**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – BOTUCATU**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**
**(ÁREA: ZOOLOGIA)**

# MORFOMETRIA DE RAINHAS DO GÊNERO *ATTA* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE: MYRMICINAE), ARQUITETURA INTERNA E INFECÇÃO PELO FUNGO PARASITA *ESCOVOPSIS* DE NINHOS INICIAIS

**SINARA MARIA MOREIRA**

**BOTUCATU**
**2013**

SINARA MARIA MOREIRA

# MORFOMETRIA DE RAINHAS DO GÊNERO *ATTA* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE: MYRMICINAE), ARQUITETURA INTERNA E INFECÇÃO PELO FUNGO PARASITA *ESCOVOPSIS* DE NINHOS INICIAIS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Botucatu Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Ciências Biológicas (Área: Zoologia).

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS FORTI

CO-ORIENTADOR: DR. NILSON SATORU NAGAMOTO

**BOTUCATU**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Moreira, Sinara Maria.
Morfologia de rainhas do gênero *Atta*, arquitetura interna e infecção pelo fungo parasita *Escovopsis* de ninhos iniciais (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) / Sinara Maria Moreira. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientadora: Luiz Carlos Forti
Coorientador: Nilson Satoru Nagamoto
Capes: 20400004

1. Formiga-cortadeira – Morfologia. 2. Saúva (Formiga). 3. Insetos – Identificação. 4. Entomologia. 5. Fungos – Classificação. 6. *Escovopsis*.

Palavras-chave: *Escovopsis*; Morfometria geométrica; Pellets; Presença; Prevalência.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”.

***(Charles Darwin)***

“Dedico este trabalho com todo o meu coração, ao meu marido Gustavo Luis Hirose e aos meus pais José da Silva Moreira Filho (in memorium) e Euripa de Lourdes Alves Moreira, pela dedicação, sacrifícios, incentivo que me deram para que continuasse minha jornada e conseguisse chegar até aqui.

**Amo muito vocês**”.

***(SINARA MOREIRA)***

# AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**. Muitas foram as lutas, maiores foram as vitórias, e isso porque o Senhor se fez sempre presente, transformando as fraquezas em força e as derrotas em vitórias.

Gostaria de agradecer ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Carlos Forti,** por me acolher em seu laboratório, pela confiança, dedicação e paciente orientação, por sua amizade, apoio e estimulo à minha formação profissional e pelo exemplo de profissionalismo e competência.

Ao meu coorientador e amigo **Dr. Nilson Satoru Nagamoto** pela amizade, dedicação nos ensinamentos, pelas idéias para a realização dessa Tese e por se dedicar intensamente na árdua tarefa de me ajudar em todo momento da Tese. Você foi peça chave para a realização deste trabalho. **Meu muito obrigada!**

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão de dois anos de bolsa de estudo, possibilitando a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. André Rodrigues**, que me ajudou muito, incluindo a confirmação da identificação dos fungos, e nas revisões do artigo do Capitulo III, o qual já está submetido para publicação. Sempre estando disposto a ajudar e responder os questionamentos quando mais precisava.

Ao **Dr. Roberto da Silva Camargo**, pelas risadas, palavras amigas, incentivos quando batia os desânimos, pelas companhia nos aguardos e nas noites das revoadas.

Ao **Sr. Nelson Carneiro**, **Antônio Marcos** e **Antônio Donizete**, amigos que foram companheiros nos dias de escavações, pessoas especiais que dedicaram seus esforços e a sua arte nas escavações.

A todos os **Funcionários da Pós Graduação da Zoologia** por toda a assistência oferecida.

As amigas **Nelci Antunes de Moura e Paula Correia Dias,** pela ajuda na entrega da tese e das papeladas; pela amizade na alegria e na tristeza. Sempre dando força, vocês foram fundamentais na minha vida. **Adoro vocês e meu muito obrigada**.

Em especial, a colega de trabalho Drª. **Ana Paula Protti de Andrade Crusciol**, pelo acolhimento, preocupação, ensinamentos diários, carinho, paciência, que foi importante para o deslumbramento com as formigas, desde o mestrado.

A todos os colegas que tive o prazer de conhecer, e que sempre esteve a disposição para me ajudar: **Marcílio de S. Silva, Nádia Caldato, Mariana Brugger Silva, Ricardo Toshio Fujihara, Sandra Regina de S. Cardoso, Maria Ines Bulgari Alves** e **David Kleber Oste Generoso.**

Aos Professores da Universidade Federal de Sergipe em especial**: Renato Gomes Faria, Adriana Bocchiglieri, Yana Teixeira dos Reis, Silmara de Moraes Pantaleao, Myrna Friederichs L. de Souza, Leandro S. Souto, Bianca Ambrogi, Claudiene Santos, Marcelo Fulgencio G. de Brito** e **Carmem Regina P. Guimaraes,** que permitiram o termino desta tese na Universidade, pelo apoio e incentivo em todas as horas, meu muito obrigada.

Ao meu marido **Gustavo Luis Hirose**, pelo carinho, incentivo, pelas duras que fizeram crescer profissionalmente, pela amizade e dedicação, sempre me dando força, quando o pensamento me levava a desistir. Sem você eu não teria conseguido terminar esta tese. **Te amo muito!**

Aos irmãos, **Sandra C. M. Garcia, Renato C. Moreira, José Ricardo Moreira,** aos cunhados **Aparício S. Garcia** e **Lívia M. G. A. Moreira**, aos sobrinhos (as), **Amanda Moreira Garcia, Ana Clara Moreira Garcia, Victor Hugo Moreira e João Pedro Moreira** e ao agregado, **Leo Cássio** que sempre acreditaram na minha capacidade, dando muita força para chegar onde estou hoje. Muito Obrigada!

A minha mãe **Euripa de Lourdes Alves Moreira** que tanto amo. Sem os seus esforços e dedicações, eu não teria conseguido alcançar os meus sonhos. **Te amo muito!**

A minha sogra **Helena Aparecida Dias Hirose**, ao meu sogro **Kyoshi Hirose** e à avó **Simone Aparecida Dias** pelo incentivo e ajuda.

# SUMÁRIO

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Formigas Cortadeiras ..... 01
Morfologia do Gênero *Atta* ..... 02
Fundação da Colônia ..... 05
Fungicultura das Formigas Cortadeiras ..... 06
Parasita do Jardim de fungo das Formigas Cortadeiras ..... 08
Referências ..... 09

## **C**APÍTULO **I:** Comparação morfométrica e geométrica na diferenciação das rocainhas de quatro espécies do gênero *Atta* do estado de São Paulo

Resumo ..... 18
Abstrat ..... 19
Introdução ..... 20
Material e Métodos ..... 22
Resultados ..... 29
Discussão ..... 37
Referências ..... 40

## **C**APÍTULO **II:** Arquitetura interna dos ninhos iniciais de *Atta sexdens*

Resumo ..... 43
Abstrat ..... 44
Introdução ..... 45
Material e Métodos ..... 48
Resultados ..... 51
Discussão ..... 58
Referências ..... 60

**C**APÍTULO **III:** AUSÊNCIA DO FUNGO PARASITA *ESCOVOPSIS* NOS PELLETS DE FUNGO MUTUALISTA TRANSPORTADAS POR FÊMEAS ALADAS DE *ATTA SEXDENS*

Resumo ..... 62
Abstrat ..... 63
Introdução ..... 64
Material e Métodos ..... 67
Resultados e Discussão ..... 69
Referências ..... 72

**C**APÍTULO **IV:** Presença e prevalência do fungo parasita *Escovopsis* nos ninhos de *Atta sexdens* em épocas distintas

Resumo ..... 75
Abstrat ..... 76
Introdução ..... 77
Material e Métodos ..... 79
Resultados ..... 83
Discussão ..... 88
Referências ..... 96

Considerações Finais ..... 101

# CONSIDERAÇÕES INICIAIS

# Considerações Iniciais

## *Formigas cortadeiras*

As formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) pertencem à tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae: subfamília: Myrmicinae), que é composta por 13 gêneros, 202 espécies e 82 variedades (KEMPF, 1972 *apud*, SCHULTZ; MEIER, 1995; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2002). As formigas *Atta* e *Acromymex*, assim como as outras espécies da tribo Attini, possuem a capacidade de cultivar e de alimentarem-se de um fungo mutualista. Por isso, são chamadas de "jardineiras", "formigas cultivadoras de fungo" ou "formigas cortadeiras" (WEBER, 1972).

As Attini mais basais cultivam seus fungos com fezes e carcaças de insetos, em geral, em decomposição (LEAL & OLIVEIRA 2000). Entretanto, as formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*), que são as mais derivadas dessa tribo, coletam uma grande gama de espécies vegetais, geralmente frescos, para cultivar o fungo mutualista, que serve como única fonte de alimento para larvas e alados, e servindo também como uma fonte importante de energia e nutrientes para as operárias adultas; sendo que essas complementam a sua nutrição através de ingestão de líquidos que extravasam das plantas durante o corte (MUELLER et al., 1998; LEAL & OLIVEIRA 2000; NAGAMOTO et al., 2011). Devido ao fato de cortarem as folhas e levarem para o interior de seu ninho, as formigas cortadeiras, em especial as do gênero *Atta*, pelo grande tamanho da colônia, são consideradas importantes pragas quando forrageiam plantas cultivadas pelos seres humanos (ROBINSON & FOWLER, 1982; HERNANDEZ et al., 1999). Apesar de receberem esta denominação "pragas", as formigas cortadeiras não só trazem prejuízos, mas, contribuem ecologicamente para a ciclagem de nurientes nos mais diversificados ecossistemas em que se encontram (GARRETTSON et al., 1998; MOUTINHO et al., 2003).

As formigas cortadeiras estão distribuídas em áreas tropicais das Américas, ocorrendo desde os Estados Unidos (latitude 33ºN) até a Argentina (latitude 33ºS) (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; WEBER, 1972; SOLOMON et al., 2008). A origem da Tribo Attini provavelmente se deu em regiões tropicais, possivelmente ao Norte da América do Sul (região amazônica - centro de origem) e em regiões próximas ao litoral, ambas com clima quente e úmido o suficiente para permitir a sobrevivência das formigas e a manutenção do fungo mutualista (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; WEBER, 1972; SOLOMON et al., 2008).

As formigas cortadeiras são consideradas pragas agrícolas nos países da América do Sul, América Central e no sul da América do Norte (FOWLER et al. 1990; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; DELLA LUCIA; FOWLER, 1993), atacando florestas, pastagens e outras culturas, sendo responsável pelo impacto negativo na agricultura de vários países, incluindo o Brasil (WEBER, 1972).

As espécies mais representativas de formigas cortadeiras do gênero *Atta* encontradas no estado de São Paulo são: *Atta sexdens* Forel (1908), *Atta bisphaerica* Forel (1908), *Atta laevigata* F. Smith (1858) e *Atta capiguara* Gonçalves (1944), conhecidas popularmente, como "saúva limão", "saúva mata-pasto", "saúva-cabeça-de-vidro" e "saúva-parda". As espécies de saúvas *Atta sexdens* e *A. laevigata* possuem uma ampla distribuição em todo o País, *A. bisphaerica* e *Atta capiguara* ocorrem nos estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul.

## *Morfologia do gênero Atta*

A identificação correta de um inseto é de fundamental importância para o bom desenvolvimento de trabalhos científicos, seja qual for o campo a ser estudado. Em se tratando de formigas cortadeiras, a identificação das espécies do gênero *Acromyrmex* é mais

complexa quando comparado com as do gênero *Atta*, devido à inexistência de soldados, utilizando-se para isto, operarias de maior tamanho. No entanto, alguns trabalhos feitos com ninhos iniciais das espécies do gênero *Atta* são dificultados, pois, nessa fase, só encontramos a rainha e as operárias menores (jardineiras, generalistas e forrageiras), e as chaves para a identificação são baseadas somente nos soldados (operárias máximas), que só surgem com 38 meses de idade (AUTUORI, 1942; FORTI & BOARETTO, 1997).

As formigas (Hymenoptera, Formicidae) são um grupo interessante para varios estudos, principalmente para o estudo da morfologia. Pois são peças notáveis e de grande importância de praticamente todos os ecossistemas terrestres (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; ANDERSEN, 1991; KASPARI et al., 2003). Porém, para o entendimento da função das comunidades de formigas, os ecologistas e os taxonomistas, têm freqüentemente utilizado simples medidas lineares de tamanho como largura da cabeça, comprimento da cabeça, largura dos olhos, largura das mandíbulas, largura da tíbia e outras (KASPARI, 1993; BYRNE, 1994; JOHNSON, 2000, FERSTER et al., 2006, TSCHINKEL et al., 2003, CAMARGO, et al. 2007).

A morfologia e a mrfometria tem sido utilizada para discriminar grupos definidos a priori, usando informações morfológicas ou biológicas como: formas, distribuição geográficas, fisiologia, origem, e outras. A morfologia (tamanho e a forma) de um organismo reflete numa combinação de diferenças na ecologia e na história filogenética das espécies (WAINWRIGHT & REILLY, 1994). O tamanho do corpo, é provavelmente a variável morfológica mais importante, pois é ela que afeta, e limita a fisiologia, biologia trófica, e habitat (PETERS, 1983). A partir da forma de um organismo, se pode atribuir informações importantes: como ele se move (LOSOS, 1990), o que ele come (FELLEY, 1984) e onde vive (DOUGLAS & MATTHEWS, 1992).

Por estas razões, muitos ecologistas e os taxonomistas quantificam e diferenciam os grupos ecológicos e taxonômicos utilizando parâmetros morfologicos (WAINWRIGHT & REILLY, 1994). Como por exemplo, medidas morfológicas que refletem na dieta (largura da cabeça) que são utilizadas para inferir processos de filiação limitados em comunidades de espécies (DAVIDSON, 1977; GRANT, 1986). Além disso, cada medida contém informações não só sob a forma da própria medida, mas também sobre covariáveis morfológicas, ecológicas e filogenéticas (DERRICKSON & RICKLEFS, 1988; LOSOS & MILES, 1994). Assim, pelo menos, duas considerações relacionadas são importantes na seleção de características para estudos morfológicos.

As primeiras considerações são as análises de covariância para o tamanho e forma para as relações alométricas interespecíficas, entre as matrizes morfológicas das espécies que contém uma considerável redundância. Porém as Análises multivariadas como a análise de componentes principais (PCA) reduzem a dimensionalidade de conjuntos de dados morfológicos e criam combinações lineares ortogonais na matriz de dados originais. Estes eixos resumem as informações sobre o tamanho, a forma e a alometria de organismos (LEGENDRE & LEGENDRE, 1998). Em segundo, a similaridade ecológica entre espécies morfologicamente semelhantes, podem representar a herança de ambos os recursos a partir de um ancestral comum recente. No entanto, uma compreensão da estrutura filogenética do conjunto de dados morfológicos, fornece uma alternativa para hipóteses adaptativas para a morfológia (LOSOS & MILES, 1994).

Este estudo de morfologia e morfometria vem sendo muito utilizado para outras espécies de formigas (*Pheidole, Solenopsis invicta*, *Pogonomyrmex*, etc) e vêm dando bons resultados. Porém para formigas cortadeiras as ferramentas de morfologia, morfometria e morfometria geométrica vêm sendo pouco utilizada.

O método mais utilizado para a identificação atualmente são as chaves taxonômicas. No entanto, ainda hoje, existem confusões taxonômicas nos gêneros Neoattini superiores e entre as formigas cortadeiras, resultantes da ausencia de revivões recentes e modernas sobre a maioria dos Attini, tornando a identificação das espécies tarefa dificil até mesmo para os taxonomistas (BRANDÃO et al., 2011).

## *Fundação da Colônia*

O vôo nupcial destas espécies ocorre uma vez ao ano durante o período da tarde para *A. sexdens, A. laevigata, A. capiguara* e no período da manhã para *Atta bisphaerica*, nos meses de Setembro – Novembro no Sudeste e Centro Oeste do Brasil, regulado pelas primeiras chuvas que rompem o período de estiagem, com os machos formando "enxames" com 200 m de diâmetro e alturas superiores a 150 m do nível do solo para *Atta capiguara* conforme por Amante (1972) *apud* Fowler et al. (1984).

Para que aconteça o vôo nupcial, tanto os machos, quanto as fêmeas precisam de energia para efetuar tal atividade. Antes de partirem do ninho de origem, machos e fêmeas estão bem nutridos e prontos para o acasalamento. Depois do acasalamento e a fêmea fecundada (média de seis a oito machos para cada fêmea), a rainha ("içá") desce ao solo, remove suas asas, e escava um túnel que se estende em uma profundidade que vai de 8 a 15 cm. Após a construção do túnel as rainhas iniciam a escavação da câmara inicial, fundando assim um novo sauveiro (AUTUORI, 1942; FORTI & BOARETTO, 1997).

As rainhas de *Atta* ficam enclausuradas na câmara inicial por cerca de 71 a 94 dias (AUTUORI 1941; NS NAGAMOTO, comunicação pessoal), regurgitam da cavidade infrabucal uma porção de fungo, utilizada para iniciar a esponja fúngica. Antes do surgimento das operárias o crescimento do fungo é suportado exclusivamente pela rainha fundadora, que utiliza fluidos fecais e secreções o jardim de fungo. Após a primeira geração de operárias, a

tarefa de forageamento, cuidado com o fungo e das larvas, deixa de ser uma função da rainha e passa a ser uma tarefa das novas operárias (MARICONI, 1970; CURRIE, 2001). Com o surgimento das primeiras operarias adultas, após 62 dias, se inicia a retirada da terra que estava vedando o pequeno canal, a partir daí, saem para o exterior para forragearem (cortarem as folhas) (FORTI & BOARETTO, 1997).

A atividade de forrageamento envolve a exploração ou busca de vegetais para o corte em fragmentos e seu transporte até o ninho. Após a seleção dos vegetais, as forrageadoras realizam o corte desse material e levam para o interior da colônia. Quando as folhas entram no ninho ocorre uma inspeção pelas operárias que aceitam ou rejeitam os fragmentos de folhas cortados (QUINLAN; CHERRETT, 1977). O material selecionado é cortado em pedaços bem pequenos, raspados para remover ceras e microorganismos e tem suas bordas pregueadas e mastigadas antes de ser incorporado ao jardim fúngico, a qual serve de alimento para as larvas e adultos. As formigas inoculam hifas nestes materiais e depositam uma gota de líquido fecal, que é rico em enzimas digestivas (tais como proteases, pectinases, amilases e celulases), que atuam na degradação do material vegetal (BOYD; MARTIN, 1975a,b; FORTI & BOARETTO, 1997; ANDRADE et al., 2002; SILVA et al., 2006; DE FINE LICHT et al., 2010; NAGAMOTO et al., 2011).

## *Fungicultura das Formigas Cortadeiras*

As formigas cortadeiras cultivam, com o material vegetal, o fungo mutualístico *Leugoagaricus gongylophorus* (Lepiotaceae: Agaricales: Basidiomycota) que é utilizado como alimento (MUELLER et al., 2001; HÖLLDOBLER; WILSON, 2009).

MÖLLER, 1941 foi o primeiro a isolar e descrever este fungo cultivado pelas formigas da tribo Attini, principalmente a espécie de *Acromyrmex disciger*, inicialmente nomeando como *Rozites gongylophora*, e indicando que trata-se de um fungo pertencente ao

filo Basidiomicota. Depois deste trabalho, outros autores procederam à árdua tarefa de identificar esse fungo.

Já num trabalho realizado por Kreisel (1972) *apud* Rodrigues (2004) foi denominado de *Attamyces bromatificus* o fungo cultivado por *Atta insularis*, devido á formação de estruturas conhecidas como "bromatia" no micélio desse fungo. A caracterização taxonômica do fungo mutualista é dificultada pela sua difícil identificação, pois as estruturas de origem sexuada (basidiocarpos ou "corpos de frutificação"), utilizadas para a identificação, estão ausentes ou só aparecem raramente (RODRIGUES, 2004). Mueller (2002) reuniu os principais trabalhos que trazem as observações dessas estruturas em ninhos de campo e de laboratório. Estes trabalhos documentaram a formação de basidiocarpos em um ninho de laboratório de *Atta sexdens ruprobilosa* (MUCHOVEJ & DELLA LUCIA, 1990), em um ninho de *Atta cephalotes* (FISHER et al. 1994 a,b) e em um ninho de campo de *Acromyrmex hispidus fallax* (PAGNOCCA et al. 2001). Em cada caso o fungo recebeu uma denominação diferente, a saber: *Leucoagaricus weberi* no primeiro e *Leucoagaricus gongylophorus* nos dois últimos, porém numa dessas eventuais ocorrências, Pagnocca et al. (2001), confirmou através do método de RAPD, que a fase sexuada observada correspondia de fato à fase micelial. Esta apresentava uma dilatação apical típica, denominada gongilídio, a qual se concentra vários nutrientes utilizado como alimento (WEBER, 1972). Por este motivo o nome atualmente aceito é *L. gongylophorus* (SINGER, 1986).

Na maioria das vezes este fungo é encontrado em estado vegetativo dentro dos ninhos, o que não permite distinção morfológica entre espécies. A similaridade morfológica do micélio e os resultados dos testes pareados feitos por Stradling e Powell (1986) levaram estes autores a propor que o fungo mutualista pertencente a uma única espécie.

Devido à este cultivo de apenas uma única espécie de fungo nos ninhos, evita a competição entre diferentes estirpes. Entretanto, teorias evolutivas postulam que populações

com diversidade genética restrita, como é o caso do fungo mutualístico, são mais propensas a serem atacadas por parasitas e patógenos (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001a). Assim, semelhantemente a agricultura mantida pelo homem, as formigas da tribo Attini apresentam em seus jardins de fungos parasitas que podem prejudicar a simbiose (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001a).

## *Parasita do jardim de fungo das formigas cortadeiras*

Desde o estudo original de Alfred Möller (1941), difundiu-se a idéia de que as formigas cortadeiras seriam capazes de manter seu parceiro, contendo apenas uma espécie de microorganismo: o fungo mutualista (WEBER, 1955). Mas hoje se sabe que ocorre pelo menos um parasita especializado.

Este parasita é considerado como fungo anamórfico (fungo que apresenta somente a fase assexuada de reprodução), do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), e está associada aos jardins das formigas Attini (CURRIE et al., 1999a). Quando presente é capaz de persistir dentro do jardim de fungo por longos períodos de tempo, causando reduções substanciais na biomassa do jardim e indiretamente, podendo reduzir a taxa de crescimento da colônia, e em alguns casos levar à colônia a morte (CURRIE, 2001b e CURRIE et al., 2003).

Sabe-se que *Escovopsis* spp. compartilha uma antiga história evolutiva com as formigas e seus fungos (CURRIE et al., 2003). O primeiro autor a descrever deste parasita especializado foi feita por Kreisel (1972), nomenado-o como *Phialocladus zsoltii.* Porém em 1990, Muchovej & Della Lucia, consideraram que a nomenclatura de Kreisel era inválida e renomearam para *Escovopsis weberi* em homenagem a Neal A. Weber grande estudioso das formigas Attini. Em 1995, Seifert et al. descreveram uma segunda espécie, denominado-o de *Escovopsis aspergilloides* devido a sua aparência globulosa portadoras de vesículas,

aparência esta semelhante a *Aspergillus* spp., sendo que essa descrição coincidiu com um dos desenhos do trabalho pioneiro de Alfred Möeller.

Möeller foi o primeiro a registrar a ocorrência de *Escovopsis* spp. deste fungo. Em seu trabalho, ele correlacionou equivocadamente *Escovopsis* spp. como sendo a fase anamórfica do fungo cultivado pela formiga *Acromyrmex disciger*. Stahel e Geijskes (1941) e Weber (1979) também encontraram a presença deste fungo nos ninhos de *Atta sexdens* e outras Attini mantidas em laboratório.

Até o presente momento apenas duas espécies desse parasita estão descritas: *Escovopsis weberi*, encontrado em *Atta insularis*, e *Escovopsis aspergilloides* isolado de *Trachymyrmex ruthae* (SEIFERT et al. 1995). No entanto, Currie (2001) acredita que existam ainda outras espécies a serem descritas.

Apesar, de nos últimos anos terem aumentando o número de trabalhos realizados com esse fungo, muitas questões ainda permanecem sem resposta. Por exemplo, (i) não se conhece o reservatório natural desse parasita; (ii) pouco se sabe sobre seu ciclo de vida ou transmissão entre colônias e (iii) ainda não se sabe se esse fungo reproduz sexuadamente na natureza (i.e. se possui fase teleomorfica) (RODRIGUES et al. 2004).

## REFERÊNCIAS


Amante, E. 1972. Preliminary observations on the sevarming behaviour of the leafcutting ant, *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Georgia Entomological Society** , v.7, p.82-3.

Andersen, A.N. 1991. Parallels between ants and plants: implications for community ecology. Ant–Plant Interactions (ed. by C. R. Huxley and D. F. Cutler), pp. 539–553. **University Press**, Oxford.

Andrade, A.P.P., Forti, L.C., Moreira, A.A., Boaretto, M.A.C., Ramos V.M., Matos C.A.O. 2002. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology.** 40: 293-306.

Autuori, M. 1941. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.–Hymenoptera: Formicidae). I–Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivo do Instituto Biológico**.12:197–228.

Autuori, M. 1942. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera – Formicidae): II – O sauveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biologico.** 13, 67–86.

Boyd, N.D.; Martin, M.M. 1975. Faecal proteinases of the fungus-growing ant *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. **Journal of Insect Physiology**. Langford Lane, v.21, n.5, p.1815-1820.

Brandão, C.R.F.; Mayhé-Nunes, A.J. 2002. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3B, p.639-665.

Brandão, C.R.F., Mayhé-Nunes, A.J. and Sanhudo, C.E.D. Taxônomia e fiogênia das formigas-cortadeiras In: Della Lucia, T.M.C. **Formigas cortadeiras da Bioecologia ao Manejo**, editora UFV, p.421, 2011.

Byrne, M.M. 1994. Ecology of twig-dwelling ants in a lowland tropical forest. **Biotropica**, 26, 61–72.

Camargo, R.S., Forti L.C., Lopes J.F.S. and Ottati A.L.T. 2007. Age polyetism in leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hymenoptera: Formicidae). **Journal Applied Entomology.**

Currie C.R., Wong B., Stuart A.E., Schultz T.R., Rehner S.A, Mueller U.G., Sung G.H., Spatafora J.W., Straus N.A. 2003. Ancient tripartite co-evolution in the attine ant–microbe symbiosis. **Science**. 299:386–388

Currie, C.R. & Stuart, A.E. 2001. Weeding and grooming of pathogens inagriculture by ants. **Proceedings of Royal Society of London**. 268: 1033-1039.

Currie, C.R. 2001. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**. 128: 99-106.

Currie, C.R., Scott, J.A., Summerbell, R.C. & Malloch, D. 1999. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398:(6729) 701-704. cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, Ithaca,

Davidson, D.W. 1977. Foraging ecology and community organization in desert seed-eating ants. **Ecology**, 58, 725–737.

De Fine Licht, H. H., Schiott, M, Mueller, U.G., Boomsma, J.J. 2010. Evolutionary transitions in enzyme activity of ant fungus gardens. **Evolution**, v. 64, p. 2055-2069.

Della Lucia, T. M. C.; Fowler, H. G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa, Editora folha de Viçosa, 1993, p. 1-3.

Derrickson, E.M. & Ricklefs, R.E. 1988 Taxon-dependent diversification of life-history traits and the perception of phylogenetic constraints. **Functional Ecology**, 2, 417–723.

Douglas, M.E. & Matthews, W.J. 1992. Does morphology predict ecology? Hypothesis testing within a freshwater stream assemblage. **Oikos**, 65, 213–224.

Felley,J.D. 1984. Multivariate identification of morphological– environmental relationships within the Cyprinidae (Pisces). **Copeia**, 1984, 442–455.

Ferster, B.; Pie, M.R.; Traniello, J.F.A. 2006. Morphometric Variation in North American Pogonomyrmex ants: Caste Evolution through ecological release or dietary change? **Ethology Ecology & Evolution**, v. 18, n.1, p. 19-32.

Fisher,P. J.; Strandling, D.J.; Pegler, D.N. Leafcutting ants, their fungus gradens nest of the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist**, Cambridge, v.8, n.3, p.128-131, 1994b.

Fisher,P. J.; Strandling, D.J.; Pegler, D.N. *Leucoagaricus basidiomata* from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycological Research**, Cambridge, v.98, n.8, p.884-888, 1994a.

Forti, L.C.; Boaretto, M. A.C. **Formigas cortadeiras, biologia, ecologia, danos e controle**: Botucatu: UNESP, 1997, p.61

Fowler, H.G. Bernardi, J.V.C.; delabie, J.C., Forti, L.C. and Pereira-da-Silva, V. Major ant problems of South America. In: VANDEER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. (ed.) **Applied Myrmecology: A world perspective.** Boulder,San Francisco & Oxford: Westview Press, 1990. p. 3-14.

Fowler, H.G.; Robinson, S.W.; Diehl, J. Effect of mature colony density on colonization and initial colony survivorship in *Atta capigura*, a leaf-cutting ant. **Biotropica,** v.16, n.1, p.51-54, 1984.

Garrettson, M.; Stetzel, J.F.; Halpern, B.S.; Hearn, D.J.; Lucey, B.T.; Mckone, M.J. Diversity and abundance of understorey plants on active and abandoned nests of leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*) in a Costa Rican rain forest. **Journal of Tropical Ecology,** v.14, p.17-26, 1998.

Grant, P.R. 1986. Ecology and Evolution of Darwin's Finches.Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Hernandez, P., Martin, A. & Dorado, G., 1999. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: A practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. **Molecular Breeding**, 5: 245-253.

Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 2009. **The superorganism: The beauty, elegance and Strangeness of Insect Societies**. W.W. Norton & Company.

Hölldobler, B.; Wilson, E.O. **The ants**. In: Hölldobler, B.; Wilson, E. O. The fungus growers. Cambridge: Harvard University. Press, 1990. cap. 17, p. 596-608.

Johnson, R.A. 2000. Seed-harvester ants (Hymenoptera: Formicidae) of North America: an overview of ecology and biogeography. **Sociobiology**, 36, 83–122.

Kaspari, M. 1993. Body size and microclimate use in Neotropical granivorous ants. **Oecologia**, 96, 500–507.

Kaspari, M., Yuan, M. & Alonso, L.E. 2003. Spatial grain and the causes of regional diversity in ants. **American Naturalist**, 161, 459–477.

Kempf, W.W. 1972. Catálogo abreviado de formigas neotropicais (Hymenoptera, Formicidae). **Studia Entomologica 15**: 1–344.

Kreisel, H. Pilze aus pilzgärten von *Atta insularis* in Kuba. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**, Berlin, v. 12, n. 8, p. 643-654, 1972.

Leal, I.R. & Oliveira, P.S. 2000. Foraging ecology of attine ants in a Neotropical savanna: seasonal use of fungal substrate in the cerrado vegetation of Brazil. **Insectes Sociaux**. 47: 376-382.

Legendre, P. & Legendre, L.1998. Numerical Ecology, 2nd edn. **Elsevier**, Amsterdam; New York.

Losos, J.B. & Miles, D.B. 1994 Adaptation, constraint, and the comparative method: phylogenetic issues and methods. Ecological Morphology (ed. by P. C. Wainwright and S. M. Reilly), pp. 13–41. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Mariconi, F.A.M. 1970. As saúvas. **Agron Ceres**, São Paulo.

Möller, A. As hortas de fungo de algumas formigas sul-americanas. Trad. de A. P. Viégas e E.M. Zink. Rio de janeiro: [s.n], 1941. 120p Tradução de: Die Pilzgaerten Einiger Suedamerikanischer Ameisen. **Publicado na Revista de Entomologia**, supl. n.1.

Moutinho, P.; Nepstad, D.C.; Davidson, E. A. 2003. Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazônia. **Ecology**, Washington, v. 84, n.5, p. 1265-1276.

Muchovej, J.J., and Della Lucia, T.M.C. 1990. Escovopsis, a new genus from leaf cutting ant nests to replace Phial-ocladus nomen invalidum. **Mycotaxon** 37: 191-195.

Mueller, U.G., Schultz T.R., Currie, C.R., Adams, R.M.M., Malloch, D. 2001. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**, 76:169–97

Mueller, U.G.; Rehner, S.A.; Schultz, T.R. 1998. The evolution of agriculture in ants. **Science**, Washington, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038.

Nagamoto, N.S.; Garcia, M. G.; Forti, L.C.; Verza, S.S.; Noronha, N.C.; Rodella, R.A. 2011. Microscopic evidence supports the hypothesis of high cellulose degradation capacity by the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Journal of Biological Research**, Thessaloniki, v.16, p.308-312.

Pagnocca, F. C.; Bacci, M. Jr; Fungaro, M.H.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.A.; Sant'anna, A.; Capelari, M. 2001. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycological Research**, Oxford, v. 105, n. 2, p. 173-176.

Peters, R.H. 1983. **The Ecological Implications of Body Size**. Cambridge University Press, Cambridge.Losos, J.B. (1990) Ecomorphology, performance capability, and scaling of West Indian Anolis lizards: an evolutionary analysis. Ecological Monographs, 60, 369–388.

Quinlan, R.J. & Cherrett, J.M. 1977. The role of substrate preparation in thesymbiosis between the leaf-cutting ant Acromyrmex octospinosus (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, 2: 161-170.

Robinson, S.W. & Fowler, H.G. 1982. Foraging and pest potential of Paraguayan grass-cutting ants (*Atta* e *Acromyrmex*) to the cattle industry. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie.** 93: 42-54.

Rodrigues, A. Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de Atta sexdens rubropilosa Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.

2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2004.

Schultz, T. R. & R. Meier. 1995. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology** 20: 337–370.

Seifert. K. A.; Samson, R. A.; Chapela, I. H. 1995. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, Bronx, v. 87, n. 3, p. 407-413.

Silva, A., Bacci, M., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., Hebling M. J. A. 2006. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Moller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current Microbiology**, v. 53, p. 68–71.

Singer R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. Königstein, Ger.: Költz **Scientific Books.**

Solomon SE, Bacci M.Jr., Martins, J.Jr., Vinha, G.G., Mueller, U.G. 2008) Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS ONE,** 3(7): e2738.

Stahel, G., And D. C. Geijskes. 1941. Weitere Untersu-chungen iiber Nestbau und Gartenpilz von Atta cephal-otes L. und Atta sexdens L. (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Entomologica.** (Rio de Janeiro) 12: 243-268.

Stradling, D.J.; Powell, R.J. 1986. The cloning of more highly productive fungal strains: a factor in the speciation of Attini ants. **Cellular and Molecular Life Science**, v.42, n.6, p.962-964.

Tschinkel W.R., Mikheyev A.S. & Storz S.R. 2003. Allometry of workers of the fire ant, *Solenopsis invicta*. **Journal of Insect Science.** 3: 1-11.

Wainwright, P.C. & Reilly, S.M. 1994. Ecological Morphology: Integrative Organismal Biology. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Weber, N. A. 1955. Pure cultures of fungi produced by ants**. Science**, Washington, v.121, n. 3134, p. 109,

Weber, N.A. 1979 Fungus culturing by ants. In: Batra, L.R. Insect-fungus symbiosis, mutualism and commensalism. **New York: John Willey & Sons**. p. 77-116.

Weber, N. A. 1972. Gardening ants: the Attines. **American Philosophical Society**, Philadelphia, Pennsylvania.

.

# Capítulo I

# CAPÍTULO I

## COMPARAÇÃO MORFOMÉTRICA E GEOMÉTRICA DAS RAINHAS DAS QUATRO ESPÉCIES DO GÊNERO *ATTA* DO ESTADO DE SÃO PAULO

**RESUMO**

As modificações nas características morfológicas e morfométricas das diferentes partes do corpo das formigas cortadeiras são muitas vezes, diferenças na forma ou no tamanho corpo (cabeça, tórax e abdômen). Porém estas diferenças que ocorrem durante o crescimento dos individuos, estão relacionadas com as mudanças nas estruturas homólogas no decorrer da evolução das espécies. O objetivo deste capítulo foi diferenciar as quatro espécies de rainhas do gênero *Atta*, presentes do estado de São Paulo, através de técnicas morfométricas e geométricas, para auxiliar na identificação de ninhos iniciais. As rainhas foram coletadas manualmente com o auxílio de uma pinça, diretamente dos ninhos das espécies pré-determinadas logo antes delas saírem para o vôo nupcial, durante a revoada que aconteceu no dia 31/10/2010. Posteriormente estas foram acondicionadas em frascos com álcool 70% e levadas para o laboratório. No laboratório as rainhas foram dissecadas com o auxílio de um estéreo microscópio óptico da marca Motic, utilizando duas pinças de pontas finas para a separação das partes do corpo como cabeça, tórax, abdômen e as asas. As partes dos indivíduos foram fixadas individualmente nas placas de vidro cobertas por um papel milimetrado, para padronizar as estruturas na mesma posição a fim de possibilitar uma melhor captura das imagens e posterior medição. Para as medidas da morfometria da cabeça, do tórax e do abdômen utilizou-se o programa ImageJ. No entanto para as medidas atribuídas à morfometria geométrica das asas utilizou-se inicialmente os programas TpsUtil e TpsDig2 versão 1.4 e em seguida o software MorphoJ. Os dados foram submetidos a uma Análise de Variância (one-way, ANOVA). Os resultados obtidos demonstram que existem diferenças significativas entre as espécies estudas ($p<0,01$), tanto para as análises de morfometria como para as análises da morfometria geométrica. Para a discriminação das espécies utilizando a morfometria, foi possível verificar que as espécies de *A. sexdens* e *A. bisphaerica* são mais distintas, quando comparadas com *A. laevigata* e *A. capiguara*, que se mostraram mais próximas uma das outras. Porém para as análises da morfometria geométrica foi possível evidenciar que as espécies de *A. capiguara* e *A. bisphaerica*, tiveram um poder maior de discriminação quando comparadas com *A. laevigata* e *A. sexdens.*

**Palavras-chave:** Morfometria, *Atta sexdens*, *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta bisphaerica*

**ABSTRACT**

The changes in morphological and morphometric characteristics of the different body parts of ants are often differences in the shape or size body (head, thorax and abdomen). However these differences that occur during growth of the individuals are related to changes in the homologous structures in the course of evolution of species. The aim of this chapter was to differentiate the queens of the four species of the genus *Atta*, present in the São Paulo state, through geometric and morphometric techniques, to assist in the identification of initial nests. The queens were collected manually with the aid of forceps, directly from the nests of the pre-determined species shortly before them leaving for the nuptial flight, during mating flight that happened on 31/10/2010. Later they were placed in vials with 70% alcohol and taken to the laboratory. In the laboratory the queens were dissected with the aid of a optical stereomicroscope of the brand Motic, using two fine-tipped tweezers to separate the parts of the body such as the head, thorax, abdomen and wings. The parts of individuals were fixed individually in glass plates covered with a graph paper, to standardize the structures in the same position in order to provide a better capture images and the subsequent measurement. For morphometric measurements of the head, thorax and abdomen, the software ImageJ used. However for the measures assigned to the geometric morphometry of wings it was initially used the programs TpsUtil and TpsDig2 version 1.4 and then the software MorphoJ. The data were subjected to an Analysis of Variance (one-way ANOVA). The results show that there are significant differences between the species studied ($p < 0.01$) for both morphometric analysis and for the analysis of geometric morphometrics. For the discrimination of species using morphometry, we found that species of *A. sexdens* and *A. bisphaerica* are more distinct when compared with *A. laevigata* and *A. capiguara*, who were more close to each other. But for the geometric morphometric analyzes it was observed that the species *A. capiguara* and *A. bisphaerica* had a greater power of discrimination when compared with *A. laevigata* and *A. sexdens*.

**Key words:** Morphometry, *Atta sexdens, Atta laevigata, Atta capiguara, Atta bisphaerica*

# 1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras constituem um grupo taxonômico de difícil identificação (BOLTON, 1994), sendo os caracteres morfológicos os mais complexos de serem relacionados. Há inúmeras controvérsias na classificação das subfamílias de Formicidae, principalmente em nível de tribo, onde a classificação é confusa (FRANÇOSO & BRANDÃO, 1993). Atualmente a organização tribal da subfamília Myrmicinae, está desordenada e necessita de uma revisão (AGOSTI et al., 2000; BOLTON, 2003). A situação pode ser estendida para os níveis taxonômicos de alguns gêneros e subgêneros, devido à presença de caracteres morfológicos dúbios e polimórficos, além de conceitos e definições obscuras que dificultam a classificação e a identificação das formigas (BOLTON, 1995).

A utilização, no passado, de um sistema pentanominal para a classificação de formigas, onde eram determinados o gênero, subgênero, espécie, subespécie e variedade na forma, também colaborou para que muitas espécies sofressem diversas mudanças em sua classificação, o que, conseqüentemente, gerou constantes alterações nas coleções e chaves de referência e confusões no reconhecimento das espécies (BUHS, 2000).

As modificações mais óbvias entre organismos relacionados são muitas vezes diferenças na forma, no tamanho ou nas partes individuais de seu corpo (cabeça, tórax e abdômen). As mudanças no crescimento estão relacionadas a um dos principais modos, através das quais estruturas homólogas mudam no decorrer da evolução; fazendo com que regiões do corpo tornem-se relativamente maiores ou menores e seus apêndices mais longos ou mais curtos e as peças mais redondas, mais achatada, mais alongada e assim por diante (FERNANDEZ et al., 1994). Este processo de mudanças durante a evolução dos individuos, exercem efeitos microscópicos ou macroscópico, durante o crescimento e a maturação dos organismo e durante a evolução de uma população (TSCHINKEL et al., 2003).

Na maioria das espécies, a presença de castas resultam em uma grande variabilidade de forma e tamanho dos indivíduos. Este fenômeno é referido como polimorfismo e está presente em cerca de 15% dos gêneros de formigas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; OSTER & WILSON, 1978; WILSON, 1953).

A maioria dos autores visa a alometria como o resultado da diferente taxa de crescimento entre as partes do corpo, no entando, Nijhout & Wheeler (1996) argumenta que a situação em insetos holometábolos é fundamentalmente diferente. Nestas, os adultos crescem na maior parte, a partir de discos marginais no último ínstar larval durante a inversão da fase de metamorfose, quando ocorre o rearranjo de célula durante os estágios pré-pupa e pupa. Isto ocorre devido ao fato de que nesses estágios as pupas não se alimentam, sendo os recursos para o crescimento do disco maginal metabólicos fixos ou tecidos corporais (TSCHINKEL et al., 2003).

O modelo também acomoda a reprogramação da dimensão crítica do metamorfose e dos parâmetros de crescimento, e pode produzir padrões alométricos observados entre as operárias. Estudos de formigas polimórficas normalmente não relatam relações entre mais de duas ou três medidas. As medidas mais frequentemente feitas são a largura da cabeça, comprimento da cabeça, da tibia, da altura do tórax, do abdômen e raramente se utiliza as medidas do comprimento da perna e outras partes, como as asas (FRANKS, 1985; KLOTZ et al., 1992).

Estudos morfométricos realizados até o presente momento, muitas vezes só analisam as medidas que se relacionam com hipóteses funcionais, e ignoram outras medidas de extrema importância (MAAVARA, 1983). A literatura contém, portanto, poucos estudos sobre as relações de tamanho e forma das principais partes do corpo, apesar de todas as partes do corpo estarem sujeitas a selecção natural do tamanho e da forma. Sendo, importate

realizar uma análise mais completa e complexa nas mudanças alométrica de uma espécie selecionada, procurando mudanças mais sutis no tamanho do corpo (MAAVARA, 1983).

O uso de novas metodologias a fim de conhecer melhor toda a biodiversidade que existe no planeta ajuda a entender toda a dinâmica dos grupos envolvidos nos estudos (SILVA, 2010). No caso deste, e de diversos outros trabalhos, a utilização de dados morfométricos tem alcançado resultados cada vez mais promissores no sentido de alcançarmos um sistema ideal de identificação automática das espécies (SILVA, 2010).

O objetivo deste capitulo foi diferenciar quatro espécies de rainhas do gênro *Atta*, do estado de São Paulo, através de técnicas morfométricas e geométricas, para auxiliar na identificação de ninhos inicias.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Área de Estudos

Os indivíduos foram coletados em duas localidades diferentes dentro do município de Botucatu-SP: 1-área localizada na Fazenda Experimental Lageado da FCA/UNESP, (22º49’53.25”S e 48º25’24.22”W) com predominância de *Eucalyptus sp.* e grande ocorrência da espécie de *Atta sexdens.* 2- área de pastagem localizada na Fazenda Santana, próxima a Fazenda Experimental Lageado (22º50’46”S e 48º26’02”W) com predominância vegetal de *Brachiaria* sp. e *Paspalum* sp. e com predominância mirmecológica de *Atta laevigata*, *Atta bisphaerica e Atta capiguara.*

### 2.2. Montagem das lâminas e Aquisição dos dados

Os ninhos foram inspecionados quanto ao tamanho, utilizando um termonebulizador, e posteriormente marcados com estacas. Os ninhos foram inspecionados diariamente até a data da revoada que ocorreu no dia 30/10/2010. As rainhas foram coletadas diretamente dos

ninhos das espécies pré-determinadas antes de saírem para o vôo nupcial. Esta metodologia foi utilizada, devido ao fato, das identificações para as espécies de *Atta* serem baseadas através da identificação dos soldados e do monte de terra solta, dificultando, os trabalhos realizados em campo com ninhos iniciais.

Cada uma das 4 espécies de rainhas do gênero *Atta* (*Atta sexdens*, *Atta laevigata*, *Atta bisphaerica* e *Atta capiguara*), foram amostradas a partir de dois ninhos distintos, visando diversificar as amostras e eliminar possíveis peculiaridades morfológicas de uma mesma população com os mesmo gene parental. Foram coletadas 50 rainhas de cada ninho, totalizando 100 rainhas (durante a revoada), de cada espécie. As rainhas eram capturadas manualmente com o auxilio de uma pinça, acondicionadas em potes de vidros contendo álcool 70% e posteriormente levadas para o laboratório.

Após a amostragem, as rainhas foram dissecadas com o auxilio de um estéreomicroscópio óptico Motic, utilizando duas pinças de pontas finas para a separação das partes do corpo como cabeça, tórax e abdômen. As partes dos indivíduos foram fixadas individualmente nas placas de vidro cobertas por um papel milimetrado, para padronizar as estruturas na mesma posição a fim de possibilitar uma melhor captura das imagens e posterior medição **(Figura 1)**. A cabeça foi colocada com a parte frontal voltada para cima, o tórax e o abdomen com a parte dorsal para cima, posições que permitiram mais clareza da visualização de duas dimensões (2D) das partes do corpo de interesse.

**Figura 1:** Montagem das placas com as partes do corpo (cabeça, tórax, abdômen e as asas) dos individuos que foram utilizadas para a retirada das fotogarfias e posterior retirdas das medidas de morfometria convencional e geometrica.

### 2.3 Comparações Morfométricas

Para as análises morfométricas, utilizou-se 20 rainhas de cada ninho, totalizando n = 40 rainhas de cada espécie. As imagens do tórax e abdômen foram obtidas através de uma câmera SonyH50, Para a captura das imagens da cabeça foi utilizado um estereomicroscópio Leica S6 com ampliação de 10 x 12 = 120x, cuja, óptica plana impede deformações periféricas da imagem. De cada indivíduo, foram tomadas 13 medidas descritas na **Tabela 1**, da cabeça, do tórax e abdômen **(Figura 2 e Figura 3).** Para a obtenção das medidas utilizadas foi utilizado o progama ImageJ.

**Tabela 1.** Medidas morfometrica das rainhas do gênero *Atta* utilizadas no estudo.

| Abreviações | Dimensão (mm) |
|---|---|
| **LC** | Largura da cabeça |
| **CCB** | Comprimento da cabeça (comprimento a partir do vértice cefálico até o final da mandíbula). |
| **LOE** | Largura do olho esquerdo (maior largura do olho esquerdo) |
| **LOD** | Largura do olho direito (maior largura do olho esquerdo) |
| **ASO** | Área superior dos olhos |
| **AIO** | Área inferior dos olhos |
| **CLP** | Área Clipeal |
| **LM** | Largura da mandíbula |
| **CT** | Comprimento do tórax |
| **AT** | Altura do tórax |
| **CAB** | Comprimento do abdômen |
| **CPEC** | Comprimento do pecíolo |
| **CPPEC** | Comprimento do pós - pecíolo |

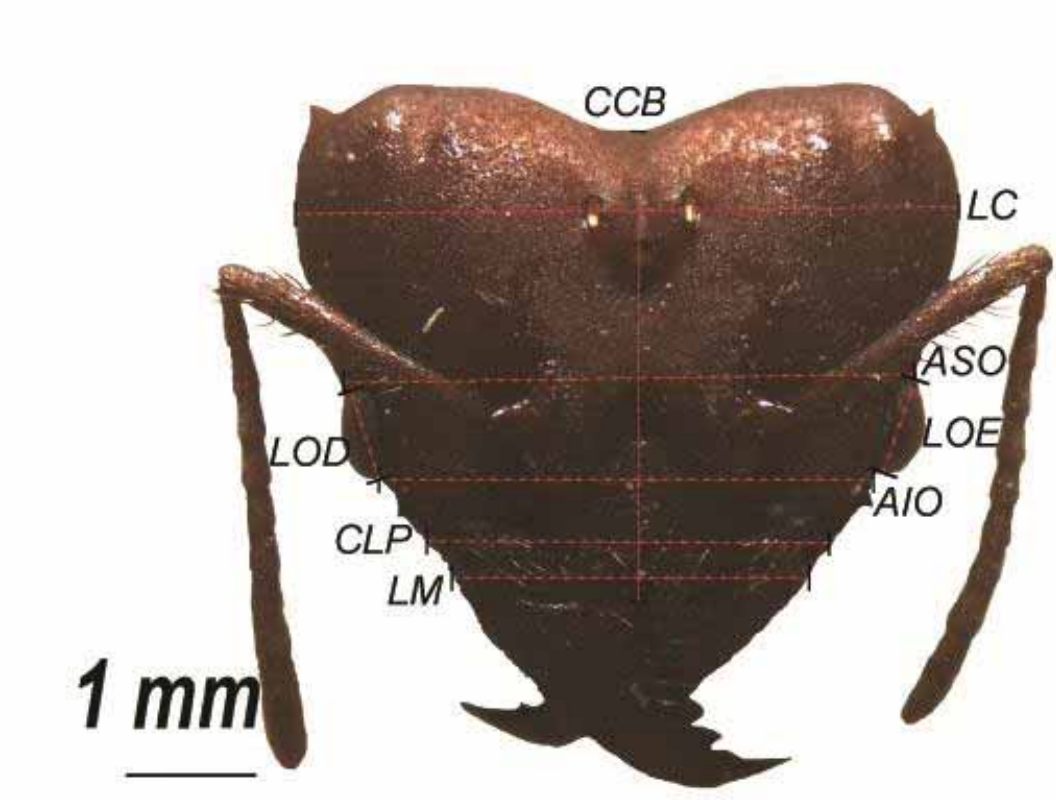


**Figura 2:** Esquema da parte anterior da cabeça de *Atta* com as medidas utilizadas para as análises morfométricas. As linhas em vermelho indicam as medidas que foram atribuidas para as análises.

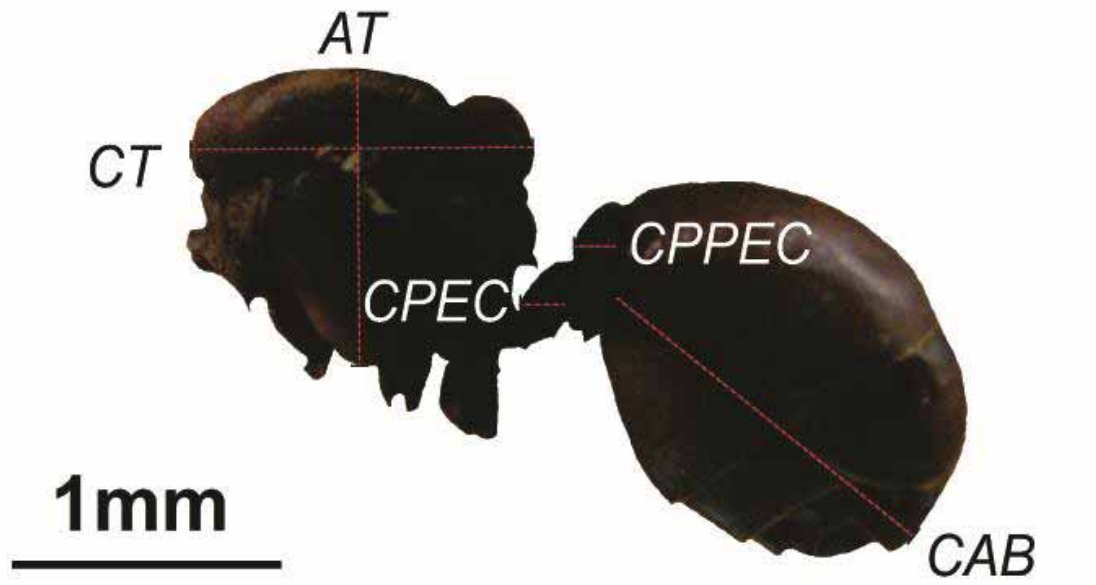


**Figura 3**: Esquema da parte lateral do corpo de *Atta* com as medidas utilizadas para as análises de morfométricas. As linhas em vermelhos indicam as medidas que foram atribuídas para a realização das análises.

### 2.4 Morfometria geométrica

Para as analises de morfometria geometrica, de cada indivíduo foi retirada a asa anterior direita (n=160) sendo posteriormente, colada em placas de vidro cobertas com papel milimetrado **(Figura 4)**.

As imagens foram obtidas utilizando a mesma metodologia para o tórax e abdômen, Em cada asa foram marcadas 10 marcos anatômicos utilizando inicialmente o programa TpsUtil e em seguida o software TpsDig2 versão 1.4 (ROHF, 2005) **(Figura 5).**

As analises de morfometria geométrica foram realizadas com caracteres das asas, devido ao fato, de certas estruturas como a cabeça, tórax e abdômen impossibilitar uma melhor adequação dos marcos anatômicos.

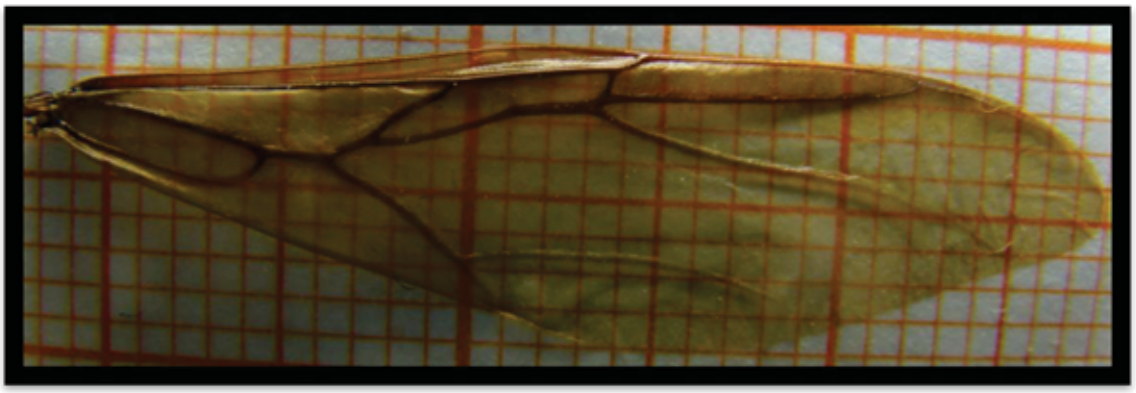

**Figura 4:** Esquema da asa anterior direita de *Atta* coladas nas placas com no papel milimetrados.

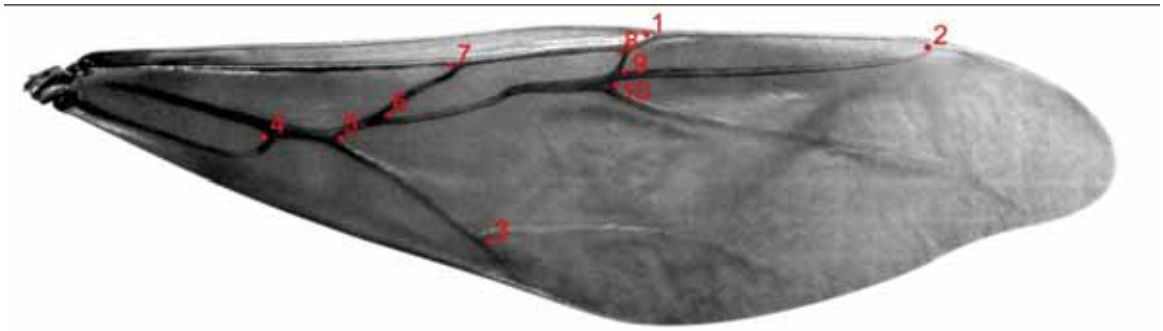


**Figura 5:** Esquema da asa anterior direita de *Atta* com os marcos anatômicos (landmarcks) utilizados para as análises de morfometria geométrica. Os pontos vermelhos indicam o posicionamento dos landmarcks e os números a sequência.

## 2.5 Analises Estatística

### 2.5.1 Comparação morfométrica

Para as análises de morfometria, os dados obtidos foram submetidos a uma análise de função discriminante, para a determinação de quais variáveis morfométricas são relevantes na divisão dos grupos (espécies) em estudo.

Posteriormente, foi realizada uma análise de discriminantes canônicos para evidenciarmos graficamente a separação dos grupos (espécies). As variáveis canônicas (Roots) foram testadas quanto a sua significância pelo teste do Chi-quadrado ($\chi^2$).

Adicionalmente, realizou-se uma Análise de Variância (one-way, ANOVA) para cada variável morfométrica separadamente sendo aplicado um teste a “posteriori” (Tukey). Como pré-requisitos, nas escolhas dos testes estatísticos utilizados, testes de normalidade (Shapiro-Wilks) e homocedasticidade (Levene) foram utilizados para se verificar se os pré-requisitos do teste foram atingidos, sendo transformados (LOG10), quando necessário.

### 2.5.2 Comparação de morfométria geométrica

Os dados obtidas através do software TpsDig2 (coordenadas posicionais dos pontos anatômicos em um plano cartesiano) foram levadas ao programa MorphoJ, para as análises de morfometria, onde foram realizados os processos de superposição (translação), proporcionalização e rotação. Posteriormente, realizou-se um ajuste generalizado de Procrustes, na qual, ele realiza um consenso na configuração média. Após estes ajustes, as configurações finais das espécies alinhadas constituíram um grupo de variáveis que se refere somente à forma das estruturas (MONTEIRO & REIS, 1999). Os consensos gerados são conjuntos de valores posicionais médios dos pontos anatômicos amostrados para as asas de *Atta*, para cada espécie representada simultaneamente sob a forma da “asa consenso”.

Foi empregada a análise de variáveis canônicas utilizando a distância $D^2$ de Mahalanobis. À distância $D^2$ de Mahalanobis entre os centróides dos dados morfométricos de todas as espécies foi utilizada como medida da distância morfométrica (MANLY, 1991). Com formas médias das espécies obtidas por meio das analises morfométricas foi realizada posteriormente a Analise das Variáveis Canônicas (AVC) a fim de verificar as diferenças entre as espécies. Em seguida foi realizada a análise da validação cruzada para verificar a precisão dos dados e quantos indivíduos foram classificados corretamente em suas devidas classificações.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Morfométrica

A análise morfométrica realizada evidenciou diferenças significativas entre as espécies. Tais diferenças, quando utilizadas na separação das espécies, apresentam-se bastante evidentes, sendo representadas por diferentes funções discriminantes **(Tabela 2)** as quais evidenciaram um alto acerto de predição (93,12%) para as espécies analisadas. A verificação dos autovalores obtidos pela análise de discriminantes canônicos evidenciou as 3 primeiras variáveis (Roots) como significativas ($p<0,001$) **(Tabela 3)**, sendo estimadas as contribuições acumuladas de variabilidade de 86,9%, 95,5% e 100% do primeiro ao terceiro autovalor, respectivamente. As primeiras duas variáveis canônicas (95,5% de explicação) obtidas a partir da análise de discriminantes canônicos foram ilustradas para cada grupo (espécies), com o seu respectivo intervalo de confiança de 95% **(Figura 6)**.

Entre as estruturas morfológicas utilizadas, baseado nos valores de Wilks' lambda, as medidas relacionadas ao tamanho da largura da cabeça (LC), comprimento da cabeça (CCB), área superior dos olhos (ASO), largura da mandíbula (LM), comprimento do tórax (CT), altura do tórax (AT) e comprimento do abdômen (CAB) foram as mais relevantes na discriminação das espécies **(Tabela 4)**. Estas diferenças, também, foram evidenciadas entre as espécies pela análise de variância (one-way, ANOVA), sendo demonstradas na **Tabela 5** e **Figura 6**. Os valores médios para cada estrutura morfométrica utilizada estão representados na **Tabela 6**.

Deste modo, a discriminação das espécies, de *A. sexdens* e *A. bisphaerica* se mostraram evidentes com relação às características morfométricas analisadas, quando comparadas com *A. laevigata* e *A. capiguara*, que se mostraram mais próximas uma das outras.

**Tabela 2.** Funções de classificações, obtidas a partir da análise discriminante para as espécies em estudo.

| Estruturas | *Atta sexdens* | *Atta laevigata* | *Atta capiguara* | *Atta bisphaerica* |
|---|---|---|---|---|
| **LC** | -32.612 | 120.928 | 165.534 | 203.140 |
| **CCB** | 23.127 | -60.859 | -64.900 | -125.256 |
| **LOE** | -218.133 | -306.912 | -309.979 | -186.706 |
| **LOD** | -112.603 | -187.188 | -93.618 | -108.184 |
| **ASO** | 249.601 | 197.820 | 206.665 | 56.928 |
| **AIO** | -57.870 | -21.254 | 14.606 | -11.323 |
| **CLP** | 208.796 | 190.775 | 164.057 | 186.712 |
| **LM** | 43.963 | 22.618 | -44.814 | 40.769 |
| **CT** | 78.597 | 133.777 | 90.399 | 272.793 |
| **AT** | -11.679 | 2.498 | -31.551 | -103.700 |
| **CAB** | 62.040 | 70.932 | 70.973 | 31.103 |
| **CPEC** | -296.019 | -318.810 | -323.436 | -336.149 |
| **CPPEC** | -230.836 | -243.686 | -240.337 | -219.960 |
| **Constante** | -215.980 | -257.879 | -251.424 | -237.702 |

**Tabela 3.** Análise da significância das variáveis canônicas (Roots) pelo teste do $\chi^2$.

| **"Roots" removidos** | **Autovalores** | **R Canônico** | **Wilks' lambda** | $\chi^2$ | **g.l.** | **Valor de p** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **0** | 3,880128 | 0.891677 | 0.030620 | 524.6574 | 39 | 0,000000 |
| **1** | 2,151683 | 0.826262 | 0.149430 | 286.0891 | 24 | 0,000000 |
| **2** | 1,123334 | 0.727353 | 0.470957 | 113.3246 | 11 | 0,000000 |

g.l. = graus de liberdade

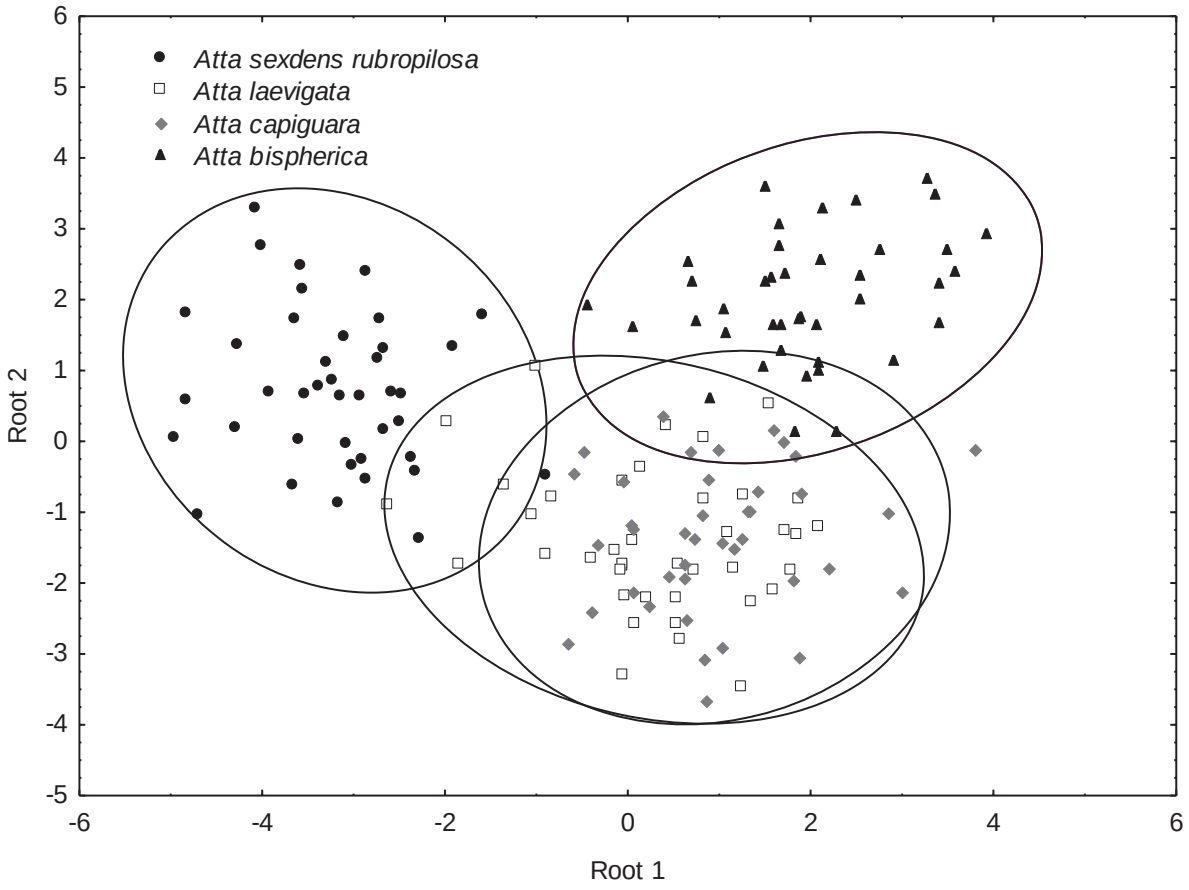


**Figura 6.** Visualização gráfica gerada a partir da relação entre duas variáveis (discriminantes canônicos) entre as espécies estudadas.

**Tabela 4.** Poder de discriminação de cada variável morfométrica e seu respectivo valor de significância.

| Estrutura | Wilks' lambda | F | Valor de p |
|---|---|---|---|
| **LC** | 0.046387 | 24.71528 | 0.000000 |
| **CCB** | 0.046349 | 24.65675 | 0.000000 |
| **LOE** | 0.033009 | 3.74390 | 0.012551 |
| **LOD** | 0.032148 | 2.39443 | 0.070821 |
| **ASO** | 0.036141 | 8.65447 | 0.000026 |
| **AIO** | 0.032054 | 2.24758 | 0.085334 |
| **CLP** | 0.031286 | 1.04397 | 0.375116 |
| **LM** | 0.037022 | 10.03485 | 0.000005 |
| **CT** | 0.046422 | 24.77010 | 0.000000 |
| **AT** | 0.035067 | 6.97116 | 0.000206 |
| **CAB** | 0.036294 | 8.89394 | 0.000019 |
| **CPEC** | 0.030934 | 0.49198 | 0.688401 |
| **CPPEC** | 0.030838 | 0.34105 | 0.795671 |

**Tabela 5.** Resultado da análise de variância (ANOVA α = 0,05) e do teste *a posteriori* (Tukey) para cada variável morfométrica utilizada no estudo.

| Estr | ANOVA | | Tukey | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Rel. | As.vs.Al | As.vs.Ac | As.vs.Ab | Al.vs.Ac | Al.vs.Ab | Ac.vs.Ab |
| LC | p | 0,00 | p | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,998 | 0,097 | 0,066 |
| | F | 15,04 | Sign. | s (**) | s (**) | s(**) | ns | ns | ns |
| CCB | p | 0,00 | p | 0,000 | 0,232 | 0,558 | 0,608 | 0,000 | 0,000 |
| | F | 7,72 | Sign. | s (**) | ns | ns | ns | s(**) | s(**) |
| LOE | p | 0,06 | p | 0,982 | 0,145 | 0,153 | 0,298 | 0,310 | 0,999 |
| | F | 2,51 | Sign. | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| LOD | p | 0,04 | p | 0,969 | 0,054 | 0,271 | 0,158 | 0,530 | 0,884 |
| | F | 2,76 | Sign. | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| ASO | p | 0,00 | p | 0,000 | 0,000 | 0,226 | 0,993 | 0,093 | 0,000 |
| | F | 8,97 | Sign. | s (**) | s (**) | ns | ns | ns | s (**) |
| AIO | p | 0,00 | p | 0,000 | 0,000 | 0,162 | 0,999 | 0,000 | 0,000 |
| | F | 10,75 | Sign. | s (**) | s(**) | ns | ns | s(**) | s(**) |
| CLP | p | 0,00 | p | 0,000 | 0,099 | 0,894 | 0,752 | 0,000 | 0,386 |
| | F | 4,45 | Sign. | s (**) | ns | ns | ns | s(**) | ns |
| LM | p | 0,00 | p | 0,000 | 0,338 | 0,958 | 0,384 | 0,000 | 0,646 |
| | F | 4,20 | Sign. | s (**) | ns | ns | ns | s(**) | ns |
| CT | p | 0,00 | p | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,186 | 0,891 |
| | F | 14,14 | Sign. | s (**) | s (**) | s (**) | s (**) | ns | ns |
| AT | p | 0,00 | p | 0,000 | 0,000 | 0,079 | 0,000 | 0,000 | 0,917 |
| | F | 14,14 | Sign. | s (**) | s (**) | ns | s (**) | s (**) | ns |
| CAB | p | 0,00 | p | 0,000 | 0,000 | 0,785 | 0,518 | 0,000 | 0,133 |
| | F | 8,26 | Sign. | s (**) | s (**) | ns | ns | s (**) | ns |
| CPEC | p | 0,03 | p | 0,000 | 0,648 | 0,998 | 0,459 | 0,062 | 0,740 |
| | F | 2,94 | Sign. | s (**) | ns | ns | ns | ns | ns |
| CPPEC | p | 0,01 | p | 0,000 | 0,878 | 0,999 | 0,121 | 0,000 | 0,919 |
| | F | 3,78 | Sign. | s (**) | ns | ns | ns | s (**) | ns |

Estr= estrutura

**Tabela 6.** Estatística descritiva para cada variável morfométrica obtida das espécies utilizadas no estudo (mm).

| Esp. / Estr. | *A. sexdens* | | *A. laevigata* | | *A. capiguara* | | *A. bisphaerica* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **média** | **dp** | **média** | **dp** | **média** | **dp** | **média** | **dp** |
| **LC** | 4,82 | 0,128 | 5,32 | 0,196 | 5,34 | 0,119 | 5.05 | 0.092 |
| **CCB** | 3,14 | 0,066 | 3,28 | 0,162 | 3,19 | 0,075 | 2,95 | 0,090 |
| **LOE** | 0,68 | 0,040 | 0,66 | 0,033 | 0,70 | 0,028 | 0,7 | 0,025 |
| **LOD** | 0,68 | 0,041 | 0,66 | 0,031 | 0,70 | 0,023 | 0,69 | 0,025 |
| **ASO** | 4,39 | 0,115 | 4,69 | 0,172 | 4,72 | 0,082 | 4,44 | 0,085 |
| **AIO** | 3,79 | 0,084 | 4,10 | 0,155 | 4,11 | 0,117 | 3,85 | 0,066 |
| **CLP** | 3,09 | 0,075 | 3,23 | 0,118 | 3,16 | 0,064 | 3,04 | 0,073 |
| **LM** | 2,85 | 0,085 | 2,97 | 0,103 | 2,86 | 0,073 | 2,78 | 0,080 |
| **CT** | 1,77 | 0,047 | 2,00 | 0,085 | 1,87 | 0,054 | 1,90 | 0,085 |
| **AT** | 1,59 | 0,044 | 1,81 | 0,081 | 1,66 | 0,057 | 1,64 | 0,090 |
| **CAB** | 2,11 | 0,099 | 2,30 | 0,150 | 2,22 | 0,139 | 2.09 | 0,132 |
| **CPEC** | 0,30 | 0,008 | 0,32 | 0,020 | 0,30 | 0,016 | 0,29 | 0,021 |
| **CPPEC** | 0,31 | 0,009 | 0,32 | 0,021 | 0,30 | 0,020 | 0,29 | 0,029 |

Esp = Espécie; Estr. = Estrutura e dp= desvio padrão.

### 3.2 Morfometria Geométrica

A análise de morfometria geométrica utilizando a forma das asas evidenciram diferenças significativas entre as espécies. Tais diferenças, quando utilizadas na separação das espécies, se apresentam bastante evidentes, sendo representadas por diferentes funções discriminantes **(Tabela 7)** as quais evidenciaram um alto acerto de predição (95,5%) para todas as espécies analisadas. A verificação dos autovalores obtidos pela análise de

discriminantes canônicos evidencia as 3 primeiras variáveis canonicas (AVC) como significativas (p<0,001) **(Tabela 7, Tabela 8)**, sendo estimadas as contribuições acumuladas de variabilidade de 48,76% para a primeira variável, 78,32% para a segunda e 100% para a terceiro, respectivamente. As duas primeiras variáveis canônicas (95,5% de explicação) obtidas a partir da análise de discriminantes canônicos foram ilustradas para cada grupo (espécies), com o seu respectivo intervalo de confiança de 95% **(Figura 7)**.

**Tabela 7.** Análise da significância das variáveis canônicas (AVC), dos autovalores, da variança e variança acumulada.

| Variáveis Canônicas | Autovalores ($\lambda_1$) | Variança (% $\alpha^2$) | Variança Acumulada(% $\alpha^2$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 6,7276 | 48,766 | 48,766 |
| 2 | 4,0783 | 29,562 | 78,328 |
| 3 | 2,9898 | 21,672 | 100,000 |

**Tabela 8.** Poder de discriminação de cada variável e seu respectivo valor de significância.

| (valor de p) | | | |
|---|---|---|---|
| Espécies | *A.bisphaerica* | *A. capiguara* | *A. laevigata* |
| *A.capiguara* | 0,000 | ---- | ---- |
| *A.laevigata* | 0,000 | 0,000 | ---- |
| *A.sexdens* | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

As análises gráficas para estudo padrão de similaridade entre as espécies nos permite verificar as proximidades e as distâncias de todas as espécies através da distância de Mahalanobis ($D^2$ Mahalanobis) **(Tabela 8)** podendo observar à variação total disponível utilizando poucas variáveis. Demonstrando, que *A. capiguara* e *A. bisphaerica*, estão mais distantes de *A. sexdens* e de *A. laevigata*, enquanto estas duas estão mais proximas **(Figura 7).**

**Tabela 9.** Análise da distancia de Mahalanobis entre as espécies estudadas.

| $D^2$ Mahalanobis | | | |
|---|---|---|---|
| Espécies | *A.bisphaerica* | *A. capiguara* | *A. laevigata* |
| *A.capiguara* | 6,7825 | ---- | ---- |
| *A.laevigata* | 5,3444 | 6,3571 | ---- |
| *A.sexdens* | 5,5461 | 6,7582 | 4,8789 |

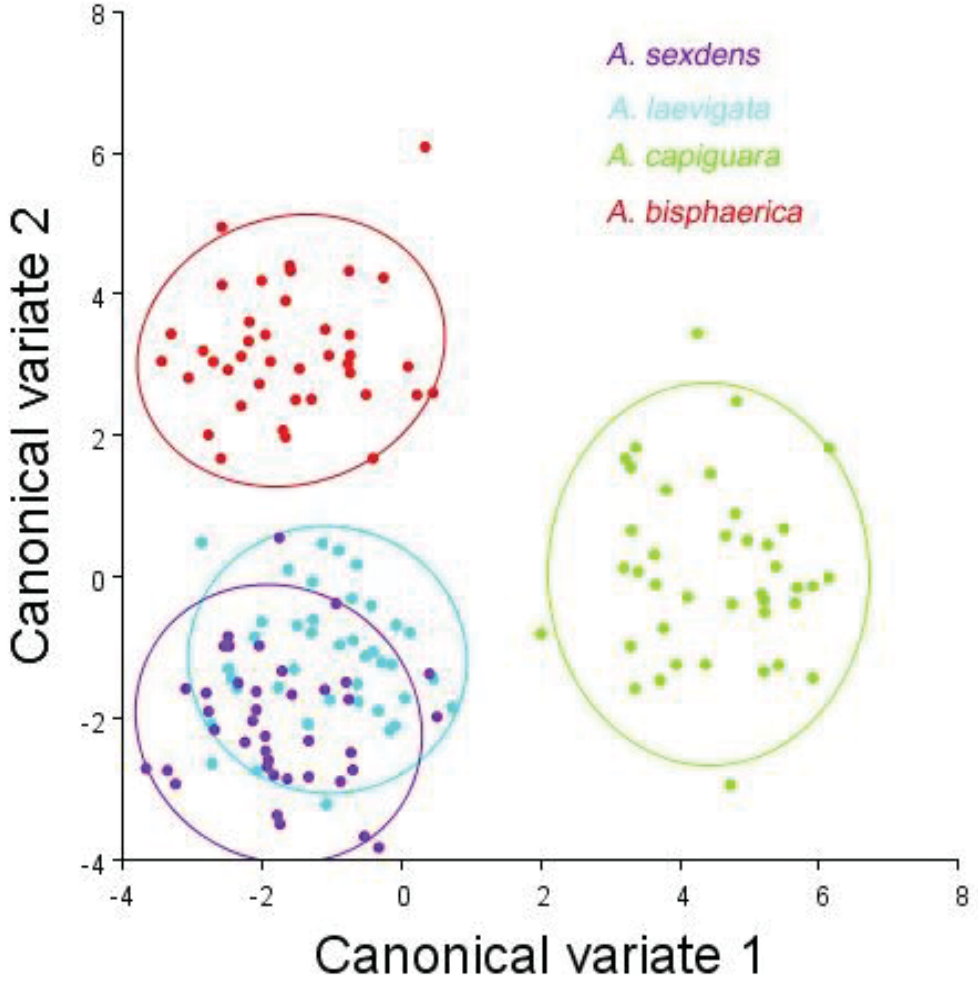


**Figura 7:** Dispersão gráfica das espécies do gênero *Atta* em relação a eixos cartesianos estabelecidos pelas variaveis canonicas (CV1, CV2) obtidas a partir da forma das asas.

# 4. DISCUSSÃO

## 4.1 Morfometria

No geral, ouve diferenças morfometrica entre as quatro espécies estudadas. No entanto, as diferenças mais marcantes, estiveram relacionadas com a largura da cabeça (LC), comprimento da cabeça (CCB), largura da mandíbula (LM), comprimento do tórax (CT), altura do tórax (AT) e comprimento do abdômen (CAB) sendo estas, as características morfológicas mais importantes na separação das espécies. Estes resultados são consistentes com os padrães encontrado por, Gonçalves (1950), Wilson (1980), Tschinkel et al, (2003), Moser (2004), e Vinha (2007) que observaram que as diferenças morfológicas mais visíveis estão relacionadas a cabeça e o abdômen. Estas diferenças morfológicas podem ser apenas evidencias adaptativas relacionadas com o grau de competição da escolha do ambiente durante o vôo nupcial, com a determinação da função que exerça dentro do ninho e com a forma que as formigas agem sobre o mundo a sua volta.

As mudanças entre as espécies de formigas, muitas vezes são relacionadas com o grau de poliétismo ou mudanças no tamanho, na forma e na função das diferentes estruturas do corpo (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). No entanto, o significado da forma e função ainda é desconhecido, ainda que existam muitas especulações. Porém alguns autores como Tschinkel et al, (2003) e Calder, (1984) acreditam que este aumento da cabeça dorsalmente, pode estar relacionado com as alterações que ocorreram nos muscúlos mandibulares.

Em nossos resultados conseguimos evidenciar que a largura das mandíbulas também foi uma estrutura de extrema importância na separação das espécies, fato este, que pode estar relacionado com as modificações que aconteceram nas diferentes espécies em relação a força e tamanho, sendo a força aumentada naturalmente com tamanho. Curiosamente, o tamanho do corpo (comprimento do tórax (CT), altura do tórax (AT) e comprimento do abdômen (CAB)),

contribuiu para a separação das espécies, corroborando com os dados de Tschinkel, (2003) que desmonstrou que o comprimento da mandibula é isometrica ao comprimento do corpo, ou seja, as mudanças que ocorreram nas formigas durante os processos evolutivos, fizeram com que as formigas maiores tivessem uma maior massa muscular para conservar uma grande quantidade de lipídios em suas reservas corporais e conseqüentemente aumentar sua força relativa durante o processo de fundação e formação dos ninhos iniciais.

No entanto, quando se compara as diferentes medidas, conseguimos através da análise de discriminação, mostrar que a espécie de *A. sexdens* e de *A.bisphaerica,* possui um potencial bastante evidente de separação quando comparadas com as espécies de *A. laevigata* e *A. capiguara.* Apoiando a idéia de que alguns táxons (*Atta sexdens sexdens* e *A. laevigata*) pode ser parafilético (descentes de um ancestral em comum) ainda que o suporte para estes padrões é fraca, sendo preciso mais estudos filogéneticos para evidenciar melhor as relações de confiança em nivel de espécies dentres os clados (BACCI et al., 2009).

Apesar de termos uma grande quantidade de trabalhos realizados com alometria e morfometria, muitos destes trabalhos são realizados apenas para as maiores operárias, e não para outras castas como as rainhas. Essa falta de informação inviabiliza estudos comparativos entre as espécies e dificulta o esclarecimento das relações taxonômicas, as quais são de fundamental importância para a melhor compreensão da filogenia do grupo.

### 4.2 Morfometria Geometrica

Com relação à morfometria geométricas realizadas para asas foram encontradas diferenças significativas entre todas as espécies estudadas. Porém a espécie *A. capiguara* e *A. bisphaerica* apresentou-se bastante diferenciada das demais espécies estudadas, formando grupos distintos. Para *A.sexdens* e *A. laevigata* as características morfométricas, foram mais próximas. Demonstrando, que as características das asas podem servir como marcadores de

diagnósticos em estudos futuros para a separação das espécies. Concluindo que a forma da asa pode ser um indicativo de estrutura genética e morfológicamente boa na separação das espécies e até mesmo de populações, devido ao fato destas características serem determinadas pela herança genética quantitativa (quantidade que um indivíduo apresenta de um determinado gene expressivo).

Apesar das asas serem estruturas que as rainhas retiram quando descem ao solo (AUTUORI, 1941), esta estrutura foi a mais relevante na separação dos grupos. Pois, são de extrema importância para a dispersão das rainhas durante o vôo nupcial "acasalamento" e para a posterior utilização parcial do tecido muscular aderidos ao tórax, para nutrir suas primeiras operárias durante a fase claustral (TINAUT, 1992). Além de tudo, as asas são estruturas relevantes para a realização de estudo morfológicos para muitos grupos (Hymenoptera, Coleoptera e Dipteras), por possuírem poucas modificações fenotípicas ao longo do tempo, diferentemente do corpo das formigas (a cabeça, tórax e abdômen) que podem ter variações fenotípicas e morfológicas dentro de uma mesma espécie. Esta variação fenotípica esta relacionada com o sistema de castas que define as formigas e outros insetos sociais (GOODISMAN, 2008). Isto não ocorre nas asas, pois estas estruturas só ocorrem nas rainhas "íça" e nos machos "bitú".

Estas características morfométricas estudadas no presente trabalho, poderão elucidar a identificação de ninhos iniciais de 4 espécies do gênero *Atta* encontradas no América do Sul, sendo uma importante ferramenta nos estudos ecológicos dando suporte à identificação de morfotipos distintos, os quais, posteriormente possa ser identificados a nível de espécies.

De forma geral, muito pouco se conhece, ainda sobre as a diferenciação das espécies de *Atta* através das rainhas. Essa falta de informação inviabiliza estudos comparativos entre as espécies e dificulta o esclarecimento das relações taxonômicas, as quais são de fundamental importância para a melhor compreensão da filogenia do grupo.

## 5. REFERÊNCIAS


Agosti, D.; Majer, J. D.; Alonso, L. E.; Schultz, T. R. **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity.** Washington: Smithsonian Institution Press, 2000. 280p.

Autuori, M. (1941). Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera: Formicidae). I – Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivo do Instituto Biológico**, 12: 197–228.

Bacci, M., Solomon, S.E., Silva-Pinhati, A.C.O., Mueller, U.G. Martins, V.G., Carvalho, A.O.R., Vieira, L.G.E. (2009) Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* Fabricius (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 51(3): 427-437.

Bolton, B. 1995. A taxonomic and zoogeographical census of the extant ant taxa (Hymenoptera: Formicidae). **Journal Natural History**, 29:1037–56

Bolton, B. 2003: **Synopsis and classification of Formicidae**. – Memoirs of the American Entomological Institute 71: 1-370.

Bolton, B. **Identification Guide to the Ant Genera of the World**. Cambridge: Harward University Press, 1994.

Buhs, J.B. 2000. Building on Bedrock: William Steele Creighton and the Reformation of Ant Systematics, 1925–1970. **Journal of the History of Biology**, 33, p. 27–70.

Calder, W. A. I. 1984. Size, Function and Life History. **Harvard University Press**, Cambridge, MA.

Fernández, F. 2004 The American species of the myrmicine ant genus. Carebara Westwood (Hymenoptera: Formicidae). **Caldasia**, 26, 191–238.

Françoso, M.F.L.; Brandão, C.R.F. 1993. Classificação dos Formicidae. **Biotemas**, v. 6, n. 1, p. 121-132.

Franks, N. R. 1985. **Reproduction, foraging efficiency and worker polymorphism in army ants.** (Hölldobler, B., Lindauer, M., Ed.). Experimental behavioral ecology and sociobiology: in memoriam Karl von Frisch, 1886–1982, vol 31. 91-107.

Gonçalves, C.R., 1950. Contribuição para o conhecimento do gênero Atta Fabr., das formigas saúvas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**. 5, 333–358.

Goodisman MAD, Kovacs JL, Hunt BG. 2008. Functional genetics and genomics in ants (Hymenoptera: Formicidae): The interplay of genes and social life. **Myrmecological News**. 11: 107-117.

Hölldobler, B. and Wilson, E.O., 1990**. The Ants**. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Klotz, J. H., B. L. Reid, and W. C. Gordon. 1992. Variation of ommatidia number as a function of worker size in *Camponotus pennsylvanicus* (DeGeer) (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux**, 39:233-236.

Maavara, V. 1983. **Variability and differentiation in some closely related Formica species (Hymenoptera, Formicidae)**. Pages 54 - 78 (Russian with English summary) in K. Paaver, and T. Sutt, editors. Kaasaegse darvinismi küsimusi' (Problems of contemporary Darwinism),. Academy of Sciences of the Estonian S.S.R., Institute of Zoology and Botany, Tartu State University.

Manly, B.F.J. **Randomatization and Monte Carlo methods in biology**. London: Chapman and Hall, 1991. 281p.

Monteiro, L.R.and Reis, S.F. 1998. Princípios de Morfometria Geométrica. Ribeirão Preto, Ed. **Holos**,188p.

Moser, J.C., Reeve, J.D., Bento, J.M.S., Della Lucia, T.M.C., Cameron, R.S., Heck, N.M., 2004. Eye size and behaviour of day- and night-flying leafcutting ant alates. **Journal of Zoology**. 264, 69–75.

Nijhout, H. F., and D. E. Wheeler. 1996. Growth models of complex allometries in holometabolous insects. **American Naturalist**, 148:41-56.

Oster, G. F., and E. O. Wilson 1978. Caste and ecology in the social insects (Monographs in population biology, no. 12). **Princeton University Press**, Princeton.

Rohlf, F. J. **TPSDig, Digitize Landmarks and Outlines, version 2.05**. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2005.

Silva, R.A.O. **Ferramentas auxiliares na identificação de espécies de abelhas Meliponine, com ênfase no gênero *Schwarziana* (Lepeletier, 1836).** 2010. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Tinaut A. and Heinze J. 1992. Wing reduction in ant queens from arid habitats. **Naturwissenschaften** 79: 84 – 85.

Tschinkel W.R., Mikheyev A.S. & Storz S.R. 2003. Allometry of workers of the fire ant, *Solenopsis invicta*. **Journal of Insect Science.** 3: 1-11.

Vinha, G. G. **Sistemática molecular de *Atta laevigata* (Smith 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery 1890)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)) - Instituto de Biociências, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Wilson, E. O. 1953. **The origin and evolution of polymorphism in ants**. **Quarterly Review of Biology**. 28:136-156.

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

# CAPÍTULO II

# CAPÍTULO II

## ARQUITETURA INTERNA DOS NINHOS INICIAIS DE *ATTA SEXDENS*

**RESUMO**

A arquitetura do ninho das formigas cortadeiras se inicia após o vôo nupcial, quando a rainha desce ao solo, retira suas asas e inicia a escavação. O túnel é obstruído com parte do solo removido durante a ampliação da câmara inicial, no sentido da superfície do solo para a câmara. A rainha fica enclausurada, e expele uma pequena porção do fungo mutualista trazido por ela em sua cavidade infra-bucal, a parti daí, está formada a colônia. O objetivo do presente estudo foi analisar se ocorre uma diferenciação na profundidade, comprimento, largura, altura e no volume da câmara inicial de fungo em relação às diferentes idades de escavação (45, 90 e 135 dias pós-revoada). Para a realização das coletas foram marcados cerca de 500 ninhos, destes, foram escavados 20 ninhos em cada período (45, 90 e 135 dias após a revoada), que ocorreu no dia 21 de outubro de 2009. As escavações foram feitas manualmente seguindo a metodologia utilizada por Autuori (1942) e Pereira-da-Silva et al. (1972), na qual, esta consistiu na utilização de chibanca, pás, e espátulas. Após a realização das escavações e das coletas assépticas dos fungos, utilizadas para a realização das análises de presença e prevalência de *Escovopsis* (Capítulo 4), foram retiradas as medidas do maior comprimento (C), largura (L) e altura (A) das câmaras de fungo e da profundidade dos túneis em relação nível do solo até a 1ª câmara. Os dados foram submetidos à análises de variância (ANOVA) ($\alpha = 0,05$). Os resultados das análises estatísticas para a profundidade resultaram em não significância (ANOVA, $F=1,63$ e $p=0,20462$), demonstrando assim, que não ocorre modificação na profundidade das câmaras ao longo do tempo. No entanto, para as outras medidas como comprimento ($F=16,20$ e $p<0,001$), largura ($F=49,98$ e $p<0,001$), altura ($F=45,97$ e $p<0,001$) e volume ($F= 75,77$ e $p<0,001$) das câmaras, as análises estatísticas foram significativas, demonstrando assim, que ocorre um desenvolvimento dos ninhos ao longo do tempo. Concluindo que o ninho tente a aumentar significativamente com o passar do tempo, devido ao fato de ocorrer um aumento no número de indivíduos e conseqüentemente no volume do fungo com a incorporação das folhas realizadas pelas operárias.

**Palavras-chave:** Desenvolvimento da colônia, fundação, comprimento das câmaras, largura, altura.

**ABSTRACT**

The architecture of leaf-cutting ants nest starts after the nuptial flight, when the queen falls to the ground, cut off his wings and starts digging. The tunnel is clogged with part of soil removed during the initial expansion of the chamber towards the ground surface into the chamber. The queen become cloistered, and expels a small portion of the mutualistic fungus brought by it in its infra-buccal cavity, then after this, the colony was formed. The aim of this study was to examine whether there is a difference in the depth, length, width, height and initial fungus chamber volume in relation to different ages of excavation (45, 90 and 135 days post-flight). In order to perform the collections we were marked 500 nests, of these, 20 nests were excavated in each period (45, 90 and 135 days after the flight), which occurred on October 21, 2009. The excavations were made manually by following the methodology used by Autuori (1942) and Pereira-da-Silva et al. (1972) in which this was the use of paddles and scrapers. After completion of the excavations and aseptic collections of fungi, used to perform analyzes of the presence and prevalence of *Escovopsis* (Chapter 4), it were taken the measures of greater length (L), width (W) and height (H) of fungus chambers and depth of tunnels over ground level to the 1st chamber. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) ($\alpha = 0.05$). The statistical analysis results for the depth resulted in no significant (ANOVA, $F = 1.63$ and $p = 0.20462$), thus demonstrating that no modification occurs at the depth of chambers over time. However, for other measures such as length ($F = 16.20$, $p<0.001$), width ($F = 49.98$, $p<0.001$), time ($F = 45.97$, $p<0.001$) and volume ($F = 75.77$, $p<0.001$) of the chambers, statistical analyzes were significant, thus demonstrating that there is a development of nests over time. In conclusion the nest tends to increase significantly over time due to the fact there is an increase in the number of individuals and therefore the volume of the fungus with the incorporation of leaves carried by the workers.

**Key words**: Colony development, foundation, length of chambers, width, height.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas formigas cortadeiras a manutenção e construção do ninho é uma tarefa realizada por todos os indivíduos, mas a primeira câmara surge com a fêmea recém acasalada (rainha). Após o vôo nupcial a fêmea alada recém copulada, desce ao solo, destaca suas asas e em seguida escava o seu próprio ninho, durante horas. O túnel é obstruído com parte do solo removido durante a ampliação da câmara inicial, no sentido da superfície do solo para a câmara. A rainha fica enclausurada, e expele uma pequena porção do fungo mutualista trazido por ela em sua cavidade infra-bucal (AUTUORI, 1941, JACOBY, 1950) (**Figura 1**).

Apesar de a rainha ser o primeiro indivíduo da colônia a elaborar a arquitetura inicial do ninho, quando as operárias emergem, a rainha deixa de escavar, permanecendo apenas como matriz reprodutora e as operárias, por sua vez, se responsabilizam em escavar novos túneis e câmaras. Provavelmente, a organização estrutural dos ninhos seja o produto do comportamento de escavação individual ou em grupo das operárias. O comportamento individual da operária envolve desde a tomada de decisão para iniciar a escavação, continuar a escavar até, simplesmente, desistir ou finalizar a tarefa (CAMARGO, 2012).

**Figura 1.** Repertório comportamental das rainhas: retirada de uma porção de terra, transporte, deposição do torrão, retorno e reclusão da rainha (clausura). **Fonte:** Camargo, 2010

As formigas cortadeiras para se protegerem na natureza constroem ninhos que lhes fornece proteção e um microclima (ambiental) estável. Estes ninhos são variáveis em estruturas e materiais utilizados para sua construção, como por exemplo, ninhos arborícolas que utilizam gravetos e folhas, ninhos epígeos (GONÇALVES, 1960) e ninhos totalmente subterrâneos com complexas estruturas como *Atta laevigata* (MOREIRA et al. 2001).

Jacoby (1950) ressaltou em seu trabalho a grande importância de conhecer a biologia das saúvas (*Atta* sp.), especialmente a realização da construção de seu ninho que é de fundamental importância para o sucesso da colônia incial, pois a profundidade em que a rainha escava tem um alto valor adaptativo a esta espécie.

Os ninhos adultos das formigas cortadeiras (gênero *Atta*) são conhecidos por serem grandes e complexos, composto de até milhares de câmaras subterrâneas, as quais abrigam o jardim de fungo que são isoladas das câmaras de lixo, que possuem resíduos de material vegetal esgotado, fungo exaurido e cadáveres de formigas. Portanto, o fungo cultivado é isolado por ser a fonte de alimento. Em razão da divisão de tarefas na colônia, operárias que entram em contato com esse lixo, são formigas mais velhas as quais não têm acesso ao jardim de fungo (MOREIRA et al. 2004, HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Mas a criação dessas estruturas é coordenada coletivamente por simples atos comportamentais de escavação das operárias, ou seja, a simples retirada de solo com as mandíbulas (CASSIL et al. 2002).

O ato de escavar é uma resposta a estímulos que podem ser emitidos pelo ambiente ou por companheiros dos ninhos. Esses estímulos aumentam de acordo com o crescimento populacional, o ambiente se torna cada vez mais rico em estímulos (THERAULAZ et al. 1998). Experimentalmente, comprovou-se que muitas espécies de formigas utilizam gradientes de umidade e temperatura para construir seus ninhos e distribuir espacialmente ovos, larvas e pupas (BRIAN, 1983; CEUSTERS, 1986; THOMÉ, 1972).

O comportamento de escavação também é influenciado por heterogeneidades no ambiente, eles tendem a caminhar, construir, armazenar e por ovos ao longo dessas heterogeneidades. Então, pode-se dizer que a futura construção já existe no ambiente sob a forma de heterogeneidades físicas e químicas, e os insetos apenas revelaram essa estrutura escondida (THERAULAZ et al. 1998).

Mas esses estímulos não são estáticos, ou seja, quando a colônia cresce, começando de uma única fundadora, mais estímulos surgem devido à emergência de novos indivíduos, conduzidos a formar ambientes mais abundantes em estímulos (THERAULAZ et al. 1998).

Estes estímulos fazem com que a rainha escave seus ninhos a uma profundidade chamada, ideal que estaria ajustada por indivíduos que constroem a câmara inicial de 8,5 a 15 cm abaixo da superfície do solo. Provavelmente, esta profundidade proporcionaria uma amplitude térmica mínima e com uma temperatura quase constante, o que seria propício para o desenvolvimento do fungo mutualista e da prole que ainda esta por surgir (CAMARGO, 2012) O comportamento de escavação na escolha da temperatura ideal para o desenvolvimento do fungo mutualístico nas formigas cortadeiras foi estudado por Bollazzi & Roces (2002), verificaram que as operárias apresentam uma preferência térmica na localização da prole e do jardim de fungo, com uma temperatura média ótima de 24º e 25ºC, respectivamente. Esses resultados dos autores combinam com o meio adequado para a maximização do desenvolvimento do fungo mutualista em formigas cortadeiras (QUINLAN & CHERRETT, 1978; POWEL & STRADLING, 1986). Em colônias de campo de *Atta sexdens*, o jardim de fungo se localiza em faixas de temperatura oscilando entre 25º a 28ºC (STAHEL & GEIJSKES, 1974 *apud* BOLLAZZI & ROCES, 2002), constituindo mais uma evidência desta faixa de temperatura para o sucesso da colônia inicial.

O objetivo do presente estudo foi analisar se ocorre uma diferenciação na profundidade, comprimento, largura, altura e no volume da câmara inicial de fungo em relação às diferentes idades escavadas (45, 90 e 140 dias) pós-revoada.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Local de estudo

As escavações foram realizadas no município de Botucatu-SP, cujas coordenadas geográficas são: 22º49’53.25” S e 48º25’24.22” O, em área de plantio com predominância de *Eucalyptus* e grande ocorrência de espécies de *Atta sexdens* **(Figura 2).**

**Figura 2.** Vista geral da Floresta de *Pinus sp.* e *Eucalyptus sp.*, localizada na cidade de Botucatu.
**Fonte: google.com.br/maps**

## 2.2. Marcações e escavação dos ninhos

Após a revoada ocorreu à marcação de cerca de 500 fundações de ninhos, utilizando arames com etiquetas numeradas e com cores variadas (amarelo, azul e preto). Foram escavados 20 ninhos durante um período de 45, 90 e 135 dias após a revoada, que ocorreu no dia 21 de outubro de 2009.

Para as escavações utilizou-se ferramentas manuais, seguindo a metodologia utilizada por Autuori (1942) e Pereira-da-Silva et al. (1972), na qual, esta consistiu na utilização de chibanca, pás e espátulas. Foram feitas trincheiras rasas de aproximadamente 1m de largura por 1m de profundidade, alargada em direção ao centro do monte de terra solta e aprofundada com o aparecimento do túnel inicial e da câmara de fungo, tomando-se o devido cuidado para que as estruturas dos ninhos não fossem destruídas. As medidas foram obtidas através da utilização das trenas de 5m e 50m.

Após a realização das coletas assépticas dos fungos, eram retiradas as medidas do maior comprimento (C), largura (L) e altura (A) das câmaras de fungo e da profundidade em

relação ao solo e dos túneis, foram atribuídas medidas em relação ao nível do solo até a 1ª câmara. Para uma melhor visualização dos ninhos, utilizou-se uma bomba de aplicação de formicida, contendo talco neutro em pó, sendo este bombeado sobre a estrutura. Alguns ninhos, do qual, não se tirou o fungo, foram moldados com cimento.

### 2.3 Volume das câmaras

Para obter volume real das câmaras de fungo, foi calculado o volume dos mesmos, realizando uma comparação com uma figura geométrica. Utilizada por Moreira et. al. 2004.

A fórmula usada foi à elipsóide que consiste em **C** comprimento, **L** largura e A altura das câmaras:

$$V=II/6.\ C.\ L.\ A$$

### 2.4 Análises Estatísticas

Os dados da profundidade, comprimento, largura, altura e do volume da câmara inicial dos 20 ninhos de cada época a partir da revoada (45, 90 e 135 dias), foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) ($\alpha$=0,05) e um teste *a posteriori* de Tukey HSD, comparando a profundidade, comprimento, largura, altura e o volume das câmaras em relação às diferentes idades (dias) dos ninhos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Arquitetura Interna dos ninhos

Os ninhos escavados de 45 e 90 dias apresentaram apenas uma câmara, porém ninhos com 135 dias após revoada começaram a apresentar formação de um novo túnel que dará origem a novas câmaras **(Figura 3).**

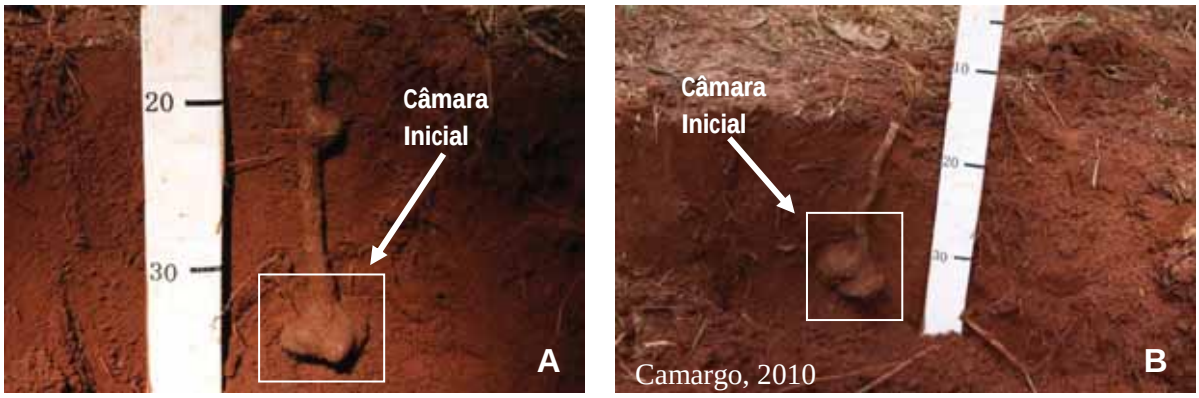


**Figura 3:** Arquitetura dos ninhos de 45 dias **(A),** ninhos de 90 dias e 135 dias **(B).**

### 3.2 Profundidades das câmaras recém-fundada de *Atta sexdens* em relação às épocas de escavação

Para a câmara recém-fundada de *A. sexdens*, verificou-se que a profundidade média da câmara inicial não diferiu estatisticamente nas idades distintas de escavação, sendo esta, iguais para os três meses de escavação (ANOVA, F=1,63 e p=0,20462) **(Figura 4, Tabela 1)**, porém a média foi de 19,0 ± 2,81cm para 45 dias, 20,3 ± 2,99cm para 90 dias e de 20,5 ± 2,91cm para 135dias. A média ± desvio padrão total da profundidade dos três meses foi de 19,94 ± 2,93 cm de profundidade **(Tabela 6).** Mostrando assim, que nas três idades distintas a profundidade não se modifica ao longo de seu desenvolvimento, assim a diferenciação das mesmas, começa a surgir com o aparecimento da segunda câmara. Que só se iniciará a partir de cinco meses após a revoada.

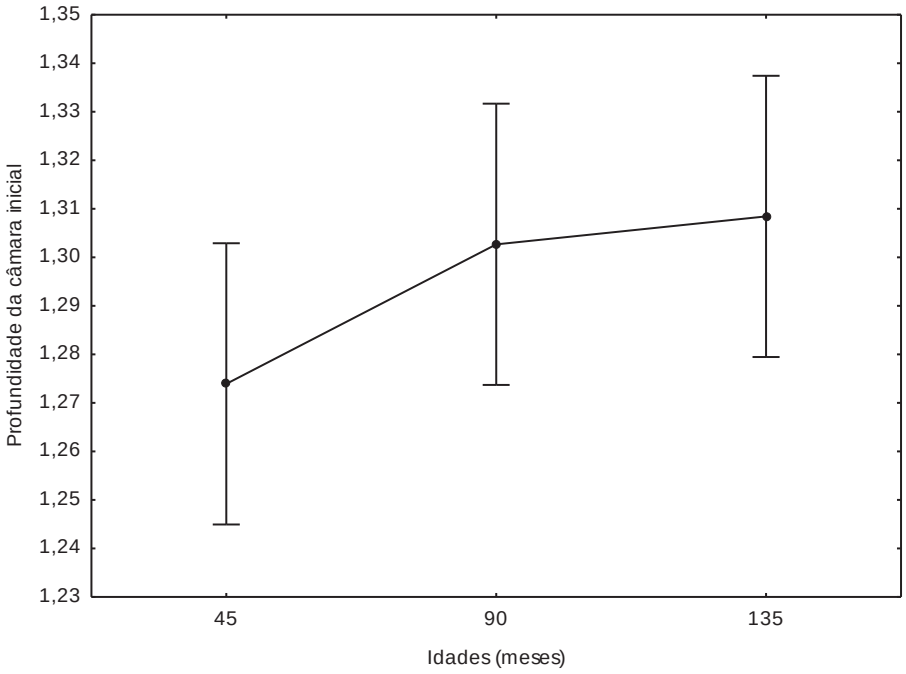


**Figura 4.** Comparação da profundidade média da câmara de fungo entre as três idades analisadas.

**Tabela 1:** Resultado do teste *a posteriori* (Tukey α= 0,05), para a profundidade da câmara inicial dos ninhos com diferentes idades.

| | Tukey (valor de p) | | |
|---|---|---|---|
| Idade (dias) | 45 | 90 | 135 |
| 45 | ---- | 0,345197 | 0,219490 |
| 90 | 0,345197 | ---- | 0,957607 |
| 135 | 0,219490 | 0,957607 | ---- |

### 3.3 Comprimento da câmara inicial

O comprimento médio ± desvio padrão da câmara foi de 4,2 ± 1,46 cm, 5,2 ± 0,66 cm e 5,73 ± 0,85cm, respectivamente para os três meses pós revoada 45, 90 e 135 dias, com

uma média geral de 5,06 ± 1,21cm **(Tabela 6)**. Para as médias do comprimento verificou-se que ocorre diferenciação estatística com relação à idade (ANOVA, F=16,20 e p< 0, 001) **(Figura 5, Tabela 3)**.

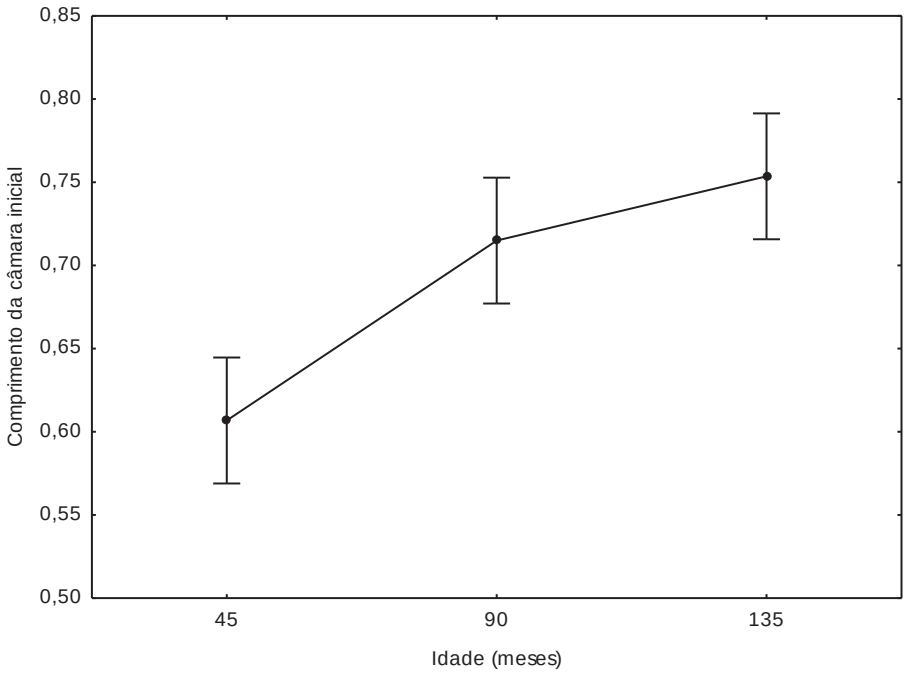


**Figura 5.** Comparação do comprimento médio da câmara de fungo entre as três idades analisadas.

**Tabela 3:** Resultado do teste a posteriori (Tukey α= 0,05), para o comprimento da câmara dos ninhos com diferentes idades.

| Tukey (valor de p) | | | |
|---|---|---|---|
| Idade (dias) | 45 | 90 | 135 |
| 45 | ---- | 0,000560 | 0,000121 |
| 90 | 0,000560 | ---- | 0,324874 |
| 135 | 0,000121 | 0,324874 | ---- |

### 3.4 Largura da câmara inicial

A largura média ± desvio padrão foi de 2,7 ± 0,52 cm em 45 dias, 3,9 ± 0,68 cm em 90 dias e 4,53 ± 0,73 cm em 135 dias, com uma média geral de 3,72 ± 0,98 cm **(Tabela 6)**. A média para as três idades foram diferentes estatisticamente (F= 49,98 e p< 0, 001) **(Figura 6, Tabela 4).** Desde modo, se observa que a largura das câmaras tende a aumentar com desenvolvimento do ninho e também com o surgimento de novos indivíduos. Estes resultados também foram encontrados para as medidas da altura e do volume das câmaras.

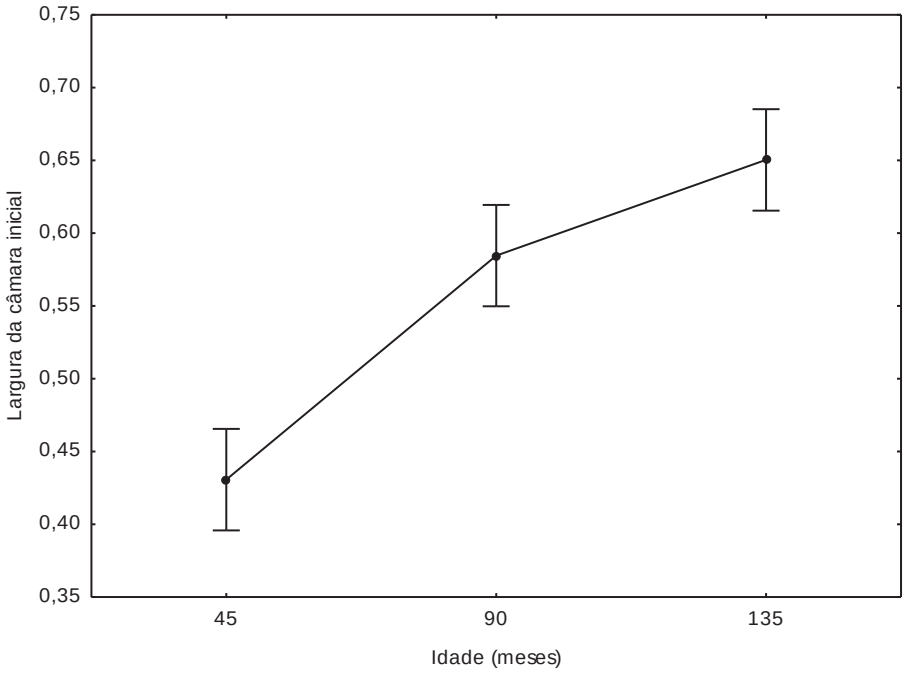


**Figura 6.** Comparação da largura média da câmara de fungo entre as três idades analisadas.

**Tabela 4:** Resultado do teste a posteriori (Tukey α= 0,05) para a largura da câmara dos ninhos com diferentes idades.

| | Tukey (valor de p) | | |
|---|---|---|---|
| Idade (dias) | 45 | 90 | 135 |
| 45 | ---- | 0,000119 | 0,000119 |
| 90 | 0,000119 | ---- | 0,026295 |
| 135 | 0,000119 | 0,026295 | ---- |

### 3.5 Altura da câmara inicial

A média da altura da câmara dos ninhos foi diferente estatisticamente nas três idades distintas (45, 90 e 135) (F= 45,97 e p< 0, 001) **(Figura 7, Tabela 5).** Na idade de 45 dias a média foi de 3,3 ± 1,02cm, 4,7 ± 0,90 cm para 90dias e 6,15 ± 0,81cm em 135 dias. A média nos três anos foi de 4,68 ± 1,50 cm **(Tabela 6).**

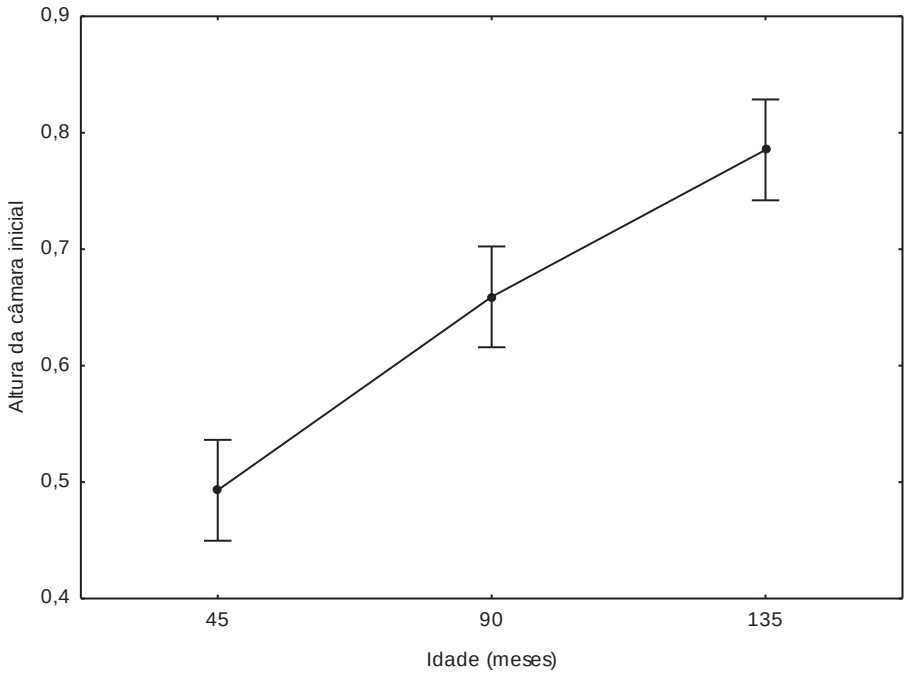

**Figura 7.** Comparação da altura média da câmara de fungo entre as três idades analisadas.

**Tabela 5:** Resultado do teste *a posteriori* (Tukey α= 0,05) para a altura da câmara dos ninhos com diferentes idades.

| Tukey (valor de p) | | | |
|---|---|---|---|
| Idade (dias) | 45 | 90 | 135 |
| 45 | ---- | 0,000121 | 0,000119 |
| 90 | 0,000121 | ---- | 0,000455 |
| 135 | 0,000119 | 0,000455 | ---- |

### 3.6 Volume das câmaras

Diferenças significativas foram encontradas para o volume das câmaras de ninhos com diferentes idades (ANOVA, F=75,77; p< 0, 001), sendo estas diferenças, significativas entre todas as idades analisadas **(Figura 8, Tabela 7).** Deste modo, os resultados apresentados demonstraram que o tamanho da câmara inicial tende a aumentar conforme seu desenvolvimento (45, 90, 135 dias), ou seja, com o surgimento de novos indivíduos e com o aumento da incorporação de folha ao fungo e consequentemente o aumento do fungo. A média para o volume da câmara de fungo foi de 19,8 ± 10,7cm para a câmara de 45 dias, 50,6 ± 16,64cm para as de 90 dias e 85,96 ± 33,15cm para as de 135 dias. A média total do volume da câmara foi de 52,11 ± 34,97 cm **(Tabela 6).**

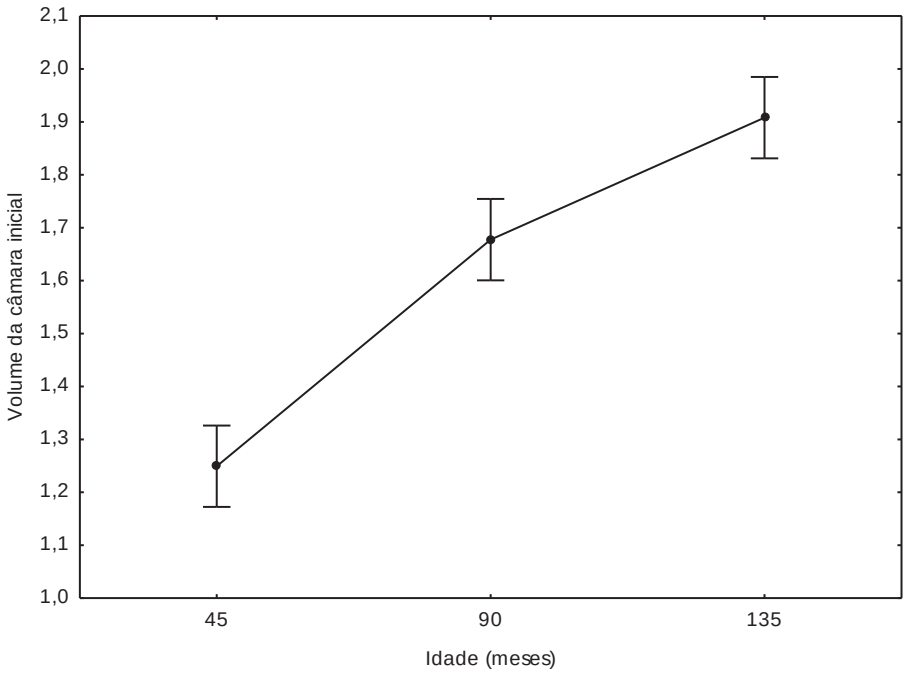


**Figura 8.** Comparação do volume médio da câmara de fungo entre as três idades analisadas.

**Tabela 7:** Resultado do teste *a posteriori* (Tukey α= 0,05) para o volume da câmara dos ninhos com diferentes idades.

| Tukey (valor de p) | | | |
|---|---|---|---|
| Idade (dias) | 45 | 90 | 135 |
| 45 | ---- | 0,000119 | 0,000119 |
| 90 | 0,000119 | ---- | 0,000342 |
| 135 | 0,000119 | 0,000342 | ---- |

**Tabela 6:** Média ± Desvio Padrão da câmara recém-fundada (45, 90 e 135 dias) de *Atta sexdens*, nos três meses de estudo.

| ***Idade dos ninhos*** | ***Profundidade (cm)*** | ***Comprimento (cm)*** | ***Largura (cm)*** | ***Altura (cm)*** | **Volume das câmaras (cm)** |
|---|---|---|---|---|---|
| **45** | 19,0±2,81 | 4,2 ±1,46 | 2,7 ±0,52 | 3,3 ± 1,02 | 19,8 ± 10,7 |
| **90** | 20,3 ± 2,99 | 5,2 ±0,66 | 3,9 ±0,68 | 4,7 ± 0,90 | 50,6 ± 6,64 |
| **135** | 20,5 ± 2,91 | 5,73 ±0,85 | 4,53 ±0,73 | 6,15±0,81 | 85,0 ± 3,15 |
| **Total** | 19,94 ±2,93 | 5,06 ±1,21 | 3,72 ± ,98 | 4,68±1,50 | 52,11 ±34,97 |

## 4. DISCUSSÃO

As rainhas são as lideres na inicialização da construção dos ninhos, pois, são elas as responsáveis por proporcionar a manutenção e realização da postura dos ovos, para dar inicio aos primeiros indivíduos da prole. Às primeiras operárias (62 - 66 dias pós revoada) ficam com a responsabilidade de aumentar o ninho estruturalmente, a partir da fundação de novos túneis e na construção de novas câmaras (AUTUORI, 1941; AMANTE, 1972).

As formigas cortadeiras possuem uma estratégia de construção rigorosa, que se inicia, desde a fundação da rainha, até a escolha ideal da profundidade do túnel e a inicialização da virada para a construção da primeira câmara, no entanto, esta tática de construção não para por ai, as rainhas preparam toda a câmara, regurgita o fungo, cuida da sua prole, que depois ficará responsável pelo aumento no diâmetro (comprimento, largura e altura), formato e profundidade das câmaras (AMANTE, 1972).

Através das medidas atribuídas neste estudo, conseguimos observar que realmente os ninhos das formigas estabelecem alguns padrões na construção e em seu desenvolvimento, na qual, as análises experimentais demonstraram que as profundidades das câmaras não se

modificam em relação às diferentes idades, ou seja, as câmaras após serem construídas permanecem estáticas. No entanto, como observado por Cardoso (2010), após 180 dias surgem o segundo túnel e novas câmaras e estas tendem a se modificar no comprimento, na altura e no volume **(Figura 4),** mostrando assim, que a profundidade da construção da câmara inicial esta associada ao comportamento de aprofundar o canal e posteriormente na construção da câmara inicial, sempre a procura de uma temperatura ideal para que ocorra o desenvolvimento da prole que ainda esta para surgir, e de seu fungo mutualista. No entanto, alguns autores, além de acreditarem que as formigas procuram o lugar ideal para desenvolver sua prole, eles também acreditam que a profundidade das câmaras esta relacionadas com compactação dos solos que podem limitar a profundidade dos ninhos (STEIN & XAVIER 1984).

No presente estudo a profundidade da câmara foi encontrada variando de 19,0 a 2,93cm **(Tabela 6).** O mesmo foi observado por Ribeiro (1972) que encontrou câmaras variando entre 8,00 e 22,00 cm de profundidade, enquanto Ribeiro & Woessner (1982) encontraram 31,80 e 32,10 cm de profundidade, para câmaras de *A.* s*exdens sexdens* em diferentes anos de estudo. O mesmo não pode ser observado por Autuori, (1942) há décadas atrás em Botucatu, que encontraram uma menor profundidade de 12 a 15 cm, em sauveiros recém fundados. Provavelmente esta variação na profundidade está relacionada com variações na compactação do solo de um local para outro, ou devido à ocorrência de aração ou gradagem na área do presente estudo, o quê possivelmente não teria ocorrido com as áreas desses trabalhos mais antigos.

As operárias são responsáveis pelo aumento estrutural dos ninhos, com a escavação de novos túneis e outras câmaras (AUTUORI, 1941; AMANTE, 1972). Este aumento foi observado nas ampliações das dimensões dos ninhos iniciais na maioria das análises, em função do aumento na população dentro do ninho, inicialmente composto apenas pela rainha

e pequena porção do fungo mutualista. Assim, com 90 dias de escavação foi observado diferença no tamanho da câmara, o que já era esperado, pois os ninhos já estavam abertos e havia uma grande presença de operárias forrageando. O mesmo foi observado por Mariconi (1970) que as operárias se ocupam do cultivo do fungo e, portanto em torno dos 90 dias, com a presença das maiores operárias tenham-se realizado outras tarefas dentro e fora do ninho. Conforme Jacoby (1950), a câmara fundada pela rainha tem suas dimensões ampliadas a cada dia pelas operárias. Isso foi evidenciado através do aumento, tanto no comprimento, quanto na largura, na altura e no volume **(Figuras 5, 6, 7 e 8).**

A dinâmica de ampliação do ninho pode apresentar dependência da densidade de formigas (HALLEY et al. 2005). A adaptação do tamanho dos ninhos à sua população é um processo comum na maioria dos insetos sociais, contudo a dinâmica de construção e ampliação de ninhos subterrâneos não é totalmente conhecida (RASSE; DENEUBOURG, 2001).

## 5. REFERÊNCIAS


Amante, E. 1972. Preliminary observations on the sevarming behaviour of the leafcutting ant, *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Georgia Entomological Society** , v.7, p.82-3.

Autuori, M. 1941. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.–Hymenoptera: Formicidae). I–Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivo do Instituto Biológico**.12:197–228

Autuori, M. 1942. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera – Formicidae). II. O sauveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.13, n. 7, p.67-86.

Bollazzi, M.; Roces, F. 2002. Thermal preference for fungus culturing and brood location by workers of the thatching grass-cutting ant *Acromyrmex heyeri*. **Insectes Sociaux**, v.49, p.153–157.

Brian, M.V. 1983. Social insects: ecology and behavioural biology. Chapman and Hall, New York.

Camargo, R. S.; Fujihara, R.T.; Forti, L. C. 2012. Nest Digging by Leaf-Cutting Ants: Effect of Group Size and Functional Structures. **Psyche**, v. 2012, p. 1-4.

Cardoso, S.R.S. 2010. **Morfogênese de ninhos iniciais, mortalidade de *Atta* spp. (Hymenoptera, Formicidae) em condições naturais e avaliação da ação de fungos entomopatogênicos**. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 149p.

Cassil, D.; Tschinkel, W.R.; Vinson, S.B. 2002. Nest complexity, group size and brood rearing in the fire ant, *Solenopsis invista*. **Insectes Sociaux**, 49: 158-163.

Ceusters, R. 1986. Simulation du nid naturel des fourmis par des nids artificiels placés sur un gradient de température. **Actes des Colloques Insestes Sociaux**, 235-241.

Gonçalves, C. R. Distribuição, biologia e ecologia das saúvas. **Divulgação Agronômica**, Rio de Janeiro, n. 1, p. 2-10, 1960.

Halley, J. D.; Burd, M.; Wells, P. 2005. Excavation and architecture of argentine ant nests. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 52, p. 350-356.

Hölldobler, B.; Wilson, E.O. **The Ants**. Harvard, MA: Harvard University Press, 1990. 732 p.

Jacoby, M. A. 1950. Arquitetura do ninho: In; JACOBY, M. A saúva: uma inteligência nociva. 2 ed. Rio de Janeiro: **Serviço de Informações Agrícola**, cap 3, p.21-31.

Mariconi, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167 p.

Moreira, A.A.; Forti, L.C.; Andrade, A.P.P.; Boaretto,M.A.C.; Ramos, V.M.; Lopes, J.F.S. 2001. Comparação entre parâmetros externos e internos de ninhos de *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae). **Acta Scientiarum**, v.24, p.369-373.

Moreira, A.A.; Forti, L.C.; De Andrade, A.P.P., Boaretto, M.A.C., Lopes, J.F.S. 2004. Nest architecture of *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Stud Neotrop Fauna** Environ. 39, 109-116.

Pereira-Da-Silva, V. 1975. Contribuição ao estudo das populações de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, e *Atta laevigata* (Fr. Smith) no estado de São Paulo (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, Petrópolis, v. 18, p. 201-250.

Powell R.J.; Stradling D.J. 1986. Factors influencing the growth of *Attamyces bromaticus*, a symbiont of attine ants. **Transactions of the British Mycological Society**. v.87, p.205–213.

Quinlan, R.J.; Cherrett, J.M. 1978. Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecology Entomology**, v.3, p.221–230.

Rasse, P. H.; Deneubourg, J. L. 2001. Dynamics of nest excavation and nest size regulation of *Lasius niger* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Behavior**, Kansas, v. 14, n. 4, p. 433-449.

Ribeiro, F. L. **Um estudo sobre a contribuição da fêmea durante a fundação da colônia em *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera – Formicidae).** 1972. 135 p. Tese (Doutorado em Psicologia)-Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

Ribeiro, G. T.; Woesnner, R. A. Estudos sobre a biologia de sauveiros inicias de Atta sexdens sexdens (Linnaeus, 1758), (Hymenoptera, Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil,** Londrina, v. 11, n. 1, p. 49-56, 1982.

Stein, C.; Xavier, G. F. Does substrate density affect the nest depth of female *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae)? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3-4, p. 297-300, 1984.

Thome, G. 1972. Le nid et le comportement de construction de la fourmi *Messor ebenius* , Forel (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**. 19, 95-103.

# Capítulo III

# CAPÍTULO III

## AUSÊNCIA DO FUNGO PARASITA *ESCOVOPSIS* NOS PELLETS DE FUNGO MUTUALISTA TRANSPORTADAS POR FÊMEAS ALADAS DE *ATTA SEXDENS*

**RESUMO**

No vôo nupcial, as rainhas das formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae: Attini), levam um pellet de fungo mutualista, seu alimento, transmitindo-o assim da colônia mãe para a nova colônia, ou seja, verticalmente. Esse mutualista é parasitado pelo fungo denominado *Escovopsis*, que parece ocorrer exclusivamente associado às colônias das formigas da tribo Attini, mas, para o qual, não se sabe muito da biologia. Surpreendentemente, os estudos até agora indicam que, apesar dessa ocorrência muito restrita e específica, a transmissão seria apenas horizontal, ou seja, ocorreria de colônias de formigas já estabelecidas para colônias idem. Por outro lado, nestes estudos realizados anteriormente ao presente trabalho, ou a amostragem foi relativamente pequena, ou utilizou-se poucas colônias. Dessa forma, procedeu-se uma investigação complementar a respeito da possibilidade de transmissão vertical, procedendo-se uma melhor amostragem, e utilizando-se a formiga cortadeira *Atta sexdens*, espécie cujas rainhas nunca foram antes avaliadas para a presença desse parasita. Foram coletadas rainhas nas revoadas de 2009 e 2010, as quais foram mantidas em câmaras úmidas para permitir a regurgitação do mutualista, e, em seguida, este foi inoculado em meio de cultura batata dextrose agar (BDA). Os fungos que cresceram nesse meio foram identificados. No presente trabalho, assim como nos anteriores, não se verificou a presença de *Escovopsis*, o fungo mutualista apresentou elevada freqüência, e os outros fungos apresentaram um percentual menor. Desta forma, pelo conjunto de dados até agora obtidos, indica-se que a transmissão vertical não existe ou é negligenciável, e que a transmissão de *Escovopsis* pode ser definida como horizontal.

**Palavras-chave:** *Escovopsis*, Attini, formiga cortadeira, transmissão vertical, vôo nupcial, *Atta sexdens*, parasitismo.

**ABSTRACT**

Before preparing for the mating flight gynes of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) harvest and store in an infrabuccal pocket a small fragment of their fungus gardens. This pellet is the start culture of the mutualistic fungus when mated gynes establish a new colony. The ant fungal cultivar is threatened by the specialized microfungal parasite *Escovopsis*, which are exclusively associated with the fungus gardens of attine ants. Reports suggest that *Escovopsis* transmission between colonies is horizontal, i.e. the parasite is transferred from infected to healthy nests. However, such studies analyzed a relatively small number of fungal pellets or were restricted to a few leaf-cutting ant colonies. Here, we carried out a complementary study on the possible vertical transmission of *Escovopsis* by sampling a large number of fungus pellets from gynes of *Atta sexdens* L., a leaf-cutting ant species not studied from this perspective. Gynes were collected during the mating flights in 2009 and 2010, and were left in containers upon regurgitation of the fungal pellets. Each pellet was inoculated on potato dextrose agar and incubated at 25°C. Our results indicate that not signs of *Escovopsis* were found in pellets. On the other hand, the mutualistic cultivar was prevalent in addition to other fungal species that occurred at lower proportions in the fungal pellets. Our study corroborates results of previous work that *Escovopsis* vertical transmission does not exist or is negligible, and therefore he parasite transmission can be defined as horizontal.

**Key words**: *Escovopsis*, Attini, vertical transmission, mating flight, *Atta sexdens*, parasitism.

## 1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras, gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae: Attini), cultivam um fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales), como alimento. Este é alvo de um fungo parasita específico *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), que, potencialmente, pode prejudicar severamente o crescimento da colônia (CURRIE et al. 1999; CURRIE 2001b). Sugere-se que microrganismos, principalmente actinobactérias encontradas na cutícula das operárias, estão envolvidos no combate deste parasita (CURRIE, 2001a; MUELLER et al. 2008; CALDERA et al. 2009; BARKE et al. 2011).

No dia da revoada, machos e rainhas de muitas colônias diferentes saem ao mesmo tempo, se acasalam entre si, e depois as rainhas descem ao solo para fundar novas colônias. Nessa ocasião, as fêmeas levam um pellet de jardim de fungo mutualista na sua cavidade infrabucal, e utilizam esse material para formar o jardim da nova colônia que fundam, transmitindo assim o fungo mutualista de forma vertical (da colônia mãe para a nova colônia). No caso do gênero *Atta*, as rainhas escavam uma câmara inicial aonde ficam enclausuradas por cerca de 65 a 94 dias, após este tempo, as primeiras operárias reabrem o canal que liga a câmara à superfície do solo (AUTUORI, 1941, 1942; CURRIE et al. 1999; PAGNOCCA et al. 2008).

Pouco se conhece sobre a biologia de *Escovopsis*, inclusive sobre o modo de transmissão (CURRIE 2001a). Os poucos dados obtidos a respeito da transmissão, são os de Currie et al. (1999) e o de Pagnocca et al. (2008), os quais indicaram que não ocorre transmissão vertical **(Tabela 1).** No primeiro, avaliou-se pellets da rainha logo após o vôo nupcial (C.R. Currie, comunicação pessoal) e jardins de colônias iniciais, e a amostragem foi relativamente pequena e restrita a uma espécie (*Atta colombica*). No segundo avaliou-se os

pellets e a cutícula das rainhas coletadas imediatamente antes de essas alçarem vôo, aonde, utilizou-se apenas 3 colônias (*Atta capiguara* e *Atta laevigata*), por outro lado, a amostragem foi maior.

Considerando-se que, além disso, não se encontrou *Escovopsis* no ar, inferiu-se que provavelmente a transmissão seria horizontal (ou seja, de colônias de formigas já estabelecidas para colônias idem), através de migração de animais entre elas (CURRIE et al. 1999; CURRIE 2001a; POULSEN & CURRIE 2006).

Por outro lado, esse parasita parece ter estreita relação com as colônias das formigas da tribo Attini (formigas fungicultoras, que incluem as formigas cortadeiras), pois: (*i*) só foi encontrado no jardim e no lixo das colônias (MUCHOVEJ & DELLA LUCIA, 1990; SEIFERT et al. 2005; CURRIE et al. 1999), (*ii*) pelos estudos filogenéticos feitos existe substancial grau de "tracking" de *Escovopsis* com o fungo cultivado (Gerardo et al. 2006; CURRIE et al. 2003), (*iii*) indica-se necessidade de gasto energético adicional para cultivar as actinobactérias para servir como uma defesa contra esse parasita, e que esse cultivo é intensificado na presença de *Escovopsis* (POULSEN et al. 2003).

Além disso, Mikheyev (2008) verificou que em Guadalupe, aonde ocorreu recente colonização por *Acromyrmex octospinosus* iniciado provavelmente por uma única rainha fecundada ou uma colônia inicial vinda do continente, esse parasita surpreendentemente foi encontrado em 12% das amostras, e as operárias das colônias em geral estavam com bastante actinomiceto. Dados em colônias iniciais de *Atta colombica* (CURRIE et al. 1999) indicam que logo após a reabertura do canal inicial, inicia-se a infecção das colônias por *Escovopsis*. Então se sugere que, ao menos para essas espécies, os mecanismos de transmissão horizontal são rápidos e eficientes, ou que existe uma limitada, porém substancial, transmissão vertical.

Dessa forma, considera-se surpreendente que a associação desse parasita seja tão estreita e, mesmo assim, a transmissão seja sugerida como exclusivamente horizontal,

portanto, esse aspecto deve ser melhor estudado. Se ocorre a transmissão vertical desse parasita, o pellet da rainha é o material mais provável de conter *Escovopsis* (CURRIE et al. 1999), e, portanto, no presente trabalho, visou-se uma melhor investigação desse aspecto, procedendo-se uma melhor amostragem, e utilizando-se a espécie *Atta sexdens*, amplamente difundida no Brasil e cujas rainhas nunca foram antes avaliadas para a presença desse parasita, provendo assim um bom complemento aos dados já existentes.

**Tabela 1.** Trabalhos envolvendo isolamento de micro-organismos de pellets, "esponja inicial", ou na cutícula de fêmeas aladas de formigas cortadeiras.

| Estudo | N | Tipo de amostra | Espécie de formiga | Ano da revoada | Local de coleta |
|---|---|---|---|---|---|
| Currie et al. (1999) | 38 | Pellets de rainhas (logo após o vôo nupcial*) | *Atta colombica* | 1998 | Gamboa, Panama |
| | 8 | Esponja de colônias iniciais (criação asséptica) | *Atta colombica* | 1998 | Gamboa, Panama |
| | 22 | Esponja de colônias iniciais (campo, fase claustral) | *Atta colombica* | 1998 | Gamboa, Panama |
| Pagnocca et al. (2008) | 144 | Pellets de rainhas + cutícula (logo antes do vôo nupcial*) | *Atta laevigata* (1 colônia) | 2006+2007 | Fazenda Santana, Botucatu, Brazil |
| | 120 | Pellets de rainhas + cutícula (logo antes do vôo nupcial*) | *Atta capiguara* (2 colônias) | 2006+2007 | |
| Este estudo (2013) | 267 | Pellets de rainhas (logo após o vôo nupcial*) | *Atta sexdens* | 2009+2010 | Fazenda Lageado, Botucatu, Brazil |

*No mesmo dia da revoada.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Local das Coletas

Escolheu-se como local de coleta uma área de cultivo de *Eucalyptus* spp., circundada por fragmento de mata nativa, infestada por colônias de *A. sexdens*, localizada no município de Botucatu-SP (22º49'53.25" S e 48º25'24.22" O) (mapa do Capítulo II desta Tese). A taxa de infecção das colônias por *Escovopsis* foi hipoteticamente considerada como sendo provavelmente alta, devido à antiguidade da presença dessa formiga. Esse aspecto foi confirmado em um estudo imediatamente posterior aonde se verificou que em colônias incipientes (135 dias de idade), 90% das colônias estavam infectadas por *Escovopsis* (SM Moreira, Capítulo IV desta Tese).

### 2.2 Coletas das rainhas

As coletas aconteceram nas revoadas principais (revoada em praticamente todas as colônias aptas a revoar no ano em questão) de dois anos: (*i*) em 21 de outubro de 2009 coletaram-se 147 rainhas, das quais foram contabilizados 127 pellets (alguns pellets foram perdidos por contaminação bacteriana ou por não ter ocorrido crescimento de qualquer fungo), e (*ii*) em 31 de outubro de 2010, 150 rainhas, das quais foram contabilizados 140 pellets.

Recém terminada a revoada, enquanto as rainhas estavam andando no solo em busca de local de fundação de nova colônia ou iniciando a escavação desta, elas foram assepticamente coletadas com pinças e colocadas em placas de Petri descartáveis (sem meio de cultura).

As rainhas foram transferidas para uma câmara úmida (Figura 1A), a qual se constituía do fundo de uma placa de Petri de cerca de 50 a 60 (Ø) x 12 (altura) mm, aonde a rainha foi colocada, dentro de uma placa de Petri de cerca de 100 x 16 mm, com adição de cerca de 20 ml de meio Agar água (como fonte de umidade) entre essas, e fechada com a tampa da placa de 100 mm. Após 24 horas, os pellets regurgitados foram inoculados assepticamente em placas de Petri com BDA e antibióticos (estreptomicina e penicilina G, Sigma, ~50 mg $L^{-1}$ cada), conforme Currie et al. (1999), e fechadas com parafilme e acondicionadas em BOD a 25°C sem luz, as quais foram inspecionadas diariamente (visualmente), até 21 dias. Todos os fungos que cresceram foram repicados em BDA e purificados.

### 2.1 Identificação dos Fungos

A identificação dos fungos filamentosos foi realizada segundo caracteres morfológicos encontrados em tratados taxonômicos clássicos (DOMSCH et al. 1980; SAMSON et al., 2000). Adicionalmente, literaturas específicas foram utilizadas para a identificação do fungo mutualista (PAGNOCCA et al. 2001) e *Escovopsis* (MUCHOVEJ & DELLA LUCIA, 1990; SEIFERT et al. 2005). Os isolados foram identificados e agrupados nas seguintes categorias, em: (*i*) fungo mutualista, baseado na presença de gongilídeos sob microscópio, (*ii*) em *Escovopsis*, baseado na macro-morfologia da colônia e na micromorfologia dos conidióforos, e (*iii*) "outros fungos" quando diferente dos dois primeiros.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, assim como nos trabalhos anteriores (CURRIE et al. 1999; PAGNOCCA et al., 2008), não se verificou a presença do fungo parasita *Escovopsis* spp. **(Fig. 1D),** entretanto o fungo mutualista (*Leucoagaricus gongylophorus*) **(Fig. 1B)** apresentou elevada freqüência nos dois anos de estudo (70,1% em 2009 e 85% em 2010), e os outros fungos **(Fig. 1C)** apresentaram um percentual menor, de 29,90% em 2009 e 15% em 2010 **(Figura 2).**

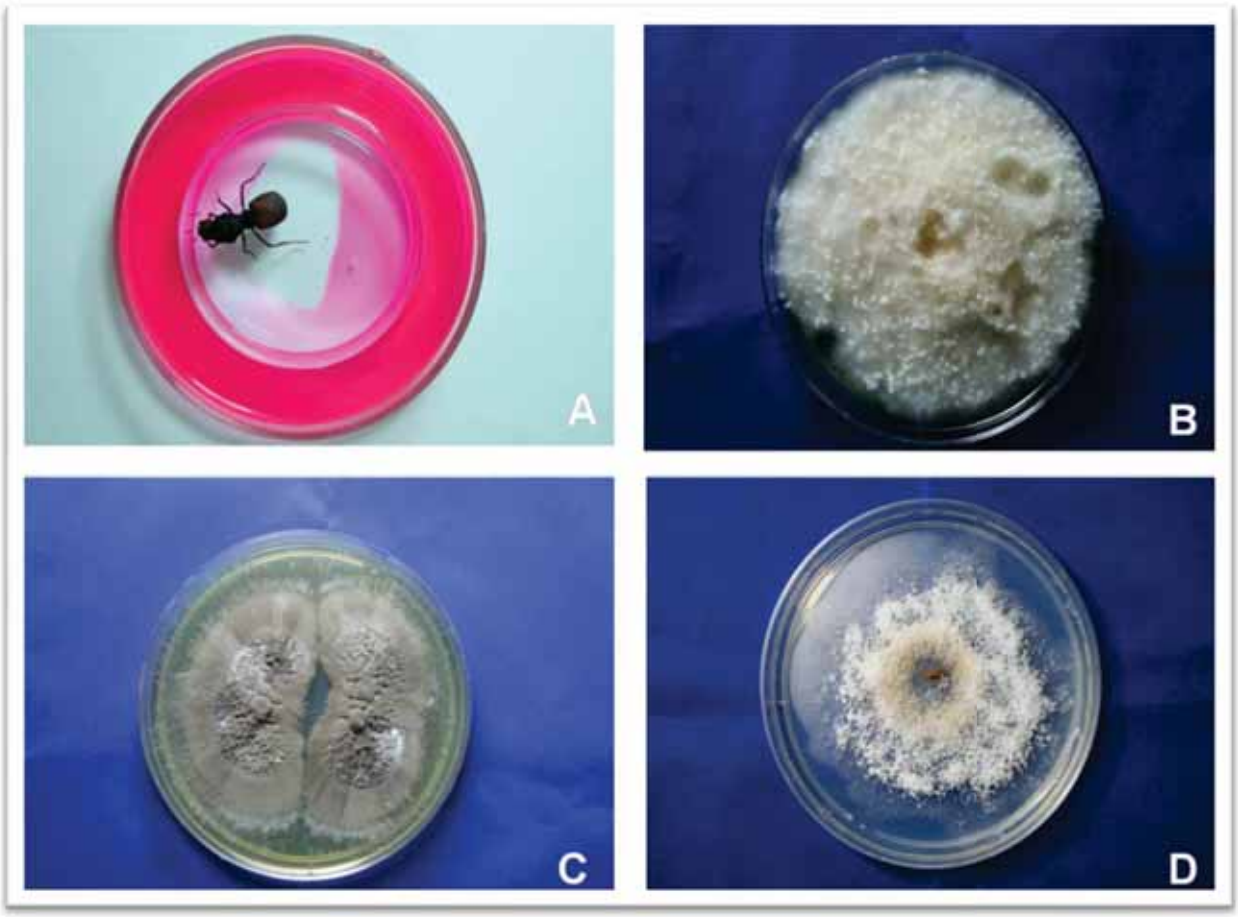


**Figura 1:** Acondicionamento da rainha na câmara úmida feita com placas de Petri de cerca de 60 x 13 e 100 x 16 mm e meio agar-água (como contraste fotográfico foi adicionado corante vermelho ao meio) para promover regurgitação do pellet do fungo mutualista **(A)**; o fungo mutualista **(B)**; um exemplo dos outros fungos encontrados nos pellets **(B, C)**; e o fungo

parasita *Escovopsis*, isolado de colônia de *Atta sexdens*, em PDA, que não foi encontrado neste trabalho (D). Para B, C e D, o meio de cultura é o PDA (Batata Dextrose Agar).

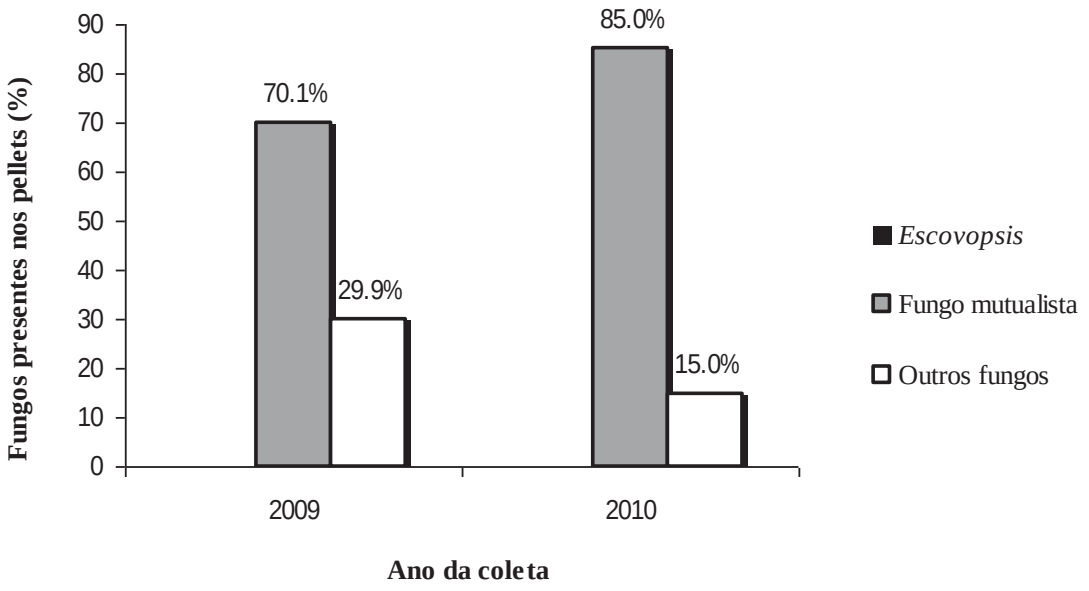


**Figura 2** Prevalência fúngica nos pellets coletados das rainhas aladas de *Atta sexdens* nos voos nupciais de 2009 (n= 127) e 2010 (n= 140). *Escovopsis* sp., parasita especializado do fungo mutualista formigas, não foi encontrado nos pellets analisados.

Em Pagnocca et al. (2008), também se verificou a presença de microfungos filamentosos, além de leveduras, no pellet infrabucal da rainha, indicando que esses organismos indesejados podem estar presentes nesse inoculo do mutualista transportado pela rainha. Porém, ressalta-se que, mesmo nesse caso, a biomassa fungica deve ser quase toda de mutualista, e que muitos dos microfungos presentes, como o *Cladosporium* (PAGNOCCA et al. 2008) são de crescimento rápido, e assim, mesmo se inicialmente presente em pequena quantidade, pode sobrepor facilmente o mutualista na ausência dos cuidados das formigas.

Pelo fato da revoada se dar em grande parte das colônias no mesmo dia, considera-se altamente provável que parte significativa das colônias de origem das rainhas avaliadas no

presente trabalho, estavam infectadas por *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999; CURRIE, 2001). Além disso, embora em Pagnocca et al. (2008) tenha utilizado apenas 3 colônias, se sabe que, ao menos uma delas, a colônia "*Atta capiguara* 1" estava, com certeza, previamente infectada por *Escovopsis* cerca de 7 semanas antes da revoada (NSN et al., dados não publicados), o que reforça as evidencias de *Escovopsis* presente nas colônias de origem não serem transportadas pelas rainhas quando estas saem das colônias.

Coletar as rainhas imediatamente antes (PAGNOCCA et al. 2008), ou logo após (CURRIE et al. 1999, presente trabalho) ao vôo nupcial provavelmente não faz diferença pois tudo indica que *Escovopsis* está presente apenas associado às colônias de Attini (CURRIE et al. 1999), sendo assim improvável as rainhas serem expostas a esse parasita, pelo ar ou pelo solo, no período de imediatamente antes da revoada (quando estão expostas ao ambiente externo) até a fase de procura de local adequado para fundar a colônia e início da escavação desta.

Assim, mesmo que tenha um parasita especializado, ficou evidente que ele não utiliza os mecanismos de transmissão de interesse alinhado com reprodutiva do hospedeiro (transmissão vertical), de modo que, em geral, a taxa de pellets parasitados é zero, ou extremamente baixa (insignificante).

Pela ocorrência dessa rápida infecção de novas colônias (CURRIE et al. 1999; CURRIE, 2001; MYKHEYEV, 2008), deduz-se que os mecanismos de transmissão horizontal de *Escovopsis*, sejam eles quais forem, são bem rápidos e eficientes.

Por outro lado, a ausência do parasita tanto nos pellets como na cutícula das rainhas indica a presença de, também eficientes, mecanismos de "escape" ao parasita. De forma que as rainhas consigam iniciar eficientemente uma nova esponja fúngica sem a presença de *Escovopsis*.

Assim, esse nosso estudo, em conjunto com os dados anteriores, indicam que a transmissão vertical do parasita não existe ou é negligenciável; sendo assim podendo-se considerar realmente horizontal.

## 4. REFERÊNCIAS


Autuori M (1941) Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.–Hymenoptera: Formicidae). I–Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivo do Instituto Biológico**.12:197–228.

Autuori, M (1942) Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera – Formicidae). II. O sauveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, 13(7): 67-86.

Barke, J., Seipke, R.F., Yu, D.W., Hutchings, M.I. 2011. A mutualistic microbiome: How do fungus-growing ants select their antibiotic-producing bacteria? **Communicative & Integrative Biology,** 4(1):41-43.

Caldera, E.J., Poulsen, M., Suen, G., Currie, C.R. 2009. Insect symbioses: a case study of past, present, and future fungus-growing ant research. **Environmental Entomology.** 38(1):78-92.

Currie, C.R., Muller, U.G., Malloch, D. 1999. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.96:7998–8002.

Currie, C.R. 2001a. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**. 55:357–380.

Currie, C.R. 2001b. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**. 128:99-106.

Currie, C.R., Stuart, A.E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceeding of the Royal Society**. 268:1033-1039.

Currie, C.R.**,** Wong, B., Stuart, A.E.**,** Schultz, T.R., Rehner, S.A., Mueller, U.G., Sung, G.H., Spatafora, J.W., and N.A. Straus, 2003. Ancient tripartite coevolution in the attine ant–microbe symbiosis. **Science**. 299: 386–388.

Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H.1980. **Compendium of soil fungi. Academic Press**, London.

Gerardo, N.M., Jacobs, S.R., Currie, C.R., Mueller, U.G. 2006. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biol** 4(8): e235.

Mikheyev, A.S. 2008. History, genetics and pathology of a leaf-cutting ant introduction: a case study of the Guadeloupe invasion. **Biological Invasions.** 10(4):467-473.

Moser, J.C. (1967) Mating activities of *Atta texana* (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux**. 14:295–312. doi:10.1007/BF02252831.

Mueller UG, Dash D, Rabeling C, Rodrigues A (2008) Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. Evol Int J Org Evol 62:2894–2912.

Muchovej, J.J., Della Lucia T.M.C. 1990. *Escovopsis*, a new genus from leaf-cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomen invalidum. **Mycotaxon**. 37:191–195.

Pagnocca FC, Bacci, M.Jr., Fungaro, M.H., Bueno, O.C., Hebling, J.M., Sant'anna, A. and Capelari, M. 2001. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycological Reseach.** 105(2):173-176.

Pagnocca, F.C., Rodrigues, A., Nagamoto, N.S., Bacci, M.Jr. 2008. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leafcutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**. 94:517–526.

Poulsen, M., Bot, A.N.M., Currie, C.R., Nielsen, M.G., Boomsma, J.J. 2003. Within colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology**. 17:260-269.

Poulsen, M., Currie, C.R. 2006. Complexity of insect-fungal associations: exploring the influence of microorganisms on attine ant-fungus symbiosis. In: Bourtzis, K.; Miller, T. A. (Eds.) **Insect Symbiosis**, v. 2, Newbury: CRC Press. pp 57-77.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. Introduction to food-airborne fungi, 6th edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures, **Baarn** 2000.

Seifert, K.A., Samson, R.A., Chapela, I.H. 1995. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia.** 87(3):407-413

Solomon, S.E., Bacci, M.Jr., Martins, J.Jr., Vinha, G.G., Mueller, U.G. 2008. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS ONE.** 3(7): e2738. doi:10.1371/journal.pone.0002738

# Capítulo IV

# CAPÍTULO IV

## PRESENÇA E PREVALÊNCIA DO FUNGO PARASITA *ESCOVOPSIS* NOS NINHOS DE *ATTA SEXDENS* EM ÉPOCAS DISTINTAS

**RESUMO**

Os jardins de fungo das formigas da tribo Attini são hospedeiros de um parasita especializado, um microfungo do gênero *Escovopsis*, o qual é descrito como capaz de causar dramáticos efeitos na taxa de crescimento das colônias dessas formigas. Os objetivos deste capítulo foram: (*i*) reavaliar as metodologias de detecção dos fungos, (*ii*) avaliar a presença e prevalência de fungos em colônias incipientes de campo e discutir suas implicações, e (*iii*) reavaliar a distribuição de *Escovopsis* nas diferentes camadas da esponja fúngica. Foram utilizadas colônias de *Atta sexdens* L. de diferentes idades, em campo. As coletas das esponjas fúngicas, assépticas, foram realizadas com 45, 90 e 135 dias (pós-revoada). Para analisar a prevalência fúngica, de cada colônia, retirava-se 3 $mm^3$ do fragmento da esponja fúngica da parte mais nova, do meio e da mais velha, e posteriormente se inoculava os fragmentos individualmente (sem operárias), em 12 placas de placas de Petri com BDA e antibióticos. Os dados foram submetidos à ANOVA ($\alpha$=0,05) e a um teste *a posteriori* de Tukey HSD, comparando a presença do *Escovopsis* em relação à posição que se encontrava (Topo, Meio e Fundo) e em relação às idades. Para se avaliar a presença, contabilizou-se os dados de prevalência sem levar em conta a parte da esponja e, complementarmente se amostrou cerca de 90% da esponja fúngica de cada colônia, em câmara úmida. A prevalência do fungo parasita para os ninhos coletados com 45 dias foi zero, sendo este observado apenas nas épocas posteriores. A média da prevalência do fungo *Escovopsis* nas colônias foi relativamente baixa, porém crescente, de 3,2 e 12,3%, respectivamente aos 90 e 135 dias após a revoada. Já para a avaliação de presença desse fungo parasita, observou-se sua ausência aos 45 dias, para os dois métodos utilizados. Aos 90 dias, esse fungo foi detectado em quantidade similar das colônias no método de câmara úmida se comparado com o em BDA, porém foi mais eficientemente detectado aos 135 dias em câmara úmida, sendo detectado em 85% das colônias, contra apenas 55% em BDA. Desde modo, os resultados demonstraram que o fungo *Escovopsis* ocorreu apenas quando o as colônias já estão abertas e as primeiras operárias já estavam forrageando. Este fungo não está presente no solo, se não teríamos a presença com 45 dias. A hipótese mais plausível para a infecção de novas colônias continua sendo o transporte de esporos de *Escovopsis* através da migração de animais entre colônias já estabelecidas.

**Palavras-chave:** Clausura, revoada, idade, mutualismo, parasitismo.

**ABSTRACT**

The fungus gardens of ants of the tribe Attini are hosts to a specialized parasite, a microfungus of the genus *Escovopsis*, which is described as capable of causing dramatic effects on the growth rate of the colonies of these ants. The objectives of this chapter were: (i) reassess the methods of detection of the fungi, (ii) evaluate the presence and prevalence of fungi in incipient field colonies and discuss its implications, and (iii) re-evaluate the *Escovopsis* distribution at the different layers of fungal sponge. We used field colonies of *Atta sexdens* L. of different ages. The aseptic collections fungal sponges, were performed with 45, 90 and 135 days (post-flight). To analyze the fungal prevalence of each colony, we withdrew 3 $mm^3$ of fungal sponge fragment of newer part, middle and older, and subsequently inoculated fragments individually (without workers) in 12 Petri plates with BDA and antibiotics. The data were analyzed by ANOVA ($\alpha = 0.05$) and an *a posteriori* Tukey HSD test, comparing the presence of *Escovopsis* relative to the position it was in (Top, Middle and Bottom) and against the age. To assess the presence, we recorded the data of prevalence without taking into account the part of the sponge and in addition we sampled about 90% of the fungal sponge of each colony in a moist chamber. The prevalence of parasitic fungus for nests collected at 45 days was zero, and it was observed only in later times. The average prevalence of fungus *Escovopsis* in the colonies was relatively low but growing by 3.2 and 12.3%, respectively at 90 and 135 days after the mating flight. For the evaluation of the presence of this fungus parasite, his absence was noted at 45 days for the two methods. At 90 days, the fungus was detected in similar number of colonies in a moist chamber method compared with the BDA; but it was more efficiently detected at 135 days in a moist chamber, being detected in 85% of the colonies, against only 55% in BDA. In this way, the results demonstrated that the fungus *Escovopsis* occurred only when the colonies are already open and the first workers were foraging. This fungus is not present in the soil; otherwise we would have found it at 45 days. The most plausible hypothesis for the infection of new colonies remains the transport of *Escovopsis* spores by the migrating animals between colonies already established.

**Key words**: Claustral, mating flight, age, mutualism, parasitism.

## 1. INTRODUÇÃO

Os jardins de fungo das formigas da tribo Attini são hospedeiros de um microfungo parasita especializado, do gênero *Escovopsis* (forma anamórfica de Hypocreales, Ascomycota) (CURRIE et al. 1999; EYNOLDS E CURRIE, 2004) que podem causar dramáticos efeito na taxa de crescimento dessas colônias (CURRIE et al. 1999a, CURRIE, 2001a). Verificou-se que esse fungo é bastante presente nas colônias (presença na colônia, verificada em pelo menos um fragmento de uma amostra da colônia) (CURRIE et al. 1999, CURRIE, 2001a).

Ao que os dados iniciais indicaram, esse impacto nas colônias está relacionada com a alta prevalência de 18,2 a 50,0% (% de fragmentos, da mesma colônia, inoculados em meio de cultura aonde esse parasita cresceu) com a qual esse parasita ocorre, especialmente nas formigas cortadeiras (nas Attini mais basais, a prevalência é menor) (CURRIE et al. 1999, CURRIE 2001b).

Esse parasita é mais presente em colônias com 1-2 anos de idade do quê nas mais velhas, e sendo menor ainda nas colônias com recém reabertura do canal inicial (imediatamente após o fim fase claustral), e ausente na fase claustral (CURRIE et al. 1999a, CURRIE 2001a). No fim da fase claustral até 1-2 anos de idade a taxa de mortalidade é altíssima (AUTUORI 1941,1942, CARDOSO, 2010), e assim é hipoteticamente plausível que a infecção por *Escovopsis* contribua substancialmente para tal, dessa forma, seria interessante complementar esses estudos iniciais, por exemplo, estudando-se a presença e prevalência desse parasita nos primeiros meses de idade.

Além disso, posteriormente, foram encontradas menores taxas de prevalência (NAGAMOTO et al. 2003, NAGAMOTO et al., dados não publicados; RODRIGUES et al., aceito) mesmo esse parasita aparentemente possuindo rápidos e eficientes mecanismos de transmissão entre colônias (CURRIE et al. 1999a, MYKHEYEV 2008, CAPÍTULO 3). Estas

baixas taxas de prevalência podem estar relacionadas à grande quantidade de câmaras que os ninhos adultos possuem, fazendo com que as operárias consigam localizar e impedir o propagação deste microfungo para outras câmaras (CURRIE, 2001a). Na porção basal da esponja, esse parasita é mais prevalente do que na parte superior (CURRIE, 2001a), o que se assemelha a uma corrida armamentista, com o parasita crescendo de baixo para cima e o fungo mutualista sendo adicionado principalmente na parte superior. Porém, esse estudo foi baseado principalmente em colônias mantidas em laboratório e que foram submetidas à inoculação de *Escovopsis* (esse parasita foi aplicado nas colônias, o que tende a produzir contaminação principalmente das partes mais expostas, como, por exemplo o topo da esponja, e, como a avaliação da prevalência ocorreu algumas semanas após, talvez a porção basal desse estudo era o topo quando foi aplicado, o que gera alguma dúvida se esse padrão descrito seria o usual), portanto esse padrão de distribuição talvez não ocorra sempre.

Se, por um lado, a determinação de prevalência pode ser feito utilizando-se apenas 10 ou 12 fragmentos de 3 ou 8 $mm^3$ de esponja fúngica por colônia (CURRIE et al. 1999, CURRIE 2001b, GERARDO et al. 2004), a detecção da presença desse parasita é mais trabalhosa e incerta, podendo requerer, para cada colônia, diversas re-avaliações ao longo do tempo (CURRIE et al. 1999a). Por outro lado, avaliações de porcões maiores de esponja, com todas as operárias removidas, e em câmara úmida, provavelmente é mais eficiente e rápida (RODRIGUES, 2004; NS NAGAMOTO et al., dados não publicados), visto que sendo o *Escovopsis* um fungo de crescimento rápido e especializado em parasitar as esponjas, provavelmente em câmara úmida as condições para esse parasita devem, ao menos hipoteticamente, ser muito boas. Embora esse tipo de amostragem em câmara úmida muitas vezes represente a destruição ou descaracterização da colônia (devido à remoção de toda ou grande parte da esponja da colônia), pode ser muito útil em alguns casos, como, por exemplo, em avaliações finais de experimentos. Assim, além de ser potencialmente mais eficiente na

avaliação de presença, avaliar em câmara úmida também é interessante porquê, ao que tudo indica, é uma condição mais natural o parasita crescer aonde é sempre econtrado (às vezes é encontrado no material do lixo, mas o lixo é, em boa parte, esponja fúngica descartada).

Desta forma, fica indicada a necessidade de se complementar esses estudos iniciais (CURRIE et al. 1999a, CURRIE 2001a), e um complemento interessante seria avaliar prevalência e presença em colônias incipientes (poucos meses de idade) em diferentes épocas. Pelo nosso conhecimento, avaliação de presença e prevalência em diferentes épocas em colônias incipientes nunca foi realizada antes, e, para tal estudo, é mais interessante que seja feito em condições de campo, pois reflete uma condição mais natural do que em laboratório.

Os objetivos deste capítulo foram: (*i*) reavaliar as metodologias de detecção dos fungos, (*ii*) avaliar a presença e prevalência de fungos e rediscutir suas implicações, e (*iii*) reavaliar a distribuição de *Escovopsis* nas camadas da esponja fúngica. Para tanto, se utlilizou colônias incipientes de *Atta sexdens* L. de diferentes idades, em condições de campo, pois estas ainda não haviam sido avaliadas sob a ótica da ecologia do fungo *Escovopsis* (no campo).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Local das coletas

Escolheu-se como local de coleta uma área de cultivo de *Eucalyptus* spp., circundada por fragmento de mata nativa, infestada por colônias de *A. sexdens*, localizada no município de Botucatu-SP (22º49’53.25” S e 48º25’24.22” O). A taxa de infecção das colônias por *Escovopsis* foi hipoteticamente considerada como sendo provavelmente alta, devido à antiguidade da presença dessa formiga, sendo, portanto, uma área interessante para se realizar o presente estudo.

## 2.2 Marcação dos ninhos e coletas dos fungos

No fim da tarde de 21/10/2009, dia da revoada, foram marcadas cerca de 500 fundações de ninhos de *A. sexdens*. Foram escavados 20 ninhos a cada 45 dias, sendo que as primeiras escavações foram feitas no dia 05/12/2009. As esponjas fúngicas (com formigas e ou formas jovens), encontradas nas câmaras iniciais foram coletas assepticamente, para avaliar a presença (se é detectado em cada colônia) e a prevalência de *Escovopsis* em laboratório.

As escavações foram realizadas manualmente, utilizando-se chibanca, pás e espátulas, e consistiu de uma abertura de trincheiras rasas de aproximadamente 1 m de largura por 0,5 m de profundidade, alargada em direção ao centro do monte de terra solta e aprofundada conforme o aparecimento do túnel inicial e da câmara de fungo. Tomou-se se o devido cuidado com a esponja fúngica, para evitar contaminação.

As coletas das esponjas fúngicas, assépticas, foram realizadas com 45, 90 e 135 dias (pós-revoada). Com o auxilio de uma pinça, as esponjas, juntamente com as operárias presentes, eram colocadas em placas de Petri de poliestireno descartável (sem meio de cultura) e vedadas com parafilme. As placas eram acondicionadas em sacos plásticos, os quais foram colocadas em caixas térmicas e levadas para o laboratório.

Para se ter uma melhor idéia do volume do fungo, coletou-se 12 esponjas adicionais em cada época, sem assepsia, e mediu-se em provetas graduadas, e em seguida se descartou essas esponjas. Os volumes (média ± desvio padrão) encontrados foram de 6,3 ± 1,8 aos 45 dias, 12,3 ± 3,8 aos 90 dias, e 18,7 ± 4,5 mL com 135 dias.

### 2.3 Prevalência de *Escovopsis* e outros fungos

Primeiramente, se avaliou a prevalência de *Escovopsis* e outros fungos dentro dos jardins de fungo das formigas cortadeira com idades distintas (45, 90 e 135 dias).

No laboratório, de cada colônia vinda do campo, retirava-se 3 $mm^3$ do fragmento da esponja fúngica da parte mais nova, do meio e da mais velha, e se inoculava esses fragmentos individualmente (sem operárias), em 12 placas de placas de Petri com BDA e antibióticos (estreptomicina e penicilina G, Sigma, ~50 mg $L^{-1}$ cada), conforme Currie et al. (1999) e Currie (2001a), e fechadas com parafilme e mantidas em BOD a 25°C sem luz.

Estas placas eram inspecionadas diariamente, até 40 dias ou mais (dependendo do crescimento do fungo), se avaliando visualmente se ocorria o crescimento radial dos fungos além do inoculo inicial (segundo Gerardo et al. 2004 e NS Nagamoto, comunicação pessoal), repicando-se separadamente e assepticamente cada fungo morfologicamente distinto que crescia, em uma placa nova com BDA; quando necessário, repicava-se sucessivamente cada isolado até ficar em cultura pura, ou seja, com apenas um fungo crescendo em cada placa.

### 2.4 Localização do *Escovopsis* na esponja fúngica

Para determinar qual área o fungo parasita *Escovopsis* estaria agregado na esponja fúngica, no item anterior, foram retirados fragmentos (3 $mm^3$) de diferentes partes da esponja para a inoculação e com isto já se aproveitava, para marcar de onde estes fragmentos estavam sendo retirados. Determinou que os fragmentos fossem sempre retirados do topo (fungo novo), meio e do fundo (fungo velho) (CURRIE 2001b), e inoculados na seqüência até a décima segunda placa. Para se avaliar a presença do fungo parasita *Escovopsis* na partes distintas da "esponja fúngica", os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) ($\alpha$=0,05) e um teste *a posteriori* de Tukey HSD, se comparando a presença do *Escovospsis*

em relação a posição que se encontrava (Topo, Meio e Fundo) e se estas diferiram em relação às diferentes idades.

### 2.5 Presença de Escovopsis e outros fungos

Em seguida, a relação da idade e a presença de *Escovopsis* e outros fungos nas colônias de campo foram avaliadas.

Para essa verificação, utilizou-se: (i) os dados dos itens anteriores, apenas contabilizando de forma diferente: se cada fungo estava presente ou ausente nos 12 fragmentos de esponja (3 $mm^3$) de cada colônia, e (ii) para o restante da esponja fúngica que não foi inoculada para a verificação da prevalência (itens anteriores), o procedimento foi o seguinte: de cada esponja fúngica retirarou-se todas as formigas e pequenas porções de esponja sujas de terra (este material sujo foi descartado), constituindo cerca de 90% do volume da esponja fúngica original, foram colocadas em câmaras úmidas (uma placa de 50 a 60 (Ø) x 12 (altura) mm, dentro de uma placa de Petri de cerca de 100 x 16 mm, com adição de cerca de 20 ml de meio Agar água (como fonte de umidade) entre essas, e fechada com a tampa da placa de 100 mm, conforme capítulo 3 e NS Nagamoto et al., dados não publicados) sem operárias, e depois colocadas na BOD (25 ºC, sem luz). Considerando-se o volume das esponjas encontradas, o volume de cada esponja foi dividido em 2 câmaras quando estas tinham cerca de 10.000 $mm^3$ ou mais (tal fato ocorreu nas esponjas coletadas com 90 dias e 135 dias). Assim, considerando-se as três épocas, o volume de esponja em cada câmara variou de cerca de 3.000 $mm^3$ a 30.000 $mm^3$ (3 a 30 mL). O volume máximo utilizado para esse tipo de câmara úmida (capítulo 3; NS Nagamoto et al., dados não publicados) foi de ~30.000 $mm^3$ (NS Nagamoto et al., dados não publicados). Essas câmaras úmidas foram inspecionadas (crescimento de fungos para bem além da esponja – mais de ~10 mm, os quais

eram repicados em BDA e purificados) por ~30 dias; no fim desse período, quando não houve crescimento para além de ~10 mm, todos fungos morfologicamente distintos, ainda que com pequena expansão radial, também foram repicados e purificados.

### 2.7 Identificação dos fungos

As identificações realizadas nesse estudo foram seguindo os critérios classificatórios descritos na literatura (DOMSCH, et al. 1993; SAMSON, 2000), que levam em conta características morfológicas (macro e microscópicas) e ecológicas (habitat frequentemente encontrado), assim como literatura específica para o fungo mutualista (PAGNOCCA et al. 2001) e para *Escovopsis* (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990 e SEIFERT et al. 2005). Para as observações microscópicas, utilizou-se água glicerinada (40%) ou corante de azul de metileno como líquido de montagem (RODRIGUES, 2004).

Os isolados foram identificados e agrupados nas seguintes categorias: (*i*) fungo mutualista, baseado na presença de gongilídeos sob microscópio, (*ii*) em *Escovopsis*, baseado na macro-morfologia da colônia e na micromorfologia dos conidióforos, e (*iii*) "outros fungos" quando diferentes dos dois primeiros.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Prevalência fúngica

Através da avaliação da prevalência fúngica realizadas nos jardins de fungo, ficaram evidenciadas variações conforme a idade da colônia (45, 90 e 135 dias pós revoada).

Considerando a média de todas as colônias de cada época, o fungo parasita *Escovopsis* teve prevalência baixa, porém crescente, de 0, 3,2 e 12,3%, respectivamente aos 45, 90 e 135 dias após a revoada. Por outro lado, o *Leucoagaricus gongylophorus*

(mutualista), foi o fungo mais prevalente: 90,4, 64,7, e 69,5% (aos 45, 90, 135 dias, respectivamente). Os demais fungos, que inclui, por exemplo, *Trichoderma* spp., foram mais prevalentes na segunda época do quê na terceira: 9,6% (45 dias), 32,1% (90 dias) e 18,2% (135 dias); diferentemente de *Escovopsis*, que foi mais prevalente na terceira do quê na segunda época **(Figura 1)**.

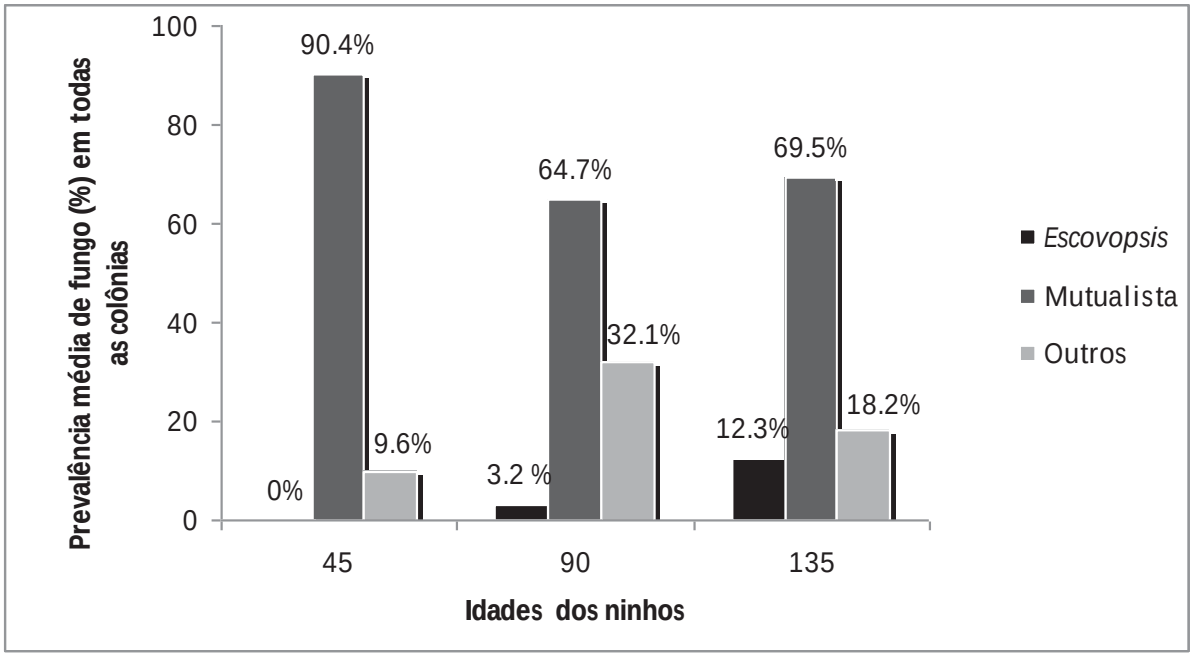


**Figura 1:** Porcentagem de fragmentos inoculados em meio BDA com crescimento do fungo parasita *Escovopsis*, do fungo mutualista, e de outros fungos em colônias de campo de *Atta sexdens* (prevalência média considerando todas as colônias; N = 20).

### 3.2 Localização de *Escovopsis* na esponja fúngica

Para a prevalência do fungo parasita *Escovopsis* avaliada em diferentes posições na esponja fúngica em relação a idade (Topo, Meio e Fundo), se verificou que não há diferença significativa (ANOVA, F=2,11 e p=0.4178) **(Figura 2, Tabela 1),** sendo as posições iguais**.**

No entanto, para resultados avaliados para as diferentes idades em relação a prevalência do fungo parasita *Escovopsis*, ficou demonstrado que houve diferença

significativa (ANOVA, F= 11.92 e p= 0.000), sendo que aos 135 dias a prevalência do fungo parasita *Escovopsis* foi maior do que para os ninhos coletados com 90 dias.

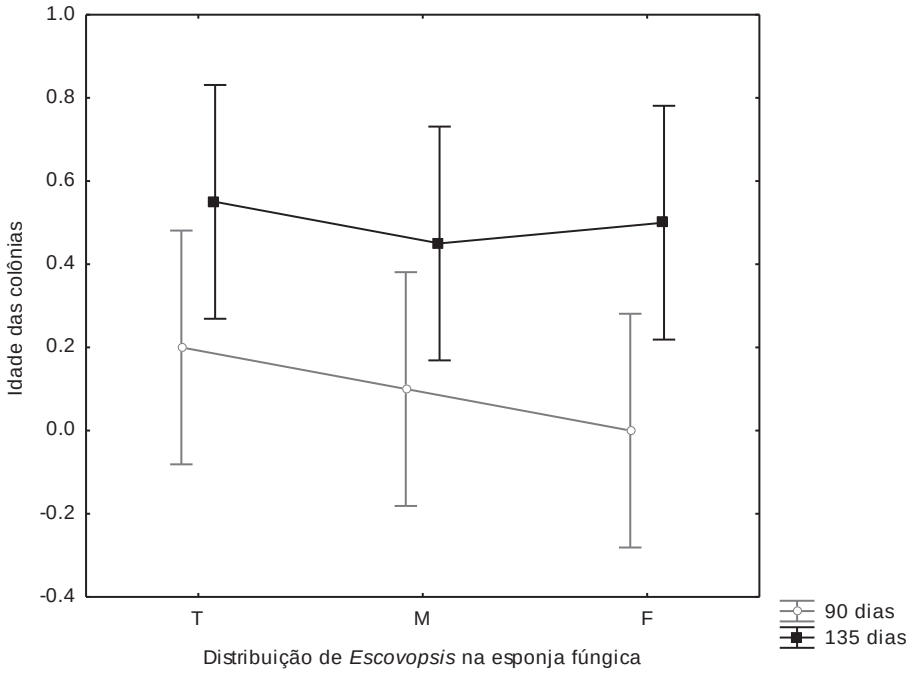


**Figura 2.** Comparação da prevalência de *Escovopsis* em relação localização em diferentes partes na esponja fúngica (Topo, Meio e Fundo).

**Tabela 1:** Resultado do teste *a posteriori* (Tukey α= 0,05), para a prevalência de *Escovopsis* em diferentes partes da esponja fúngica.

| Tukey (valor de p) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 9 0 | | | 135 | | |
| Idade | Posição | T | M | F | T | M | F |
| 90 | T | ---- | 0.996219 | 0.996219 | 0.505838 | 0.813243 | 0.668155 |
| 90 | M | 0.996219 | ---- | 0.996219 | 0.226840 | 0.505838 | 0.352607 |
| 90 | F | 0.918175 | 0.996219 | ---- | 0.075186 | 0.226840 | 0.135282 |
| 135 | T | 0.505838 | 0.226840 | 0.075186 | ---- | 0.996219 | 0.999881 |
| 135 | M | 0.813243 | 0.505838 | 0.226840 | 0.996219 | ---- | 0.999881 |
| 135 | F | 0.668155 | 0.35607 | 0.135282 | 0.999881 | 0.999881 | ---- |

### 3.3 Presença do fungo parasita *Escovopsis*, mutualista, e outros fungos nas colônias de *Atta sexdens*

Os resultados de presença obtidos através de inoculação em BDA (**Figura 3**) diferiram bastante em relação ao método da câmara úmida (**Figura 4**), principalmente para o fungo mutualista e outros fungos. O fungo mutualista foi muito menos isolado em câmara úmida. Os outros fungos foram mais detectados aos 90 e 135 dias em BDA e 45 e 90 dias na câmara úmida.

Quanto ao *Escovopsis*, esteve ausente aos 45 dias, para os dois métodos apresentados. Aos 90 dias, esse fungo foi detectado em quantidade similar de colônias no método de câmara úmida se comparado com o em BDA, porém foi mais eficientemente detectado aos 135 dias em câmara úmida, sendo detectado em 85% das colônias, contra apenas 55% em BDA.

Levando em conta a somatória dos dois métodos de avaliação de presença (**Figura 5**), a taxa de colônias infectadas por *Escovopsis* teve tendência crescente ao longo do tempo; enquanto que os outros fungos tiveram sempre alta taxa de presença. Quanto ao fungo mutualista foi quase 100% presente em todas as épocas (esteve ausente em apenas uma colônia aos 45 dias).

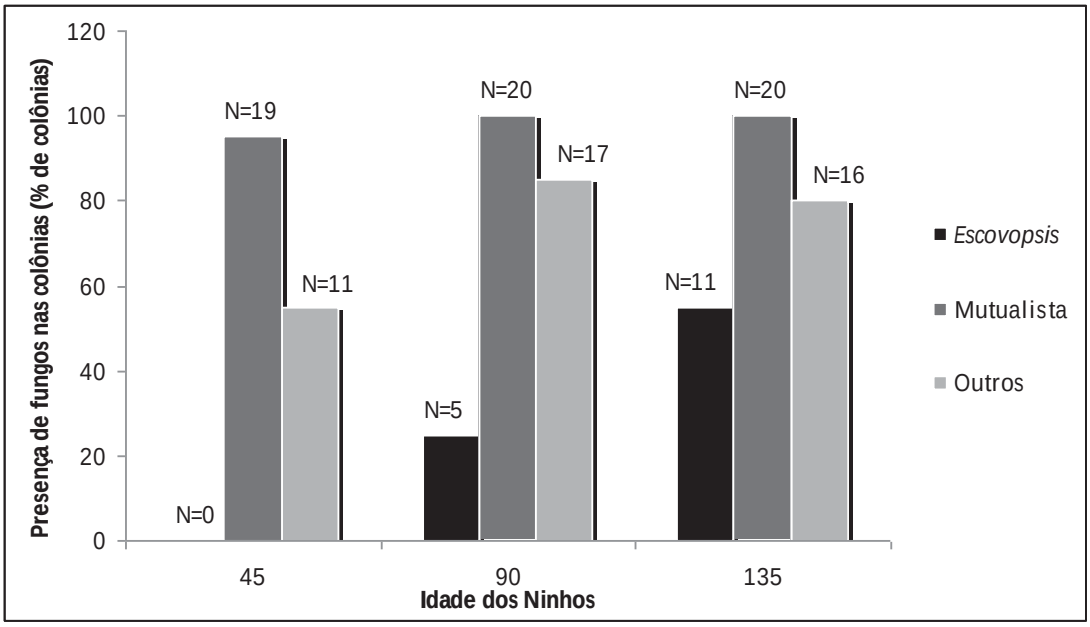


**Figura 3:** Presença do fungo parasita *Escovopsis*, fungo mutualista, e outros fungos, em colônias de campo de *Atta sexdens* (N = 20) através da inoculação de 12 fragmentos (3 $mm^3$) de esponja fúngica por colônia.

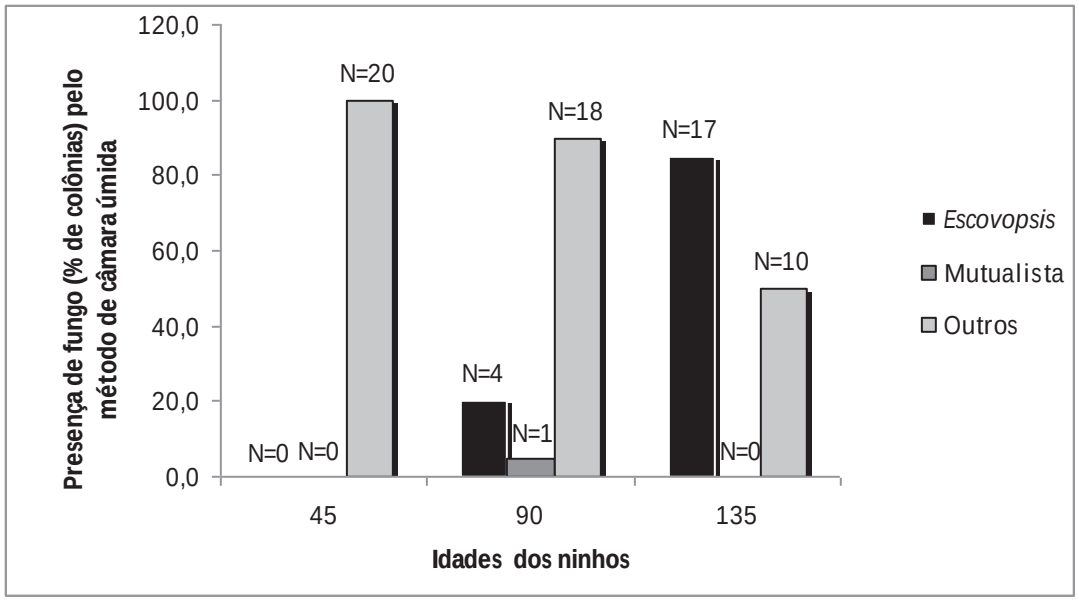


**Figura 4:** Presença de fungos em colônias de *Atta sexdens* (% de colônias; N = 20) pelo método de câmara úmida, com amostragem de ~90% da esponja de cada colônia.

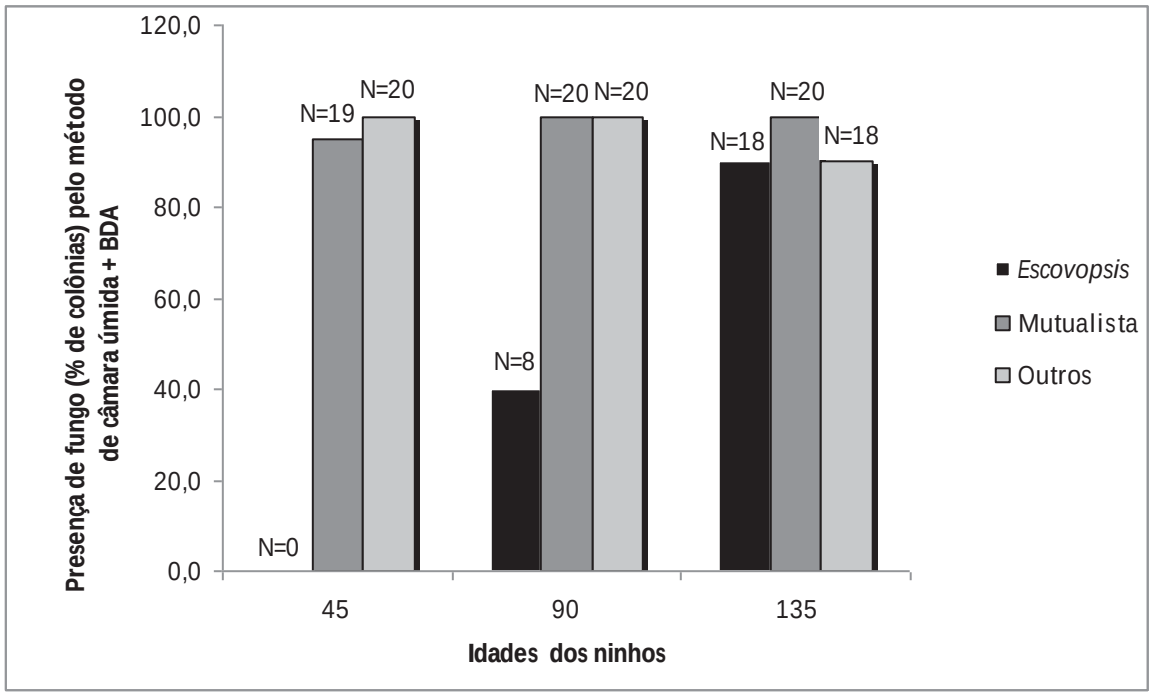


**Figura 5:** Presença de fungos nas colônias de *Atta sexdens* (% de colônias; N = 20) pelo método de câmara úmida, com amostragem de ~90% da esponja de cada colônia + dados da inoculação de 12 fragmentos (3 $mm^3$) de esponja fúngica por colônia.

## 4. DISCUSSÃO

O presente trabalho contribui ao apresentar dados mais detalhados, embora mais específicos e restritos do quê os primeiros trabalhos de ecologia de *Escovopsis* (CURRIE et al. 1999; CURRIE 2001a). Não existe, na literatura, um método pré-definido e eficiente de como se avaliar a presença desse parasita nas colônias, o que pode ser potencialmente problemático, pois colônias inicialmente consideradas livres do parasita podem, na verdade, estar infectadas (GERARDO et al. 2004); além disso, alguns resultados apresentados inicialmente (CURRIE et al. 1999; CURRIE 2001b), vem sendo alvo de questionamentos (NAGAMOTO et al. 2003; NAGAMOTO et al., dados não publicados), de forma que considera-se importante repetir alguns estudos em condições diferentes, utilizando-se colônias de espécies diferentes, com idades distintas, tal como no presente trabalho.

### 4.1. Detecção dos fungos presentes: métodos

O objetivo de detecção de presença de *Escovopsis* é originalmente feita através de fragmentos de ~3 a 8 $mm^3$ de esponja fúngica inoculados no meio de cultura BDA contendo antibióticos, com incubação de até 30 dias, mas sendo 10 dias geralmente suficiente (CURRIE et al. 1999; CURRIE 2001a; GERARDO et al. 2004). Porém, o uso de 10-12 fragmentos por colônia freqüentemente nem sempre é suficiente, pois, em alguns casos, mesmo não detectado inicialmente nesses fragmentos, se detecta *Escovopsis* posteriormente (GERARDO et al. 2004); por esse motivo, Currie et al. (1999) procedeu, em períodos distintos, avaliando vários isolamentos de cada colônia para saber se a colônias estava realmente livre do parasita. Além disso, num estudo aonde se utilizou fragmentos de ~30 $mm^3$ em BDA (NS NAGAMOTO et al., dados não publicados), *Escovopsis* chegou a crescer depois de 10 dias, embora isso seja bem pouco freqüente. Esse crescimento tardio, provavelmente ocorreu devido ao crescimento de bactérias ao redor do inóculo, nos primeiros dias após a inoculação, formando colônias facilmente visíveis a olho nu, o quê inibiu temporariamente o crescimento de fungos em geral, inclusive *Escovopsis* (NS NAGAMOTO, comunicação pessoal). Após a inoculação, a esponja tende a absorver água, e como o crescimento de bactérias ocorre mesmo se usando meio agar-água com antibióticos, portanto deve crescer através dos nutrientes provindos no próprio inóculo, que no caso de ~30$mm^3$ ou mais, já pode ser suficiente para, muitas vezes suportar grande crescimento bacteriano e, nos casos aonde as bactérias não dominam completamente o inóculo, essa esponja pode servir como reservatório de fungos, que podem crescer, tardiamente, após a degradação da colônia de bactérias (NS NAGAMOTO, comunicação pessoal). Por outro lado, esse luxuriante crescimento bacteriano nunca ocorre na câmara úmida utilizada no presente trabalho, provavelmente porquê não há contato físico do inóculo com o ágar-água, a fonte de umidade (NS NAGAMOTO, comunicação pessoal).

No presente trabalho, o isolamento em câmara úmida através de fragmento de 3.000 a 30.000 $mm^3$ (na verdade, um agrupamento feito artificialmente a partir de fragmentos bem menores), foi muito menos eficiente para se isolar o fungo mutualista do quê fragmento de ~3$mm^3$ em meio de cultura. Isso se deve ao fato de quê o mutualista possui um crescimento relativo muito mais lento do que alguns microfungos tais como *Escovopsis*, *Trichoderma* ou *Cladosporium* (RODRIGUES 2004; PAGNOCCA et al. 2008), sendo o mutualista, na ausência das formigas, geralmente sobreposto facilmente por tais fungos se esses estiverem presentes. Logicamente, existem fungos ainda mais lentos do quê o simbionte como, por exemplo, *Phomopsis quercella* e um fungo endofítico que ocorre em folhas de carvalho (*Quercus* spp.) (FISHER et al. 1996).

Para *Escovopsis* na coleta dos 135 dias, o isolamento em câmara úmida (~3.000 a ~60.000 $mm^3$ por colônia) foi mais eficiente que o isolamento de 12 fragmentos de ~3 $mm^3$ em BDA (~36 $mm^3$ por colônia). Esse resultado é interessante, pois nos resultados de Fisher et al. (1996), aonde se utilizou fragmentos menores, quase sempre de até 2 $mm^3$ (separaram cada fragmento vegetal original, inoculando-os individualmente), numa das colônias estudadas, se encontrou *Escovopsis* no lixo, mas não nos isolamentos em meio de cultura de fragmentos de esponja dessa mesma colônia. Dessa forma, levando em conta também os resultados do presente trabalho, consideramos que, ao contrário do mutualista, que é praticamente onipresente na esponja fúngica, os outros fungos provavelmente tem distribuição muito mais localizada. Essa colocação não é invalidada pelos dados que apresentaram na porção basal da esponja mais *Escovopsis* que a porção superior (CURRIE 2001a; NS NAGAMOTO et al., dados não publicados) pois isso é, sob essa ótica, um mero detalhe.

Por outro lado, aos 90 dias, inesperadamente, o isolamento em BDA foi de similar eficiência para avaliar a presença, e, além disso, na maioria das colônias *Escovopsis* só foi

detectado em um único método (Figura 3 *vs* Figura 4 *vs* Figura 5), de forma que somando-se os dois métodos, o número das colônias aonde se detectou o parasita quase dobra. Sendo a transmissão horizontal de *Escovopsis* rápida e eficiente (capítulo 3), considera-se que, uma vez finda a fase claustral, as colônias podem, em alguns casos, ser sucessivamente infectadas pelo parasita, o quê tende, aos poucos, aumentar a prevalência desse fungo na colônia, pelo menos enquanto essa colônia for bem pequena, visto que colônias com 3-4 anos de idade tem menos *Escovopsis* que de 1-2 anos (CURRIE 2001b). Assim sendo esse nosso resultado aos 90 dias sugere que a distribuição de *Escovopsis* nessa época é diferente da do usual como aos 135 dias no presente trabalho e em outro estudo (NS NAGAMOTO et al., dados não publicados), provavelmente isso está relacionado, de alguma forma, com a peculiar distribuição dessa bem recente infecção.

Dessa forma, nos casos aonde é aceitável uma amostragem destrutiva, é mais lógico amostrar um volume total muito maior do quê, por exemplo, de 30 a 96 $mm^3$ por colônia (respectivamente, 10 fragmentos de ~3 $mm^3$ e 12 fragmentos de ~8 $mm^3$) como feito em CURRIE et al . 1999; CURRIE 2001a; GERARDO et al. 2004. Já que, no presente trabalho, amostrar ~90% da esponja em câmara úmida não foi muito eficiente para 90 dias, se for um estudo de presença de *Escovopsis* em colônia com idade próxima a essa, a sugestão é amostrar 100% do fungo, ignorando a possibilidade de *Escovopsis* estar presente no solo e muitas vezes acabar ficando aderido na esponja (muitas vezes é difícil de se evitar essa adesão, especialmente quando o solo está muito úmido ou quando a esponja se esfarela na retirada). Na verdade, aparentemente, é muito mais provável que o parasirta esteja presente apenas na esponja e lixo, não estando presente no solo da parede da câmara, visto que o modo de contaminação mais provável é a migração de animais entre colônias (CURRIE 2001b; capítulo 3; POULSEN & CURRIE 2006; RODRIGUES et al., aceito), de forma que o solo aderido pode influir na detecção de outros microfungos mas não o de *Escovopsis*.

### 4.2. Presença e prevalência de fungos e suas implicações

Os dados obtidos de presença reforçam a dedução (capítulo 3), de quê o parasita infecta rapidamente, pois com 45 dias está ausente e com 90 dias, 40% das colônias estão infectadas. A reabertura do canal principal tende geralmente ocorrer entre 71 a 94 dias, podendo variar um pouco conforme o ano (AUTUORI 1941; FORTI & BOARETTO, 1997; NS NAGAMOTO, comunicação pessoal). Mesmo com alguma variação, tendo a reabertura média ocorrido, por exemplo, a cerca de 5, 10, ou 15 dias antes da avaliação de 90 dias, de qualquer forma, certamente pode-se considerar que uma taxa de infecção de 40% das colônias pelo parasita foi rápida para esse curto período de tempo. Currie et al. (1999) reportaram 6,6% de presença em colônias logo após a fase claustral, mas como não se especificou a idade dessas colônias, e amostrou apenas pequenas porções das esponjas fúngicas para se detectar o parasita, tornou-se difícil comparar os dados com o presente trabalho.

Além disso, a ausência do parasita nas rainhas durante a revoada (CURRIE et al., 1999a; PAGNOCCA et al., 2008; capítulo 3), nos jardins de fungo, com cerca de 45 dias (CURRIE et al., 1999a; presente trabalho), e no solo da parede da câmara de fungo (RODRIGUES et al., aceito) indicam que este parasita não é freqüentemente presente no solo e reforçam a estreita associação desse fungo com as esponjas das colônias das formigas (CURRIE et al., 1999ab; capítulo 3 da presente Tese). Dessa forma, a resposta para o aumento da presença e talvez até mesmo da prevalência do fungo parasita *Escovopsis* nestas épocas (90 e 135 dias), está relacionado, provavelmente, de forma específica com à migração de animais entre colônias (CURRIE 2001b; POULSEN & CURRIE 2006). Um possível exemplo de transmissores seriam os ácaros, os quais, ao que tudo indica, são importantes agentes dispersores de *Escovopsis* em laboratório (NS NAGAMOTO, comunicação pessoal). Por outro lado, algum outro processo ainda não relatado, que não sejam a transmissão por animais, ainda não pode ser descartado (CURRIE 2001b; POULSEN & CURRIE 2006).

Currie et al. (1999) reportaram que, em formigas cortadeiras, a prevalência de microfungos foi de ~27%, e que deste total, ~73% foi de *Escovopsis*, ou seja, a prevalência desse parasita foi de ~20%. No estudo posterior, Currie (2001a) encontrou valores de 18,2 a 50,0% de prevalência no campo, sendo que nesses dados de campo, não há a especificação da idade das colônias, o quê dificulta um maior aprofundamento na discussão desses dados no presente trabalho. Nesses trabalhos citados, a determinação de prevalência em colônias de idade conhecida foi feita apenas no experimento de laboratório aonde se verificou o impacto da aplicação de *Escovopsis* em colônias de poucos meses de idade, sendo que a prevalência foi de ~43%, ou seja, em condições que podem ser consideradas substancialmente diferentes das naturais.

Assim, pelo nosso conhecimento, no presente trabalho, se reportou, pela primeira vez, a prevalência em colônia de idade conhecida em condições naturais. É interessante que a prevalência foi relativamente baixa (3,2 e 12,3%), mesmo com taxa de presença de 40 e 90% (respectivamente, 90 e 135 dias), quê sugere que o impacto do parasita não seja muito grande nas colônias iniciais, pelo menos nos primeiros 135 dias de idade. Assim, o presente trabalho vai de encontro com outros trabalhos posteriores (NAGAMOTO et al., 2003; NAGAMOTO et al., dados não publicados), aonde ficou evidenciado que a infecção pelo parasita não necessariamente impede o crescimento das colônias, e nem necessariamente a prevalência é alta (muitas vezes seria menor que os 18 a 50% de CURRIE et al., 1999a e CURRIE, 2001a).

Por outro lado, esses trabalhos de Nagamoto et al. (2003) e Nagamoto et al. (dados não publicados) se baseiam em colônias que, apesar de pequenas, tinham mais idade do que os de Currie (2001a) (mais de 8 meses em Nagamoto et al. *vs* ~3-4 meses em Currie) e os do presente trabalho só foi executado até 135 dias (~4,5 meses). Dessa forma, não pode, ainda, descartar totalmente que o parasita pode ser, com freqüência, altamente prevalente e causar grande impacto (CURRIE, 2001a); apenas ressalva-se novamente que a sugestão das colônias

infectadas não sejam capazes de crescer (CURRIE et al., 1999a e CURRIE, 2001b) como pouco provável, de forma que a hipótese das colônias se tornarem mais resistentes com o decorrer da idade ou tamanho, como uma hipótese um pouco mais provável do quê era em 2001 (CURRIE, 2001b). Assim, os dados detalhados no que concerne à correlação com o impacto nas colônias, na verdade é bem escasso, o que demanda mais estudos futuros.

Considerando-se, globalmente, os dados de presença e prevalência os dados deste e dos trabalhos anteriores, indicam que o padrão geral, no início, é: se iniciar com baixa presença (CURRIE et al., 1999a; presente trabalho) e prevalência (presente trabalho) logo após a reabertura dos canais; sendo que em poucas semanas após, já aumenta bastante a presença e substancialmente a prevalência (135 dias, presente trabalho). Porém, além disso, ainda não se pode fazer afirmações mais conclusivas, pois apesar de que foi relatado que, com 1-2 anos (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001a), essa taxa foi menor (do que aos 135 dias no presente trabalho): 58,2 (CURRIE et al., 1999a) a ~45% (CURRIE, 2001b), e que tende a diminuir ainda mais nos anos seguintes (CURRIE, 2001b), estas podem ser sub-estimativas devido a baixa amostragem, sendo assim, hipoteticamente possível que seja um equívoco, ao invés de uma tendência verdadeira devido à menor amostragem de % da esponja fúngica total da colônia conforme a idade (as colônias maiores tiveram menor % de volume de esponja amostrada).

Dessa forma é difícil correlacionar a prevalência de *Escovopsis* com a mortalidade muito alta das colônias no primeiro ano (AUTUORI 1941, 1942, CARDOSO, 2010). No presente trabalho, se evidenciou que, num período relativamente curto, de 45 dias (entre 90 e 135 dias), já ocorre aumento da prevalência. Assim, existe correlação da prevalência de *Escovopsis* com a alta mortalidade inicial das colônias, embora, à primeira vista, não se possa afirmar se essa prevalência de 12,3 a 50% (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001a; presente trabalho) seria causa ou efeito, pois o parasita poderia, hipoteticamente, atuar geralmente

apenas como um mero oportunista. Propõe-se, como hipóteses dessa correlação existir: *(i)* as colônias, nos primeiros meses de idade não estariam mais suscetíveis ao parasita, apresentando assim prevalência e presença similar às colônias mais velhas, tendo assim o parasita um papel secundário na mortalidade das colônias, aonde outros fatores como competição intra e interespecífica, predação, inimigos naturais, fungos entomopatogênicos, encharcamento das colônias e seca também seriam fatores importantes (DELLA LUCIA, 1993), e que o aumento da prevalência estaria mais relacionado com recontaminações sucessivas, visto que a migração de animais entre colônias certamente é um processo contínuo; ou *(ii)* o parasita teria papel importante na mortalidade dessas colônias iniciais, inclusive sendo este capaz de, uma vez presente, aumentar a prevalência mesmo nas colônias que acaso escapem de novas contaminações por esse parasita.

### 4.3. Distribuição nas camadas da esponja fúngica

As operárias continuamente adicionam novos substratos, principalmente no topo do jardim, enquanto o fungo velho é removido principalmente do fundo, para ser descartado no lixo. Portanto, era de se esperar que os resultados demonstrassem que a prevalência deste fungo parasita fosse maior nas partes mais velhas do fungo do que no Topo, tal como foi observado por Currie (2001a). No entanto, não houve diferença de distribuição no presente trabalho, portanto isso enfraquece uma hipótese alternativa à transmissão desse parasita por animais: a de quê esse microfungo estaria presente na vegetação adicionada ao jardim. Acredita-se que as operárias das formigas cortadeiras tentam suprimir ou eliminar o parasita *Escovopsis* através de uma associação mutualística com bactérias actinomicetas produtoras de antibiótico e também pela remoção mecânica do parasita. Portanto, ainda são necessários mais estudos para se entender melhor como ocorre a distribuição de *Escovopsis* dentro da

esponja fúngica, assim como a respeito dos fatores que levam a uma distribuição diferenciada (CURRIE 2001b) ou não diferenciada (presente estudo).

## 5. REFERÊNCIAS


Autuori, M. 1941. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.–Hymenoptera: Formicidae). I–Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**. 12:197–228.

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. **Introductory mycology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 880p.

Barnett, H.; Hunter, B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4 ed. St. Paul: **The American Phytopathological Society**, 218p.

Brandão, C. R. F.; Mayhé-Nunes, A. J. 2002. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3B, p. 639-665.

Camargo, R.S.; Forti, L.C.; Rocha, M.M.; Matos, C.A.O.; Lopes, J.F.S.; Andrade, A.P.P.; Verza, S. S. 2003. The effect of plant diversity on fungus garden development and foraging behavior of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology,** 42:(2).

Cardoso, S.R.S. 2010. **Morfogênese de ninhos iniciais, mortalidade de *Atta* spp. (Hymenoptera, Formicidae) em condições naturais e avaliação da ação de fungos entomopatogênicos**. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 149p.

Currie CR, Muller UG, Malloch D, 1999. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 7998-8002.

Currie CR, 2001a. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, 55: 357-380.

Currie, C.R. 2001b. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**. 128: 99-106.

Currie C.R., Wong B., Stuart A.E., Schultz T.R., Rehner S.A, Mueller U.G., Sung G.H., Spatafora J.W., Straus N.A. 2003. Ancient tripartite co-evolution in the attine ant–microbe symbiosis. **Science**. 299:386–388.

Della Lucia, T. M. C.; Fowler, H. G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p. 1-3.

Della Lucia, T. M. C.; Fowler, H. G.; Moreira, D. D. O. Espécies de formigas cortadeiras no Brasil. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993a, p. 26-31.

Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T.H. **Compendium of soil fungi.** London: Academic, 1980. 859 p.

Fisher, P.J.; Stradling, D.J.; Pegler, D.N. 1994a. *Leucoagaricus basidiomata* from a live nest of the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycological Research**; Cambridge, v.98, n.8, p.884-888.

Fisher, P.J.; Stradling, D.J.; Pegler, D.N. 1994b. Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist**, Cambridge, v.8, n.3, p.128-131.

Fisher, P.J., Stradling, D.J., Sutton, B.C., Petrini, L.E. 1996. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, v.100, p.541-6.

Fowler, H. G. et al. Major ant problems of South America. In: VANDEER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. (ed.) **Applied Myrmecology: A world perspective.** Boulder, San Francisco & Oxford: Westview Press, 1990. p. 3-14.

Gerardo, N.M., Mueller, U.G., Price, S.L., Currie, C.R. 2004. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**. 271: 1791–1798.

Hölldobler, B.; Wilson, E.O. **The Ants.** Harvard, MA: Harvard University Press, 1990. 732p.

Kreisel H. Pilze aus Pilzgarten Von *Atta insularis* in Kuba. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie.** 12:643–54, 1972.

Mikheyev, A.S., Mueller, U.G. And Boomsma, J J. 2007. Population genetic signatures of diffuse co-evolution between leafcutting ants and their cultivar fungi. **Molecular Ecology** 16(1):209– 216.

Moller, A. As hortas de fungo de algumas formigas Sul - Americanas. Trad. De A. P. Viégas e E.M. Zink. Rio de Janeiro: [s.n.], 1941. p.120. Tradução de: Die Pilzgaerten Einiger Sueda Merikanischer Ameisen. **Publicado na revista de Entomologia**, supl. N.1

Muchovej, J.J.; Della Lucia, T.M. & Muchovej, R.M. 1991. *Leucoagaricus weberi* sp nov. from a live nest of leaf-cutting ants. **Mycological Research**, 95: 1308-1311.

Muchovej, J. J. & Della Lucia, T. M. C. **Mycotaxon** 37**,** 191–195pp., 1990.

Mueller, U. G.; Schultz, T. R.; Currie C. R.; Adams, R. M. M.; Malloch, D. 2001. The origin of the attine ant-fungus symbiosis. Quarterly Review of Biology , New York, v.76, n. 2, p. 169-197.

Nagamoto, N. S.; Rocha, M. M.; Forti, L. C.; Boaretto, M. A. C.; Camargo, R. S.; Andrade, A. P. P.; Lopes, J. F. S. Reavaliação do impacto do fungo parasita *Escovopsis* em colônias de formigas cortadeiras, mantidas em laboratório. 2003.

Pagnocca, F.C., Bacci, M., Fungaro, M.H., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., Sant´Anna, A. & Cappellari, M. 2001. RAPD analysis in basidiomata found in a nest of the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*, Santschi. **Mycological Research**, 105: 173-176.

Pagnocca F.C., Rodrigues A., Nagamoto N.S. & Bacci, M. Jr. 2008. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leafcutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**. 94:517–526.

Poulsen, M., Currie, C.R. 2006. Complexity of insect-fungal associations: exploring the influence of microorganisms on attine ant-fungus symbiosis. In: Bourtzis K., Miller TA (eds.) **Insect Symbiosis**, vol 2. CRC Press, Newbury, pp 57–77.

Rodrigues, A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de Atta sexdens rubropilosa Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.** 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2004.

Rodrigues, A., F. C. Pagnocca, O. C. Bueno, M. Bacci, M. J. A. Hebling, And L. H. Pfenning. Contaminação de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) com esporos de fungos filamentosos. 2004. Arquivos do Instituto Biológico São Paulo, 2004.71:225–227.

Rodrigues A., M.R.Z. Passarini, M. Ferro, N.S. Nagamoto, L.C. Forti, M. Bacci Jr, L.D. Sette & F.C. Pagnocca. Fungal communities in nest soils of leaf-cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, aceito.

Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. Introduction to food-airborne fungi, 6th edn. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Baarn, 2000.

Seifert K.A., Samson R.A., Chapela I.H. 1995. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia** 87:407–13.

Schmid- Hempel, P. Parasites in social insetos. New Jersey: Princeton University Press, 1998. 409p.

Schultz, T.R.; Meier, R. 1995. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology Oxford**, v. 20, n. 4, p. 337-370.

Singer R. **The *Agaricales* in Modern Taxonomy**. Konigstein, Ger.: Koltz Scientific Books,1986.

Weber, N.A. 1955. Pure cultures of fungi produced by ants. Science, Washington, v.121, n. 3134, p.109.

Weber, N.A. 1979 Fungus culturing by ants. In: Batra, L.R. Insect-fungus symbiosis, mutualism and commensalism. **New York: John Willey & Sons**. p. 77-116.

Weber, N.A. 1972. **Gardening Ants:** *The Attines*. American Philosophical Society, Philadelphia. 146 pp.

Weber, N.A. 1972b. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**. 12: 577-587.

Weber, N.A. 1982. Fungus Ants. In: *Social Insects, IV* (H. Hermann, Ed.), **Academic Press**, New York, pp. 255–363.

Wilson, E.O. The insect societies. 4th ed. **Cambridge: Belknap**. Press, 1976. 548p.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

# Considerações Finais

Através dos resultados apresentados concluímos que:

1- As quatro espécies (*Atta sexdens, Atta laevigata, Atta bisphaerica* e *Atta capiguara*) estudadas através das técnicas de morfometria e morfometria geométrica, tiveram um alto grau na separação das espécies, tanto nas análises realizadas para o corpo, quanto para as asas. Conclui-se que a separação das espécies foi mais eficiente para a forma da asa do que para o corpo, demonstrando-se ser uma estrutura geneticamente e morfologicamente boa na separação das espécies, sendo as características apresentadas neste estudo pontos chaves para serem utilizadas (a mesma ou similar metodologia) em novos estudos.

2- Além disso, procuramos entender a morfologia dos ninhos iniciais, analisando o seu crescimento em períodos distintos (45, 90 e 135 dias). Concluiu-se, que não ocorrem modificações em relação à profundidade das câmaras, para todas as idades se mantiveram na mesma profundidade, provavelmente isto pode estar relacionado com o tipo de solo. Deste modo só foram observadas diferenças em relação à ampliação (comprimento, largura, altura e volume) das câmaras, o que nos mostra que com o surgimento de novos indivíduos e o aumento substancial do fungo mutualístico, as primeiras operárias tenham que aumentar as câmaras (comprimento, largura, altura e volume), para que possa suportar seu desenvolvimento e posteriormente aumentar o número de câmaras.

3- Estudos recentes demonstraram que este fungo mutualístico é parasitado por um fungo parasita chamado do gênero *Escovopsis*. Em nosso estudo foi possível observar que o fungo parasita não é trazido pelas rainhas, no pellet que elas carregam em sua cavidade infrabucal. Deste modo concluímos que o fungo parasita *Escovopsis* é transmitido verticalmente, ou seja, a contaminação da colônia não ocorre da colônia mãe para a filha.

4- Contudo, nossos estudos confirmam as propostas anteriores, demonstrando que o fungo parasita *Escovopsis* analisados em diferentes idades (45, 90 e 135 dias), não se obtivemos sua presença e prevalência com 45 dias, sendo estes observados apenas com 90 e 135 dias, quando o as colônias já estão abertas e as primeiras operárias começam a sair para forragear. Este fungo não está presente no solo, se não teríamos a presença e prevalência com 45 dias. A hipótese mais plausível para a infecção de novas colônias continua sendo o transporte de esporos de *Escovopsis* através da migração de animais entre colônias.