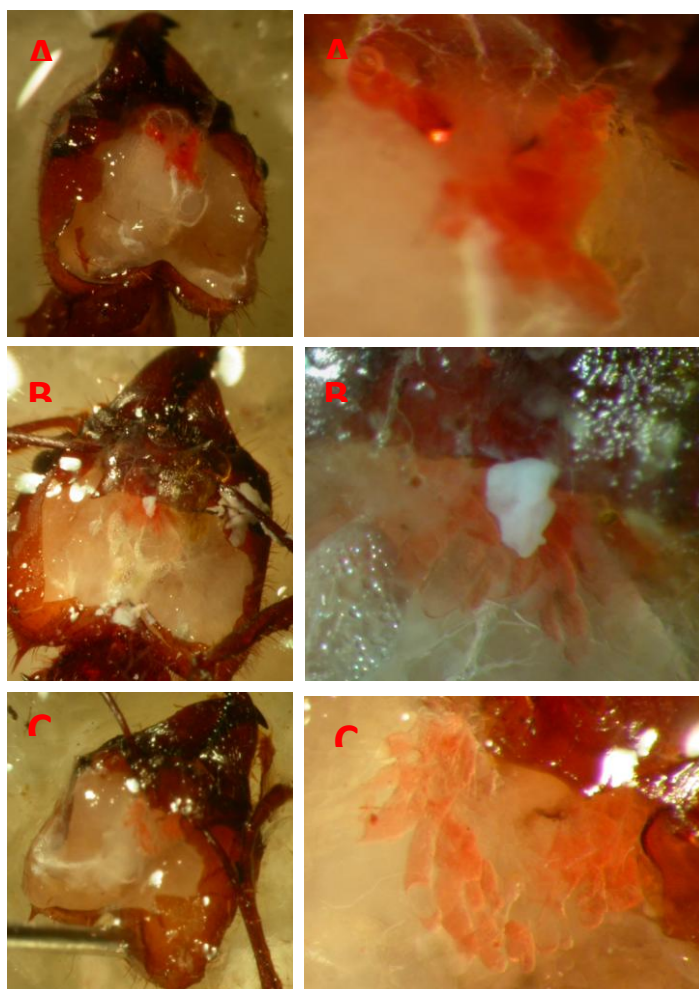
3.8. FIGURAS E TABELAS

Figura 2. Operarias dissecadas de *Atta sexdens rubropilosa*, com exposição da glândula pós faringeal (aumento 60 X).

A1 e A2 – operaria forrageira que ingeriu 1 µl da solução oleosa na cavidade oral. A2 Detalhe da glândula corada com Sudan III, na solução óleo de soja, com concentração de 5% (p/p).

B1 e B2 – operaria forrageira que recebeu no pronoto 1 µl da solução oleosa. B2 Detalhe da glândula corada com Sudan III, na solução óleo de soja, com concentração de 5% (p/p).

C1 e C2 – operaria forrageira que permaneceu 24 horas com operaria que recebeu no pronoto Sudan III, na proporção 1:1 (5 com Sudan e 5 sem Sudan) . C2 Detalhe da glândula corada com Sudan III, na solução óleo de soja, com concentração de 5% (p/p).



Fonte: material elaborado pelo autor

Figura 3. Frequencia absoluta dos atos comportamentais de operarias de *Atta sexdens rubropilosa* durante 24 horas de observação em 4 diferentes situações experimentais.

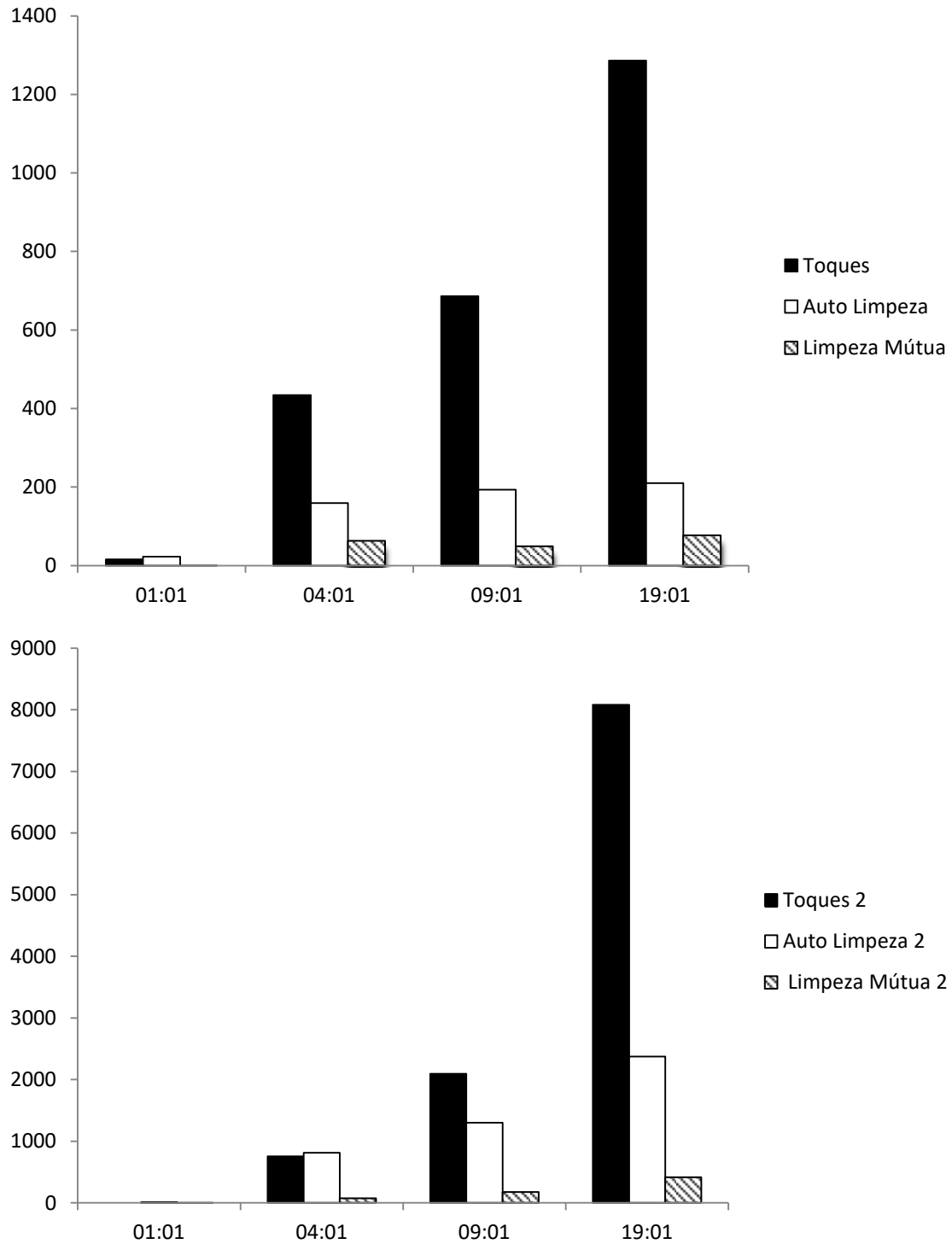


Tabela 5. Proporção dos atos comportamentais executados por operarias de *Atta sexdens rubropilosa*. Letras diferem estatisticamente entre si.

Auto Limpeza			Auto Limpeza 2			Toques		
19:01	70	a	19:01	791,33	a	19:01	428,66	a
9:01	64,33	ab	9:01	434	b	9:01	228,66	b
4:01	53	b	4:01	270,66	c	4:01	144,66	c
1:01	7,66	c	1:01	3	d	1:01	5,33	d
Toques 2			Limpeza Mutua			Limpeza Mutua 2		
19:01	2693	a	19:01	25,66	a	19:01	138,66	a
9:01	698	b	9:01	21	ab	9:01	57,66	b
4:01	252,33	c	4:01	16,33	b	4:01	24	c
1:01	0	c	1:01	0,33	c	1:01	0,33	d

Tabela 6. Proporção dos atos comportamentais executados por operarias de *Atta sexdens rubropilosa*. Letras diferem estatisticamente entre si.

01:01			09:01			19:01			04:01		
Auto Limpeza	7,67	a	Toques 2	698	A	Toques 2	2693	a	Auto Limpeza 2	270,67	a
Toques	5,33	ab	Auto Limpeza 2	434	B	Auto Limpeza 2	791,33	b	Toques 2	252,33	a
Auto Limpeza 2	3	b	Toques	228,67	C	Toques	428,67	c	Toques	144,67	b
Limpeza Mutua	0,33	c	Auto Limpeza	64,33	D	Limpeza Mutua 2	138,67	d	Auto Limpeza	53	c
Limpeza Mutua 2	0,33	c	Limpeza Mutua 2	57,67	D	Auto Limpeza	70	e	Limpeza Mutua 2	24	d
Toques 2	0	c	Limpeza Mutua T	16,33	E	Limpeza Mutua	25,67	f	Limpeza Mutua	21	d

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse estudo pudemos concluir que alguns comportamentos de contato direto e indireto com os ingredientes ativos de iscas formicidas possuem maior influência na contaminação de operárias. Dentre os comportamentos observados durante o processamento de pellets de polpa cítrica, estão aqueles que ocorreram em maior frequência: segurar os pellets na superfície do fungo e lambe-los. Além disso, essas substâncias também são dispersadas rapidamente entre os membros da colônia por comportamentos de contato indireto com a isca. Os resultados dos experimentos realizados mostraram que os toques entre operárias são os mais frequentes, seguidos da auto-limpeza e limpeza mútua. A dissecação de operárias nos dois experimentos realizados mostrou a presença de corante traçador na glândula pós-faríngea de quantidade significativa dos membros da colônia, o que possibilitou a comprovação de nossa hipótese de que os comportamentos de contato direto e indireto são responsáveis pela contaminação das operárias.