

**COMPORTAMENTO DE CUIDADO DA PROLE DA  
SAÚVA-LIMÃO *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908  
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

**MARCELO DE OLIVEIRA SCHNEIDER**

*Orientador.* **Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO**

RIO CLARO  
Estado de São Paulo - Brasil  
Setembro / 2003

**COMPORTAMENTO DE CUIDADO DA PROLE DA  
SAÚVA-LIMÃO *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908  
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

MARCELO DE OLIVEIRA SCHNEIDER

*Orientador.* Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Zoologia).

RIO CLARO  
Estado de São Paulo - Brasil  
Setembro / 2003

Este trabalho é dedicado à minha admirável avó,  
**Carmen de Mello Schneider**, por toda sua força e  
perseverança, carinho e compreensão, pela  
incrível capacidade de auxiliar a todos ao seu  
redor sem jamais necessitar de algo em troca  
ou sequer perder o bom humor e a fé.

Above the planet on a wing and a prayer  
My grubby halo, a vapour trail in the empty air  
Across the clouds I see my shadow fly  
Out of the corner of my watering eye  
A dream unthreatened by the morning light  
Could blow this soul right through the roof of the night

There's no sensation to compare with this  
Suspended animation, state of bliss  
Can't keep my mind from the circling sky  
Tongue-tied and twisted just an earth-bound misfit, I

Pink Floyd – Learning to Fly

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno pela orientação, atenção, paciência, incentivo, e força durante todo esse tempo de trabalho e aprendizado em conjunto. Por estar sempre acessível e presente.

À minha querida esposa Vívian de Oliveira Schneider por todo o amor, companheirismo e cumplicidade de todos esses anos. Te amo muito.

Aos meus pais Marilena e Sérgio e ao meu irmão Bruno, por todo o apoio, amor e atenção a qualquer hora. Muito obrigado por estarem sempre por perto, não importando a distância física entre nós.

Aos Profs. Drs. Maria José Hebling, Fernando Pagnocca, Maurício Bacci Jr., Osmar Malaspina e Mário Palma do Centro de Estudos de Insetos Sociais por estarem sempre dispostos a auxiliarem e acessíveis a qualquer discussão.

A todos os amigos e colegas do CEIS pelo companheirismo em horas de aventuras, dificuldades e também de muitas alegrias, especialmente a Itamar e Necis, sempre muito gentis e prontas a ajudar com o que for possível.

Aos professores dos Departamentos de Biologia e Zoologia e às secretárias e técnicos que auxiliam tanto nosso trabalho, meu muito obrigado.

Aos colegas de pós-graduação do Departamento de Biologia, entre os quais fiz grandes amigos que sempre farão parte de minha vida. Obrigado pelo companheirismo.

E finalmente agradeço às pessoas que de alguma forma ou de outra me auxiliaram ou incentivaram à carreira científica como Dr. Jorge A. Guimarães, Dr. Warwick E. Kerr, Dra. Irene Terry, Dr. Dominique Fresneau e Carol Bender, entre tantas outras pessoas brilhantes cujos caminhos já cruzaram com os meus.

## ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Coleta e manutenção das colônias.....	13
3.2. Observações comportamentais.....	14
3.3. Coleta do líquido proctodeal das larvas.....	19
3.3.1. Preparo de capilares para a coleta de material.....	19
3.3.2. Coleta de larvas e de seu líquido proctodeal.....	19
3.4. Análise do fluido proctodeal de larva.....	21
3.4.1. Análise química.....	21
3.4.2. Análises bioquímicas.....	21
3.4.2.1. Determinação de proteínas.....	22
3.4.2.2. Determinação de glicose.....	22
3.4.2.3. Atividade sobre dissacarídeos.....	22
3.4.2.4. Atividade sobre polissacarídeos.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Observações gerais.....	25
4.1.1. Indivíduos da colônia.....	25
4.1.1.1. Ovos.....	26
4.1.1.2. Larvas.....	27
4.1.1.3. Pré-pupas e pupas.....	31
4.1.1.4. Adultos.....	33
4.1.1.4.1. Idade das operárias.....	33
4.1.1.4.2. Polietismo etário.....	33
4.1.1.4.3. Polimorfismo.....	36
4.1.2. Distribuição de estágios imaturos no jardim de fungo.....	37
4.2. Quantificação dos comportamentos.....	39
4.3. Limpeza.....	44
4.3.1. Limpeza de indivíduos adultos.....	45
4.3.2. Limpeza de imaturos.....	46
4.4. Fluxo de alimento.....	48
4.4.1. Ovos tróficos.....	48
4.4.2. Alimentação com fungo.....	49
4.4.3. Trofalaxia.....	54
4.4.3.1. Trofalaxia estomodeal.....	55
4.4.3.2. Trofalaxia proctodeal.....	55
4.4.3.2.1. Quantidade liberada de líquido proctodeal de larvas.....	57
4.4.3.2.2. Análise química do líquido proctodeal de larvas.....	58
4.4.3.2.3. Análise bioquímica do líquido proctodeal de larvas.....	58
4.5. Mecônio.....	61
4.6. Transporte de lixo.....	62
4.7. Resumo dos comportamentos de cuidado com a prole.....	63
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERÊNCIAS.....	73

## RESUMO

Um conjunto de microcâmeras e aparelhos para gravação e análise de imagens foi usado para observar, descrever e quantificar os comportamentos de cuidado da prole por parte das operárias adultas da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa*. Para isso foram utilizadas colônias de laboratório com câmaras especialmente projetadas para a observação do ambiente interior do formigueiro, o jardim de fungo.

As microcâmeras utilizadas permitiram que os comportamentos fossem vistos com grande riqueza de detalhes, mostrando-se bastante adequadas para observar pequenos objetos como as menores operárias do formigueiro, e comportamentos que ocorrem em uma pequena área como os propostos neste trabalho. A análise do material filmado em fitas de vídeo possibilitou que comportamentos rápidos fossem facilmente observados e que comportamentos que aconteciam simultaneamente fossem analisados independentemente.

Foram descritos diversos comportamentos que ocorrem na área da cria, com suas respectivas frequências, discutindo-se o papel do tamanho e da idade das operárias na divisão de trabalho. As principais categorias de comportamentos de cuidado da prole observados foram: limpeza dos estágios imaturos pelas operárias adultas, o provisionamento das larvas e a ocorrência de trofalaxia no interior do formigueiro. Além disso, uma nova forma de transferência de alimento das larvas para as operárias adultas, denominada trofalaxia proctodeal, foi descrita para *Atta*.

## ABSTRACT

A set of microcameras and other equipment for recording and image analyses were used to observe, describe and quantify the brood care behaviors of the adult workers of the Lemon Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa*. In order to observe the fungus garden inside the ant colony, laboratory colonies with especially designed observation chambers were used.

The microcameras enabled the behaviors to be observed in great detail, proving themselves to be very adequate for the observation of small objects such as the smallest workers, as well as behaviors occurring on a small area as the ones proposed in this work. The analyses of the material recorded on videotapes made it easier to follow fast behaviors and to independently analyze distinct behaviors happening simultaneously.

Several behaviors occurring around the brood are described with their respective frequencies. The role of worker age and size on the division of labor are discussed. The main categories of brood care behavior observed were: grooming of the immature stages by the adult workers, larval feeding and the occurrence of trophalaxis in the colony. A new means of food transfer from the larvae to the adult workers, named proctodeal trophalaxis was also described.

## 1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 12 mil anos atrás, a espécie humana dava um passo importantíssimo para a formação da sociedade em que vivemos hoje: o advento da agricultura. A capacidade de cultivar a maior parte do alimento necessário para a própria sobrevivência possibilitou ao ser humano atingir um grau de independência da natureza que o libertou de várias restrições ambientais e populacionais impostas a um grupo de meros caçadores e coletores. Desde então, a população humana no planeta só tem aumentado.

Os seres humanos, porém, não são os únicos animais capazes de cultivar seu próprio alimento. Tampouco foram os primeiros a fazê-lo. Entre 50 e 65 milhões de anos antes que surgissem os primeiros povos agricultores, um grupo de formigas da subfamília Myrmicinae, restrito ao continente americano, começava a desenvolver sua própria versão de agricultura (SCHULTZ e MEIER, 1995; MUELLER et al. 2001). Estas formigas da tribo Attini desenvolveram a capacidade de cultivar fungos que são utilizados para sua alimentação, e tal como ocorreu com a espécie humana, estas formigas cultivadoras de fungos tornaram-se um belíssimo exemplo de sucesso biológico, formando colônias enormes e de grande importância ecológica em toda a América tropical.

Existem cerca de 210 espécies catalogadas de Attini divididas em 13 gêneros: *Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocephalus*, *Myrmicocrypta*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* (KEMPF, 1972; BOLTON, 1995; BROWN Jr., 2000; BRANDÃO e MAYHÉ-NUNES, 2001). As Attini são restritas ao Novo Mundo, e são um grupo essencialmente de clima tropical, ocorrendo dos Estados Unidos ao centro da Argentina, entre as latitudes 40° N e 44° S, incluindo várias ilhas do Caribe como Curaçao, Cuba, Trinidad e Tobago (WEBER, 1972; NORTH et al., 1997). Com a exceção de *Acromyrmex striatus* dos Andes argentinos que já foi encontrada a 3.500 metros de altitude, as Attini em geral são encontradas em menores altitudes, como é o caso do gênero

*Atta*, que mesmo na Colômbia, Equador e Bolívia são restritas a altitudes inferiores a 2.000 m (WEBER, 1972).

As Attini formam um grupo monofilético baseado em alguns caracteres sinapomórficos das larvas (SCHULTZ e MEIER, 1995) e de uma característica particular, a presença de uma seta no centro do labro dos adultos (BRANDÃO e MAYHÉ-NUNES, 2001), além da capacidade de todas as espécies da tribo de cultivarem fungos da família Lepiotaceae para sua alimentação (CHAPELA et al., 1994; MUELLER et al., 1998).

Todas espécies da tribo aparentam ser dependentes obrigatórias do fungo mutualista que cultivam (WEBER, 1972). Esta associação entre as Attini e os fungos simbiotes é tida como altamente bem sucedida e é exaltada por muitos autores como WEBER (1966), HÖLLDOBLER e WILSON (1990) e WETTERER (1994) entre outros. Apesar de não se saber ao certo como a relação entre formigas e fungo se iniciou, diferentes espécies de Attini cultivam fungos diferentes, indicando que ocorreram várias aquisições de fungo por parte das formigas ao longo de sua história evolutiva (CHAPELA et al., 1994).

Pelo fato da maioria das espécies das formigas cultivadoras de fungo, principalmente aquelas consideradas mais basais, estar presente em áreas úmidas de baixa altitude da Amazônia, onde o clima tem sido quente e úmido desde o Terciário, este local é considerado o berço destas formigas por diversos autores como WHEELER (1925), KUSNEZOV (1963), WEBER (1972) e MAYHÉ-NUNES e JAFFÉ (1998).

Entre as Attini, os gêneros tidos como mais basais como *Apterostigma* utilizam matéria orgânica em decomposição como carcaças e fezes de insetos como substrato para seu fungo. Gêneros mais derivados exploram também fragmentos de material vegetal seco e o gênero *Trachymyrmex* chega a utilizar pedaços de pétalas frescas para o cultivo do fungo simbiote.

O consenso em se tratando da filogenia das Attini é que os gêneros *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas) representam o ápice evolutivo da tribo. Estas formigas cultivam seu fungo simbiote sobre material vegetal fresco, principalmente folhas, cortado por elas mesmas, o que as torna conhecidas como formigas cortadeiras. Este novo passo na associação entre

formigas e fungo é chamado por WILSON (1986) de "um dos grandes avanços da evolução animal" pois possibilita às formigas cortadeiras e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* utilizarem eficientemente quase todas as formas de material vegetal fresco.

A capacidade de cultivar seu próprio alimento a partir de um substrato tão abundante, aparentemente libertou as formigas cortadeiras de certas restrições alimentares e permitiu a formação de colônias enormes com milhões de operárias como é o caso do gênero *Atta* (WEBER, 1972). Devido ao tamanho de suas colônias, as formigas cortadeiras são de grande importância econômica e ecológica no continente americano, podendo ser consideradas como os herbívoros dominantes da região (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

O grande tamanho dos formigueiros aliado à preferência das cortadeiras por plantas exóticas, trazidas de outros ambientes e cultivadas pelo homem, as torna pragas agrícolas de grande relevância pelos danos que causam a pastagens, plantações e reflorestamentos (WEBER, 1966; VILELA, 1986; WILSON, 1986; CHERRETT, 1986; DELLA LUCIA, 1993).

Entretanto, a ação das formigas cortadeiras também pode apresentar aspectos positivos ao ambiente. Elas podam a vegetação estimulando o crescimento de algumas plantas, decompõem rapidamente material vegetal e reviram, arejam e enriquecem o solo (HAINES, 1978). Além disso, COUTINHO (1983) revela que a ação das saúvas no cerrado tende a favorecer o crescimento de árvores e arbustos, uma vez que elas levam grandes quantidades de matéria orgânica para profundidades de até 7 m no solo, longe do alcance das raízes de gramíneas, onde somente o extrato arbóreo pode utilizá-la. Desta forma, as saúvas estariam fornecendo adubo às árvores, desempenhando um papel oposto ao do fogo no cerrado, que cria uma camada superficial de cinza disponível especialmente para as raízes rasas dos capins.

Atualmente, o método mais eficiente no combate a essas formigas ainda é o químico, através das iscas granuladas que possuem compostos ativos de baixa especificidade e que podem acarretar a contaminação do solo e de lençóis freáticos por serem carregados para dentro dos formigueiros, além de terem outros aspectos negativos, como por exemplo, a possibilidade de

destruição de organismos benéficos e a rápida degradação da isca (VILELA, 1986; FORTI e BOARETO, 1997).

As formigas cortadeiras cortam e transportam material vegetal fresco para o interior do formigueiro para cultivar seu fungo simbiote. Dentro do ninho, o material vegetal coletado pelas operárias é cortado em pedaços cada vez menores que são limpos num processo mecânico de raspagem que retira as ceras epicuticulares das folhas (QUINLAN e CHERRETT, 1978). Estes fragmentos de folhas são então regados com líquido fecal das operárias adultas, depositados sobre o jardim de fungo e inoculados com pequenos tufo de micélio (ANDRADE et al., 2002). Todo esse manuseio do material trazido para o interior do formigueiro cria muitas oportunidades para que formigas e fungo se livrem de substâncias tóxicas que estejam presentes no material coletado. Algumas das ocasiões em que material tóxico pode ser evitado, jogado fora ou neutralizado incluem: a coleta de folhas, o preparo do material vegetal dentro do formigueiro pelas operárias e a ação de enzimas produzidas pelo fungo enquanto este digere seu substrato. Isto sem mencionar a ação de microorganismos tais como bactérias e leveduras, associados à esponja de fungo que são produtoras de antibióticos e também podem auxiliar na degradação do substrato vegetal (CHAPELA et al., 1994).

Para que métodos e produtos mais eficazes de controle das formigas cortadeiras sejam desenvolvidos, é necessário que haja um maior conhecimento sobre a biologia básica destas formigas, porém, o conhecimento sobre o comportamento das *Attini* dentro do formigueiro, na esponja de fungo, é bastante limitado. Ainda não é sabido, por exemplo, o número de instares larvais destas formigas, ou o mecanismo de determinação de castas. Há poucas descrições detalhadas do ambiente no interior dos formigueiros, e as existentes são antigas e portanto sem o uso da tecnologia atualmente disponível. Não há descrições recentes detalhadas sobre as relações entre operárias e rainha ou mesmo do cuidado com a prole por parte das formigas adultas. Como qualquer substância empregada no controle, obrigatoriamente passará pelo interior do formigueiro, este tipo de informação seria bastante útil e necessária.

Os objetivos deste trabalho foram descrever e quantificar os comportamentos de operárias adultas da saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, relativos ao cuidado da prole, observados no interior da esponja de fungo em formigueiros de laboratório. Os comportamentos analisados tiveram três aspectos de maior enfoque: a limpeza dos estágios imaturos pelas operárias adultas, o provisionamento das larvas pelas operárias e a ocorrência de trofalaxia no interior do formigueiro. Pretendeu-se também testar a utilização de novas tecnologias para a observação de comportamentos, assim como fornecer subsídios para uma melhor compreensão das complexas relações entre fungo, operárias adultas e cria dentro do formigueiro e com isso contribuir para o desenvolvimento de maneiras mais sustentáveis e eficazes de controle destas formigas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tão notórias são as colônias de saúvas que elas são mencionadas inclusive em relatos do Padre José de Anchieta datados de 1560 (AUTUORI, 1949). As grandes trilhas de formigas carregando folhas cortadas das plantas sempre chamaram a atenção de todos, mas foi necessário que mais de 300 anos se passassem até que BELT (1874) fosse o primeiro a observar que elas não ingerem as folhas diretamente, mas utilizam-nas como substrato para cultivarem um fungo do qual se alimentam.

Quenquéns e saúvas são especialmente importantes no Brasil, país que possui o maior número de espécies de formigas cortadeiras. Das 15 diferentes espécies de *Atta* catalogadas, 9 ocorrem no Brasil e 5 são de grande importância econômica (FORTI e BOARETTO, 1997; DELABIE et al., 1998). Das 26 espécies de *Acromyrmex*, 20 ocorrem no Brasil, das quais 9 são mais economicamente importantes (FORTI e BOARETTO, 1997, BROWN Jr., 2000). Colônias grandes destas formigas são comuns a ponto de qualquer pessoa com um pouco de experiência no campo poder relatar ocasiões em que árvores inteiras são desprovidas de quase todas suas folhas em uma única noite.

Uma colônia de *Acromyrmex crassispinus* pode chegar a 270 mil indivíduos e a população de uma colônia adulta de *Atta vollenweideri* pode ultrapassar os 7 milhões de operárias (FORTI e BOARETTO, 1997). *Atta capiguara*, que é especializada em cortar gramíneas, reduz em 10% a capacidade do pasto em número de cabeças de gado (FOWLER et al., 1986). As *Atta* sozinhas consomem de 12 a 17% da produção de folhas das florestas tropicais (CHERRETT, 1986), desempenhando na América tropical o papel ecológico dos grandes mamíferos africanos segundo HÖLLDOBLER e WILSON (1990).

A importância das formigas cortadeiras para seu ambiente também pode ser comprovada pelo fato das saúvas serem bastante conhecidas pela população, a ponto de haver diversos nomes comuns para elas nos diferentes países do continente americano. Nomes populares existem até mesmo para as formas aladas como bitú para o macho e içá ou tanajura para a fêmea,

demonstrando um grande conhecimento empírico sobre o ciclo de vida das colônias destas formigas. Na época da revoada, ou vôo nupcial, as rainhas são utilizadas até os dias de hoje como alimento humano em certas regiões do continente americano.

No consenso geral, as operárias de *Atta* e *Acromyrmex* cortam as folhas para cultivarem o fungo do qual se alimentam. MARTIN et al. (1969) afirmam que a composição do fungo de *Atta colombica tonsipes* é de 27% de carboidratos, 4,7% de aminoácidos livres, 13% de proteína e 0,2% de lipídeos, o que seria uma ótima fonte de alimento para as formigas que o cultivam. Além disso, o fungo simbiote também serviria como fonte de enzimas para as formigas (BOYD e MARTIN, 1975).

O fungo simbiote não é, porém, o único alimento ingerido pelas operárias das formigas cortadeiras. Durante o corte das folhas e o preparo do substrato vegetal para a incorporação do fungo, as operárias ingerem a seiva da planta (LITTLEDYKE e CHERRETT, 1976; STRADLING, 1978; FORTI e ANDRADE, 1999).

QUINLAN e CHERRETT (1979), por outro lado, afirmaram que o fungo supre apenas 4,8% da demanda energética das operárias adultas de *Atta cephalotes*, sugerindo que o restante das necessidades nutricionais das operárias vem da seiva das plantas que elas cortam. Este valor foi posteriormente corrigido para 9% por BASS e CHERRETT (1995). As larvas por outro lado, segundo estes autores, são capazes de obter nutrientes e energia suficientes para seu crescimento e suas necessidades respiratórias do consumo do fungo. Recentemente, SILVA et al. (2003) analisaram a degradação extracelular do material vegetal pelo fungo simbiote e sugeriram que a atividade das operárias adultas de “lamber” a esponja de fungo é na verdade uma forma de assimilar açúcares oriundos da degradação de polissacarídeos das folhas.

Larvas e adultos se alimentam geralmente de maneiras diferenciadas em formigas assim como em outros insetos holometábolos. Em *Atta*, as operárias adultas “manuseiam” pedaços da esponja de fungo com seu aparelho bucal, antenas e pernas dianteiras, mas não ingerem o pedaço de fungo, como

é o caso das larvas. GLANCEY et al. (1981) demonstraram que operárias de *Solenopsis invicta* possuem pêlos no aparelho bucal, entre a cavidade pré-oral e a faringe formando um aparelho filtrador que impede que adultos ingiram partículas maiores que 0,88 µm em diâmetro. As larvas de *S. invicta*, por sua vez, são capazes de ingerir partículas de até 45,8 µm. QUINLAN e CHERRETT (1978) descreveram que operárias adultas de *Acromyrmex octospinosus* são capazes de filtrar partículas de 10 µm de diâmetro. Estes dados sugerem que formigas adultas possam se alimentar somente de material líquido, enquanto as larvas podem ingerir partículas de tamanho consideravelmente maior.

O processo de alimentação de larvas de *Atta* pela rainha durante o período inicial de um formigueiro foi estudado por WHEELER (1948), AUTUORI, (1949), MARICONI (1970) e WEBER (1972). De acordo com WHEELER (1948), a rainha deposita ovos tróficos diretamente no aparelho bucal da larva e exerce pressão sobre ele para auxiliar a larva a ingeri-lo. Quando as larvas são muito pequenas, várias delas podem ser alimentadas com o mesmo ovo. Mesmo por algum tempo após as primeiras operárias adultas terem emergido, as larvas continuam sendo alimentadas com ovos tróficos, porém segundo AUTUORI (1949), a postura de ovos tróficos pela rainha cessa algumas semanas após o olheiro do formigueiro ser aberto pelas primeiras operárias forrageiras.

SORENSEN et al. (1981) investigaram o processo de distribuição de alimentos e alimentação de larvas na formiga lava-pés *Solenopsis invicta* oferecendo dietas sólidas e líquidas marcadas com <sup>125</sup>Iodo às forrageadoras. Observaram que em dez minutos, 6% do alimento sólido (gema de ovo) havia sido ingerido pelas larvas, enquanto que para alimentos líquidos como óleo de soja e uma solução de 50% de mel misturados ao <sup>125</sup>Iodo, somente 2% e 0,2%, respectivamente, foram passados às larvas após dez minutos. Em *S. invicta* as operárias forrageadoras passam o alimento coletado para operárias reservadoras, que por sua vez passam o alimento para as operárias enfermeiras que depositam o alimento em uma "cesta de alimentação," região específica na superfície ventral da larva (PETRALIA e VINSON, 1978). Algo semelhante a estas "cestas de alimentação" foi descrito por PETRALIA e

VINSON (1979) a partir de imagens de microscópio eletrônico de varredura, em larvas de *Atta texana*. Segundo os autores estas larvas possuem uma protuberância ventral no protórax com pêlos minúsculos que devem servir para prender a massa de fungo quando a larva se alimenta, devido à proximidade da protuberância às peças bucais da larva. WHEELER (1948), também descreveu a anatomia das larvas dos principais gêneros da tribo Attini, especialmente em relação à anatomia externa da região da cabeça.

O fluxo de alimento num formigueiro não é somente no sentido operárias – larvas. WILSON (1976) descreveu que operárias adultas consomem secreções glandulares, eflúvios anais e peles descartadas pelas formas jovens e que larvas de formigas também expõem líquidos de seu intestino posterior e aparelho bucal (claramente de origem salivar) que são rapidamente consumidos pelas operárias.

WHEELER e WHEELER (1979) relataram que formigueiros coletados com larvas e mantidos em laboratório permanecem mais ativos e saudáveis do que colônias compostas apenas por operárias apesar de todas as colônias receberem quantidades iguais de água e alimento. Segundo estes autores, as larvas de formigas e vespas são as responsáveis pela digestão de proteínas para a colônia.

HÖLDOBLER e WILSON (1990) e WHEELER (1994) afirmaram que com exceção das Dolichoderinae, todas as grandes subfamílias de formigas apresentam alguma forma de secreção oral das larvas que é passada para os adultos.

"Em Ponerinae, Myrmicinae e Formicinae as larvas periodicamente expõem pequenas quantidades de um líquido claro [...] que são rapidamente sorvidas pela primeira operária a encontrá-las. As operárias também parecem buscar o líquido lambendo a região da cabeça da larva mais frequentemente do que o restante do corpo e ocasionalmente solicitam a regurgitação pelos mesmos toques de antena usados para oferecer comida às larvas. [...] Larvas de formigas também produzem um líquido claro na região anal, que deve ser originado

nos túbulos de Malpighi e conter substâncias para excreção que as operárias solicitam com toques de antena na extremidade do abdômen da larva" (WILSON, 1976).

O'NEAL e MARKIN (1973) observaram que em *Solenopsis invicta* as larvas possuem duas formas de secreções anais: uma substância clara e constituída de material excretado que as operárias transportam em suas mandíbulas para os limites do ninho; e um líquido leitoso que as operárias ingerem e que aparenta ser uma forma de suplemento alimentar.

Rainhas da formiga-do-faraó *Monomorium pharaonis* ingerem secreções líquidas estomodeais de larvas e as fezes de larvas se tornando pré-pupas, denominadas mecônio. Rainhas de colônias cujas larvas haviam sido retiradas sofreram uma queda de um terço na produção de ovos (BØRGESEN, 1989).

As larvas portanto não devem ser consideradas meros parasitas sociais de uma colônia, mas parte integrante de um superorganismo na qual as larvas e demais formas imaturas servem como depósito de alimento, produção de proteinases, e renovação dos indivíduos adultos da colônia (WHEELER e WHEELER, 1979).

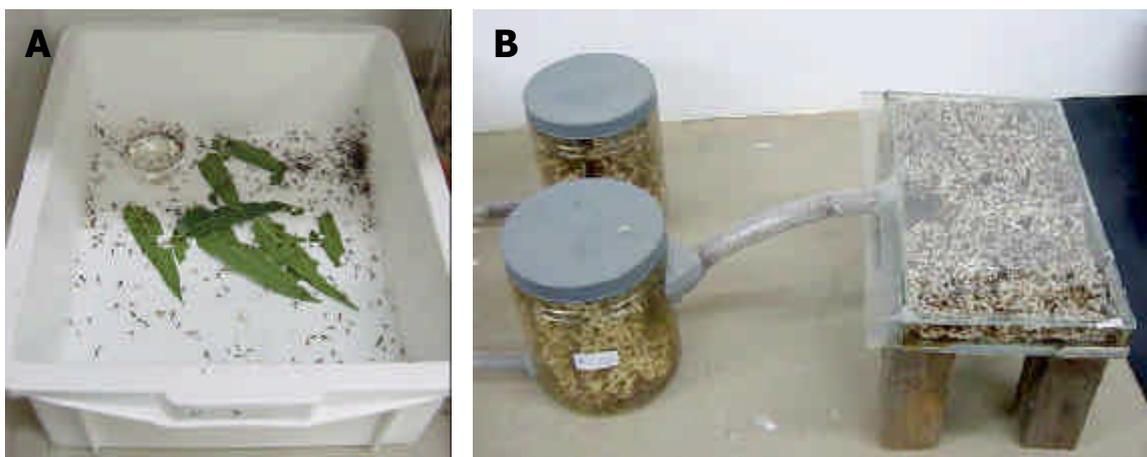
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta e manutenção das colônias

Os formigueiros utilizados para as observações de comportamento foram mantidos em uma sala climatizada a 25°C e umidade relativa acima de 70% do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro (22° 23' 73" S e 47° 32' 56" W), onde pesquisas sobre a biologia e o controle de *A. sexdens rubropilosa* são feitas desde 1984.

As colônias de laboratório foram estabelecidas a partir de pequenos formigueiros coletados no campo, cerca de seis meses após a revoada. Nessa época, os novos formigueiros ainda possuem apenas uma câmara a uma profundidade de, aproximadamente, 25 cm onde se encontra a rainha juntamente com toda a esponja de fungo, a prole e as primeiras operárias adultas, facilitando assim a coleta de toda a colônia.

Cada colônia coletada foi posta em um sistema de dois potes plásticos transparentes de 2 litros (figura 1B) e uma arena para coleta de material vegetal (figura 1A), interligados por mangueiras transparentes de plástico. A arena de forrageio consistia de uma caixa plástica de 37,5 cm de comprimento por 30,0 cm de largura por 14,5 cm de altura (16 litros). Talco inodoro era rotineiramente aplicado às laterais internas da área de forrageio para evitar que as formigas escapassem. Os formigueiros eram mantidos sempre com água em abundância e eram tratados diariamente com folhas de *Eucalyptus*, *Hibiscus*, ou *Acalypha* e flocos de aveia.



**Figura 1.** Colônia de *A. sexdens rubropilosa* mantida em laboratório nas dependências do Centro de Estudos de Insetos Sociais da Unesp- Rio Claro. (A) Arena de forrageio com folhas de eucalipto e água. (B) Painelas de jardim de fungo

### 3.2. Observações comportamentais

As observações do comportamento de operárias adultas e prole foram realizadas em três colônias que tiveram câmaras especiais de observação conectadas a um dos potes plásticos do sistema descrito anteriormente. Estas câmaras de observação foram feitas como um aquário de vidro com dois litros de volume (30,0 x 20,0 x 3,5 cm) (figura 2). O jardim de fungo dentro destas câmaras era mantido normalmente pelas formigas, permitindo assim a observação do comportamento das formigas no interior da esponja de fungo com um mínimo possível de perturbação ao formigueiro.

Os atos comportamentais das formigas foram observados com o auxílio de um conjunto de mini e microcâmeras acopladas a monitores, gravadores de vídeo e a um microcomputador (figura 3). O ambiente era iluminado por uma luz incandescente de 60W do tipo spot. As microcâmeras foram montadas em suportes especiais em tripés que permitiam que as câmeras fossem facilmente movimentadas em várias direções para facilitar a observação de operárias individuais possibilitando que elas fossem seguidas pelas câmeras.



**Figura 2.** Câmara de vidro utilizada para a observação dos comportamentos de operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Ao fundo, as demais câmaras de fungo do formigueiro e a arena de forrageio.

Os atos comportamentais das operárias adultas e da prole foram observados por total de aproximadamente 30 horas, das quais 10 horas foram gravadas em fitas de vídeo. Estas fitas foram posteriormente observadas permitindo uma descrição e uma quantificação detalhada dos atos comportamentais. Sempre que um ato comportamental se iniciava, este era seguido até o fim, depois a fita de vídeo era rebobinada e outros atos comportamentais que ocorriam simultaneamente ao primeiro também eram, um a um, acompanhados e analisados até o fim.

Quando os formigueiros não estavam em observação, as câmaras de vidro eram cobertas com papel celofane vermelho, impedindo que a claridade do ambiente perturbasse as atividades das formigas e estas abandonassem a câmara de observação.

Uma vez que o foco deste trabalho foi o comportamento de cuidado com a prole, a maioria das observações foi feita ao redor de larvas, pupas ou ovos, e o comportamento das operárias adultas também ao redor da cria foi analisado.



**Figura 3.** (A) Sistema de equipamentos eletrônico utilizado para a visualização, gravação e análise de imagens dos atos comportamentais. (B) Equipamento montado para a observação dos comportamentos de cuidado da prole no jardim de fungo de uma das colônias de *A. sexdens rubropilosa*.

Os comportamentos observados neste trabalho, comparados àqueles observados por WILSON (1980), constam da tabela 2. Foram quantificados 28 atos comportamentais que se enquadram nas seguintes categorias gerais: (1) transporte de formas jovens, (2) transporte de alimento (3) manipulação do fungo, (4) limpeza da prole, (5) aprovisionamento de larvas, (6) auxílio durante a ecdise, (7) limpeza de operárias adultas (*grooming*), (8) cuidado do fungo simbiote, (9) trofalaxia e (10) transporte de lixo.

As operárias adultas observadas em ato comportamental relevante eram classificadas conforme duas categorias: idade e tamanho. De acordo com a coloração de seu tegumento, as operárias adultas foram classificadas em recém-emergidas ou jovens (tegumento claro, amarelado), intermediárias (coloração intermediária) e velhas (tegumento bem esclerotizado, marrom escuro). Quanto ao tamanho, as operárias foram classificadas em 6 grupos de tamanho de acordo com a largura de sua cápsula cefálica. As categorias de tamanho variaram desde a menor até a maior (soldado) (tabela 1) aproximadamente como a divisão de tamanho proposta por WILSON (1980).

**Tabela 1.** Categorias de tamanho de operárias de *A. sexdens rubropilosa* utilizadas neste trabalho baseadas na largura de suas cápsulas cefálicas.

Tamanho das operárias	Largura da cápsula cefálica (mm)
Mínimas	< 0,8
Pequenas	0,8 – 1,0
Médias-Pequenas	1,0 – 1,4
Médias	1,4 – 2,2
Médias-Grandes	2,2 – 3,0
Grandes (Soldados)	> 3,0

**Tabela 2.** Categorias comportamentais observadas na área de prole de colônias mantidas em laboratório de *A. sexdens rubropilosa*, comparados com aqueles analisados por WILSON (1980).

Conforme WILSON, 1980	Presente trabalho
<i>1. Transporte de formas jovens</i>	
Transportar ovos e larvas bem pequenas	Transportar ovos
Transportar larvas pequenas a intermediárias	Transportar larvas
Transportar larvas intermediárias a grandes	Transportar pupas
Transportar pupas	Transportar ovos tróficos
	Transportar adultos recém-emergidos
<i>2. Transporte de alimento</i>	
Transportar hifas	Transportar hifas
	Transportar estáfilas
<i>3. “Manipulação” do fungo</i>	
	Manipular hifas ou fungo em geral
	Manipular estáfila
<i>4. Limpeza da prole</i>	
Limpar prole	Limpar pupa
	Limpar corpo da larva
	Limpar larva - região bucal
	Limpar larva - região anal
<i>5. Aproveitamento da prole</i>	
Alimentar larvas	Alimentar larva com ovo trófico
	Alimentar larva com estáfila intacta
	Alimentar larva com estáfila manipulada
	Alimentar larva com hifas intactas
	Alimentar larva com hifas manipuladas
	Auxiliar larva a alcançar alimento / Manter fungo em contato com mandíbulas da larva
<i>6. Auxílio durante a ecdise</i>	
Auxiliar na ecdise	Auxiliar larva / pupa na ecdise
<i>7. Limpeza de operárias adultas</i>	
Limpeza de outros indivíduos	Limpeza de operária menor
	Limpeza de operária de tamanho igual
	Limpeza de operária maior
	Auto-limpeza
<i>8. Cuidado com a esponja de fungo</i>	
	Lamber a esponja de fungo
<i>9. Trofalaxia</i>	
	Trofalaxia entre operárias adultas
	Trofalaxia estomodeal entre operária e larva
	Trofalaxia proctodeal de larva para adulta
<i>10. Transporte de lixo</i>	
	Transportar lixo

### 3.3. Coleta do líquido proctodeal das larvas

#### 3.3.1. Preparo de capilares para a coleta de material

Capilares de 10  $\mu\text{L}$  para coleta de sangue foram levados a uma chama em um bico de Bunsen e suas extremidades foram puxadas para que no centro dos capilares se formasse uma canalícula bem mais fina. Cada capilar foi então partido ao meio para que sua extremidade mais fina pudesse ser tocada nas larvas. Para o cálculo de volume de líquido proctodeal de larvas, a ponta destes capilares foi graduada em incrementos de 0,2  $\mu\text{L}$ , através do uso de uma micropipeta, água destilada e tinta de pincel atômico permanente usada para marcação de formigas. A água destilada foi retirada dos capilares e estes foram então levado a uma estufa onde foram secos a uma temperatura de aproximadamente 80°C.

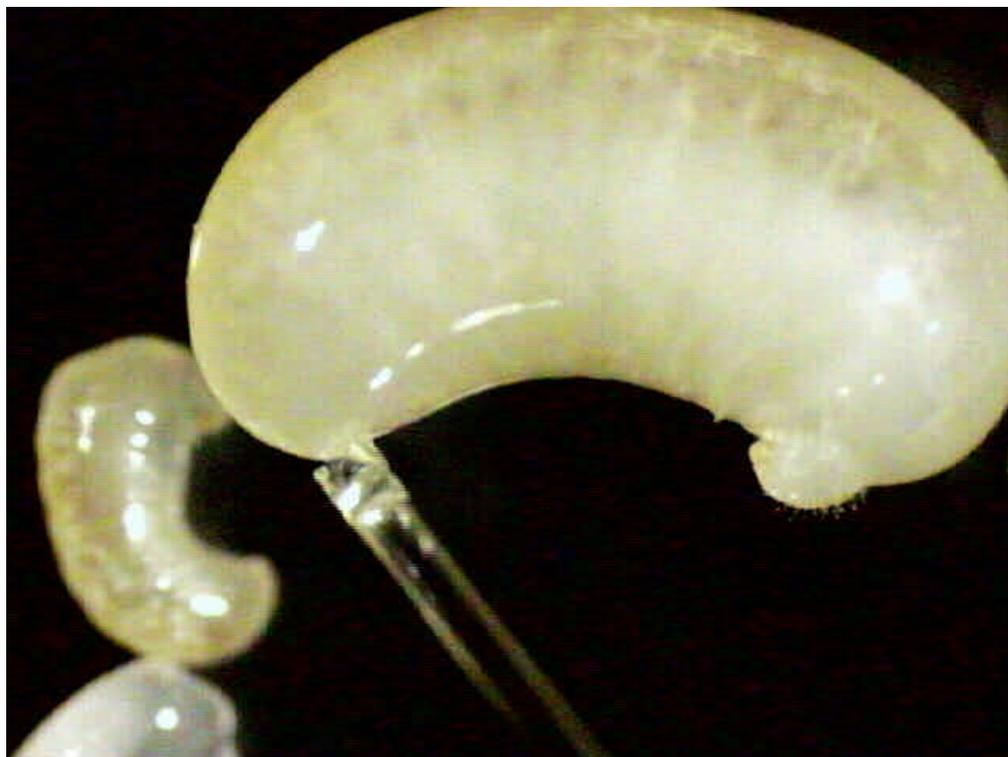
Esses capilares foram conectados a uma pequena mangueira de borracha para que o líquido proctodeal fosse transferido do capilar para um pequeno tubo Ependorf de 1,5 mL de capacidade. O material coletado foi mantido em - 80°C até sua análise química ou bioquímica.

#### 3.3.2. Coleta de larvas e de seu líquido proctodeal

A parte central das esponjas de fungo de formigueiros de laboratório bem estabelecidos era coletada e posta em uma bandeja plástica cujas bordas haviam sido cobertas com Teflon-30 para impedir a fuga das formigas. Durante um período de aproximadamente uma hora, larvas de todos os tamanhos eram coletadas e depositadas em uma placa de Petri, com um pedaço de algodão embebido em água.

Após sua coleta, as larvas eram mantidas sob uma lupa e o líquido proctodeal era coletado com auxílio dos capilares descritos anteriormente. Para induzir uma larva a expelir o líquido proctodeal, a ponta do capilar era usada para estimular mecanicamente a larva através de leves toques em sua região ventral posterior, próximo à abertura anal.

Assim que a primeira gotícula de líquido se formava na abertura, ela e todo o líquido expelido posteriormente eram coletados imediatamente (figura 4).



**Figura 4.** Larva de *A. sexdens rubropilosa* no momento da coleta do líquido proctodeal com auxílio de capilar. Aumento: 50X.

Para determinar a volume de líquido proctodeal expelido por larva, determinou-se o número de larvas necessárias para atingir 0,2  $\mu\text{L}$  de volume e depois este valor foi dividido pelo número de indivíduos necessários para se obter tal volume, para se obter o valor médio.

Para determinar a diferença de peso das larvas após terem expelido o líquido proctodeal, usou-se uma balança de alta precisão para determinar o peso individual de larvas antes e depois da coleta do líquido.

### 3.4. Análise do fluido proctodeal de larva

#### 3.4.1. Análise química

As análises bioquímicas do fluido proctodeal de larvas foram feitas por Fernando Petacci, como parte de sua pesquisa para a obtenção do título de doutor pelo Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Aproximadamente 50  $\mu\text{L}$  de líquido proctodeal foram liofilizados. O material seco foi redissolvido em 50  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  e transferido para um microtubo (100 $\mu\text{L}$ ) de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e “hetero spin quantum correlation” (HSQC), onde foram feitos experimentos em uma e duas dimensões respectivamente. Com os resultados obtidos por RMN pôde-se fazer o tratamento adequado para a amostra, que foi silicada com bis-trimetilsililacetamida (BTMSA) e analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A condição cromatográfica utilizada foi 70°C (5 min) / 6°C/min / 290°C (10 min) (PETACCI, 2001).

Do perfil cromatográfico obtido, alguns componentes tiveram sua identidade comprovada por injeção de padrão (Merck), enquanto outros menos comuns foram identificados apenas com base na biblioteca NIST 62 do próprio equipamento, com alto grau de similaridade.

#### 3.4.2. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas do fluido proctodeal de larvas foram feitas por Célia Gomes de Siqueira, doutora pelo Centro de Estudos de Insetos Sociais da Unesp - Rio Claro. As amostras de fluido de larva foram diluídas 1:20 com água deionizada e foram determinadas as concentrações de proteína e glicose, bem como as atividades de dissacaridases e polissacaridases presentes.

#### 3.4.2.1. Determinação de proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina bovina como padrão. A reação foi feita de acordo com o protocolo abaixo:

Amostra	4 ou 10 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O dd	qsp 50 $\mu\text{L}$
Reagente de Bradford	50 $\mu\text{L}$

A leitura em espectrofotômetro foi feita a 595 nm. A curva padrão de albumina bovina apresentou um fator de 4,98.

#### 3.4.2.2. Determinação de glicose

A concentração de glicose presente no material foi determinada pelo método de Glicose-Oxidase, e a reação enzimática foi feita de acordo com o protocolo:

Amostra	1 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O dd	qsp 50 $\mu\text{L}$
Reagente de glicose-oxidase	200 $\mu\text{L}$

Incubou-se por 15 minutos a 37°C e a leitura foi feita a 505 nm. A curva padrão de glicose apresentou fator de 9,51.

#### 3.4.2.3. Atividade sobre dissacarídeos

Foi determinada a atividade enzimática sobre uma solução de água deionizada contendo 0,5% de substrato (maltose, celobiose, sacarose ou trealose), sendo que a glicose liberada durante 8 horas de incubação a 25°C foi detectada pelo método de glicose-oxidase. Para cada reação enzimática utilizou-se uma reação controle contendo o mesmo volume de amostra e substrato dosada sem período de incubação, onde a concentração de glicose presente na amostra mais a presente nos substratos representou

o zero da reação, sendo subtraído do resultado final, de acordo com o seguinte protocolo:

Reação enzimática

Amostra		1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O dd	qsp	25 $\mu$ L
Substrato a 0,5%		25 $\mu$ L

Incubado por 8 horas a 25°C, duas para cada substrato.

Controle: mesma reação sem incubação.

Após tempo de incubação adicionou-se 200  $\mu$ L de reagente de glicose-oxidase a cada reação, incubou-se por 15 minutos, a 37°C.

#### 3.4.2.4. Atividade sobre polissacarídeos

Determinou-se a presença de polissacaridases no material utilizando-se soluções de água deionizada contendo 0,5% de amido, pectina, carboximetilcelulose, celulose ou xilana. As reações enzimáticas foram feitas em duplicata de acordo com o protocolo abaixo:

Reação enzimática

Amostra		5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O dd	qsp	25 $\mu$ L
Substrato a 0,5%		25 $\mu$ L

Incubado por 24 horas a 25°C.

Reação controle: igual à reação anterior, sem tempo de incubação.

Após o tempo de incubação determinou-se a concentração de açúcares redutores presentes nas reações enzimáticas utilizando-se o método de DNS (ácido dinitrissalicílico), de MILLER (1959) de acordo com o protocolo abaixo:

Amostra	50 $\mu$ L
Reagente de DNS	50 $\mu$ L

Fervura por 5 minutos, adição de 500  $\mu$ L de água destilada e leitura a 575 nm.

Reação controle: a concentração de AR foi determinada no tempo zero, sendo que o resultado para todas as amostras foi igual a zero. Os cálculos foram feitos com os resultados de 24h de incubação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Observações gerais

O equipamento utilizado mostrou-se adequado para realizar observações comportamentais que ocorrem em uma pequena área e os objetos de observação são ainda menores como o proposto neste trabalho. As microcâmeras utilizadas possibilitaram um aumento de 20 a 75 vezes, permitindo que os comportamentos fossem observados em grande detalhe. A análise do material filmado em fitas de vídeo possibilitou que os comportamentos fossem observados facilmente em velocidades mais lentas e que outros comportamentos que aconteciam simultaneamente fossem analisados independentemente, fornecendo aos dados obtidos um alto grau de confiabilidade.

#### 4.1.1. Indivíduos da colônia

Formas imaturas de *A. sexdens rubropilosa* de todos os tamanhos e estágios de desenvolvimento são incapazes de movimentarem-se e portanto, dependem obrigatoriamente das operárias adultas para sua limpeza, deslocamento e alimentação, mesmo estando em contato direto com o jardim de fungo. Larvas e pupas também dependem do auxílio das operárias adultas para eclodirem de seus ovos e emergirem das ecdises durante o processo de muda. Este fato já havia sido observado por WEBER (1966) e SCHREIBER (1974), mostrando que o grau de desenvolvimento social nas formigas cortadeiras é tal que os estágios imaturos não podem se desenvolver quando retirados do ambiente social. Outras espécies de formigas também possuem este grau de desenvolvimento social. As larvas da formiga lava-pés *Solenopsis invicta*, por exemplo, também precisam ser auxiliadas durante a ecdise (O'NEAL e MARKIN, 1973).

#### 4.1.1.1. Ovos

Ovos de *A. sexdens rubropilosa* são muito pequenos, de coloração branca leitosa e de superfície lisa e lustrosa (figura 5). Ovos viáveis medem  $0,49 \text{ mm} \pm 0,03 \text{ mm}$  de comprimento e  $0,31 \text{ mm} \pm 0,03 \text{ mm}$  de largura ( $n = 11$ ). Estes valores são muito próximos aos dados de WEBER (1972), que aponta como uma média de tamanho de ovos de cinco gêneros de Attini incluindo *Atta*, como  $0,45 \text{ mm} \times 0,32 \text{ mm}$ . Segundo AUTUORI (1949), os primeiros ovos ovipositados pela rainha na fundação de um formigueiro levam em torno de 23 dias para eclodirem.



**Figura 5.** Agrupamento de ovos viáveis de *A. sexdens rubropilosa*, obtidos de colônia mantida em laboratório. Aumento: 50X.

Nas poucas vezes que foram observados, os ovos se encontravam em grupos de dezenas e até centenas, em áreas mais centrais do jardim de fungo. Junto com os ovos haviam larvas que, devido ao tamanho de seus corpos, eram provavelmente larvas recém-emergidas. Durante a abertura de painéis de fungo para coleta de material, era comum observar operárias carregando pequenos grupos de ovos entre suas mandíbulas.

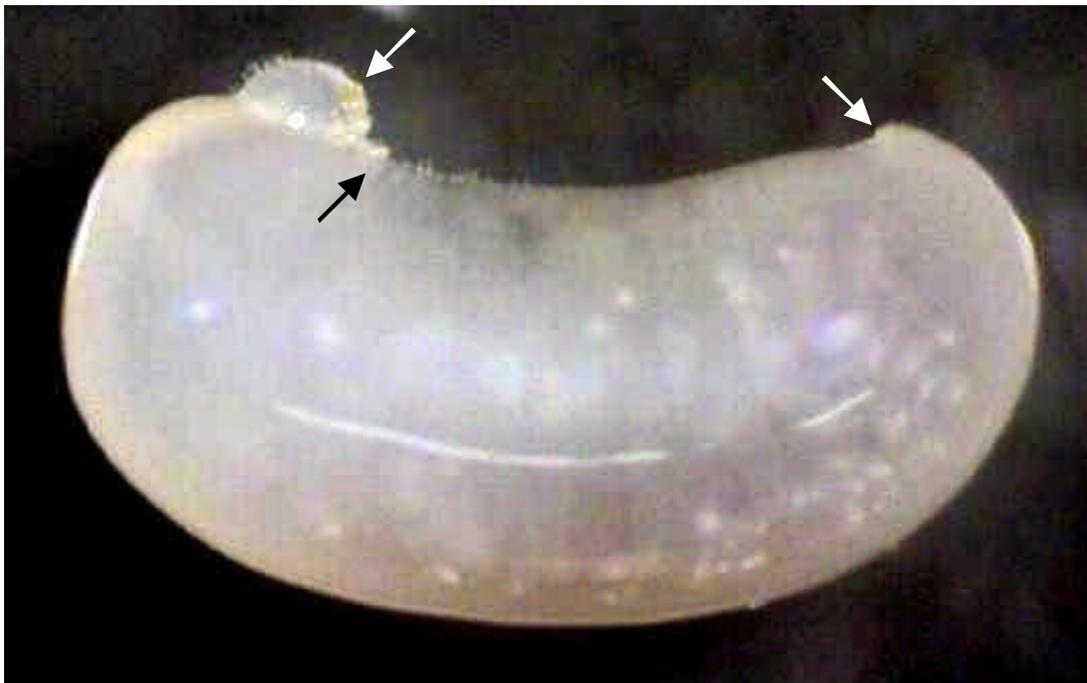
#### 4.1.1.2. Larvas

As larvas das saúvas são do tipo “atóide,” conforme a classificação de WHEELER e WHEELER (1979). Como nas demais espécies, as larvas das formigas cortadeiras não têm olhos. Elas são ápodas e de coloração esbranquiçada devido à grande concentração de corpo gorduroso sob sua cutícula. A porção anterior é ligeiramente mais larga que a posterior, a cabeça e a extremidade anal são situados na face ventral e côncava de seu corpo e são as únicas estruturas da superfície das larvas visíveis a olho nu (figuras 6 e 7). Larvas pequenas possuem uma cabeça relativamente grande em relação ao resto do corpo (figura 6), mas conforme se desenvolvem esta diferença diminui consideravelmente.



**Figura 6.** Ovo e larvas de ínstaes iniciais de *A. sexdens rubropilosa* coletadas de colônia de laboratório.

A superfície do corpo das larvas de *Atta* é lisa. Os poucos pelos em seu tegumento são do tipo simples e estão concentrados ao redor da cabeça e do ânus (WEBER, 1972; PETRALIA e VINSON, 1979). Estes pelos são facilmente visíveis sob um estereomicroscópio mesmo em pequeno aumento (figura 7). Os pelos da superfície ventral imediatamente abaixo da cabeça servem como apoio para auxiliar as larvas a manterem a massa fúngica em contato com suas mandíbulas enquanto se alimentam (WEBER, 1972; PETRALIA e VINSON, 1979).



**Figura 7.** Vista lateral de larva de último ínstar de *A. sexdens rubropilosa* de colônia de laboratório. A cabeça e a extremidade anal são as únicas estruturas que se sobressaem superficialmente (setas brancas). Presença de pilosidade na região ventral inferior à cabeça (seta preta). Aumento: 50X.

O orifício anal das larvas é uma abertura transversal localizada ventralmente no segmento abdominal AX (WHEELER e WHEELER, 1979) (figura 8).

É possível verificar na superfície dorsal da larva uma faixa longitudinal escura que corresponde ao intestino médio que pode ser visto por transparência através da cutícula e do vaso dorsal (figura 9).

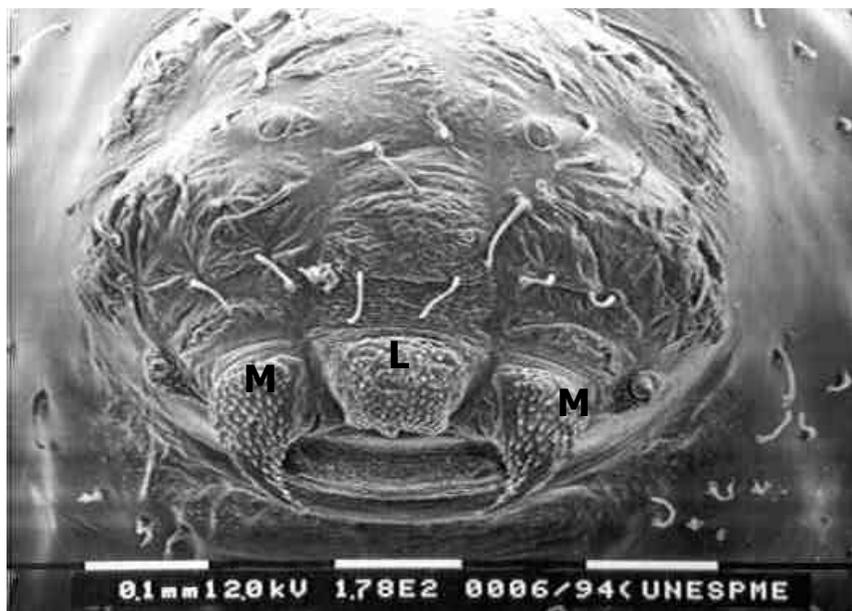


**Figura 8.** Microfotografia eletrônica de varredura do ânus de larva de *A. sexdens rubropilosa*. A abertura anal é localizada em uma saliência ventral da larva com poucos pelos ao redor.



**Figura 9.** Vista dorsal de larva de último ínstar de *A. sexdens rubropilosa*. A faixa escura longitudinal ao corpo corresponde ao intestino médio visto por transparência através do coração. Aumento: 50X.

Independentemente do tamanho da larva, as peças bucais são as únicas estruturas externas que apresentam movimento. As mandíbulas e o labro as únicas estruturas esclerotizadas, e portanto rígidas, da superfície da larva e são cobertos de minúsculos espinhos (figura 10) especializados para auxiliar a larva a prender o fungo (WEBER, 1972). As maxilas e o lábio auxiliam nos movimentos mastigatórios, mas não são estruturas rígidas.



**Figura 10.** Microfotografia eletrônica de varredura da cabeça de larva de *A. sexdens rubropilosa*. Olhos ausentes. Espinhos no labro (L) e mandíbulas (M) auxiliam a segurar e macerar a massa fúngica utilizada na alimentação. Lábio e maxilas (não esclerotizados) não estão visíveis por estarem retraídos sob as mandíbulas.

Não foi possível detectar alterações marcantes nas larvas que pudessem indicar diferenças entre ínstares larvais. As exceções são: o primeiro ínstar (recém-emergida), denominado microlarva por HÖLLDOBLER e WILSON, (1990) quando a larva tem o tamanho do ovo (figura 6), e o último, quando a larva já se tornou uma pré-pupa. O tamanho larval também não pode ser utilizado para a identificação de ínstares larvais, uma vez que larvas de praticamente todos os tamanhos podem entrar em metamorfose, originando assim o alto grau de polimorfismo existente nas operárias de *Atta*.

#### 4.1.1.3. Pré-pupas e pupas

Quando as larvas atingem o final da fase de crescimento, elas interrompem sua alimentação, seus corpos tornam-se ainda mais brancos e a faixa dorsal escura, mencionada anteriormente, tende a desaparecer. Esta fase do desenvolvimento é denominada pré-pupa e corresponde ao final do último ínstar larval, ou seja, representa o início da metamorfose da larva. O primeiro sinal visto sob um estereomicroscópio de

que uma larva iniciou o processo de muda, é a interrupção dos movimentos das peças bucais, isto é, a larva não responde mais a toques em sua região bucal com movimentos mastigatórios. Em formigas que apresentam casulo, ele seria secretado logo no início desta fase, mas as Attini possuem pupas nuas que se formam apenas sob o tegumento larval. Quando as pré-pupas estão mais desenvolvidas, pode-se visualizar por transparência através da cutícula os rudimentos de apêndices dos adultos: primeiro as pernas e depois as antenas (figura 11).



**Figura 11.** Pré-pupa de *A. sexdens rubropilosa* de colônia de laboratório com a região ventral translúcida devido à formação das pernas da pupa sob o tegumento larval. Aumento: 40X.

Uma vez que a pupa completou sua diferenciação sob o tegumento do último ínstar larval, as operárias adultas retiram a cutícula velha puxando-a com suas mandíbulas e lambendo a cutícula recém-exposta da nova pupa. A cutícula velha é mastigada pelas operárias. As pupas de *Atta* são cada vez mais parecidas com formigas adultas, pois as estruturas da cabeça (mandíbulas e antenas), mesossoma (pernas, e espinhos dorsais) e gáster já são bem definidas exteriormente. A princípio as pupas são totalmente brancas. Com o tempo os olhos vão se pigmentando até tornarem-se completamente escuros. O corpo também passa a sofrer pigmentação e se torna cada vez

mais marrom avermelhado (figura 12). Finalmente, o tegumento de pupa é retirado pelas demais operárias e uma nova operária adulta emerge. As pupas são totalmente dependentes das operárias adultas durante o processo de emergência de sua fase pupal, conforme observado por SCHREIBER (1974). O tegumento da nova operária ainda não está totalmente esclerotizado, fato que ocorre com o passar do tempo e que permite estimar a idade das operárias.



**Figura 12.** Mudanças na coloração de pupas de operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Pupas brancas se encontram no início do processo, enquanto que as mais escuras já estão mais desenvolvidas e próximas do período adulto. Aumento: 6,3X.

#### 4.1.1.4. Adultos

##### 4.1.1.4.1. Idade das operárias

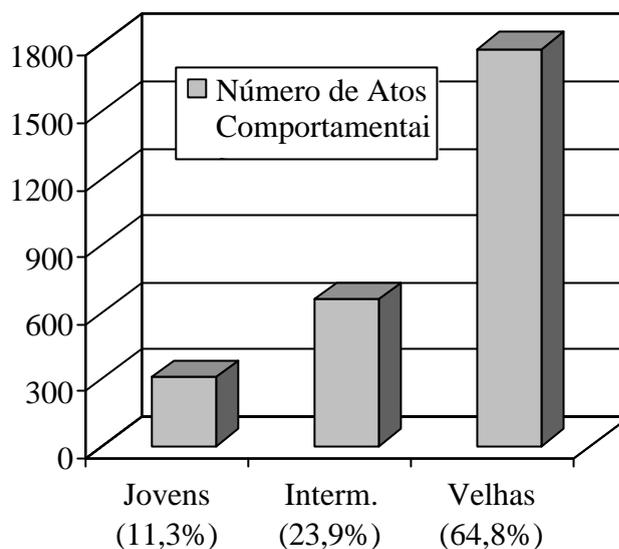
A idade das operárias adultas foi determinada através da coloração da cutícula da cabeça. Ao emergirem, as operárias apresentam um tegumento marrom claro, quase

amarelado que com o passar do tempo, devido ao processo de esclerotização das camadas externas de quitina, escurece gradativamente até atingir o marrom escuro avermelhado característico da espécie. Após a observação do processo de esclerotização de formigas recém-emergidas e mantidas em placas de Petri, pôde-se verificar que este processo é ligeiramente mais rápido em formigas menores do que em formigas maiores. De maneira geral, as operárias adultas foram separadas em três grupos distintos de idade: (1) operárias jovens e de cutícula clara: de 0 a 3 dias após a emergência; (2) formigas de coloração e idade intermediárias: entre 4 e 7 dias como adultas; e (3) operárias com cutícula completamente esclerotizadas e mais velhas: mais de uma semana de vida adulta. Uma vez que operárias têm uma vida média de 3 a 6 meses (WEBER, 1972), o número de operárias consideradas adultas é consideravelmente maior do que jovens ou intermediárias no interior de um formigueiro já estabelecido.

#### 4.1.1.4.2. Polietismo etário

Os indivíduos de praticamente todas as espécies de insetos sociais executam tarefas diferentes conforme se tornam mais velhos, geralmente mudando de “babás” a forrageadoras. Mudanças nas glândulas exócrinas comumente acompanham estas mudanças comportamentais. Em insetos eussociais, o conjunto de diferenças na programação de comportamentos de um indivíduo no decorrer de sua vida é chamado polietismo etário e possibilita uma maior especialização, e conseqüentemente uma maior eficiência ergonômica, na execução de tarefas específicas na colônia (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

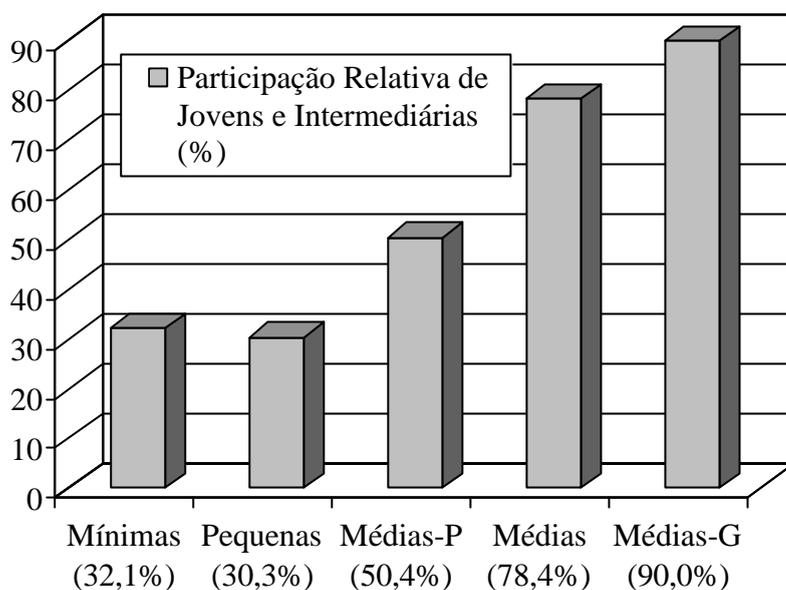
Os atos comportamentais realizados pelas operárias mais velhas na área de prole correspondem a 64,8% do total registrado (n = 1776). Operárias de idade intermediária foram responsáveis por 23,9% (n = 655) das observações e operárias jovens por 11,3% (n = 308). Uma vez que a população de operárias de tegumento bem esclerotizado é bastante maior do que o número de operárias de tegumento claro devido à rápida esclerotização do tegumento, é natural que a categoria de operárias mais velhas apresente uma maior participação no total dos atos comportamentais observados (figura 13 e tabela 2).



**Figura 13.** Participação relativa de operárias adultas de *A. sexdens rubropilosa* de acordo com o grau de esclerotização de suas cápsulas cefálicas.

Operárias jovens tendem a passar mais tempo paradas sobre o jardim de fungo enquanto que indivíduos mais velhos apresentam uma maior atividade. Quando o jardim de fungo é perturbado, as operárias jovens e claras raramente apresentam o mesmo comportamento agressivo demonstrado por suas companheiras mais velhas, permanecendo imóveis ou encolhidas em cavidades do jardim. Nestas ocasiões, formigas jovens as vezes são transportadas pelas mais velhas como se ainda fossem pupas.

Operárias jovens de tamanhos maiores apresentam maior inatividade do que as operárias menores (WILSON, 1980). Pode-se encontrar com frequência operárias pequenas e mínimas jovens já em atividade no jardim de fungo, enquanto que operárias médias e médias-grandes jovens, em sua grande maioria, ainda permanecem inativas na área de prole, limitando-se a serem limpas por outras operárias. Apesar disso, a participação relativa das operárias jovens e intermediárias em tarefas próximas à área da prole aumenta com o tamanho da operária (figura 14 e tabela 3).



**Figura 14.** Participação de operárias jovens e intermediárias de *A. sexdens rubropilosa* de acordo com o tamanho de suas cápsulas cefálicas. As categorias maiores apresentam uma participação relativa de operárias jovens e intermediárias muito maior, indicando que a atividade destas formas maiores na área da prole diminui com o passar do tempo, enquanto as operárias das classes menores seguem trabalhando na área de cria.

**Tabela 3:** Participação relativa de operárias de *A. sexdens rubropilosa* conforme idade nos atos comportamentais observados na área de prole.

Tamanho das operárias	Jovens	Interm.	Jovens + Interm.	Velhas	Total	Participação relativa de jovens e interm.
Mínimas	141	342	483	1024	1507	32,1%
Pequenas	71	191	262	602	864	30,3%
Médias-pequenas	66	65	131	129	260	50,4%
Médias	24	45	69	19	88	78,4%
Médias-grandes	6	12	18	2	20	90,0%
Total	308	655	963	1776	2739	35,2%
%	11,3	23,9	35,2	64,8	100,0	

A maior participação relativa de operárias jovens de tamanhos maiores em tarefas realizadas na região da prole pode ser explicada pelos diferentes destinos que operárias de diferentes tamanhos tomam com o passar do tempo. Enquanto as operárias

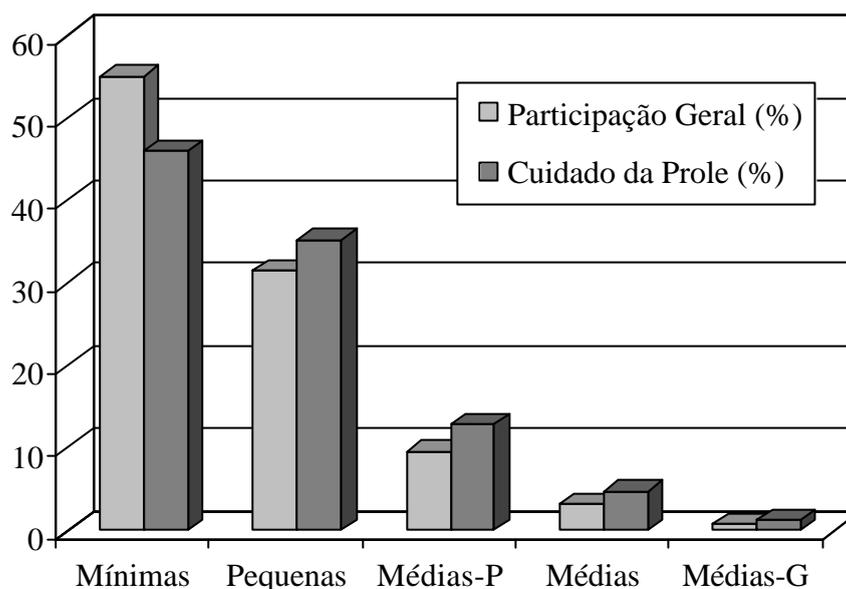
de tamanhos menores permanecem no jardim de fungo por toda sua vida se ocupando de tarefas relacionadas ao cuidado da prole e manutenção do jardim de fungo, as operárias maiores permanecem na área de prole somente durante os primeiros dias após sua emergência. Conforme vão atingindo uma idade mais avançada, estas formigas passam a participar do processamento de material vegetal para sua incorporação no jardim de fungo assim como do trabalho de escavação e manutenção de painéis e túneis do formigueiro, tarefas que são executadas fora da área de prole. Tarefas realizadas no exterior da colônia, como corte e transporte de material vegetal, também são executadas por operárias ainda mais velhas e de tamanhos maiores. Operárias de tegumento mais claro raramente são vistas do lado de fora do formigueiro.

A atividade que apresentou a maior participação de operárias jovens e intermediárias (45,3%) foi a de limpeza de larvas (131/289), confirmando a observação de HÖLLDOBLER e WILSON (1990) que o cuidado da prole é a primeira tarefa com que operárias se ocupam no decorrer de suas vidas. Estas diferenças de atividades exercidas de acordo com a idade da operária criam um número de castas funcionais na colônia ainda maior do que seria possível apenas com diferenças de tamanho entre operárias.

#### 4.1.1.4.3. Polimorfismo

A presença de operárias adultas pertencentes às classes de maior tamanho é rara na área de prole. Soldados não foram observados no presente trabalho devido ao tamanho dos formigueiros utilizados, uma vez que colônias pequenas ou médias normalmente não produzem soldados. Quando painéis de fungo são abertos em formigueiros maiores para coleta de material, a ocorrência de operárias maiores na área de prole é praticamente restrita a indivíduos jovens. Os três tamanhos menores de operárias (mínimas, pequenas e médias-pequenas) foram responsáveis por 96,1% do total dos atos comportamentais observados ( $n = 2628$ ) e 94,0% dos comportamentos de limpeza, auxílio à ecdise, alimentação e transporte da cria ( $n = 726$ ). Enquanto que as operárias mínimas sozinhas foram responsáveis por 55,0% dos atos comportamentais observados ( $n = 1504$ ) (figura 15).

A participação marcante das operárias mínimas foi na tarefa de transporte de ovos. Das 26 ocorrências desta tarefa, 88,5% ( $n = 23$ ) foram executadas por operárias mínimas e o restante por operárias pequenas (11,5%,  $n = 3$ ). Nota-se que esta tarefa é executada exclusivamente pelas duas menores classes de operárias, que devido ao seu tamanho certamente são as mais bem-adaptadas para o transporte de ovos.



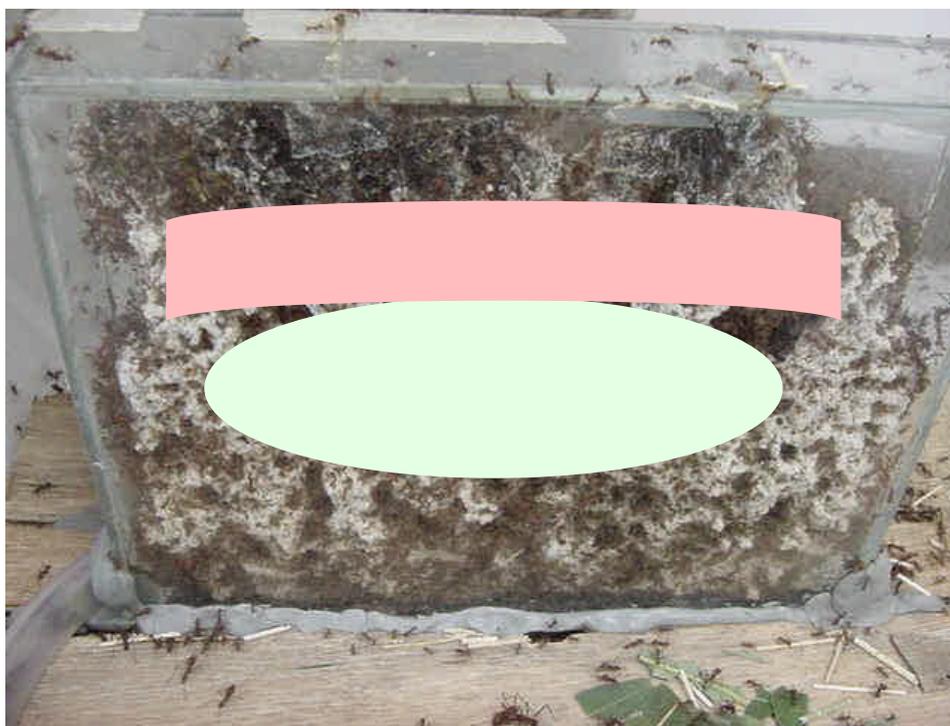
**Figura 15:** Participação relativa de operárias de *A. sexdens rubropilosa* conforme o tamanho da cápsula cefálica. As barras mais claras são relativas a todos os atos comportamentais observados. As barras mais escuras correspondem somente aos atos comportamentais relativos ao cuidado da prole.

#### 4.1.2. Distribuição de estágios imaturos no jardim de fungo

Uma vez que formas imaturas de *A. sexdens rubropilosa* são incapazes de se movimentarem, as operárias adultas são responsáveis por sua distribuição pelo jardim de fungo. Os ovos, larvas, pré-pupas e pupas não são espalhados uniformemente pelo jardim de fungo, e sim em estratos de acordo com seu desenvolvimento. Esta distribuição da prole é nítida nas câmaras de observação de ninhos de laboratório, assim como nas câmaras abertas para coleta de material de outros formigueiros também mantidos em laboratório.

As pupas são preferencialmente distribuídas na parte superior ou seja, a camada mais nova do jardim de fungo, imediatamente abaixo da região de deposição de substrato fresco para o cultivo do fungo. Larvas são encontradas com maior frequência na camada central do jardim de fungo, abaixo da região de maior concentração de pupas (figura 16). Pré-pupas estão presentes em ambas as áreas de maior concentração de prole, ou seja, tanto com larvas como com as pupas.

Ovos foram encontrados na região central do jardim de fungo, juntamente com as larvas. Formas imaturas são raras na parte inferior e mais antiga do jardim. É importante ressaltar que estas divisões ocorrem como um padrão geral, e não como uma divisão em pilhas ou painéis distintos dentro da colônia.



**Figura 16.** Distribuição formas imaturas de *A. sexdens rubropilosa* na esponja de fungo. A área verde contém uma maior concentração de larvas, enquanto que a região vermelha apresenta uma maior concentração de pupas.

O posicionamento de larvas no centro do jardim de fungo pode estar relacionado à sua proteção, especialmente em colônias de laboratório em que as partes externas das painéis de fungo são expostas a uma variação maior de temperatura e luminosidade. Mas esta distribuição desigual das formas imaturas pelo jardim pode também estar

relacionada ao estado de desenvolvimento do próprio fungo. A porção superior da esponja é composta por substrato fresco com inóculos recentes de fungo, que se encontra pouco desenvolvido. Esta é uma região onde não há muitas estáfilas para a alimentação de larvas, e talvez por isso as pupas, que não precisam ser alimentadas, sejam mais numerosas nesta região.

BOLLAZZI e ROCES (2002) demonstraram que operárias de *Acromyrmex heyeri* transportam larvas num gradiente de temperatura para que seu crescimento seja otimizado. Portanto também é possível que larvas e pupas tenham seu desenvolvimento ideal em temperaturas ligeiramente diferentes e que esta divisão de cria acompanhe um gradiente de temperatura dentro da panela de fungo.

#### **4.2. Quantificação dos comportamentos**

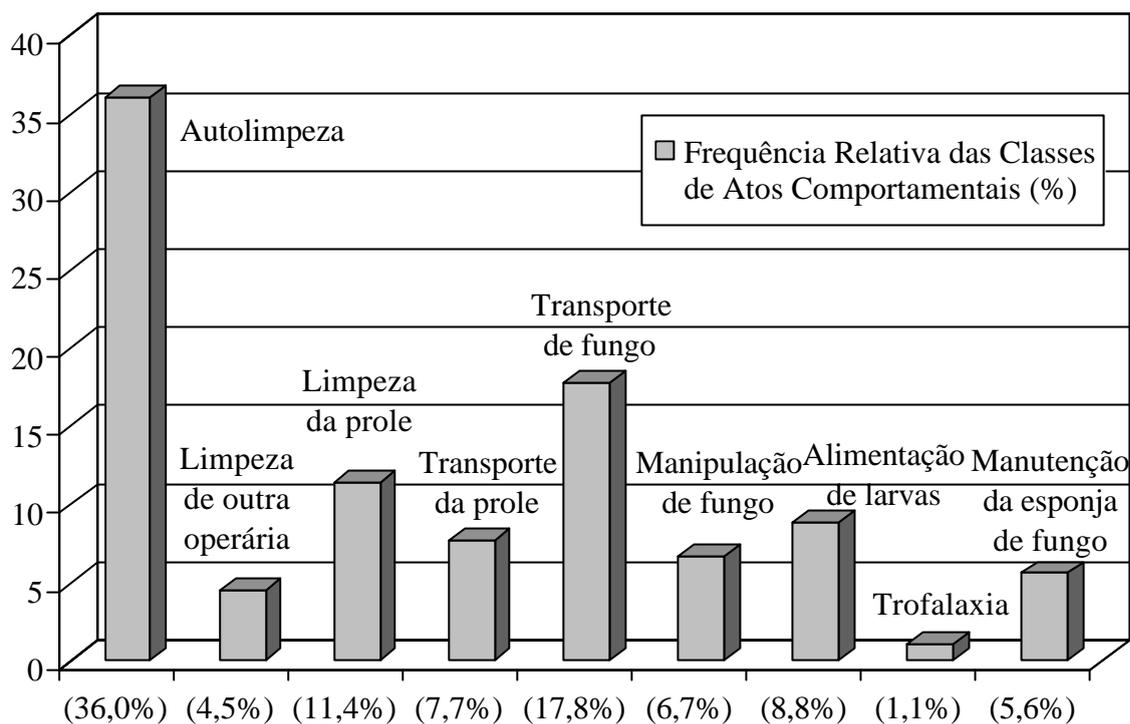
Os atos comportamentais quantificados a partir das 10 horas de gravação estão resumidos na tabela 4. Dez classes de comportamentos divididas em 28 diferentes categorias de atos comportamentais foram observadas e um total de 2739 atos comportamentais foram registrados. A tabela 5 resume somente os comportamentos relativos ao cuidado da prole. Uma representação da frequência relativa das classes gerais dos atos comportamentais observados se encontra na figura 17.



**Tabela 5.** Frequência absoluta dos atos comportamentais relativos exclusivamente ao cuidado da prole de *A. sexdens rubropilosa* conforme a idade da operária e o tamanho de sua cápsula cefálica.

Atos Comportamentais	Mínima			Pequena			Média-Pequena			Média			Média-Grande			Total
	Jovem	Interm.	Velha	Jovem	Interm.	Velha	Jovem	Interm.	Velha	Jovem	Interm.	Velha	Jovem	Interm.	Velha	
Limpar pupa	3	1	12		1	6	1									24
Limpar corpo de larva	10	15	37	2	13	29	1	3	2		2					114
Limpar região bucal de larva	8	14	21	6	11	19	2	6	6	3	3			5	1	105
Limpar região anal de larva	2	6	23	1	7	12	5	2	8	1	3					70
Auxiliar larva / pupa na ecdise					1	1		1	3							6
Transportar ovos		4	19			3										26
Transportar larvas	4	11	31	9	15	32	6	10	5		3					126
Transportar pupas		3	15	2	5	15	4	3	7	1	1	3			1	60
Auxiliar larva a alcançar alimento / manter fungo em contato com boca da larva	7	10	40	2	10	27	8	2	4	5	4			2		121
Alimentar larva com estáfila intacta		1	4		1	4			1		3	1				15
Alimentar larva com fungo manipulado	5	10	36	2	7	28	3	1	5	3	1					101
Alimentar larva com hifas intactas						1										1
Alimentar larva com ovos tróficos			3													3
Totais	39	75	241	24	71	177	30	28	41	13	20	4	0	7	2	772

Atos Comportamentais	Mínima			Pequena			Média-Pequena			Média			Média-Grande			Total
	Jovem	Interm	Velha	Jovem	Interm	Velha	Jovem	Interm	Velha	Jovem	Interm	Velha	Jovem	Interm	Velha	
Transporte de lixo			3		2	1			1							7
Transporte de hifas																0
Transporte de estáfilas	6	32	190	8	31	101	7	3	19		2	3				402
Transporte de fungo	4	9	30	4	3	23	1	2	3		1	3				83
Transporte de ovos tróficos									1		1					2
Manipulação de hifas			1			1										2
Manipulação de estáfilas	3	22	59	3	11	39	5	4	10	5	6	2	2	1		172
Manipulação de fungo	3	1	5			1										10
Auxílio a larva a alcançar alimento / manter fungo em contato com boca da larva	7	10	40	2	10	27	8	2	4	5	4			2		121
Alimentação de larva com estáfila intacta		1	4		1	4			1		3	1				15
Alimentação de larva com estáfilas manipuladas	5	10	36	2	7	28	3	1	5	3	1					101
Alimentação de larva com hifas intactas						1										1
Alimentação de larva com ovo trófico			3													3
Lamber a esponja de fungo	12	32	65	6	6	18	4	2	4			1	3			153
Total	141	342	1024	71	191	602	66	65	129	24	45	19	6	12	2	2739



**Figura 17.** Frequência relativa das classes de atos comportamentais de operárias de *A. sexdens rubropilosa* observadas. A classe de limpeza de operárias adultas foi dividida em autolimpeza e limpeza de outra operária adulta. As classes de auxílio a larva ou pupa durante a ecdise (com frequência de 0,2%) e transporte de lixo (com frequência de 0,3%) não estão representadas no gráfico. As classes de comportamentos relativos a limpeza somam 51,8% de todos os atos comportamentais observados.

### 4.3. Limpeza e transporte

A limpeza do formigueiro é uma tarefa extremamente importante. É graças à limpeza mantida no interior da colônia que as formigas cortadeiras mantêm sob controle os contaminantes presentes no solo ou trazidos do exterior do ninho, que possam prejudicar seu fungo simbionte ou mesmo as próprias formigas (WEBER, 1972). Em formigas onde o comportamento de trofalaxia não é comum como no caso das *Atta* (figura 17) o comportamento de limpeza associado aos toques entre operárias parece ser o principal mecanismo da transmissão entre os indivíduos da colônia dos hidrocarbonetos cuticulares que compõem o odor característico de cada formigueiro. Portanto, não é surpreendente que comportamentos relacionados à limpeza das formigas adultas, assim como estágios imaturos, correspondam a mais da metade de todos os atos comportamentais observados no presente trabalho (51,8%, n = 1420) (tabela 6).

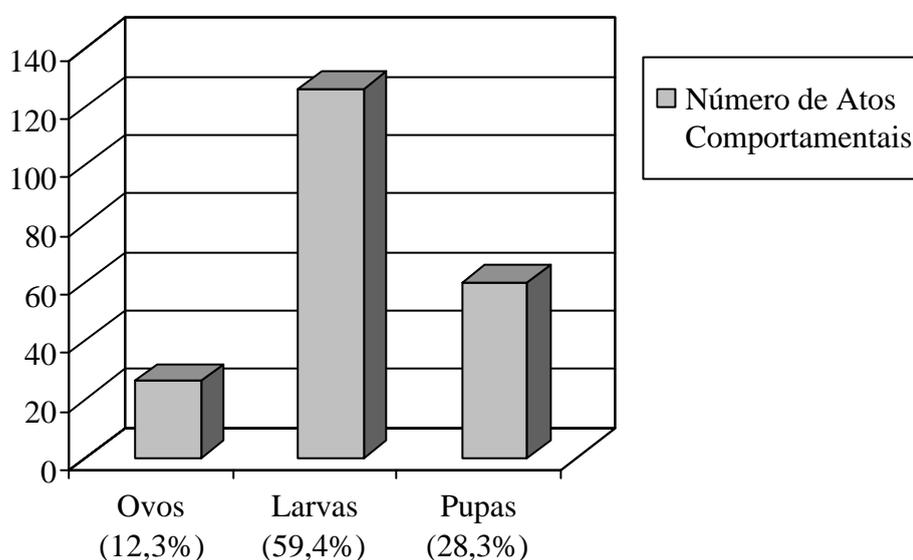
Todos os comportamentos relativos a limpeza são feitos com movimentos das peças bucais das operárias adultas, em especial da glossa. A superfície a ser limpa é, literalmente, raspada com movimentos de baixo para cima da glossa da operária. Todo o material retirado pela glossa é passado para a cavidade infrabucal da operária adulta onde fica retido até ser posteriormente levado ao lixo da colônia (QUINLAN e CHERRETT, 1978).

**Tabela 6:** Participação relativa de operárias de *A. sexdens rubropilosa* em atos comportamentais relativos a limpeza conforme o tamanho da cápsula cefálica.

Tamanho das operárias	Autolimpeza	Limpeza de outra operária	Limpeza de pupas	Limpeza de larvas	Total	%
Mínimas	601	66	16	136	819	57,7
Pequenas	280	43	7	100	430	30,3
Médias-Pequenas	80	10	1	35	126	8,9
Médias	21	2	0	12	35	2,5
Médias-Grandes	3	1	0	6	10	0,7
Total	985	122	24	289	1420	100,0
%	69,4	8,6	1,7	20,3	100,0	

Não foi observado nenhum comportamento de operárias adultas transportando operárias também adultas, mesmo que recém-emergidas. Como este comportamento é comumente observado em painéis de fungo perturbadas para a coleta de material, e provavelmente corresponde a um comportamento de emergência, sua ausência é na verdade um aspecto positivo, indicando que os métodos utilizados para observação foram pouco invasivos.

Considerando que o transporte de ovos tróficos, devido à sua função ser de uma natureza alimentar, não é uma forma de transporte de imaturos, e por não ter havido nenhum transporte de adultos, o transporte de larvas foi o mais significativo entre os atos de transporte de formas jovens (figura 18).



**Figura 18.** Frequências do transporte de formas jovens de *A. sexdens rubropilosa*.

#### 4.3.1. Limpeza de indivíduos adultos

De todos os comportamentos observados, o ato de maior frequência foi a autolimpeza, com 36,0% do total ( $n = 985$ ) e de 69,4% dentro dos comportamentos relacionados à limpeza. No jardim de fungo, a frequência com que a autolimpeza ocorreu em operárias adultas foi cerca de 8 vezes maior do que a de limpeza de outra operária (985:122 ocorrências). Por outro lado, a duração da limpeza de outra operária é

muito mais longa, podendo ultrapassar 5 minutos de duração, enquanto que a grande maioria das ocorrências de autolimpeza não ultrapassa 5 segundos de duração.

A maioria, ou 52,5% (n = 64) das ocorrências de limpeza de outro indivíduo, foi de formigas menores limpando formigas maiores; 36,1% ocorreram entre operárias de mesmo tamanho (n = 44); e somente em 11,5% das vezes uma operária maior limpou uma menor (n = 14) (tabela 7). As operárias mínimas foram responsáveis por 54,1% das ocorrências de limpeza coletiva (n = 66) e as operárias pequenas por 35,2% (n = 43). Estes números indicam que a limpeza dos indivíduos adultos na colônia também é uma tarefa de responsabilidade das menores operárias. As duas menores classes de tamanho juntas executaram 89,3% das ocorrências de limpeza de outra operária. É provável que devido a seu tamanho reduzido, elas sejam capazes de fazer uma limpeza mais completa, alcançando pontos nos corpos das outras formigas que as operárias maiores não são capazes de atingir.

**Tabela 7:** Participação das operárias de *A. sexdens rubropilosa* na limpeza de outras operárias adultas.

Tamanho das operárias	Limpeza de operária menor	Limpeza de operária de mesmo tamanho	Limpeza de operária maior	Total	%
Mínimas	-	33	33	66	54,1
Pequenas	11	7	25	43	35,2
Médias-Pequenas	3	2	5	10	8,2
Médias	0	1	1	2	1,6
Médias-Grandes	0	1	0	1	0,8
Total	14	44	64	122	
%	11,5	36,1	52,5		

#### 4.3.2. Limpeza de imaturos

Operárias adultas foram observadas limpando larvas um total de 289 vezes (10,6% do total de atos observados). Este comportamento foi dividido em três categorias de acordo com a região da larva que estava sendo limpa: a região em torno da cabeça da larva (considerada a região bucal), a região ao redor do orifício anal da larva e o corpo da larva correspondente ao restante da superfície larval (figura 19). A limpeza da região

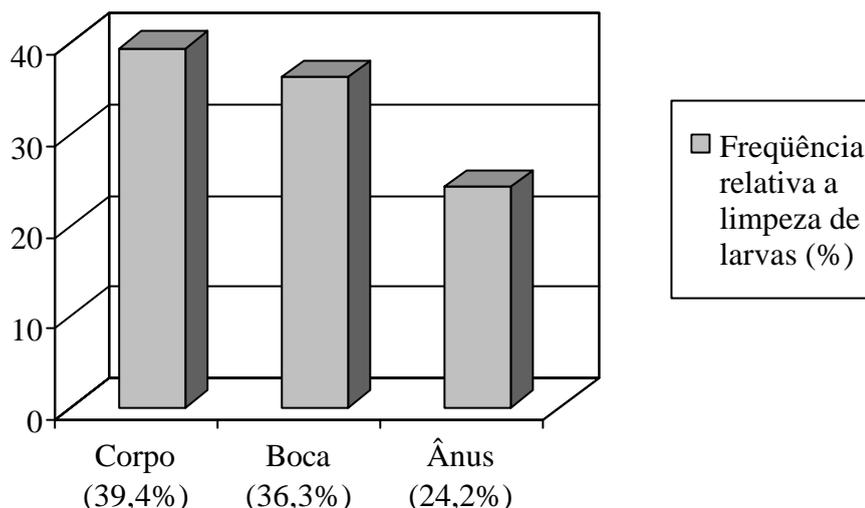
bucal das larvas corresponde a 36,3% (n = 105) do total de ocorrências (n = 289); a limpeza da região anal corresponde a 24,2% (n = 70); e do resto do corpo das larvas a 39,4% (n = 114) (figura 20). Uma vez que as áreas correspondentes às regiões bucal e anal são menores do que o restante do corpo das larvas, pode-se afirmar que há uma preferência por parte das operárias por limpar estas regiões. A limpeza de larvas como um todo correspondeu a 20,4% dos atos comportamentais relacionados a limpeza em geral e a 37,4% dos atos de cuidado da prole.



**Figura 19.** Divisão da superfície corpórea de larvas de *A. sexdens rubropilosa*. A área verde corresponde à região bucal e a área vermelha à região anal da larva. Aumento: 50X.

Foram observadas somente 24 ocorrências de limpeza de pupas, totalizando apenas 0,9% dos atos comportamentais observados e a 1,7% das ocorrências de limpeza. Pupas provavelmente necessitam de menos cuidados com limpeza do que larvas, uma vez que neste estágio a formiga não se alimenta e é imóvel, e portanto, tem menos chances de se contaminar. Mais importante do que a limpeza das pupas parece ser o seu transporte, que foi observado 60 vezes, ou 2,2% de todos os comportamentos observados. O transporte de novas pupas da área de larvas para a área de pupas na

esponja de fungo assim como a transferência de hidrocarbonetos cuticulares devem ser fatores importantes para esta aparente importância para o transporte de pupas. Porém, vale ressaltar que o transporte de larvas foi observado mais do que duas vezes maior do que de pupas (figura 18) e que considerando todos os comportamentos relacionados a cuidado da prole, somente 11,3% foram relacionados a pupas.



**Figura 20:** Frequências das regiões das larvas de *A. sexdens rubropilosa* limpas pelas operárias. A área relativa ao “corpo” da larva é bastante maior do que as áreas relativas ao ânus ou à boca, mas esta diferença não se reflete na frequência de limpeza.

#### 4.4. Fluxo de alimento

##### 4.4.1. Ovos tróficos

Ovos tróficos foram vistos sendo transportados em duas ocasiões distintas, mas sua utilização para a alimentação de larvas foi observada somente uma vez. O ovo foi utilizado para a alimentação de larvas de primeiro ínstar. Este fato corrobora com observações de AUTUORI (1949) e WEBER (1972) apesar de aparentemente estas observações serem da fundação de ninhos.

Durante a observação de uma área repleta de ovos, uma operária mínima foi vista carregando em suas mandíbulas um ovo diferente dos demais naquela região. Ovos viáveis são pequenos, ovais, esbranquiçados e aparentemente firmes, ao passo que o ovo transportado por esta operária era maior, mais arredondado e aparentava ser flácido. Os diversos outros ovos se encontravam junto a larvas que devido ao seu tamanho de corpo e cápsula cefálica eram larvas recém-emergidas de primeiro ínstar. Da mesma forma que se dá a alimentação de larvas com fungo, a operária manteve o ovo trófico em contato com as peças bucais da larva enquanto esta o ingeria. Após os movimentos mastigatórios da larva terem cessado, a operária ofereceu o ovo parcialmente comido para uma nova larva que se encontrava próxima à anterior, e depois a uma terceira larva, todas elas de primeiro ínstar.

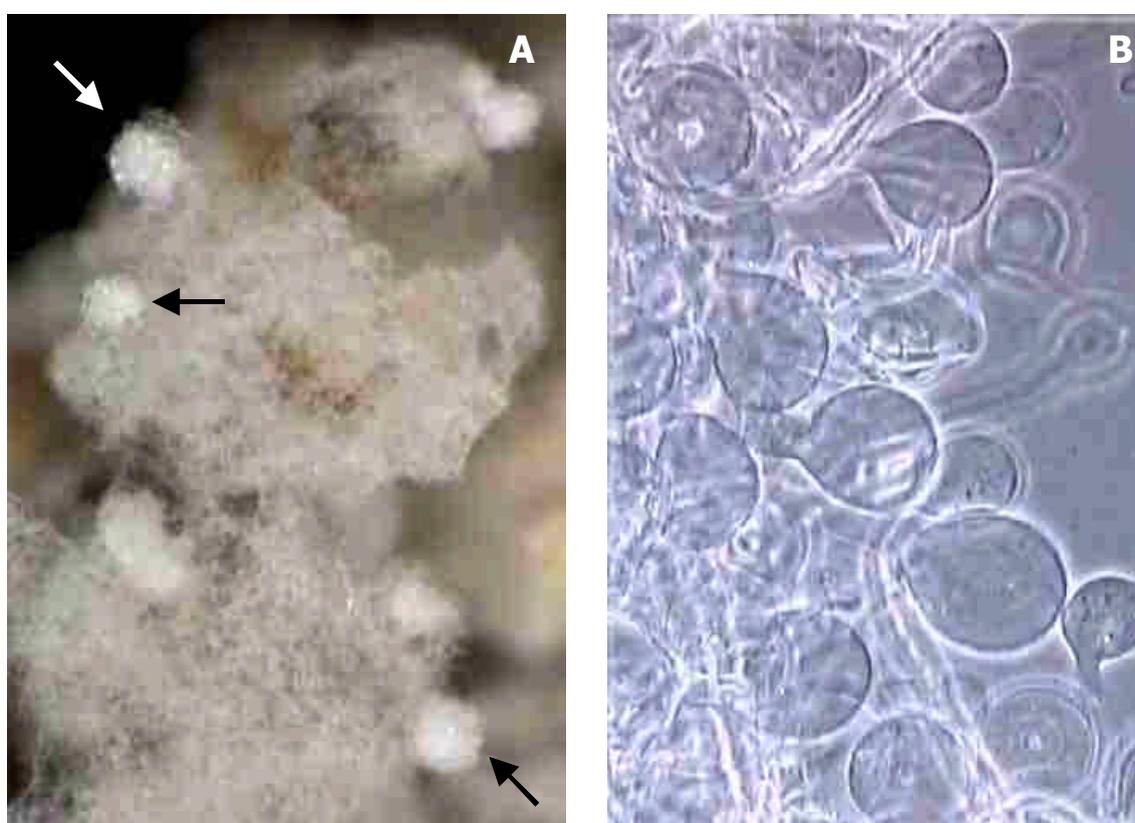
Estas foram as únicas observações de alimentação de larvas de primeiro ínstar, devido à dificuldade de localizar uma região de ovos mesmo com toda a tecnologia empregada. É conhecido que larvas de todos os instares de desenvolvimento são alimentadas com ovos tróficos produzidos pela rainha nos primeiros meses que seguem a fundação de um novo formigueiro, após o vôo nupcial até que as primeiras operárias comecem a forragear e o fungo se desenvolva (MARICONI, 1970; WEBER, 1972).

Segundo a literatura, rainhas de *A. sexdens rubropilosa* botam uma média de 8 ovos viáveis para cada ovo trófico (DELLA LUCIA et al., 1990) e rainhas de *Atta laevigata* botam 12 ovos viáveis para cada ovo trófico (ARAÚJO e DELLA LUCIA, 1993). É possível que larvas de primeiro ínstar de *Atta* sejam alimentadas exclusivamente com ovos tróficos, mas as observações feitas durante este trabalho não são suficientes para confirmar ou rejeitar esta hipótese. Existe ainda a possibilidade destes ovos não terem sido postos pela rainha, e sim pelas operárias como é o caso de outros Hymenoptera sociais.

#### 4.4.2. Alimentação com fungo

*Leucoagaricus gongylophorus*, o fungo simbiote das *Atta*, produz estruturas únicas entre os fungos, denominadas gongilídeos, que aparentam ser uma adaptação especial a vida com as formigas (WEBER, 1972). Gongilídeos são estruturas

arredondadas (figura 21B) repletas de líquido contendo concentrações maiores de lipídeos e carboidratos do que o resto do fungo (MARTIN et al., 1969). Conjuntos de gongilídeos, que se assemelham a minúsculos cachos de uva, são denominados estáfilas (figura 21A). Estáfilas são facilmente visíveis no jardim de fungo, pois são mais brancas e brilhantes do que o restante do jardim. Operárias coletam as estáfilas do jardim de fungo e levam-nas para as larvas. Durante seu transporte, estáfilas podem ser diferenciadas das hifas do fungo por sua coloração esbranquiçada e pelo brilho característico dos gongilídeos.



**Figura 21.** Aspectos microscópicos do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, o fungo simbiote de *A. sexdens rubropilosa*. (A) Estáfilas (setas) contrastando com hifas (Aumento: 50X). (B) Estáfila vista sob microscópio óptico: cada esfera correspondendo a um gongilídeo (Aumento: 1000X).

Com exceção da ocasião em que três larvas de primeiro ínstar foram alimentadas com ovos tróficos, todas as outras 117 ocorrências de alimentação de larvas ocorreram

com fungo (97,5%), mostrando a importância do simbiote como alimento das larvas da saúva (tabela 8). Estáfílas são a parte do fungo mais manuseada na área da prole. Correspondem a 82,9% (402/485) de todos os transportes de fungo, 93,5% (172/184) do fungo ingerido pelas operárias e a 96,7% (116/120) dos atos de alimentação das larvas. Uma única observação foi feita em que o fungo dado à larva não se tratava de uma estáfíla.

Durante a alimentação da larva, o fungo é sempre depositado diretamente em contato com suas peças bucais, enquanto a operária toca incessantemente a região da cabeça da larva com suas antenas (figura 22). A larva mastiga o fungo com movimentos de suas maxilas, lábio, mandíbulas e labro. As maxilas e o lábio são estruturas macias e flexíveis que auxiliam na sustentação do alimento, enquanto que as mandíbulas e o labro são estruturas de tegumento mais rígido, onde o alimento é realmente macerado para ser ingerido (figura 10).

O fungo pode ser ingerido por completo ou até o momento em que uma operária, que pode ou não ser a mesma que iniciou o processo de alimentação, retira o fungo da boca da larva e oferece-o para outra larva. Como foi mencionado anteriormente, as únicas partes das larvas que executam movimentos são as peças bucais externas, e portanto as larvas se alimentam somente do que lhes é oferecido pelas operárias adultas. A duração média de larvas se alimentando de fungo foi de 5 minutos e 54 segundos (n = 43).

Durante a alimentação da prole, é comum observar a operária que trouxe o fungo utilizando suas peças bucais para mantê-lo em contato com as mandíbulas da larva enquanto suas antenas mantêm contato com a cabeça da larva, verificando se os movimentos mastigatórios prosseguem (figura 23). Este contato antenal também ocorre quando uma operária passa próximo de uma larva que está se alimentando sem o auxílio de uma operária adulta. Este comportamento de auxiliar a larva a manter o alimento em contato com suas mandíbulas foi observado 121 vezes, enquanto foram registradas 117 ocorrências de alimentação de larvas com pedaços de fungo (tabela 8).



**Figura 22.** Operária adulta de *A. sexdens rubropilosa* alimentando larva com pedaço de fungo. Após a estáfila ter sido manipulada pela operária, ela coloca-o em contato com a boca da larva que o mastiga e ingere. A operária adulta sempre mantém contato com a larva através de suas antenas. Pela largura da cápsula cefálica e pelo grau de esclerotização do tegumento, trata-se de uma operária média-pequena velha. A larva tem 5 mm de comprimento.

**Tabela 8.** Atos comportamentais observados relacionados à alimentação de larvas de *A. sexdens rubropilosa*, em colônia de laboratório.

Ato Comportamental	Frequência	%
Alimentação de larva com estáfila intacta	15	12,5
Alimentação de larva com estáfilas manipuladas	101	84,2
Alimentação de larva com hifas intactas	1	0,8
Alimentação de larva com hifas manipuladas	0	0,0
Alimentação de larva com ovo trófico	3	2,5
Total de alimentações com fungo intacto	16	13,3
Total de alimentações com fungo manipulado	101	84,2
Total de alimentações com fungo	117	97,5
Total de alimentações	120	100,0
Auxílio à larva a alcançar alimento / Manter fungo em contato com boca da larva	121	



**Figura 23.** Operária adulta de *A. sexdens rubropilosa* mantendo pedaço de fungo em contato com a boca de uma larva enquanto esta mastiga e ingere do fungo. A operária adulta sempre mantém contato com a cabeça da larva através de suas antenas. Pela largura da cápsula cefálica e pelo grau de esclerotização do tegumento, trata-se de uma operária mínima velha. A larva tem 5 mm de comprimento.

PETRALIA e VINSON (1979) descreveram a existência de uma protuberância protorácica central com presença de pelos na região ventral logo abaixo da região bucal de larvas de *Atta texana*. Esta estrutura supostamente auxiliaria a larva a prender o fungo durante a alimentação. Através de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar a existência de uma pequena fileira de pelos imediatamente sob a cabeça na superfície ventral das larvas de *A. sexdens rubropilosa* (figura 24). É possível que estes pelos sirvam ao mesmo propósito que a protuberância descrita por PETRALIA e VINSON (1979). Mesmo assim, não é raro observar larvas com uma pequena quantidade de fungo em sua superfície ventral imediatamente abaixo de sua boca, porém fora do alcance de suas mandíbulas. A intervenção de operárias adultas é fundamental para que as larvas recuperem e voltem a se alimentar destes pedaços de fungo desprendidos de suas mandíbulas.



**Figura 24.** Microfotografia eletrônica de varredura de larva de *A. sexdens rubropilosa* mostrando maior pilosidade em sua superfície ventral sob a região bucal.

#### 4.4.3. Trofalaxia

Conforme WILSON (1976) e WHEELER (1994), trofalaxia é definida como a transferência de substâncias líquidas entre dois ou mais indivíduos, que podem ser adultos, tanto operárias como rainhas, ou imaturos. A forma mais comum de trofalaxia nas formigas em geral é a trofalaxia estomodeal, que ocorre quando um indivíduo adulto regurgita o conteúdo de seu papo, que é ingerido por outro indivíduo adulto. A ingestão de líquidos secretados por outras maneiras, como do ânus de uma operária ou de uma larva como é o caso da transferência de conteúdo intestinal em cupins, também pode ser considerada uma forma de trofalaxia, a proctodeal. A trofalaxia é um comportamento social comum em muitos Hymenoptera sociais. Em formigas ocorre com frequências variáveis em algumas tribos como as Camponotini e as Solenopsini, mas não ocorre entre as Ponerinae (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). A trofalaxia é uma forma bastante rápida de transferência de alimentos pela colônia, sendo apontada como o mecanismo de manutenção da homeostase do formigueiro, minimizando as diferenças

de níveis de provisionamento entre indivíduos da colônia (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Pelo fato da trofalaxia ser uma maneira de transferência rápida de alimentos, ela também pode ser utilizada para que um ingrediente ativo possa atingir rapidamente a todos os indivíduos da colônia e desta forma, realizar um controle eficiente.

#### 4.4.3.1. Trofalaxia estomodeal

Do total aproximado de 10 horas de observação, houve apenas 4 possíveis ocorrências de trofalaxia entre operárias adultas, mas jamais foi vista uma gotícula de líquido sendo transferida da boca de uma formiga para a boca de outra, caracterizando a trofalaxia estomodeal entre estas operárias. Aparentemente, estas poucas ocorrências de contato oral entre operárias foram apenas casos de uma operária limpando o aparelho bucal da outra. Tal fato corrobora observações de ANDRADE et al. (2002) que não observaram trofalaxia estomodeal entre operárias adultas de *A. sexdens rubropilosa* ao analisarem o comportamento de preparação de substrato vegetal para a incorporação do fungo simbiote.

Da mesma forma também não foi observada a existência de trofalaxia estomodeal entre operárias e larvas. Houve apenas uma ocasião em que o contato entre regiões bucais de uma larva e uma operária foi bastante prolongado (17 segundos), mas também nenhuma transferência de líquido pôde ser observada. No caso da trofalaxia entre larvas e rainhas da formiga-do-faraó *Monomorium pharaonis* por exemplo, gotículas foram observadas sendo transferidas das larvas para as rainhas (BØRGESSEN, 1989).

Se realmente ocorre trofalaxia entre operárias de saúvas, o que parece não ser verdadeiro, esse ato não ocorre em quantidade significativa, especialmente para poder ser usado para a distribuição de alimento ou mesmo para dispersar um agente de controle pelo formigueiro. Desta forma, a trofalaxia estomodeal é um evento raro na saúva-limão, contrariando as observações que citam esse mecanismo como responsável pela dispersão de inseticidas pela colônia na metodologia de iscas tóxicas (DELLA LUCIA, 1990; FORTI et al., 1993).

#### 4.4.3.2. Trofalaxia proctodeal

Na região proctodeal da larva, de tempos em tempos, ocorre a formação de uma gotícula de líquido transparente, levemente amarelado (figura 25), que é imediatamente sorvida pela primeira operária que a encontra. Um único toque de antena na gotícula é o suficiente para que a operária passe imediatamente a ingeri-la. Geralmente, a larva elimina uma pequena quantidade inicial deste líquido proctodeal e enquanto uma operária o ingere e toca a larva com suas antenas e peças bucais, ela elimina outra gota maior de líquido de mesma aparência.

As larvas liberam este líquido proctodeal, aproximadamente, uma vez para cada quatro vezes que são alimentadas em média (29/120). Uma única vez foi observado que o líquido proctodeal produzido pelas larvas não foi imediatamente absorvido pelas operárias ao tocarem o líquido com suas antenas. Isto sugere que o líquido é bastante atrativo para as operárias.



**Figura 25.** Larva de *A. sexdens rubropilosa* expelindo gotícula de líquido proctodeal. O comprimento da larva é de 8 mm.

O comportamento de transferência de líquido proctodeal larval foi observado num total de 29 vezes, sugerindo uma forma de transferência de substâncias de valor alimentar, das larvas para as operárias. A frequência desse ato é muito maior do que os raros e dúbios casos de trofalaxia estomodeal entre operárias adultas ou entre elas e as larvas.

Fato similar de trofalaxia proctodeal foi observado por O'NEAL e MARKIN (1973) em *Solenopsis invicta*. De acordo com estes autores, larvas a partir do segundo ínstar larval produzem um líquido anal leitoso que é um dos alimentos preferidos das operárias adultas e serve como fonte complementar de alimento para a colônia. Este líquido pode ser solicitado pelas operárias através de pressões intermitentes na região anal das larvas ou, menos frequentemente, as próprias larvas espontaneamente disponibilizam o líquido. As mesmas larvas de *S. invicta* também eliminam uma substância clara, que segundo os autores é constituída de material excretado que as operárias transportam em suas mandíbulas para os limites do ninho. Comportamentos semelhantes de trofalaxia proctodeal também foram descritos para *Monomorium pharaonis* e *Myrmica rubra* por OHLY-WÜST (1977, apud HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Da mesma forma as larvas eliminam um líquido proctodeal que é constantemente solicitado pelas operárias. Análises químicas revelaram que este líquido apresenta uma concentração de nitrogênio de 2,1 µg/µL além de conter ácido úrico, aminoácidos e traços de proteínas.

As operárias de *A. sexdens rubropilosa* que mais se utilizaram deste líquido proctodeal foram as jovens e intermediárias (44,8%). As mesmas categorias de idade se destacaram na tarefa de limpar as larvas (com 45,3% dos atos observados) e, portanto, é natural que sejam também as que mais ingerem o líquido proctodeal.

#### 4.4.3.2.1. Quantidade liberada de líquido proctodeal de larvas

A tabela 9 resume informações sobre a quantidade de líquido proctodeal eliminado pelas larvas de diferentes tamanhos e coletadas de duas formas. Uma determinação foi realizada de amostragens aleatórias de larvas (n = 75) no jardim de fungo, resultando em 0,0547 µL/larva. A segunda amostragem foi composta por larvas

de diferentes tamanhos (pequenas, médias e grandes), cujo valor médio foi de 0,0551  $\mu\text{L}/\text{larva}$  ( $n = 136$ ). A média final combinada foi de 0,055  $\mu\text{L}/\text{larva}$  ( $n = 211$ ).

A diferença média de peso das larvas ( $n = 18$ ) entre os pesos determinados antes e depois da extração do líquido anal foi de 0,07 mg, o que corresponde a 1,05% do peso total da larva.

**Tabela 9:** Determinação do volume de líquido proctodeal expelido pelas larvas de *A. sexdens rubropilosa*.

Tamanho das larvas	n	Vol. Coletado ( $\mu\text{L}$ )	$\mu\text{L}/\text{larva}$
Pequenas	60	2,0	0,0333
Médias	59	3,7	0,0627
Grandes	17	1,8	0,1059
Média P, M, G	136	7,5	0,0551
Ao acaso	75	4,1	0,0547
Total geral	211	11,6	0,0550

#### 4.4.3.2.2. Análise química do líquido proctodeal de larvas

A determinação da composição química do líquido proctodeal das larvas mostra que o material é uma mistura de açúcares, aminoácidos, ácido fosfórico e glicerol. Os aminoácidos identificados foram valina, leucina, serina, treonina, fenilalanina e tirosina.

#### 4.4.3.2.3. Análise bioquímica do líquido proctodeal de larvas

As análises bioquímicas do líquido proctodeal larval mostraram que este contém 5-8 mg de proteína/mL, o equivalente a 0,275-0,440  $\mu\text{g}$  de proteína por larva a cada liberação de líquido proctodeal.

A concentração de glicose foi determinada em 10,98 mg/mL de material, o equivalente a aproximadamente 0,6  $\mu\text{g}$  de glicose por larva a cada ciclo de liberação do líquido proctodeal.

A tabela 10 contém valores das atividades enzimáticas do líquido proctodeal sobre dissacarídeos. O material apresentou atividade sobre maltose, celobiose, trealose e sacarose. A atividade sobre trealose é marcante, apresentando capacidade de liberação de 135,30  $\mu\text{g}$  de glicose por minuto de reação, por mL de amostra.

**Tabela 10:** Atividade enzimática do líquido proctodeal de *A. sexdens rubropilosa* sobre dissacarídeos.

Substrato	DO <sub>505</sub>	Controle	$\mu\text{g}_{\text{glic}}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ *	$\mu\text{M}_{\text{glic}}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ **	$\mu\text{M}_{\text{glic}}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ***
Maltose	0,1201 0,1227	0,1010	8,08	0,0450	76,3
Celobiose	0,0616 0,0682	0,0575	2,93	0,0163	27,6
Trealose	0,4637 0,3976	0,0892	135,30	0,7510	1272,9
Sacarose	0,0626 0,0572	0,0557	1,66	0,0092	15,6

\*  $\mu\text{g}$  de glicose liberado por minuto de reação, por mL de amostra.

\*\*  $\mu\text{M}$  de glicose liberado por mL de amostra, por minuto de reação.

\*\*\*  $\mu\text{M}$  de glicose liberado por minuto de reação, por g de proteína.

As análises de atividade enzimática sobre polissacarídeos mostraram ausência de atividade sobre amido, xilana e CMC. Por outro lado, foi verificada certa atividade sobre celulose e pectina conforme os resultados descritos na tabela 11.

**Tabela 11:** Atividade enzimática do líquido proctodeal de *A. sexdens rubropilosa* sobre polissacarídeos.

Substrato	DO <sub>575</sub>	$\mu\text{g}_{\text{AR}}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	$\mu\text{M}_{\text{AR}}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	$\mu\text{M}_{\text{AR}}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$
Amido	0	0	0	0
Xilana	0	0	0	0
CMC	0	0	0	0
Celulose	0,0327 0,0316	23,6	0,1112	188,5
Pectina	0,1284 0,1775	49,3	0,2323	393,7

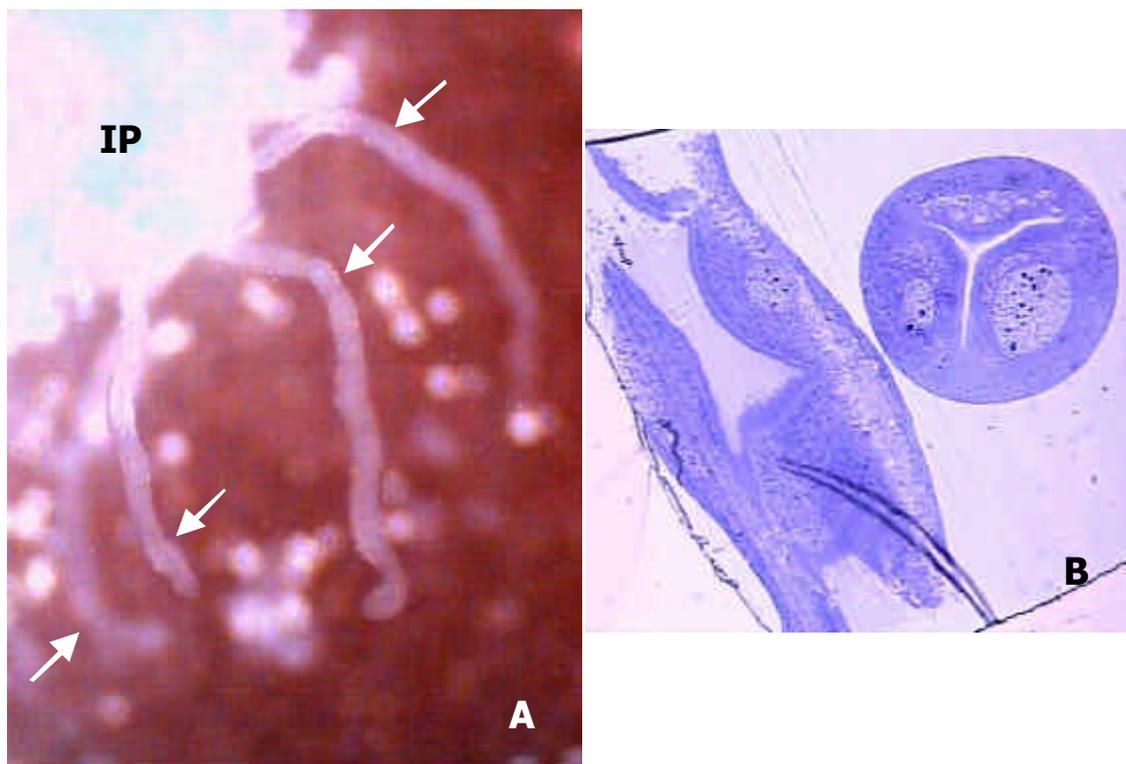
O fato do líquido proctodeal possuir açúcares, entre os quais a glicose (10,98 mg/mL), proteínas (5-8 mg/mL), assim como aminoácidos livres, sugere que este

líquido não se trata de um simples excreta das larvas mas que ele possui um valor nutricional.

Por outro lado, a presença de atividade enzimática, especialmente da grande quantidade de trealase indica que as larvas estão transferindo estas enzimas para as operárias adultas e colaborando enzimaticamente com sua alimentação, uma vez que a trealose é o principal açúcar da hemolinfa dos insetos (WIGGLESWORTH, 1972). Uma vez que as operárias adultas defecam nas folhas depositadas para a formação do jardim de fungo (ANDRADE et al., 2002), é possível que estas enzimas auxiliem ambos fungo e formigas a atingirem e utilizarem o material vegetal trazido para o interior do formigueiro.

Anatomicamente, nas formigas, o intestino posterior das larvas, de onde vem o líquido proctodeal, não possui conexão com o intestino médio em larvas (WHEELER e WHEELER, 1979), portanto este líquido não pode se tratar de um simples subproduto da digestão do fungo ingerido pelas larvas, ou mesmo fezes. O líquido proctodeal deve ser originário dos túbulos de Malpighi das larvas e eliminado pelo intestino posterior (WILSON, 1976; HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). Larvas dissecadas apresentam quatro túbulos de Malpighi bastante grossos, longos e desenvolvidos, que desembocam no início do intestino posterior (figura 26).

As larvas estariam portanto, se alimentando exclusivamente de fungo (estáfílas) e parte do resultado da digestão do fungo estaria sendo extraído da hemolinfa pelos túbulos de Malpighi larvais e sendo passado para as operárias adultas por trofalaxia proctodeal. Desta forma, as larvas estariam digerindo a parte sólida do fungo e possibilitando que as operárias adultas, que só ingerem alimentos líquidos, tenham mais uma fonte de nutrientes, otimizando a rede alimentar da colônia.



**Figura 26.** Túbulos de Malpighi de larva de operária de *A. sexdens rubropilosa*. (A) Os quatro túbulos desembocam no intestino posterior da larva (IP), aumento: 50X; (B) Lâmina com montagem de corte transversal e longitudinal dos túbulos de Malpighi, evidenciando um canal central entre as células grandes e ativas, aumento: 500X.

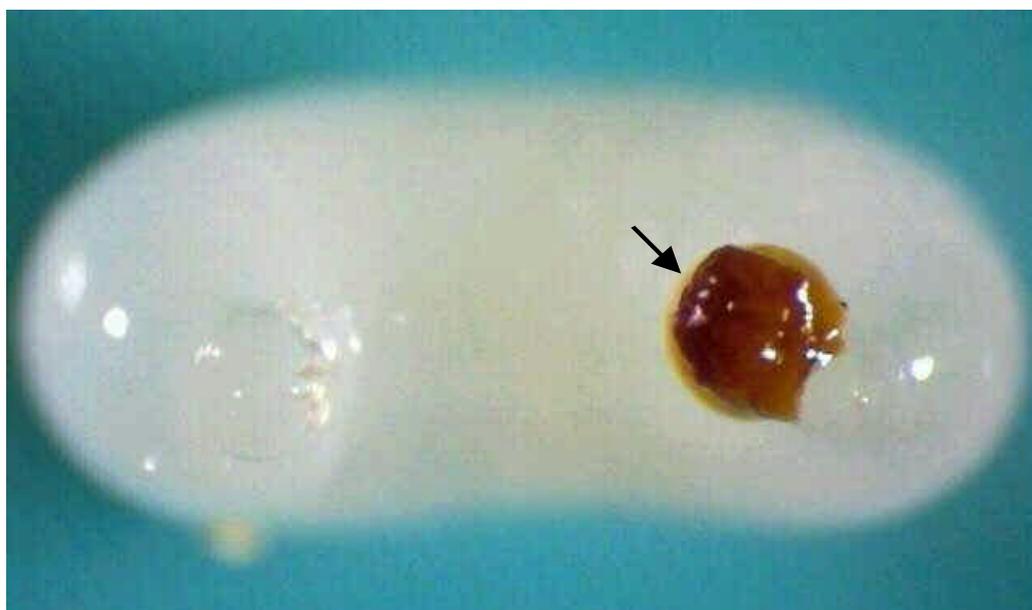
#### 4.5. Mecônio

Também foi observada a eliminação por uma larva de ínstar avançado de uma substância viscosa de coloração marrom escura que parecia secar e enrijecer com o tempo. Este material é o mecônio, as primeiras fezes expelidas pelas larvas dos Hymenoptera, quando se dá a ligação dos intestinos médio e posterior, nos momentos que antecedem a metamorfose (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

O mecônio eliminado não foi prontamente coletado pelas primeiras operárias adultas que entraram em contato com ele, como normalmente ocorre com o líquido proctodeal. Mais tarde, porém, a massa marrom foi coletada por uma operária que

ingeriu a porção líquida e transportou a porção sólida em suas mandíbulas. Não foi possível seguir a operária ou determinar o destino desta substância. Posteriormente, a mesma massa viscosa escura foi observada várias vezes durante o processo de coleta de líquido proctodeal para a realização das análises química e bioquímica. O mecônio era, geralmente, encontrado em larvas maiores e/ou bem esbranquiçadas, coloração que indica que a larva se encontra na fase de pré-pupa (figura 27).

O'NEIL e MARKIN (1973) observaram que em *Solenopsis invicta*, o mecônio, depois de suficientemente seco, é retirado por operárias que o levam para o lixo do formigueiro, mas segundo LE MASNE (1953), em Ponerinae e Camponotinae o mecônio é ingerido.



**Figura 27.** Pré-pupa de *A. sexdens rubropilosa* ao eliminar o mecônio (seta). Aumento: 50X.

#### 4.6. Transporte de lixo

O transporte de lixo foi caracterizado pelo transporte de partículas de um material de coloração marrom-amarelada muito similar àquela do material vegetal exaurido que compõe o lixo da colônia e que, nitidamente, não continha nem hifas ou

estáfílas do fungo simbiote e nem pedaços de folhas para sua incorporação no jardim de fungo. As operárias foram observadas transportando este material entre suas mandíbulas ao passarem pela área de prole.

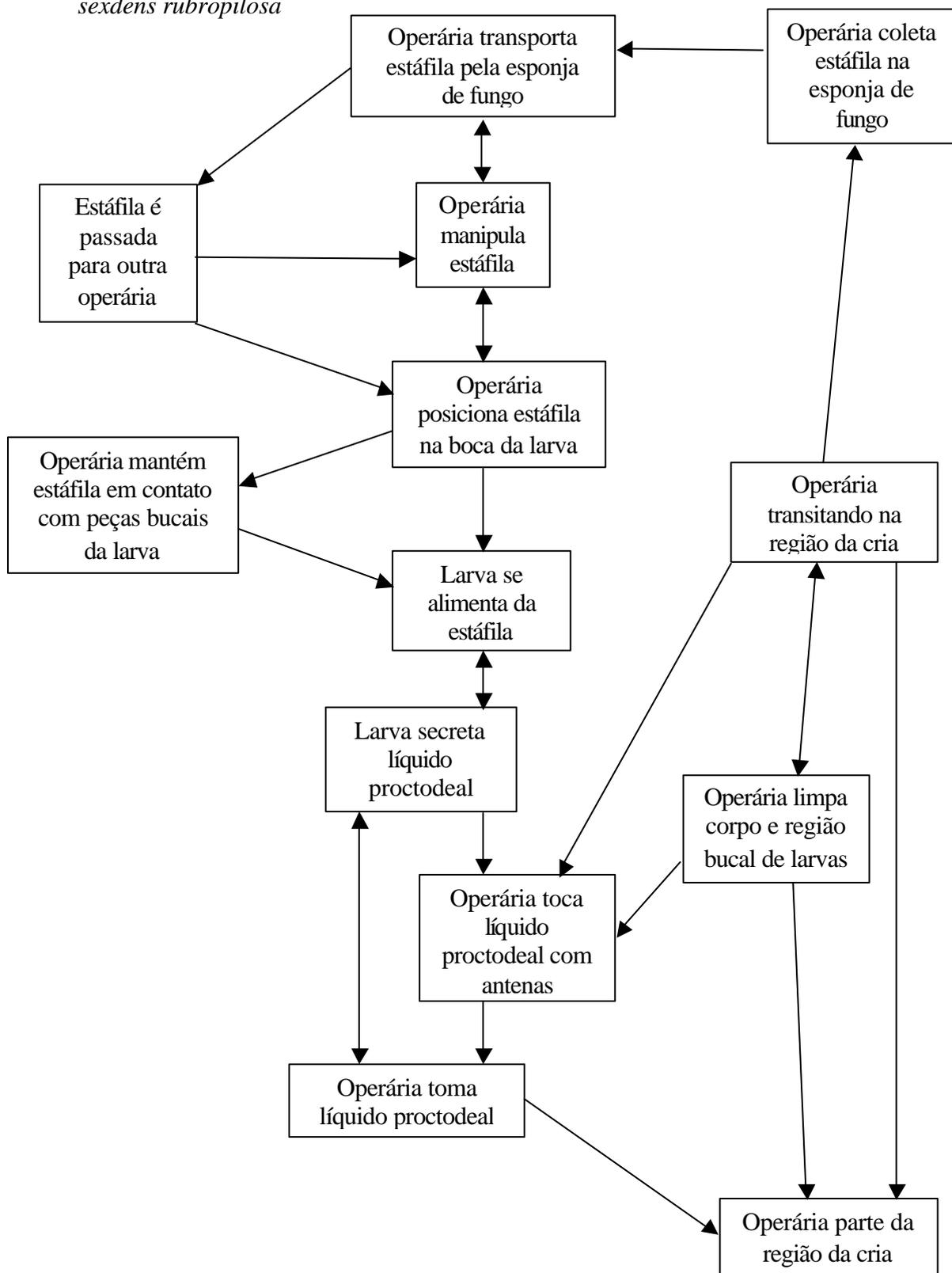
Observações do transporte de lixo foram raras na região de prole e ocorreram somente 7 vezes durante as observações em contraste com 212 ocorrências de transporte de estágios imaturos e 485 vezes de transporte de fungo. O transporte de lixo deve ocorrer com maior frequência na região mais inferior do jardim de fungo, onde o substrato vegetal para o fungo simbiote já está exaurido. É provável também que o transporte de lixo seja evitado na área de prole para minimizar o risco de contaminação.

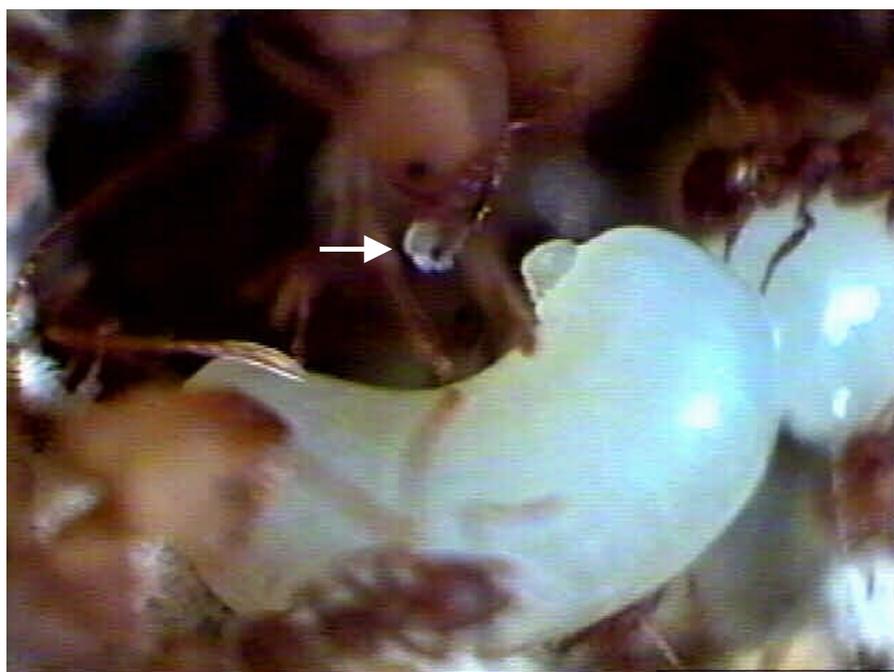
#### **4.7. Resumo dos comportamentos de cuidado com a prole**

As fotos das páginas seguintes (figuras 28-39) apresentam a seqüência detalhada de todo o comportamento de provisionamento da prole e da trofalaxia proctodeal que ocorre com *A. sexdens rubropilosa*.

O diagrama da página 64 (tabela 12) resume os principais passos comportamentais que envolvem o processo de cuidado com a prole por operárias adultas de *A. sexdens rubropilosa*. As áreas gerais de comportamento incluem limpeza da prole, alimentação da prole com estáfílas do fungo simbiote, e a alimentação das próprias operárias durante o preparo das estáfílas para as larvas e nas ocorrências de trofalaxia proctodeal.

**Tabela 12.** Diagrama de comportamentos envolvidos no cuidado da cria de *Atta sexdens rubropilosa*





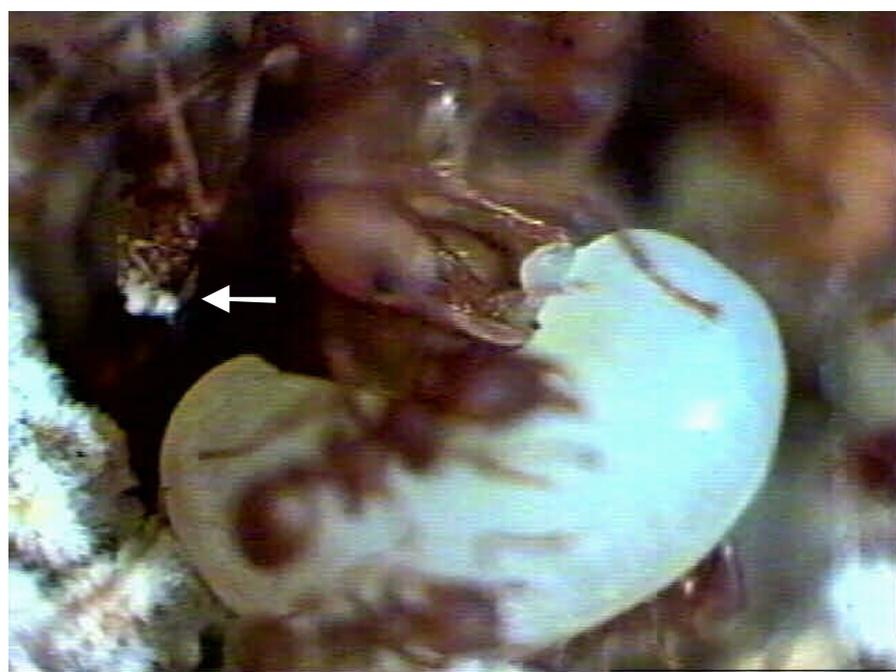
**Figura 28.** Operária média-pequena de *A. sexdens rubropilosa* carregando entre as mandíbulas, estáfila previamente mastigada (seta), cuja parte líquida foi em grande parte sugada durante seu manuseio. Quanto à sua idade, esta operária é classificada como ‘velha’ pelo grau de esclerotização de seu tegumento.



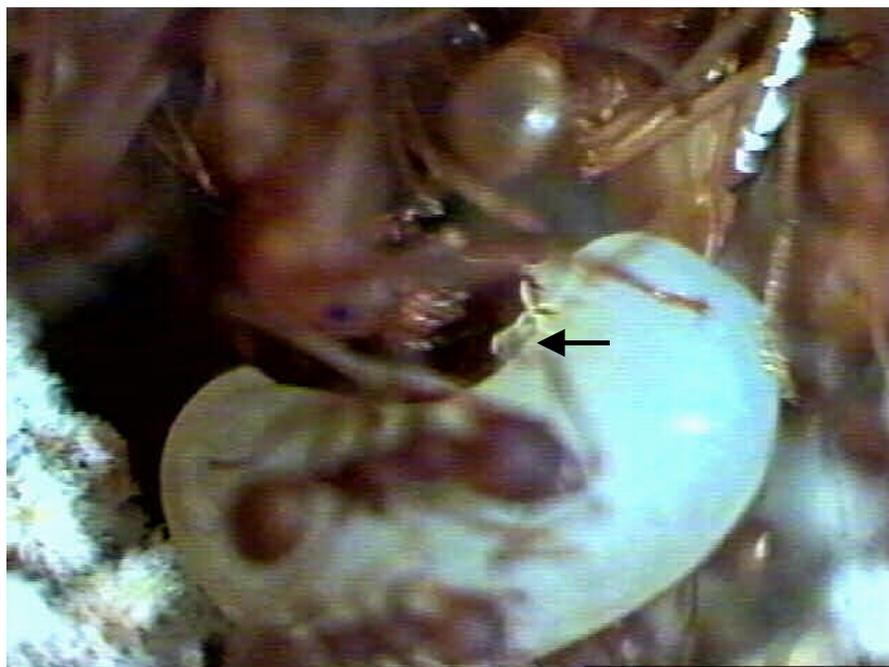
**Figura 29.** Operária de *A. sexdens rubropilosa* identificando larva com toques das pontas das antenas na cabeça da larva (seta). As formigas que se encontram no canto inferior esquerdo da foto se tratam de uma operária média-pequena jovem e uma mínima ‘velha’ devido à largura e coloração de suas cápsulas cefálicas.



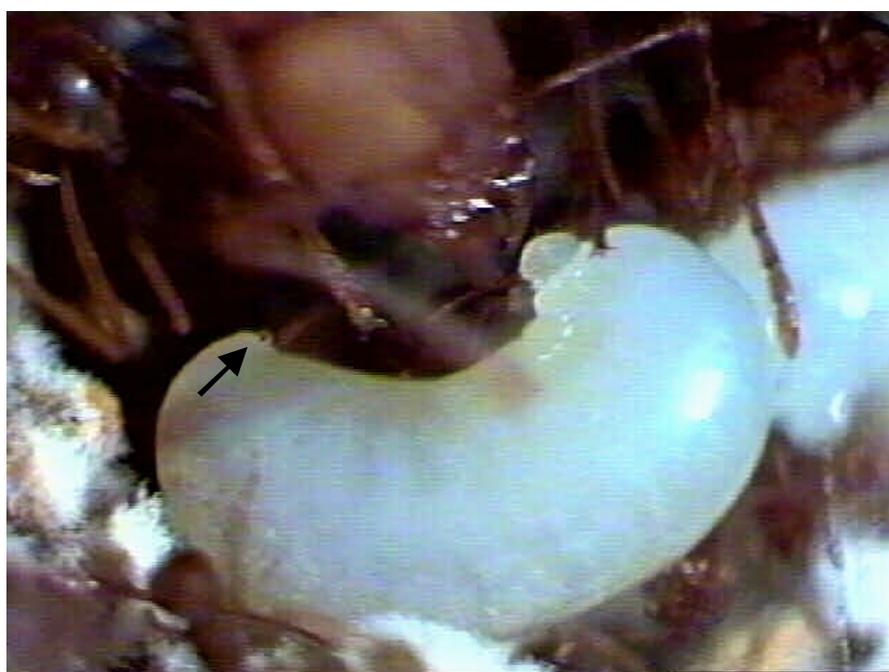
**Figura 30.** Operária de *A. sexdens rubropilosa* posicionando estáfila previamente mastigada diretamente em contato com as mandíbulas da larva (seta).



**Figura 31.** Operária de *A. sexdens rubropilosa* mantendo estáfila diretamente em contato com as mandíbulas da larva. A operária à esquerda (seta) manipula uma estáfila entre suas pernas dianteiras, mandíbulas e antenas enquanto ingere o material líquido proveniente dos gongilídeos rompidos no processo de mastigação.



**Figura 32.** Operária de *A. sexdens rubropilosa* parte da área de prole, deixando a larva ingerindo estáfila que fica alojada em sua superfície ventral (seta).



**Figura 33.** Enquanto uma nova operária média de *A. sexdens rubropilosa* verifica se a larva está se alimentando, esta elimina uma gotícula de líquido proctodeal por seu orifício anal (seta). A larva já ingeriu toda a estáfila deixada a ela pela operária anterior e uma operária mínima já apresenta uma nova estáfila à larva.



**Figura 34.** A operária adulta verifica o corpo da larva com suas antenas e descobre a existência da gotícula de líquido proctodeal com um toque de antena. Enquanto isso a larva começa a se alimentar com a estáfila trazida pela operária mínima (seta).



**Figura 35.** Após o toque antenal, a operária de *A. sexdens rubropilosa* procede imediatamente a ingerir o líquido proctodeal lambendo o ânus da larva com sua glossa (seta). A operária mínima mantém a estáfila em contato com a boca da larva.



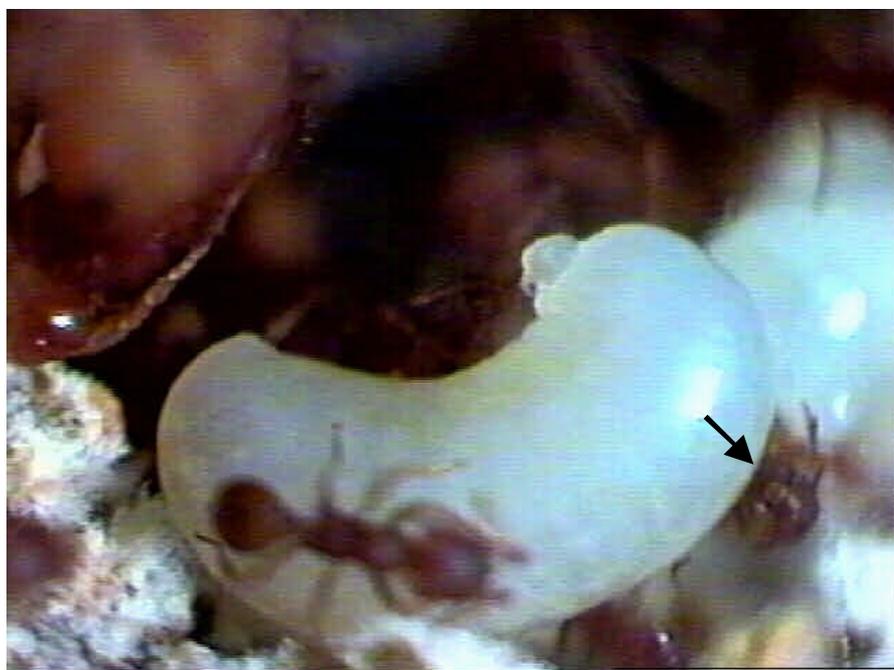
**Figura 36.** Uma vez que a gotícula inicial de líquido proctodeal foi ingerida pela operária média, a larva expele uma gota ainda maior do mesmo líquido (seta). A operária mínima mantém a estáfila em contato com a boca da larva.



**Figura 37.** A operária média imediatamente ingere a nova gota de líquido proctodeal com movimentos de sua glossa. A operária mínima mantém a estáfila em contato com a boca da larva.



**Figura 38.** A operária média lambe a região anal da larva em busca de mais líquido proctodeal. Ocasionalmente a larva expele uma quantidade maior do líquido, que é prontamente sorvido pela operária adulta.



**Figura 39.** Sem receber mais líquido proctodeal, a operária média parte da área de observação. A operária mínima ainda mantém o que resta de sua estáfila em contato com a boca da larva. A operária mínima na superfície dorsal da larva (seta) lambe o tegumento da larva com sua glossa num ato típico de limpeza de larva.

## 5. CONCLUSÕES

O equipamento empregado no presente trabalho mostrou-se bastante adequado para observar e analisar com detalhes o comportamento de pequenos animais em uma pequena área.

Por serem incapazes de se movimentarem, as larvas e pupas de *A. sexdens rubropilosa* dependem das operárias adultas para tudo. As grandes responsáveis por todo o processo de cuidado da cria da saúva-limão são as operárias mínimas e pequenas.

O centro da panela do jardim de fungo é a área de cuidado da cria. É nesta região que as operárias concentram as larvas. As pupas de *A. sexdens rubropilosa* são mantidas na parte superior do jardim de fungo.

A participação relativa de operárias jovens e intermediárias no cuidado da cria de *A. sexdens rubropilosa* aumenta com o tamanho. Isto deve ocorrer pelo fato de formigas maiores adultas se ocuparem com tarefas executadas fora da área da cria, como o corte e transporte de material vegetal.

A alimentação das larvas de *A. sexdens rubropilosa* é quase que exclusivamente composta de estáfilas do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Estas estáfilas são quase sempre mastigadas previamente pelas operárias adultas, provavelmente para ingerir o conteúdo líquido dos gongilídeos.

Não houve nenhum registro de trofalaxia estomodeal (transferência de líquido de valor nutricional de boca a boca) entre operárias adultas e nem entre operárias adultas e larvas. Porém foram observadas 29 ocorrências de trofalaxia proctodeal de larvas para operárias.

O líquido proctodeal oferecido pelas larvas às operárias adultas provavelmente representa uma forma de recompensa pelo cuidado da cria. Este líquido é rico em nutrientes e possui grande capacidade energética.

## 6. REFERÊNCIAS

- 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*, v.40, n.2, p.293-306.
- ARAÚJO, M. S.; DELLA LUCIA, T.M.C. 1993. Periodicidade de oviposição em rainhas de *Atta laevigata* em condições de laboratório. *Revista Ceres*, v.40, n.227, p.104-112.
- AUTUORI, M. 1949. Investigações sobre a biologia da saúva. *Ciência e Cultura*, v.1, n.1-2, p.4-12.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiological Entomology*, v.20, p.1-6.
- BELT, T. 1874. **The Naturalist in Nicaragua**. London, John Murray. xvi + 403 pp.
- 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.

- BOLTON, B. 1995. **A New General Catalogue of the Ants of the World**. Cambridge, Harvard University Press. 504 pp.
- 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*, v.21, p.1815-1820.
- BØRGESEN, L. W. 1989. A new aspect of the role of larvae in the Pharaoh's Ant society (*Monomorium pharaonis* (L.) – Formicidae, Mymicinae): Producer of fecundity-increasing substances to the queen. *Insectes Sociaux*, v.36, n.4, p.313-327.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. 2001. 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: Myrmicinae). *Sociobiology*, v.38, p.667-698.
- BROWN JR., W. 2000. Diversity of ants. *In*: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, A. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington, Smithsonian Institution Press, p.45-79.
- CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, v.266, p.1691-1694.
- CHERRETT, J. M. 1986. History of the leaf-cutting ant problem. *In*: LOEFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.). **Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management**. Boulder, Westview Press. p.10-17.

- COUTINHO, L. M. 1983. Aspectos ecológicos da saúva no cerrado - a saúva, as queimadas e sua possível relação na ciclagem de nutrientes. *Boletim de Zoologia*, v.8, p.1-9.
- DELABIE, J. H. C. 1998. *Atta silvai* Gonçalves, sinônimo júnior de *Atta laevigata* (Fr. Smith) (Hymenoptera; Formicidae; Attini). *Revista Brasileira de Entomologia*, v.41, p.339-341.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F.; MOREIRA, D. D. O.; BENTO, J. M. S.; DOS ANJOS, N. 1990. Egg-laying in *Atta sexdens rubropilosa* under laboratory conditions. In: VANDER MEER, R. K.; JAFFÉ, K.; CEDEÑO, A. (Eds.). **Applied Myrmecology: A World Perspective**. Boulder, Westview Press. p.173-179.
- DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) 1993. **As Formigas Cortadeiras**. Viçosa, Editora Folha de Viçosa. 262 pp.
- FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P. 1999. Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. *Naturalia*, v.24 (n.esp.), p.61-63.
- FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C. 1997. **Formigas cortadeiras: Biologia, ecologia, danos e controle**. Botucatu. 61 pp.
- FORTI, L. C.; MARTINS F. S. D.; YASSU, W. K.; PINHÃO, M. A. S. 1993. Trofalaxia entre operárias-operárias e operárias-larvas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). Resumos do 14<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Entomologia, Piracicaba, SP.

- FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; PEREIRA DA SILVA, V. 1986. Economics of grass-cutting ants. *In*: LOEFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.). **Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management**. Boulder, Westview Press. p.18-35.
- GLANCEY, B. M.; VANDER MEER, R. K.; GLOVER, A.; LOFGREN, C. S., VINSON, S. B. 1981. Filtration of microparticles from liquids ingested by the red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren. *Insectes Sociaux*, v.28, n.4, p.395-401.
- HAINES, B. L. 1978. Element and energy flows through colonies of leaf-cutting ant, *Atta colombica*, in Panama. *Biotropica*, v.10, n.4, p.270-277.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. 1990. **The Ants**. Cambridge, Harvard University Press. 732 pp.
- KEMPF, W. W. 1972. Catálogo abreviado da formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). *Studia Entomologica*, v.15, n.1-4, p.3-344.
- KUSNEZOV, N. 1963. Zoogeografia de las hormigas de sudamerica. *Acta Zoologica Lilloana*, v.19, p.25-186.
- LE MASNE, G. 1953. Observations sur les relations entre couvain et les adultes chez les fourmis. *Annales des Sciences Naturelles Zoologie* v.15, p.1-56.
- LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. 1976. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bulletin of Entomological Research*, v.66, p.205-217.
- MARICONI, F. A. M. 1970. **As saúvas**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. 167 pp.

- MARTIN, M. M.; CARMAN, R. M.; MacCONNELL, J. G. 1969. Nutrients derived from the fungus cultured by the fungus-growing ant *Atta colombica tonsipes* Santschi. *Annals of the Entomological Society of America*, v.62, p.11-13.
- MAYHÉ-NUNES; A. J.; JAFFÉ, K. 1998. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Ecotropicos*, v.1, p.45-54.
- MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428.
- MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. 1998. The evolution of agriculture in ants. *Science*, v.281, p.2034-2038.
- 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*, v.76, p.169-197.
- NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. 1997. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Trends in Ecology and Evolution*, v.12, n.10, p.386-389.
- O'NEAL, J.; MARKIN, G. P. 1973. Brood nutrition and parental relationships of the imported fire ant *Solenopsis invicta*. *Journal of the Georgia Entomological Society*, v.8, n.4, p.294-303.
- PETACCI, F. 2001. Produtos naturais de um saúveiro e atividade inseticida de *Dimorphandra mollis*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP. 123 pp.
- PETRALIA, R. S.; VINSON, S. B. 1978. Feeding in the larvae of the imported fire ant, *Solenopsis invicta*: behavior and morphological adaptations. *Annals of the Entomological Society of America*. v.71, p.643-648.

- PETRALIA, R. S.; VINSON, S. B. 1979. Comparative anatomy of the ventral region of ant larvae, and its relation to feeding behavior. *Psyche*, v.86, p.375-394.
- QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. 1978. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, v.25, n.3, p.237-245.
- QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. 1979. The role of fungus in the diet the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology*, v.4, p.151-160.
- SCHREIBER, J. R. 1974. Isolation of Attini brood from the social environment (Hymenoptera: Formicidae). *Entomological News*, v.85, n.9-10, p.303-314.
- 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*, v.20, p.337-370.
- SILVA, A.; BACCI Jr., M.; SIQUEIRA C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. 2003. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, v.49, p.307-313.
- SORENSEN, A.; MIRENDA, J. T.; VINSON, S. B. 1981. Food exchange and distribution by three functional worker groups of the imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren. *Insectes Sociaux*, v.28, n.4, p.383-394.
- STRADLING, D. J. 1978. Food and feeding habits in ants. *In*: BRAIN, M. V. (Ed.) **Production ecology of ants and termites**. Cambridge, Cambridge University Press, p.81-106.
- VILELA, E. F. 1986. Status of leaf-cutting ant control in forest plantations in Brazil. *In*: LOEFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.). **Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management**. Boulder, Westview Press. p.399-408.

- WEBER, N. A. 1966. Fungus-growing ants. *Science*, v.153, p.587-604.
- WEBER, N. A. 1972. Gardening Ants: the Attines. *Memoirs of the American Philosophical Society*, v.92, 146 pp.
- WETTERER, J. K. 1994. Nourishment and evolution in fungus-growing ants and their fungi. *In*: HUNT, J. H.; NALEPA, C. A. (Eds.). **Nourishment and Evolution in Insect Societies**. Boulder, Westview Press. p.309-328.
- WHEELER, D. E. 1994. Nourishment in ants: patters in individuals and societies. *In*: HUNT, J. H.; NALEPA, C. A. (Eds.). **Nourishment and Evolution in Insect Societies**. Boulder, Westview Press. p.245-278.
- WHEELER, W. M. 1925. **Ants: their structure, behavior and development**. New York, Columbia University Press. 660 pp.
- WHEELER, G. C. 1948. The larvae of the fungus-growing ants. *The American Midland Naturalist*, v.40, n.3, p.664-689.
- WHEELER, G. C.; WHEELER, J. 1979. Larvae of the social Hymenoptera. *In*: HERMANN, H. R. (Ed.) **Social Insects**. v. 1. New York, Academic Press. p.287-338.
- WIGGLESWORTH, V. B. 1972. **The Principles of Insect Physiology**. New York, Halsted Press. vii + 827 pp.
- WILSON, E. O. 1976. **The Insect Societies**. 4<sup>a</sup> edição. Cambridge, The Belknap Press of Harvard University Press. 548 pp.
- WILSON, E. O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* v.7, p.143-156.

WILSON, E. O. 1986. The defining traits of fire ants and leaf-cutting ants. *In*: LOEFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.). **Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management**. Boulder, Westview Press, p.1-9.