

GABRIELA CHRISTAL CATALANI

**ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E MECANISMOS DE CONTAMINAÇÃO EM
COLÔNIAS DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta sexdens* (HYMENOPTERA,
FORMICIDAE)**

Botucatu

2020

GABRIELA CHRISTAL CATALANI

**ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E MECANISMOS DE CONTAMINAÇÃO EM
COLÔNIAS DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta sexdens* (HYMENOPTERA,
FORMICIDAE)**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Agronomia (Proteção de
Plantas)

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Forti

Botucatu

2020

C357e

Catalani, Gabriela Christal

Estudos comportamentais e mecanismos de contaminação em colônias da formiga cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) / Gabriela Christal Catalani. -- Botucatu, 2020
99 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientador: Luiz Carlos Forti

1. Atos comportamentais. 2. Cultivo do fungo simbiote. 3.
Dispersão de ingrediente ativo. 4. Ingestão de líquidos. 5.
Trafalaxia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudos comportamentais e mecanismos de contaminação em colônias da formiga cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae)

AUTORA: GABRIELA CHRISTAL CATALANI

ORIENTADOR: LUIZ CARLOS FORTI

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


Prof. Dr. LUIZ CARLOS FORTI (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP


Prof.ª Dr.ª SANDRA VERZA DA SILVA (Participação Virtual)
Ciências Biológicas e Ambientais / Universidade Federal da Grande Dourados


Prof.ª Dr.ª ALDENISE ALVES MOREIRA (Participação Virtual)
Fitotecnia e Zootecnia / Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia


Prof.ª Dr.ª JULIANE FLORIANO LOPES SANTOS (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Juiz de Fora

Botucatu, 18 de dezembro de 2020

Aos meus pais, Denise Regina Christal Catalani e José Hamilton Catalani, pelo amor, incentivo e carinho em todos os momentos compartilhados.

Às minhas irmãs, Beatriz Christal Catalani e Laura Christal Catalani, pelo apoio nas minhas realizações.

À minha avó, Evani Cruciol Christal, meu maior exemplo de fé, amor e dedicação.

Vocês são minha família, minha base e meu porto seguro.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora Aparecida e Anjo da Guarda que sempre me regem, me guardam, me governam e me iluminam.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Forti pela orientação, ensinamentos, oportunidades concedidas e exemplo de professor.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

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

Ao Dr. Roberto da Silva Camargo por todo conhecimento transmitido, auxílio na realização dos experimentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Oliveira de Matos (UNESP – Campus de Itapeva) pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos membros do Laboratório de Insetos-Praga (LISP), Adriano Pimentel Farias, Luís Eduardo Pontes Stefanelli, David Generoso e Nilson Satoru Nagamoto, e em especial, à Kátia Kaelly Andrade Sousa e Nadia Caldato, pela convivência diária e amizade. Agradeço à Kaelly por toda ajuda gráfica dos capítulos.

Ao corpo docente do Departamento de Proteção Vegetal, por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca avaliadora da tese: Dra. Aldenise Alves Moreira, Dr. Carlos Frederico Wilcken, Dra. Juliane Floriano Lopes Santos e Dra. Sandra Verza da Silva por todas contribuições e sugestões.

À Giovana Carolina Dourado Cruciol e Rafaela Morando que me acolheram em Botucatu.

Aos amigos que o doutorado me presenteou, em especial, Maria Clézia dos Santos e Sabrina Ongaratto, pelos momentos compartilhados.

Às minhas amigas – Ana Karina Vieira Silva, Leticia Serpa dos Santos e Lourdes Dickmann – sou grata pela amizade que tenho com cada uma de vocês.

E por último, porém não menos importante, ao Pedro Anderson Alves Silva, pelo amor, amizade, incentivo e compreensão das vezes que não estive presente fisicamente.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Confie no Senhor com todo o seu coração. Pense nele em todos os seus caminhos, e ele aplainará as suas trilhas.” (Provérbios 3,5-6)

RESUMO

As formigas cortadeiras cortam e transportam para o ninho uma grande quantidade de plantas que são incorporadas ao fungo simbiote, do qual se alimentam. Para evitar a contaminação da colônia, esse material vegetal passa por um processo de assepsia e o mesmo ocorre quando carregam as iscas formicidas; porém, ainda se questiona como ocorre a contaminação, se pelo contato direto das operárias durante o processamento do substrato, ou por “allogrooming” e “self-grooming”, ou ainda por trofalaxia. Deste modo, o objetivo foi estudar os mecanismos de contaminação com operárias de formiga cortadeira, *Atta sexdens*, por meio de estudos comportamentais, buscando esclarecer como ocorre a dispersão e a contaminação com diferentes ingredientes ativos na colônia, e elucidar se a contaminação das operárias pode ocorrer via trofalaxia oral. Assim, foram analisados e registrados os atos e frequências comportamentais realizados pelas operárias durante o processamento dos pellets utilizando um corante traçador lipossolúvel, e registrando a quantidade de operárias coradas, após o cultivo do fungo. O comportamento mais frequente foi o “allogrooming”, que correspondeu a 45,87% do processo de contaminação das operárias, seguido de segurar, lambear e repicar os pellets, que responderam a 40,22% do processo. Após o processamento dos pellets, as operárias apresentaram as estruturas morfológicas externas e internas marcadas pelo corante traçador, 93,75% e 79,25%, respectivamente. Os resultados confirmaram que os comportamentos realizados durante o cultivo do fungo contribuem para a dispersão de substâncias, como os inseticidas, causando a contaminação das operárias. Adicionalmente, verificou-se como os fragmentos das iscas são dispersados e se o modo de ação do ingrediente ativo, que bloqueia os canais de sódio e interrompe a produção de ATP na mitocôndria, interfere na distribuição dos fragmentos no interior do ninho. Para isso, avaliou a dispersão dos fragmentos de pellets durante o cultivo do fungo pelas operárias, referenciando espacialmente o fragmento no jardim do fungo. Os fragmentos de pellets foram distribuídos aleatoriamente, mas a quantidade dos fragmentos foi influenciada pelo modo que o ingrediente ativo atua na colônia. E por fim, se o comportamento de forrageamento líquido está relacionado às taxas de trofalaxia em formigas cortadeiras. Para estudar se a ocorrência de trofalaxia está relacionada com a ingestão de substâncias líquidas, avaliou se há forrageamento

líquido e troca de alimento líquido em colônias de laboratório de formigas cortadeiras. Os resultados revelaram que as forrageiras comumente ingerem líquido quando fornecido com uma fonte líquida. Dentro do ninho, as operárias forrageiras realizaram diversos comportamentos, mas nenhuma troca alimentar (trofalaxia oral) ocorreu durante todo o período de oito horas em que as operárias foram observadas. Nas condições experimentais, o forrageamento líquido não teve relação com a trofalaxia oral entre operárias dentro do ninho. Assim, a coleta de líquidos atende às necessidades individuais das operárias e não se destina à trofalaxia entre elas, uma vez que esse comportamento é para alimentar a colônia, dependendo principalmente do hábito alimentar e do papo desenvolvido para transportar alimento líquido. Portanto, o presente estudo concluiu que a contaminação das operárias pelos ingredientes ativos presentes nas iscas formicidas ocorre pelo processamento das iscas para incorporação no jardim de fungo, bem como o contato indireto (“allogrooming” e “self-grooming”). O modo de ação dos ingredientes ativos, sulfluramida e indoxacarbe, influencia a quantidade de fragmentos incorporados no jardim de fungo. E o forrageamento líquido realizado pelas operárias não implica na ocorrência de trofalaxia oral.

Palavras-chave: Atos comportamentais. Cultivo do fungo simbiote. Dispersão de ingrediente ativo. Ingestão de líquidos. Trofalaxia.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants cut and transport a large number of plants to their nest which are incorporated into symbiotic fungus, on which they feed. Although plants undergo an asepsis process even they carry toxics baits to avoid the colony's contamination, it may be asked how contamination occurs, or rather, whether it occurs by direct contact of the workers during substrate processing or by allogrooming and self-grooming, or even by trophallaxis. Current analysis studies the mechanisms of contamination in the workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens*, through behavioral studies and clarifies how dispersion and contamination with different active ingredients in colony occur and also verifies whether contamination of workers occurs via oral trophallaxis. Behavioral acts and their frequencies performed by workers during the pellet processing were analyzed and recorded by means of a liposoluble tracer dye, whereas the number of stained workers was recorded after the cultivation of the fungus. Allogrooming, reaching 45.87% of the contamination process of the worker ants was the most frequent behavior, followed by holding, licking and pellet cutting, which accounted to 40.22% of the process. After pellets processing, the workers had their external and internal morphological structures marked by the tracer dye, 93.75% and 79.25%, respectively. Results proved that behaviors performed during fungus cultivation contribute towards the dispersion of substances, such as insecticides, which contaminate workers. Further, it has also been verified how bait fragments are dispersed and whether the mode of action of the active ingredient, which blocks sodium channels and interrupts of ATP production in the mitochondria, interferes with the distribution of fragments in nest. For this, it evaluated the dispersion of the fragments of pellets during the cultivation of the fungus by the workers, spatially referencing the fragment in the fungus garden. Although pellet fragments were randomly distributed, the amount of pellet fragments was affected by the manner the active ingredient works in the colony. It has also been analyzed whether liquid foraging is related to rates of trophallaxis in leaf-cutting ants. The investigation on the occurrence of trophallaxis as related to the ingestion of liquid substances has been carried out by evaluating liquid foraging and exchange of liquid food in laboratory colonies of leaf-cutting ants. Results revealed that foragers commonly ingest liquid when provided with a liquid source. Foragers workers performed several behaviors inside the nest, but no food exchange

(oral trophallaxis) occurred during a period of eight hours they were observed. In experimental conditions, liquid foraging was not related to oral trophallaxis among workers inside the nest. Thus, liquid foraging meets the workers individual needs and it is not meant for trophallaxis among them, once this behavior is to feed the colony and mainly depends on feeding habits and the existence of a well-developed crop, and the resulting mode of transporting liquid food. Thus, present study revealed that the contamination of workers by active ingredients present in the toxic baits occurs through the bait processing for incorporation in fungus garden and through indirect contact, such as allogrooming and self-grooming. The mode of action of active ingredients, sulfluramid and indoxacarb, influences the number of fragments incorporated in fungus garden. Moreover, liquid foraging carried out by workers does not imply the occurrence of oral trophallaxis.

Keywords: Behavioral acts. Cultivation of symbiotic fungus. Dispersion of active ingredient. Fluid intake. Trophallaxis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 (Fluxo de Substâncias Lipossolúveis Durante o Cultivo do Fungo Simbionte por Formigas Cortadeiras)

- Figura 1 – Porcentagem de cada ato comportamental realizado por *Atta sexdens* durante o preparo do substrato da isca e sua incorporação ao jardim de fungos. (SP) segurar os pellets na superfície do fungo; (LP) lambe os pellets; (RP) repicar os pellets em fragmentos menores; (MFP) mastigar os fragmentos após repicar; (IFP) incorporação de fragmentos no jardim de fungo; (LF) lambe os fragmentos recém-incorporados; (DH) deposição de hifas nos fragmentos incorporados e; (LEF) limpeza entre formigas.....32
- Figura 2 – Fluxograma com frequência de atos comportamentais realizados por operárias de *Atta sexdens* durante o cultivo do fungo. (SP) segurar os pellets na superfície do fungo; (LP) lambe os pellets; (RP) repicar os pellets em fragmentos menores; (MFP) mastigar os fragmentos após repicar; (IFP) incorporação de fragmentos no jardim de fungo; (LF) lambe os fragmentos recém-incorporados; (DH) deposição de hifas nos fragmentos incorporados e; (LEF) limpeza entre formigas.....33
- Figura 3 – Operária de *Atta sexdens* contaminada com o corante, após cultivo do fungo simbionte. A: sem luz ultravioleta. B: com luz ultravioleta. A1 e B1: morfologia externa. A2 e B2: morfologia interna com plano de secção sagital na cabeça da operária, evidenciando a cavidade infrabucal (CIB). C1 e C2: porcentagem de operárias com as estruturas externas e internas, respectivamente, coradas e não coradas. * = $p < 0,05$. Os valores dentro das barras indicam o número total de formigas coradas e não coradas.....36

CAPÍTULO 2 (Controle químico de formigas cortadeiras: como as operárias dispersam fragmentos de iscas tóxicas no jardim de fungo?)

- Figura 1 – Colunas de variogramas: controle, sulfluramida e indoxacarbe.....50
- Figura 2 – Distribuição dos fragmentos dos pellets no jardim de fungo, com e sem ingredientes ativos. A2, B2, C2: distribuição dos fragmentos com luz ultravioleta. A1 e A2: pellets sem ingrediente ativo. B1 e B2: pellets com sulfluramida. C1 e C2: pellets com indoxacarbe. A1, B1, C1: distribuição do fragmento sem luz ultravioleta. Os tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente.....52

CAPÍTULO 3 (As operárias de formigas cortadeiras trocam substâncias líquidas após o forrageamento?)

Figura 1 – Medidor de potencial de água WP4-T.....	84
Figura 2 – Forrageamento líquido em operárias formigas cortadeiras: A) grupo de operárias sugando solução; B) única forrageira sugando solução com rodamina; C e D) Detalhes da sucção das vistas frontal e lateral.....	85
Figura 3 – Frequência de atos comportamentais (número médio) realizados pelas operárias de <i>Atta sexdens</i> . Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Comportamentos: 1: “allogrooming”, 2: contato com o fungo, 3: cuidado com as larvas, 4: cuidado com as pupas, 5: limpeza da operária com traçador por outras, 6: operárias com traçador limpando operárias, 7: “self-grooming”.....	86
Figura 4 – Frequência de atos comportamentais (número médio) realizados pelas operárias de <i>Atta sexdens</i> . Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As barras referem-se a comportamentos realizados pelas operárias: 1: “allogrooming”, 2: contato com o fungo, 3: cuidado com as larvas, 4: cuidado com as pupas, 5: limpeza da operária com traçador por outras, 6: operárias com traçador limpando operárias, 7: “self-grooming”.....	87
Figura 5 – Ilustração e foto da cavidade infrabucal (CIB) e papo da operária de <i>Atta sexdens</i>	88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 (Fluxo de Substâncias Lipossolúveis Durante o Cultivo do Fungo Simbionte por Formigas Cortadeiras)

- Tabela 1 – Comparação pareada dos atos comportamentais realizados pelas operárias pequenas e médias de *Atta sexdens* durante o cultivo do fungo pelo teste pós-teste Student-Newman-Keuls.....34
- Tabela 2 – Comparação pareada das estruturas morfológicas das operárias médias de *Atta sexdens* com a presença do corante traçador pelo teste pós-teste Student-Newman-Keuls.....35

CAPÍTULO 3 (As operárias de formigas cortadeiras trocam substâncias líquidas após o forrageamento?)

- Tabela 1 – Taxa de ingestão de líquido para operárias de *Atta sexdens* por largura da cabeça.....89
- Tabela 2 – Modelo de regressão logística para frequência de operárias com a cavidade infrabucal corada/operárias com a cavidade infrabucal não corada.....91
- Tabela 3 – Modelo de regressão logística para frequência de limpeza da operária com traçador por outras e frequência de operária com traçador limpando outras operárias.....91

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	21
CAPÍTULO 1 – Fluxo de Substâncias Lipossolúveis Durante o Cultivo do Fungo Simbionte por Formigas Cortadeiras.....	26
Introdução.....	27
Material e Métodos.....	28
<i>Espécie estudada.....</i>	<i>28</i>
<i>Preparo de pellets de polpa cítrica.....</i>	<i>28</i>
<i>Estudo comportamental.....</i>	<i>29</i>
<i>Quantificação de operárias coradas externamente e internamente....</i>	<i>30</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>30</i>
Resultados.....	31
<i>Comportamentos de cultivo do fungo simbionte.....</i>	<i>31</i>
<i>Operárias coradas externamente.....</i>	<i>34</i>
<i>Operárias coradas internamente.....</i>	<i>35</i>
Discussão.....	36
<i>Comportamentos de cultivo do fungo simbionte.....</i>	<i>36</i>
<i>Operárias coradas externamente.....</i>	<i>38</i>
<i>Operárias coradas internamente.....</i>	<i>38</i>
Referências.....	40
CAPÍTULO 2 – Controle químico de formigas cortadeiras: como as operárias dispersam fragmentos de iscas tóxicas no jardim de fungo?.....	44
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	47
<i>Espécie estudada.....</i>	<i>47</i>
<i>Preparo dos pellets de polpa cítrica.....</i>	<i>48</i>
<i>Dispersão do substrato no fungo.....</i>	<i>48</i>
<i>Análise geoestatística.....</i>	<i>49</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>49</i>
Resultados.....	49
Discussão.....	53

	Referências.....	55
	CAPÍTULO 3 – AS OPERÁRIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS	
	TROCAM SUBSTÂNCIAS LÍQUIDAS APÓS O	
	FORRAGEAMENTO?.....	60
1.	Introdução.....	61
1.1	A dieta das formigas cortadeiras.....	61
1.2	Forrageamento líquido em formigas cortadeiras.....	62
1.3	Trofalaxia em formigas cortadeiras.....	62
1.4	Objetivo.....	63
2.	Material e Métodos.....	63
2.1	Colônias estudadas.....	63
2.2	Atividade Água.....	64
2.3	Estudos comportamentais.....	65
2.3.1	<i>Ingestão de líquidos pelas operárias.....</i>	<i>65</i>
2.3.2	<i>Forrageamento líquido para trofalaxia entre operárias.....</i>	<i>66</i>
2.4	Análise estatística.....	68
3.	Resultados.....	69
3.1	Ingestão de líquidos pelas operárias.....	69
3.2	Forrageamento líquido para trofalaxia entre operárias.....	70
4.	Discussão.....	73
	Referências.....	78
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
	CONCLUSÕES.....	94
	REFERÊNCIAS.....	95

INTRODUÇÃO GERAL

As formigas são insetos eusociais pertencentes à família Formicidae e, estima-se que englobam mais de 24.000 espécies agrupadas em 23 subfamílias (BOLTON, 2007). Entre estas, estão as formigas cortadeiras, que pertencem à subtribo Attina, subfamília Myrmicinae, que compreendem 17 gêneros com aproximadamente 246 espécies descritas (BOLTON, 2017), as quais são cultivadoras de fungo (SILVA et al., 2003). Entre as espécies de importância econômica, estão as formigas cortadeiras que pertencem aos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), (FORTI; BOARETTO, 1997; DELLA LUCIA, 2011).

As formigas cortadeiras são nativas do Novo Mundo, estão presentes no continente Americano, desde o Sul dos Estados Unidos, seguido pela América Central (exceto em algumas ilhas das Antilhas), América do Sul (exceto no Chile) até o centro da Argentina (GONÇALVES, 1961; DELLA LUCIA, 1993; FORTI; BOARETTO, 1997; BRITTO et al., 2016).

Até o ano de 2020 eram conhecidos apenas dois gêneros de formigas cortadeiras, mas recentemente foi publicado na revista *Austral Entomology* a proposta de mais um gênero, *Amoimyrmex* (CRISTIANO et al., 2020). Por meio de estudos morfológicos e moleculares, os autores sugeriram que *Acromyrmex striatus* pertença a esse novo gênero de formiga cortadeira.

As formigas cortadeiras são consideradas pragas nos setores agrícola, pecuária e floresta, e se destacam principalmente, pelo desfolhamento que causam ao cortarem e carregarem as partes vegetais das plantas cultivadas (GARCIA et al., 2003), que após processadas servem de substrato para o fungo simbiote, *Leucocoprinus gongylophorus* (MUELLER et al., 2018), utilizado como principal fonte de alimentação da colônia (DELLA LUCIA, 2011), principalmente para as larvas, enquanto que as operárias suprem suas necessidades nutricionais com líquidos como óleos, açúcares e exsudados da seiva durante o corte das folhas (ECHOLS, 1966; PEREGRINE; MUDD, 1974; LITTLEDYKE; CHERRETT, 1975; 1976; QUINLAN; CHERRETT, 1978; 1979; BASS; CHERRETT, 1995).

Durante o cultivo do fungo, uma série comportamental é realizada visando à preparação adequada do material vegetal (DINIZ; BUENO, 2009). O vegetal é levado para o jardim de fungo, uma ou mais operárias seguram o substrato enquanto outras realizam uma série de comportamentos, como lambem e raspar, promovendo a limpeza

e removendo a camada de cera epicuticular das folhas que favorece o crescimento do fungo simbiote; posteriormente repicam o vegetal em pequenos fragmentos, algumas operárias depositam fluído fecal nesses fragmentos, o que pode estar relacionado com o processo de decomposição; depois de repicados, os fragmentos vegetais são depositados temporariamente em uma região do fungo e outras operárias vão recolhendo e inserindo no jardim de fungo; por fim, as jardineiras inoculam hifas nos fragmentos incorporados ao fungo, facilitando o processo de decomposição dos vegetais (QUINLAN; CHERRETT, 1978; ANDRADE et al., 2002; CAMARGO et al., 2007; GARRETT et al., 2016). As etapas do processamento do substrato minimizam a entrada de micro-organismos ou de substâncias antifúngicas no jardim de fungo (DELABIE; OSPINA; ZABALA, 2003), pois a assepsia do ninho é importante para a sobrevivência da colônia (FOWLER et al., 1991).

O processamento tanto das folhas como das iscas formicidas passam pelas mesmas etapas (DINIZ; BUENO, 2009; SILVA et al., 2015) e as operárias, jardineiras e generalistas, são as principais responsáveis pela preparo do substrato e as que predominam dentro da colônia (PEREGRINE; CHERRETT, 1974, 1976; ANDRADE et al., 2002).

Em uma colônia as operárias jardineiras representam 60-67 % das formigas, as generalistas 30-33 %, as forrageiras 1-2%, e os soldados (limitado ao gênero *Atta*), menos de 1% de uma colônia (WEBER, 1972); assim, a preparação e incorporação do substrato vegetal no jardim de fungo estão ligadas à contaminação das operárias pelos ingredientes ativos (ANDRADE et al., 2002). Além disso, no cultivo do fungo simbiote com pellets de polpa cítrica, as operárias trabalham mais em seu processamento quando comparados ao processamento de folhas, ocasionando a contaminação das operárias da colônia pelo ingrediente ativo (SILVA et al., 2015).

Atualmente, o método de controle químico com iscas formicidas é considerado um dos mais eficientes no controle de formigas cortadeiras; entretanto, existe a importância do inseticida matar em baixas concentrações (BOARETTO; FORTI, 1997; BRITTO et al., 2016). Além disso, é importante que o ingrediente ativo possua particularidades como: agir por ingestão; ser inodoro e não ser repelente às formigas cortadeiras; ser de ação tóxica retardada, com mortalidade menor que 15% após o primeiro dia e maior que 90% no 21º; ser letal em baixas concentrações; deve ser uma combinação do princípio ativo e um substrato atrativo e; não causar danos ambientais

(BOARETTO; FORTI, 1997; FORTI et al., 2003; NAGAMOTO et al., 2004; NYAMUKONDIWA; ADDISON, 2011; MATHIESON; TOFT; LESTER, 2012).

Durante o processamento da isca, as operárias entram em contato com o inseticida e inicia o processo de contaminação (FORTI et al., 1993, 2007). Após a hidratação dos pellets, depositados sobre o jardim de fungo, as operárias começam a repicá-los e incorporá-los. O processo de incorporação pode iniciar seis horas após a oferta das iscas e prolongar até 18 horas após (FORTI et al., 1993, 2007). Durante o processamento, 70% das operárias ficam contaminadas com o inseticida, comprovado através da utilização de um corante traçador (FORTI et al., 2007).

Ainda assim discute-se como ocorre a contaminação das formigas cortadeiras e a dispersão do inseticida na colônia. A contaminação através do contato direto com os inseticidas consiste nos comportamentos realizados pelas operárias envolvidos na manipulação do substrato durante o seu preparo e incorporação no jardim de fungo (BRITTO et al., 2016; CAMARGO et al., 2017), ocorrendo principalmente nas operárias médias através do comportamento de lambe o pellet (ANDRADE et al., 2002). Ainda as operárias podem ser contaminadas pelo contato indireto, ou seja, na limpeza, por “allogrooming” ou “self-grooming” (ANDRADE et al., 2002; CAMARGO et al., 2017), ou por ingestão e, posteriormente, por trofalaxia (FORTI et al., 1993; MOREIRA et al., 2006, 2015; DA SILVA; NAVAS; RIBEIRO, 2009).

A trofalaxia em formigas cortadeiras é relatada em alguns estudos, porém ainda é um assunto que gera discussão e um comportamento que necessita de esclarecimentos (FORTI; ANDRADE; RAMOS, 2000; ANDRADE et al., 2002); pois, provavelmente, durante o processo de trofalaxia oral há a diluição do ingrediente ativo. As formigas trocam alimentos entre si. Desse modo, as operárias passam alimentos digeridos e secreções produzidas pelas glândulas. A troca de líquidos entre os membros da colônia é chamado de trofalaxia e tem papel importante na organização social de muitas espécies de insetos sociais (WILSON, 1971).

As formigas, em geral, alimentam-se de substâncias no estado líquido, as partículas sólidas e alimentos semissólidos são raspados ou lambidos pela glossa e armazenadas na cavidade infrabucal. Nas formigas, o papo tem funções bastante importantes, é local de reserva de alimentos ingeridos e local de produção de enzimas digestivas como amilase, invertase, maltase e trealase (FOWLER et al., 1991).

Larvas e adultos de formigas, geralmente, se alimentam de maneiras diferenciadas (SCHNEIDER, 2003). Operárias de *Solenopsis invicta* possuem pelos

no aparelho bucal, entre a cavidade pré-oral e a faringe, que forma um filtro impedindo partículas maiores que 0,88 μm de diâmetro sejam ingeridas pelas operárias enquanto as larvas são capazes de ingerir partículas de até 45,8 μm (GLANCEY et al., 1981). Já em *Acromyrmex octospinosus*, as operárias são capazes de filtrar partículas de 10 μm de diâmetro (QUINLAN; CHERRETT, 1978).

A trofalaxia é a regurgitação de líquidos que estão estocados no papo e são repassados para as companheiras da colônia, essa troca de nutrientes é um importante comportamento social (RICHARD; ERRARD, 2009; MOREIRA et al., 2010, 2015). No entanto, a trofalaxia oral em formigas cortadeiras ainda é altamente discutida e é uma questão bastante contraditória entre os pesquisadores (MOREIRA et al., 2006, 2007a, 2007b, 2010, 2015; RICHARD; ERRARD, 2009).

A taxa de trofalaxia nas espécies de formigas é variável, de forma que reflete a sua posição filogenética e hábitos alimentares (WILSON, 1971). Em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* a taxa de trofalaxia foi de 23, 13 e 3% em dietas líquida, semissólida e sólida, comparadas às taxas de trofalaxia em *Atta sexdens rufopilosa* que foram 13, 3 e 0%, respectivamente, nas mesmas dietas (MOREIRA et al., 2015). Em *A. subterraneus subterraneus* e *A. octospinosus*, 63 e 67%, respectivamente, das operárias que retornaram da área de forrageamento, que foram observadas como alimentadas, passaram os líquidos coletados para as companheiras de ninho, via trofalaxia, permitindo a troca de alimento entre os membros da colônia; este comportamento foi raramente observado em operárias que não forragearam (RICHARD; ERRARD, 2009).

Quando comparado a taxa de ingestão de líquidos em diferentes espécies que se alimentaram de néctar, foi observado que operárias de *Camponotus rufipes* (Formicinae) e *Pachycondyla villosa* (Ponerinae) coletaram fluídos com as maiores taxas de ingestão, enquanto que operárias de formiga cortadeira *A. sexdens* (Myrmicinae) e uma formiga predadora do complexo *Rhytidoponera impressa* (Ponerinae) coletaram em menores taxas; essas formigas têm diferentes hábitos alimentares, por exemplo, o gênero *Camponotus* possui um papo desenvolvido, com capacidade de armazenar o líquido do alimento ingerido (PAUL; ROCES, 2003).

No entanto, as operárias de *Atta cephalotes* suprem sua deficiência de líquidos ingerindo água durante períodos secos, ou em laboratório, quando o ar é mais seco do que na natureza (WEBER, 1972). Além disso, as forrageiras sem carga estão associadas ao transporte, consumo e assimilação de líquidos na forma de néctar

vegetal rico em carboidratos (WIRTH et al., 2003), mas não há evidências de que isso seja uma rotina no campo (RYTTER; SHIK, 2016). Embora há ingestão de substâncias líquidas durante o preparo do substrato a ser incorporado, as operárias saem do ninho para forragear as folhas com o mesêntero cheio (SCHILMAN; ROCES, 2008; RYTTER; SHIK, 2016) e consomem para alimentar atividades de forrageamento que são energeticamente caras (RYTTER; SHIK, 2016).

Visto que a trofalaxia é muito argumentada entre os pesquisadores e ainda necessita de esclarecimentos, a hipótese é que pode ocorrer em baixa frequência ou ainda seja até ausente nesse grupo de formigas cortadeiras; discute-se que não seja uma das principais causas de contaminação das operárias no interior da colônia e que a intoxicação com os inseticidas ocorra a partir do contato direto, durante o processamento e incorporação das iscas formicidas no jardim de fungo e, também durante os comportamentos de limpeza, “self-grooming” e “allogrooming” (ANDRADE et al., 2002).

Apesar de muitos estudos desenvolvidos na área de controle químico para formigas cortadeiras, a maioria deles é restrita à experimentação com formicidas, sem a preocupação com os aspectos básicos como a distribuição do substrato e a dinâmica de dispersão dos inseticidas na colônia (PRETTO, 1996).

Deste modo, o objetivo foi estudar os mecanismos de contaminação com operárias da formiga cortadeira – *Atta sexdens*, por meio de estudos comportamentais, buscando esclarecer como ocorre a dispersão e a contaminação com diferentes ingredientes ativos na colônia e elucidar se a contaminação das operárias pode ocorrer via trofalaxia oral.

CAPÍTULO 1¹

Fluxo de Substâncias Lipossolúveis Durante o Cultivo do Fungo Simbionte por Formigas Cortadeiras

GC Catalani¹, RS Camargo¹, KKA Sousa¹, N Caldato¹, AAC Silva², LC Forti¹

¹ Depto de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

² Univ Federal do Piauí, Campus Univ Ministro Petrônio Portella, Teresina, PI, Brasil

Catalani, G. C.; Camargo, R. S.; Sousa, K. K. A.; Caldato, N.; Silva, A. A. C.; Forti, L. C. Fat-Soluble Substance Flow During Symbiotic Fungus Cultivation by Leaf-Cutter Ants. **Neotropical Entomology**, v. 49, n. 01, p. 116-123, 2020. doi.org/10.1007/s13744-019-00718-0

<https://link.springer.com/article/10.1007/s13744-019-00718-0>

Resumo: As formigas cortadeiras realizam uma série de comportamentos especializados para o preparo do vegetal, durante o cultivo do fungo simbionte. Esse processamento pode estar relacionado com a contaminação das operárias por substâncias como os inseticidas, o que leva a hipotetizar que as substâncias são dispersadas entre elas por meio de comportamentos que realizam durante o cultivo do fungo. Para testar essa hipótese, foram analisados os atos comportamentais realizados pelas operárias durante o processamento dos pellets utilizando um corante traçador lipossolúvel, uma vez que o princípio ativo que compõe as iscas tóxicas, utilizadas para o controle das formigas cortadeiras, é lipossolúvel. Foram registradas as frequências dos comportamentos realizados, e avaliou-se a quantidade de operárias coradas, após o cultivo do fungo. O comportamento mais frequente é o “allogrooming” e corresponde a 45,87% do processo de contaminação das operárias, seguido de segurar, lambear e repicar os pellets, que respondem a 40,22% do processo. Após o processamento dos pellets, as operárias apresentaram as estruturas morfológicas externas e internas marcadas pelo corante traçador, 93,75% e 79,25%, respectivamente. Os resultados confirmam que os comportamentos realizados durante o cultivo do fungo contribuem para a dispersão de substâncias, como os inseticidas, causando a contaminação das operárias.

¹Este capítulo segue as normas da Neotropical Entomology, onde o artigo científico foi publicado.

Palavras-chave: *Atta sexdens*. Comportamento. Contaminação. Jardim de fungo. Operárias.

Introdução

As formigas cortadeiras, *Atta* e *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae), cultivam um fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* (Heim, 1957) (Leucocopriini: Agaricales), o qual é a base para sua nutrição. Para isso, cortam diversas plantas cultivadas e são considerados pragas em sistemas agrícolas e florestais (Bass & Cherrett 1994, Garcia *et al* 2003, Mueller *et al* 2018).

Durante o cultivo do fungo simbiote, as operárias classificadas como jardineiras e generalistas têm maior participação no processamento do substrato vegetal (Wilson 1980, Andrade *et al* 2002). As operárias realizam uma série de comportamentos especializados, como lamber, raspar e repicar o vegetal em fragmentos menores antes de incorporá-los ao jardim, promovendo a limpeza e assepsia. Após o processamento, esses fragmentos são gradualmente inseridos no jardim do fungo e inoculados com hifas fúngicas (Andrade *et al* 2002, Diniz & Bueno 2009, Garrett *et al* 2016).

Assim, é importante conhecer o repertório comportamental realizado durante o cultivo do fungo, visto que há um grande número de operárias envolvidas no processamento de iscas tóxicas, levando à contaminação das mesmas pelo inseticida (Andrade *et al* 2002, Silva *et al* 2015).

As iscas são um método eficiente para o controle químico de formigas cortadeiras. No entanto, ainda é discutido sobre como ocorre a dispersão dos inseticidas na colônia e a contaminação das operárias (Forti *et al* 2007). Sabe-se que a contaminação das operárias pode estar relacionada com o contato direto com as iscas tóxicas, por meio de comportamentos que elas realizam durante o processamento e incorporação no jardim de fungo (Britto *et al* 2016, Camargo *et al* 2017a) e pelo contato indireto que consiste em comportamentos de limpeza. A limpeza é um importante comportamento individual e social, quando realizado em relação a si mesmo (“self-grooming”) ou em relação aos outros (“allogrooming”) (Camargo *et al* 2017b).

Com a digestão do alimento iniciada na cavidade infrabucal, as partículas sólidas são retidas e apenas o alimento líquido alcança o proventrículo (Eisner & Happ 1962, Febvay & Kermarrec 1981, 1986). Constituindo o sistema digestivo, na faringe existem as glândulas pós-faríngeas que estão envolvidas na produção de enzimas digestivas e são especializadas na nutrição lipídica de formigas adultas, ou seja, para absorver, armazenar, metabolizar e mobilizar lipídios para a hemolinfa (Vieira & Bueno 2015, 2016, Decio *et al* 2016, Camargo *et al* 2017b). Assim, por meio dessa rota que, possivelmente, ocorre a contaminação das operárias.

Uma das principais técnicas em estudos de contaminação é o uso de corantes traçadores para visualizar a trajetória do alimento no sistema digestivo das formigas. Portanto, corantes lipossolúveis são utilizados como ferramenta para demonstrar a contaminação das operárias com inseticidas (Peregrine *et al* 1972, Forti *et al* 2007, Camargo *et al* 2017a, b), uma vez que o ingrediente ativo utilizado para o controle de formigas cortadeiras é lipossolúvel.

Usando essa técnica, este estudo testou a hipótese de que as substâncias são dispersas entre as operárias por meio de comportamentos que elas realizam durante o cultivo do fungo simbiote. O estudo analisou os atos comportamentais realizados pelas operárias, utilizando um corante traçador lipossolúvel. Adicionalmente, avaliou a quantidade de operárias coradas após a incorporação dos pellets no jardim de fungo.

Material e Métodos

Espécie estudada

As colônias de *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) utilizadas no experimento foram coletadas em março de 2017 e mantidas no Laboratório de Insetos Sociais-Praga do Departamento de Proteção Vegetal. Como substrato vegetal para manutenção do fungo, foi utilizada *Acalypha* sp.

Preparo de pellets de polpa cítrica

Os pellets foram preparados manualmente a base polpa cítrica. As laranjas foram descascadas, picadas em pequenos pedaços e esses foram secos em estufa a 50 °C por 72h; após a secagem, essa polpa foi moída e armazenada em freezer até o preparo dos pellets (Verza *et al* 2006). Os pellets foram preparados com 10% de

carboximetilcelulose (CMC) e 90% de polpa cítrica, e misturados com água destilada para formar uma mistura pastosa (Sousa *et al* 2017). A mistura foi colocada em uma seringa de plástico descartável de 20 ml para formar os filetes, que foram colocados em uma bandeja de alumínio e secos em estufa a 50 °C por 24h. Esses filetes foram quebrados em pellets de tamanho médio de 0,5 cm de comprimento e armazenados em freezer. Durante a execução do experimento, os pellets foram empanados com uma solução de suco de laranja e sacarose (3:1) e corante em pó de cor amarelo fluorescente lipossolúvel da BioQuip® Products (Rancho Dominguez, CA); depois de empanados, os pellets foram secos em estufa por 30 min.

Estudo comportamental

O experimento foi realizado com cinco colônias, cada uma com 350 ml de volume de fungo de aproximadamente sete meses. Cada colônia foi transferida para uma caixa de vidro transparente de 23 cm de comprimento, 11 cm de largura e 3 cm de altura com tampa de vidro e uma camada de gesso de 1 cm no fundo, para manter a umidade do jardim de fungo. Dois orifícios foram feitos em lados opostos da caixa e com pedaços de uma mangueira transparente foram conectados dois recipientes com capacidade para 250 ml, um para fornecimento de substrato vegetal e outro para deposição dos resíduos (lixo). As colônias foram mantidas em temperatura de 24 ± 2 °C e umidade relativa de 70%, essas foram transferidas para caixas de vidro 7 dias antes de iniciar o experimento, para que se adaptassem ao local, e privadas de substrato por 24h antes de iniciar o experimento.

As observações dos atos comportamentais foram realizadas com o auxílio de microscópio estereoscópio. Para isso, cada colônia recebeu 11 pellets com peso médio de 0,125 g (Forti *et al* 2012) e foi observada por um período de 8h, totalizando 40h. As observações foram feitas a cada 20 min, e foram registrados os comportamentos realizados pelas operárias pequenas (largura da cabeça de 0,8 - 1,2 mm) e médias (largura da cabeça de 1,3 - 2,2 mm), definidas por Wilson (1980), Andrade *et al* (2002) e Travaglini *et al* (2017), durante o processamento de pellets. O sistema de observação realizado foi do tipo varredura, como descrito por Martin & Bateson (1986), no qual um grupo de indivíduos é observado e o comportamento é registrado em intervalos regulares.

Os comportamentos realizados pelas operárias durante o cultivo do fungo foram classificados em: segurar os pellets na superfície do fungo (SP), lamber os pellets (LP), repicar os pellets em fragmentos menores (RP), mastigar os fragmentos após repicar (MFP), incorporar os fragmentos no jardim de fungo (IFP), lamber os fragmentos recém-incorporados (LF), depositar hifas nos fragmentos incorporados (DH) e limpeza entre formigas (LEF). Esses comportamentos foram quantificados pela frequência de operárias envolvidas em cada um deles.

Quantificação de operárias coradas externamente e internamente

Após o período de observação dos atos comportamentais, retirou-se aleatoriamente uma amostra de operárias com largura da cabeça entre 1,3 e 2,2 mm, representando 5% da população da colônia (80 operárias), conforme Pretto (1996), em cinco repetições, totalizando 400 operárias, a fim de avaliar a presença de corante nas estruturas morfológicas externas e internas das operárias.

Primeiro foi avaliado e quantificado o número de operárias com a presença do corante nas estruturas morfológicas externas, como: cabeça, antenas, peças bucais, tórax, abdômen e pernas. Essa avaliação foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópio e lâmpada ultravioleta (luz negra, Foxlux® 3U 27W), em sala escura. Após essa avaliação, as amostras de operárias foram congeladas por 12h, em freezer.

Para a avaliação da morfologia interna, foi quantificado o número de operárias com a cavidade infrabucal e papo corados. Para isso, as operárias congeladas foram dissecadas com tesoura entomológica sob um microscópio estereoscópico iluminado por uma lâmpada ultravioleta, em sala escura (adaptado de Camargo *et al* 2006, Forti *et al* 2012, 2007).

Análise estatística

Foi realizada a análise estatística Shapiro-Wilk, teste W, de forma preliminar para verificar a normalidade dos dados. Como as análises não indicaram normalidade, os dados comportamentais foram submetidos à análise não paramétrica: um teste de Kruskal-Wallis, e caso fosse atingido o índice de significância, cada grupo foi comparado pelo pós-teste Student-Newman-Keuls, com significância de 5%.

O número de formigas coradas e não coradas, no exterior e interior do corpo, foi comparado pelo teste G. As estruturas corporais marcadas foram submetidas ao

teste de Kruskal-Wallis e, caso fosse atingido o nível de significância, cada grupo foi comparado pelo pós-teste Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5%.

Resultados

Comportamento de cultivo do fungo simbiote

Durante o cultivo do fungo, o comportamento mais frequente realizado pelas operárias foi limpeza entre formigas. No processamento e incorporação do substrato no jardim de fungo, as operárias seguiram a sequência de atos comportamentais indicada na Fig. 1. Após o carregamento, os primeiros comportamentos realizados foram lambe e segurar os pellets, que tiveram maior frequência, respectivamente, em relação aos outros comportamentos. Após os pellets estarem hidratados, eles foram repicados em fragmentos menores; posteriormente, esses fragmentos foram mastigados e incorporados ao jardim de fungo, onde outras operárias lambe a superfície dos fragmentos incorporados e depositaram hifas fúngicas; comportamentos menos frequentes (Fig. 2).

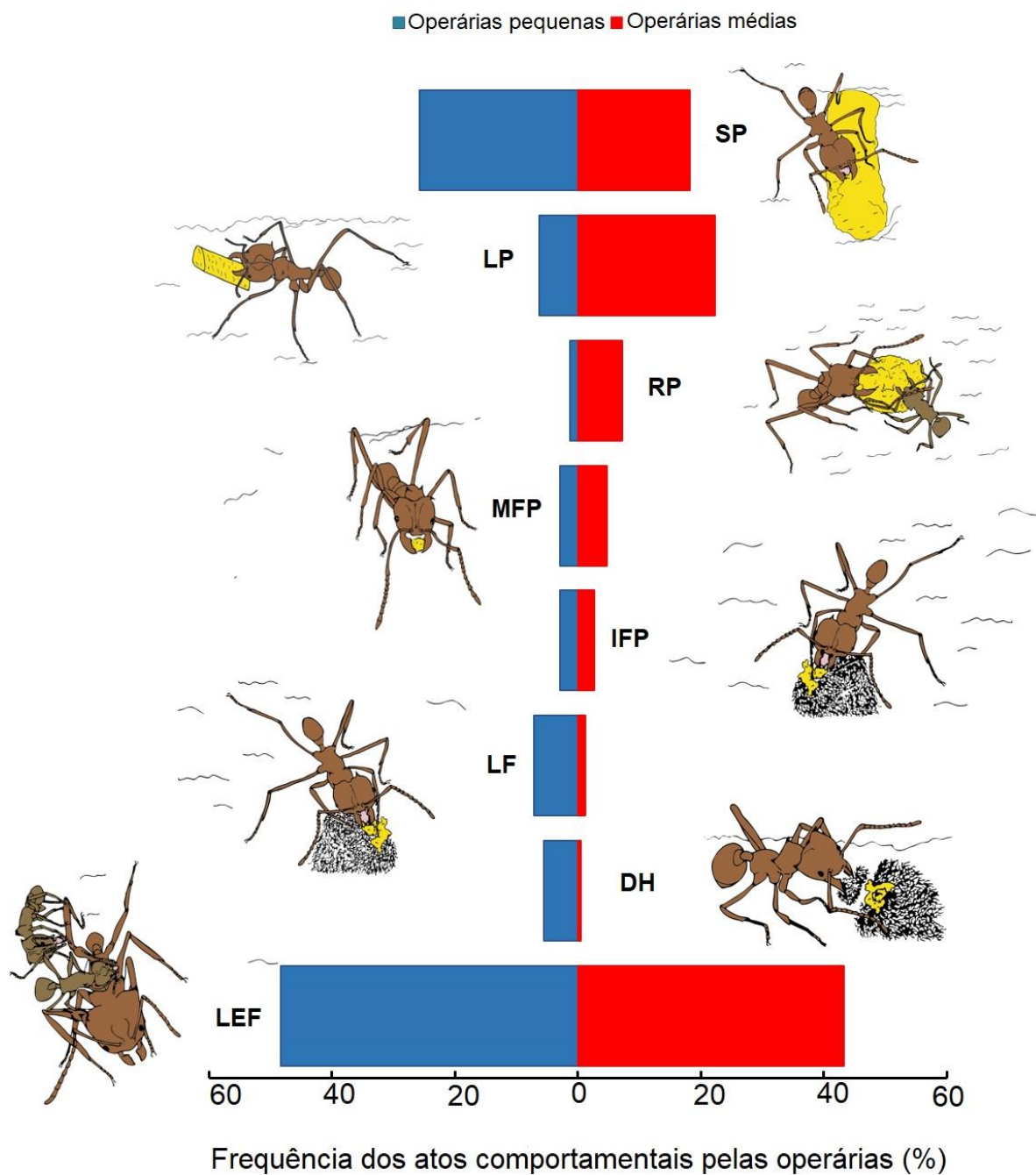


Fig 1. Porcentagem de cada ato comportamental realizado por *Atta sexdens* durante o preparo do substrato da isca e sua incorporação ao jardim de fungos. (SP) segurar os pellets na superfície do fungo; (LP) lambe os pellets; (RP) repicar os pellets em fragmentos menores; (MFP) mastigar os fragmentos após repicar; (IFP) incorporação de fragmentos no jardim de fungo; (LF) lambe os fragmentos recém-incorporados; (DH) deposição de hifas nos fragmentos incorporados e; (LEF) limpeza entre formigas.

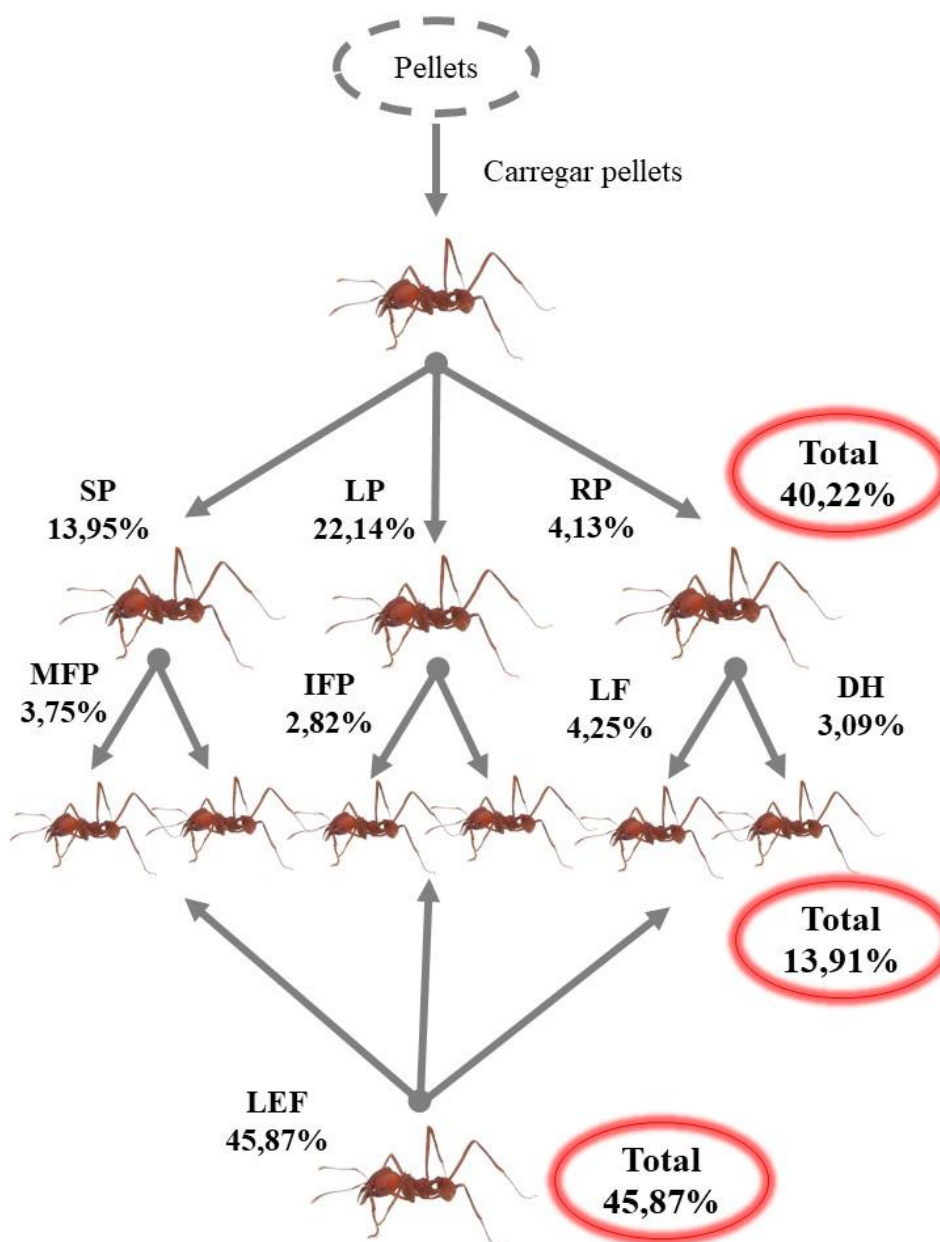


Fig 2. Fluxograma com frequência de atos comportamentais realizados por operárias de *Atta sexdens* durante o cultivo do fungo. (SP) segurar os pellets na superfície do fungo; (LP) lamber os pellets; (RP) repicar os pellets em fragmentos menores; (MFP) mastigar os fragmentos após repicar; (IFP) incorporação de fragmentos no jardim de fungo; (LF) lamber os fragmentos recém-incorporados; (DH) deposição de hifas nos fragmentos incorporados e; (LEF) limpeza entre formigas.

Dessa forma, foi observada diferença estatística significativa entre os atos comportamentais realizados pelas operárias pequenas ($H = 29,85$, G.L. = 7, $p = 0,05$).

Os comportamentos de lambar os pellets, repicar os pellets e limpeza entre formigas diferiram estatisticamente (Tabela 1). No grupo de operárias médias, observou-se diferença estatística significativa entre os atos comportamentais realizados pelas mesmas ($H = 33,44$, G.L. = 7, $p = 0,05$), quando analisados os comportamentos de segurar os pellets, lambar os pellets, repicar os pellets e limpeza entre formigas (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação pareada dos atos comportamentais realizados pelas operárias pequenas e médias de *Atta sexdens* durante o cultivo do fungo pelo teste pós-teste Student-Newman-Keuls.

	Comportamentos													
	SP		LP		RP		MFP		IFP		LF		LEF	
Comportamentos	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M
LP	ns	ns												
RP	ns	ns	*	ns										
MFP	ns	ns	*	ns	ns	ns								
IFP	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns						
LF	ns	*	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns				
DH	ns	*	ns	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
LEF	*	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*	ns	*	*	*

(S) operárias pequenas; (M) operárias médias; (SP) segurar os pellets na superfície do fungo; (LP) lambar os pellets; (RP) repicar os pellets em fragmentos menores; (MFP) mastigar os fragmentos após repicar; (IFP) incorporação de fragmentos no jardim de fungos; (LF) lambar os fragmentos recém-incorporados; (DH) deposição de hifas nos fragmentos incorporados e; (LEF) limpeza entre formigas. (*) significativo a 5%; (ns) não significativo.

Operárias coradas externamente

A porcentagem de operárias coradas externamente foi de 93,75%, diferindo estatisticamente das operárias não coradas, 6,25% ($\chi^2 = 87,65$, G.L. = 4, $p < 0,05$) (Fig 3). Observa-se diferença significativa das estruturas morfológicas das operárias coradas ($H = 19,44$, G.L. = 5, $p = 0,05$), diferindo entre cabeça, antenas e peças bucais (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação pareada das estruturas morfológicas das operárias médias de *Atta sexdens* com a presença do corante traçador pelo teste pós-teste Student-Newman-Keuls.

Estruturas Morfológicas	Cabeça	Antenas	Peças bucais	Tórax	Abdômen
Antenas	*				
Peças bucais	*	ns			
Tórax	ns	*	*		
Abdômen	ns	*	*	ns	
Pernas	ns	*	*	ns	ns

(*) significativo a 5%; (ns) não significativo

Operárias coradas internamente

A porcentagem de operárias coradas internamente foi de 79,5%, diferindo significativamente das não coradas, 20,5% ($\chi^2 = 938,5$, G.L. = 4, $p < 0,0001$) (Fig. 3). Observou-se diferenças significativas entre as operárias coradas na cavidade infrabucal (79,5%) e papo (7,5%) ($H = 6,98$, G.L. = 1, $p = 0,05$).

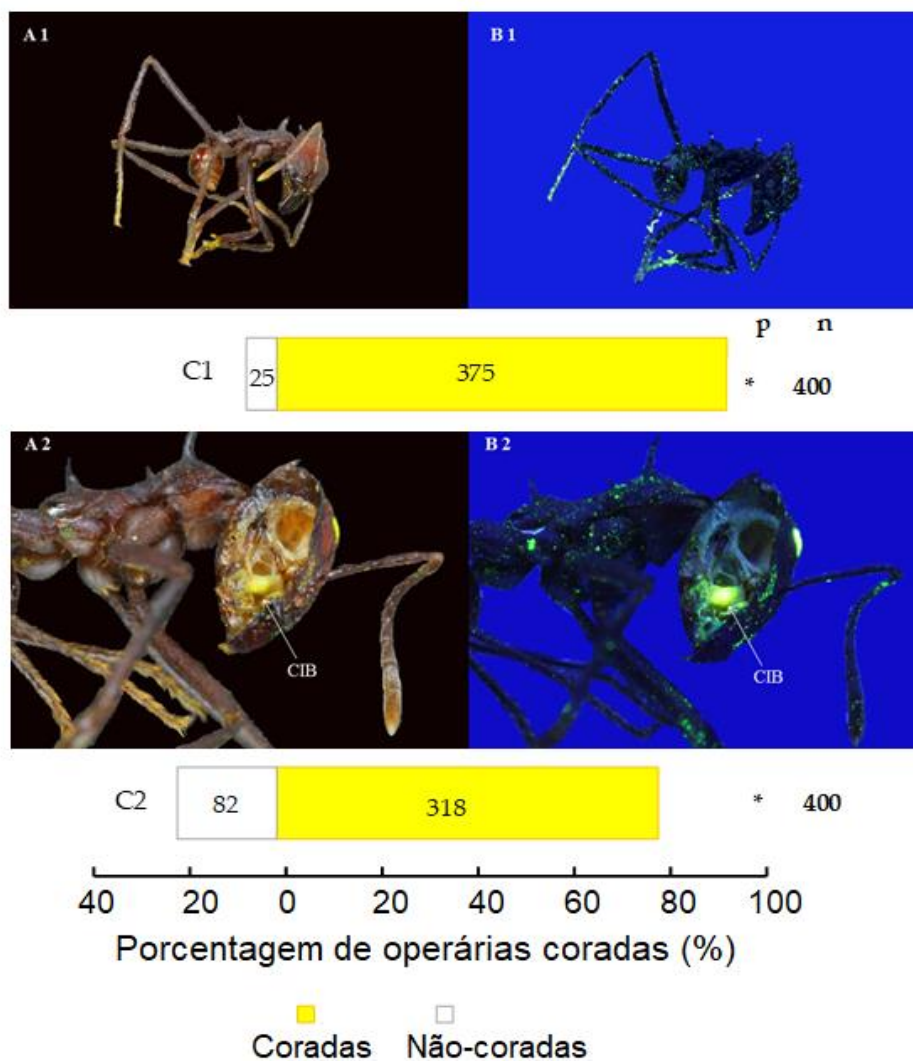


Fig 3. Operária de *Atta sexdens* contaminada com o corante, após cultivo do fungo simbiote. A: sem luz ultravioleta. B: com luz ultravioleta. A1 e B1: morfologia externa. A2 e B2: morfologia interna com plano de secção sagital na cabeça da operária, evidenciando a cavidade infrabucal (CIB). C1 e C2: porcentagem de operárias com as estruturas externas e internas, respectivamente, coradas e não coradas. * = $p < 0,05$. Os valores dentro das barras indicam o número total de formigas coradas e não coradas.

Discussão

Comportamento de cultivo do fungo simbiote

Os resultados confirmam a hipótese proposta para este estudo, que as substâncias são dispersas entre as operárias por meio de comportamentos que realizam para o cultivo do fungo, causando contaminação; o que pode ser confirmado pela presença do corante traçador nas estruturas morfológicas das operárias (Fig. 3). Os dados corroboram com os obtidos em estudos anteriores (Forti *et al* 2007, 2012, Camargo *et al* 2017a, b), que avaliaram a rota de dispersão de substâncias por meio dos atos comportamentais realizados no processamento dos pellets, utilizando corante traçador. Portanto, esse método de avaliação em que se utiliza corante como traçador para avaliar o fluxo de substâncias é confiável, de acordo com os demais estudos.

O comportamento de limpeza foi o mais frequente em relação aos demais comportamentos avaliados, por ser um dos principais atos comportamentais realizados pelas formigas cortadeiras, estas utilizam para protegerem a si mesmas e seu fungo simbionte contra a propagação de micro-organismos (Fernández-Marín *et al* 2009, Morelos-Juárez *et al* 2010, Galvanho *et al* 2013, Lopes *et al* 2017), tornando a higiene importante entre os membros da colônia. Além disso, também é um ato que dispersa substâncias, como ingredientes ativos de iscas tóxicas, entre as operárias no interior do ninho (Camargo *et al* 2017b).

Os demais atos comportamentais frequentes realizados pelas operárias foram lambar e segurar os pellets. Essa alta frequência de lambar o substrato antes da incorporação foi observada em estudos anteriores com formigas cortadeiras (Andrade *et al* 2002, Silva *et al* 2015, Camargo *et al* 2017a, Sousa *et al* 2017), independentemente do substrato oferecido. Esse comportamento é importante, pois quando um substrato nocivo é fornecido, esse ato comportamental não é alterado e sim potencializado, para otimizar a assepsia do substrato (Sousa *et al* 2017); favorecendo o crescimento do fungo simbionte (Silva *et al* 2015, Garrett *et al* 2016, Camargo *et al* 2017a). Além disso, lambar é um comportamento frequente, uma vez que os pellets precisam ser hidratados para incorporação ao jardim de fungo (Silva *et al* 2015).

Neste estudo e em outros, esse ato comportamental foi realizado principalmente pelas operárias pequenas, pois essa casta se demonstra altamente especializada (Andrade *et al* 2002, Silva *et al* 2015). Dessa forma, ao lambar o substrato, as operárias se expõem ao contato direto com o ingrediente ativo (formicidas) e se contaminam (Silva *et al* 2015).

Segurar os pellets também foi observado com frequência, corroborando com Andrade *et al* (2002) e Camargo *et al* (2017a). Esse é um comportamento importante, pois proporciona estabilidade para repicar o vegetal ou auxiliar em outros comportamentos; além disso, há evidências de que pode reduzir o gasto energético (Garrett *et al* 2016).

Assim, o comportamento de limpeza entre formigas contribuiu com 45,87% de possibilidade das operárias se contaminarem; juntos, os três comportamentos mais frequentes durante o processamento dos pellets contribuíram com 40,22%, enquanto os menos frequentes, 13,91% (Fig. 2), o que foi confirmado pela alta frequência de operárias com estruturas morfológicas coradas (Fig. 3). Portanto, quando iscas tóxicas são utilizadas no controle de formigas cortadeiras, esses atos comportamentais são de suma importância para a contaminação das operárias com os ingredientes ativos.

Operárias coradas externamente

Os atos comportamentais contribuíram significativamente para a presença do corante traçador nas estruturas morfológicas externas das operárias, conforme observado nas Figuras 2 e 3. Durante o processamento dos pellets as partículas do corante aderiram às operárias e foram observadas nas antenas, cabeça, aparelho bucal, tórax, abdômen e pernas. A presença do corante nessas estruturas deve-se à sua transferência por operárias contaminadas para suas companheiras de ninho por contato. Conforme mostrado em um estudo, a presença de uma substância contaminante no tegumento de uma operária desencadeia um processo intenso de limpeza coletiva, sendo suficiente para provocar a dispersão de partículas aderidas ao corpo, influenciando as taxas de contaminação (Barbieri *et al* 2009). Ou seja, a limpeza aumenta o número de operárias contaminadas; conseqüentemente, favorece a contaminação por ingestão da substância, confirmando que o ato contribui para a dispersão de substâncias na colônia.

Operárias coradas internamente

Após o cultivo do fungo, 79,5% das operárias apresentaram estruturas internas marcadas pelo corante traçador, concordando com a hipótese de que os comportamentos realizados no processamento dispersam substâncias lipossolúveis. A cavidade infrabucal foi a estrutura mais corada, a mesma já foi observada utilizando

o corante Sudan III como traçador (Forti *et al* 2012), provavelmente porque a cavidade infrabucal é a primeira estrutura a entrar em contato com as partículas do corante.

Sabe-se que a cavidade infrabucal é onde inicia a digestão dos alimentos e que serve como filtro para as partículas sólidas absorvidas durante a alimentação e limpeza. Essas partículas são armazenadas na cavidade infrabucal e posteriormente eliminadas por regurgitação (Eisner & Happ 1962, Quinlan & Cherrett 1978) na forma de pellets (Janet 1895); isso faz com que as formigas ingiram a parte líquida do alimento e bloqueiam a passagem das partículas sólidas para o proventrículo (Eisner & Happ 1962).

A maioria das formigas avaliadas estavam com a cavidade infrabucal coradas. Isso é coerente com um estudo anterior usando corante traçador em que 70% das operárias estavam contaminadas (Forti *et al* 2007).

A quantidade de operárias com o papo corado foi relativamente pequena, mas sugere que o corante foi translocado junto com o alimento. Os lipídios passam pela cavidade infrabucal, glândulas pós-faríngeas e papo, mas são absorvidos nas glândulas pós-faríngeas (Bueno 2005), que são responsáveis por conduzir os lipídios da dieta para a hemolinfa e outros órgãos e que, portanto, transferem inseticidas lipídicos para órgãos e tecidos (Vieira & Bueno 2015, 2016, Decio *et al* 2016).

Conclui-se que o fluxo da substância lipídica ocorre durante os atos comportamentais realizados pelas operárias no cultivo do fungo simbiote, evidenciando como as operárias são contaminadas pelo ingrediente ativo das iscas tóxicas.

Declaração de contribuição dos autores: Gabriela Christal Catalani, Roberto da Silva Camargo e Luiz Carlos Forti planejaram, projetaram e executaram trabalhos experimentais. Gabriela Christal Catalani, Roberto da Silva Camargo e Luiz Carlos Forti conduziram a análise dos dados. Gabriela Christal Catalani, Roberto da Silva Camargo, Kátia Kaelly Andrade Sousa, Nadia Caldato, Aline Amorim Costa Silva e Luiz Carlos Forti escreveram o manuscrito.

Informações de financiamento: Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brasil), Código de financiamento 001. Luiz Carlos Forti foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (301-938 / 2017-2).

Referências

- Andrade APP, Forti LC, Moreira AA, Boaretto MAC, Ramos VM, Matos CAO (2002) Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. *Sociobiology* 40:293–306
- Barbieri RF, Forti LC, Fuhihara RT, Nagamoto NS, Camargo RS (2009) Ant group effects on the insecticide and dye flow among *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) Workers. *Sociobiology* 54(2):589–600
- Bass M, Cherrett JM (1994) The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. *Ecol Entomol* 19:215–220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1994.tb00412.x>
- Britto JS, Forti LC, Oliveira MA, Zanetti R, Wilcken CF, Zanuncio JC, Loeck AE, Caldato N, Nagamoto NS, Lemes PG, Camargo RS (2016) Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int J Res Environ Stud* 3:11–92
- Bueno OC (2005) Filtro infrabucal e glândulas pós-faríngeas da saúvalimão *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). 107f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro
- Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS, Andrade APP, Raetano CG, Mendonça CG (2006) The role of workers in transferring queen substances and the differences between worker castes in the leaf-cutting ant, *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 48(2):503–513
- Camargo RS, Puccini C, Forti LC, Matos CAO (2017a) Behaviors in fungus garden cultivation: routes of contamination of leaf cutting ant workers with fat-soluble tracer dye. *Int J Agric Innov Res* 5(4):555–560
- Camargo RS, Puccini C, Forti LC, Matos CAO (2017b) Allogrooming, self-grooming, and touching behavior: contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. *Insects* 8:59. <https://doi.org/10.3390/insects8020059>
- Decio P, Vieira AS, Dias NB, Palmas MS, Bueno OC (2016) The postpharyngeal gland: specialized organ for lipid nutrition in leaf-cutting ants. *PLoS One* 11(5):e0154891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154891>

- Diniz EA, Bueno OC (2009) Substrate preparation behaviors for the cultivation of the symbiotic fungus in leaf-cutting ants of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 53(3):651–666
- Eisner T, Happ GM (1962) The infrabuccal pocket of a formicine ant: a social filtration device. *Psyche* 69:107–116
- Febvay G, Kermarrec A (1981) Morphologie et fonctionnement du filtre infrabuccal chez une attine *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae): role de la poche infrabuccale. *Int J Insect Morphol Embryol* 10(5/6):441–449. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(81\)90024-6](https://doi.org/10.1016/0020-7322(81)90024-6)
- Febvay G, Kermarrec A (1986) Digestive physiology of leaf-cutting ants. In: Lofgren CS, Vandemeer RK (eds) *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. Westview Press, Boulder, pp 272–288
- Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Nash DR, Boomsma JJ, Wcislo WT (2009) Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. *Proc R Soc B* 276(1665):2263–2269
- Forti LC, Pretto DR, Nagamoto NS, Padovani CR, Camargo RS, Andrade APP (2007) Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 50(3):1149–1164
- Forti LC, Silva MS, Fujihara RT, Caldato N, Garcia MG (2012) Trajectory of water-and fat-soluble dyes in the grass-cutting ant *Atta capiguara*: evaluation of infrabuccal cavity, post-pharyngeal glands and gaster (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology* 59(2):511–520. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v59i2.614>
- Galvanho JP, Carrera MP, Moreira DDO, Erthal M Jr, Silva CP, Samuels RI (2013) Imidacloprid inhibits behavioral defences of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *J Insect Behav* 26(1):1–13. <https://doi.org/10.1007/s10905-012-9328-6>
- Garcia IP, Forti LC, Engel VL, Andrade APP, Wilcken CF (2003) Ecological interaction between *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and the vegetation of a mesophyll semideciduous forest fragment in Botucatu, SP, Brazil. *Sociobiology* 42(2):265–283
- Garrett RW, Carlson KA, Goggans MS, Nesson MH, Shepard CA, Schofield RMS (2016) Leaf processing behaviour in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes

- place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. *R Soc Open Sci* 3(1):150111. <https://doi.org/10.1098/rsos.150111>
- Janet CS (1895) Etudes sur les fourmis. 8a note. Sur Porgane de nettoyage tibiotarsien de *Myrmica ruba* L., race levinodis Nyl. *Ann la Société Entomol Fr* 63:691–704
- Lopes JFS, Camargo R d S, Forti LC, Hughes WOH (2017) The trade-off between the transmission of chemical cues and parasites: behavioral interactions between leaf-cutting ant workers of different age classes. *Rev Bras Entomol* 61(1):69–73. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2016.11.002>
- Martin P, Bateson P (1986) Measuring behaviour: an introductory guide. Cambridge University Press, New York
- Morelos-Juárez C, Walker TN, Lopes JFS, Hughes WOH (2010) Ant farmers practice proactive personal hygiene to protect their fungus crop. *Curr Biol* 20(13):R553–R554
- Mueller UG, Kardish MR, Ishak HD, Wright AM, Solomon SE, Bruschi SM, Carlson AL, Bacci M Jr (2018) Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. *Mol Ecol* 27:2414–2434. <https://doi.org/10.1111/mec.14588>
- Peregrine DJ, Percy HC, Cherrett JM (1972) Intake and possible transfer of lipid by the post-pharyngeal glands of *Atta cephalotes* L. *Entomol Exp Appl* 15(2):248–249
- Pretto DR (1996) Arquitetura dos túneis de forrageamento e do ninho de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae), dispersão de substrato e dinâmica do inseticida na colônia. 110 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu
- Quinlan RJ, Cherrett JM (1978) Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym., Formicidae). *Insect Soc* 25(3):237–245
- Silva LC, Camargo RS, Forti LC, Matos CAO, Travaglini RV (2015) Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? *Sociobiology* 62(4):484–493. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.772>
- Sousa KKA, Camargo RS, Forti LC (2017) Communication or toxicity: what is the effect of cycloheximide on leaf-cutting ant workers? *Insects* 8: 126. <https://doi.org/10.3390/insects8040126>

- Travaglini RV, Stefanelli LEP, Arnosti A, Camargo RS, Forti LC (2017) Isca encapsulada atrativa visando controle microbiano de formigas cortadeiras. *Teckne e Logos* 8(2):100–111
- Verza SS, Forti LC, Matos CAO, Garcia MG, Nagamoto NS (2006) Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 47(2):391–399
- Vieira AS, Bueno OC (2015) Mitochondrial and peroxisomal population in post-pharyngeal glands of leaf-cutting ants after lipid supplementation. *Micron* 68:8–16. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.08.004>
- Vieira AS, Bueno OC (2016) Lipid mobilization and acyl-coenzyme A dehydrogenase abundance in the postpharyngeal gland of a leaf-cutting ant. *Sociobiology* 63(4):1005–1014. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v63i4.1027>
- Wilson EO (1980) Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *A. sexdens*. *Behav Ecol Sociobiol* 7:143–156

CAPÍTULO 2²

**Controle químico de formigas cortadeiras: como as operárias dispersam
fragmentos de iscas tóxicas no jardim de fungo?**

Gabriela C. Catalani^a, Kátia K. A. Sousa^a, Roberto S. Camargo^a, Nadia Caldato^a,
Carlos A. O. Matos^b, Luiz C. Forti^a

^aUniversidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Departamento
de Proteção Vegetal, Botucatu, SP, Brasil

^bUniversidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Itapeva, Itapeva, SP, Brasil

Catalani, G. C.; Sousa, K. K. A.; Camargo, R. S.; Caldato, N.; Matos, C. A. O.; Forti,
L. C. Chemical control of leaf-cutting ants: how do workers disperse toxic bait
fragments onto fungus garden?. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 63, n. 04, p.
290-295, 2019. doi.org/10.1016/j.rbe.2019.09.004

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085562619300755?via%3Dihub>

Resumo: As formigas cortadeiras são controladas com iscas tóxicas. Para maior eficiência do método, as iscas devem ser distribuídas e processadas pelas operárias durante o cultivo do fungo. Para testar as hipóteses de como os fragmentos das iscas são dispersados e se o modo de ação do ingrediente ativo – indoxacarbe que bloqueia os canais de sódio e sulfluramida que interrompe a produção de ATP na mitocôndria – interfere na distribuição dos fragmentos no interior do ninho; foi avaliada a dispersão dos fragmentos de pellets durante o cultivo do fungo pelas operárias, referenciando espacialmente o fragmento no jardim do fungo. Os fragmentos de pellets foram distribuídos aleatoriamente, mas a quantidade de fragmentos de pellets foi influenciada pela forma como o ingrediente ativo atua na colônia.

Palavras-chave: Comportamento de *Atta sexdens*. Indoxacarbe. Modo de ação. Sulfluramida.

Introdução

As formigas cortadeiras – *Atta* Fabricius, 1805 e *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae) – cultivam seu fungo simbiote, *Leucocoprinus*

²Este capítulo segue as normas da Revista Brasileira de Entomologia, onde o artigo científico foi publicado.

gongylophorus Heim, 1957, com diversas espécies de plantas que possuem importância econômica e assim são consideradas pragas nos setores agrícola, florestal e pecuária (Fowler et al., 1989; Montoya Lerma et al., 2012; Mueller et al., 2018). Atualmente, o método mais eficiente para o controle das formigas cortadeiras é a utilização das iscas formicidas, pois apresenta viabilidade técnica, econômica e operacional. Essas iscas contêm um substrato atrativo e um inseticida (Britto et al., 2016).

A sulfluramida é o ingrediente ativo mais utilizado devido às suas características que apresenta: modo de ação (Nagamoto et al., 2007, 2004; Schnellmann e Manning, 1990); não repelente (Forti et al., 1998; Nagamoto et al., 2004); dispersão uniforme em colônias (Forti et al., 2007; Pretto et al., 1995; Pretto e Forti, 1993); estabilidade quando exposta ao meio ambiente (Cameron, 1990); e baixa toxicidade ao homem e outros organismos (Britto et al., 2016). A sulfluramida, presente no corpo das formigas operárias, é quebrada e transformada em DESFA (perfluorooctanossulfonamida) e atua no processo de fosforilação oxidativa, interrompendo a produção de ATP na mitocôndria e tornando-se letal ao inseto. As formigas operárias apresentam sintomas típicos de intoxicação por sulfluramida, ou seja, movimento lento e diminuição da agressividade devido aos seus baixos níveis de energia, que reduzem até que seu metabolismo seja interrompido, causando sua morte (Britto et al., 2016; Schnellmann e Manning, 1990).

O modo de ação do ingrediente ativo é que qualquer isca utilizada no controle de formigas cortadeiras é importante para seu sucesso nos programas de manejo de pragas. Dessa forma, as características de uma isca eficaz incluem que o comportamento das forrageiras não seja alterado com a ação do inseticida e toda isca oferecida seja carregada para o ninho antes de iniciar a morte das operárias, aumentando a distribuição da isca na colônia (Delabie et al., 2000); e conseqüentemente terá maior contaminação das operárias e eficácia do controle. Portanto, sem perceber a presença do ingrediente ativo, os comportamentos de cultivo do fungo não são comprometidos; e, portanto, essa molécula é eficiente no controle de formigas cortadeiras (Della Lucia et al., 2014).

As iscas formicidas e o substrato vegetal são processados igualmente pelas operárias, as quais realizam uma série comportamental para o cultivo do fungo (Diniz e Bueno, 2009). Desta forma, o substrato é transportado para o jardim de fungo e as operárias realizam a limpeza para promover assepsia e umedecimento.

Posteriormente, cortam o substrato e mastigam suas bordas; em seguida, esses fragmentos são inseridos no fungo e hifas são inoculadas nos mesmos (Andrade et al., 2002; Camargo et al., 2017; Garrett et al., 2016; Silva et al., 2015). Tais comportamentos são realizados pelas operárias jardineiras e generalistas, uma vez que essas castas constituem a maior proporção de indivíduos na colônia (Andrade et al., 2002; Camargo et al., 2017, 2007; Lopes et al., 2004; Wilson, 1980). Por isso, o processo de incorporação do substrato é importante na dispersão do ingrediente ativo, visto que há maior participação dessas castas (Silva et al., 2015). Assim, deve-se favorecer a importância de um inseticida permitir que as operárias realizem todos os comportamentos envolvidos no cultivo do fungo e, conseqüentemente, contaminá-las, uma vez que o ativo não é percebido (Forti et al., 2007).

Os inseticidas de ação retardada agem por períodos prolongados na colônia, por isso, a sulfluramida é eficiente, pois mata as operárias lentamente (Nagamoto, 2003). Devido à sua ação durante o processamento, que tem duração de até 18h após o oferecimento das iscas, as operárias não percebem a presença do inseticida e 70% delas ficam contaminadas (Forti et al., 2007; Pretto et al., 1995; Pretto e Forti, 1993). Após o terceiro ou quarto dia, as operárias param de forragear, ocorre desorganização na colônia, observa-se uma alta mortalidade das operárias, bem como o crescimento de fungos sem possibilidade de recuperação do fungo mutualista; a morte de todos os indivíduos ocorre entre 16 e 22 dias (Pretto e Forti, 1993). Assim, pela forma como esse ingrediente ativo atua nas colônias, as iscas formicidas à base de sulfluramida são eficientes no controle das formigas cortadeiras (Britto et al., 2016; Cruz et al., 1996; Forti et al., 2003; Zanuncio et al., 1999, 1996), pois toda isca oferecida à colônia é processada e incorporada ao fungo.

No controle de insetos-praga, uma alternativa é o uso de inseticidas que bloqueiam os canais de sódio, como o indoxacarbe, que é altamente eficiente no controle de lepidópteros-praga (Wing et al., 2000, 1998). Esse ingrediente ativo, uma vez absorvido ou ingerido pelo inseto, interrompe a alimentação, o que pode ocorrer em 2-8 horas (Dias, 2006), causando mortalidade em 48h (Barr, 2003). O indoxacarbe é uma substância neurotóxica que, quando presente no inseto, após a bioativação, resulta na formação do metabólito IN-JT333 (N-descarbometoxilado, DCJW), que bloqueia os canais de sódio; ou seja, compromete a função nervosa, interrompe a alimentação, paralisa e mata o inseto (Dias, 2006). Por exemplo, em *Solenopsis invicta*, esse inseticida causa supressão rápida de forrageamento, em 48 horas, e

ocorre antes da eliminação da colônia (Barr, 2003). Entretanto, o indoxacarbe tem potencial de uso no controle de formigas cortadeiras (Stefanelli, 2019).

Todo substrato vegetal carregado pelas formigas cortadeiras é distribuído nas câmaras de fungo, em diferentes profundidades, e o mesmo ocorre com as iscas formicidas (Forti e Silveira Neto, 1989; Moreira e Forti, 1999; Pretto e Forti, 2000). Desse modo, a distribuição do substrato transportado pelas operárias está relacionada com a eficiência da isca (Moreira et al., 2003; Moreira e Forti, 1999). Sabe-se que as iscas são distribuídas nas câmaras de fungo (Forti e Silveira Neto, 1989; Moreira et al., 2003; Moreira e Forti, 1999; Pretto e Forti, 2000), com grande participação de operárias no processamento, contaminando-as (Camargo et al., 2017; Forti et al., 2019, 2007); no entanto, não se sabe como é a dispersão no fungo.

Diante do exposto, levanta-se a hipótese de que o modo de ação do ingrediente ativo da isca formicida afeta diretamente as operárias durante o cultivo do fungo simbiote e, conseqüentemente, a distribuição dos fragmentos da isca e a contaminação das operárias no interior do ninho. Assim, pergunta-se: “Como as operárias dispersam fragmentos de iscas tóxicas no jardim de fungo?”. Para responder a essa pergunta, avaliou-se a dispersão dos fragmentos de pellets durante o cultivo do fungo simbiote pelas operárias, referenciando espacialmente os fragmentos e, posteriormente, aplicando uma análise geoestatística para acessar sua distribuição espacial.

Material e Métodos

Espécie estudada

Nove colônias de *Atta sexdens* utilizadas neste estudo foram coletadas em março de 2017, em Botucatu (22° 50' 48" S; 48° 26' 06" W), SP, e levadas ao Laboratório de Insetos Sociais-Praga (LISP) pertencente ao Departamento de Proteção Vegetal, localizado na Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP), em Botucatu.

As colônias foram armazenadas em recipientes cilíndricos de plástico transparente (750 ml) com uma camada de gesso no fundo (1 cm) para manter a umidade do jardim de fungo. Foram feitos dois furos em lados opostos desses recipientes e, com pedaços de uma mangueira transparente, foram conectados dois

recipientes com capacidade para 250 ml, um para fornecimento de substrato vegetal e outro para deposição de resíduos (lixo). A *Acalypha* sp. foi fornecida como substrato vegetal para manutenção de cultura de fungo. As colônias foram mantidas à temperatura de 24 ± 2 °C e umidade relativa de 70%.

Preparo dos pellets de polpa cítrica

Os pellets foram preparados manualmente a base de polpa cítrica. As laranjas foram descascadas e cortadas em pedaços pequenos e esses foram secos em estufa a 50 °C por 72h; após a secagem, a polpa foi moída e armazenada em freezer até o preparo dos pellets (Verza et al., 2006).

Como traçador, foi usado um corante amarelo fluorescente lipossolúvel em pó (BioQuip® Products, Rancho Dominguez, CA). Os tratamentos utilizados foram: controle (sem ingrediente ativo), 0,3% de sulfluramida (Britto et al., 2016) e 0,15% de indoxacarbe. Para o preparo dos pellets utilizou polpa cítrica (65%), carboximetilcelulose (CMC) (10%), solução de óleo de milho com corante fluorescente a 5% (25%), inseticida e água destilada para formar uma mistura pastosa. As misturas foram colocadas em seringas plásticas descartáveis (3 ml) para formar os filetes, que foram dispostos em bandejas de alumínio e secos em estufa a 50 °C por 21h; após a secagem, foram armazenados em freezer até a utilização no experimento (Sousa et al., 2017).

Dispersão do substrato no fungo

O experimento foi realizado com três tratamentos e três repetições, totalizando nove colônias; cada colônia com 600 ml de fungo, em média. As colônias permaneceram por um período de 24 horas sem o fornecimento de substrato antes de iniciar o experimento. Foram oferecidos pellets (0,51 g) com tamanho médio de 0,5 cm de comprimento para cada colônia (Forti et al., 2012). Vinte e quatro horas após o fornecimento dos pellets, as colônias foram armazenadas em freezer por 24h para avaliar a dispersão dos fragmentos dos pellets processados e incorporados ao fungo. O fungo foi avaliado com auxílio de lâmpada ultravioleta, em ambiente escuro, levando-se em consideração a localização dos fragmentos incorporados com pigmentos fluorescentes em relação aos eixos X, Y e Z (a distância entre os pontos

foi medida em centímetros (cm)); após medir a distância do fragmento em relação aos eixos, o mesmo foi retirado com pinça entomológica.

Análise geoestatística

O método mais comumente usado para análise geoestatística é a construção do variograma, que é um gráfico que mostra a dependência espacial de um organismo no qual as variâncias amostrais das diferenças dos pares amostrais são plotadas em relação a distância entre os pontos amostrais. Essas variâncias podem ser definidas em termos de γ como uma função da distância de separação entre os pontos (h):

$$\gamma(h) = \frac{1}{2 N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} [Z_{x_i} - Z_{x_{i+h}}]^2$$

onde: Z_{x_i} é o valor amostral observado (1 = presença de fungo e 0 = ausência de fungo) no local, x_i , $Z_{x_{i+h}}$ é o valor amostral observado no local, x_{i+h} e $N(h)$ é o número total de pares amostrais para cada uma das distâncias de separação (Isaaks e Srivastava, 1989). O pacote RGeostats (Renard et al., 2017) foi usado em conjunto com o ambiente de desenvolvimento integrado para cálculos estatísticos e gráficos R 3.4.0 (Team, 2017).

Análise estatística

Os dados do número médio de fragmentos incorporados pelas operárias em cada tratamento foram comparados pela ANOVA e do teste de comparações múltiplas de Tukey com significância de 5%.

Resultados

Os modelos derivados do estudo estão apresentados na Figura 1 e nos gráficos 3D:

<https://www.youtube.com/watch?v=LzqBVScQITl>

<https://www.youtube.com/watch?v=N3Psu1WvAKw>

<https://www.youtube.com/watch?v=c7VPQvEIVXk>

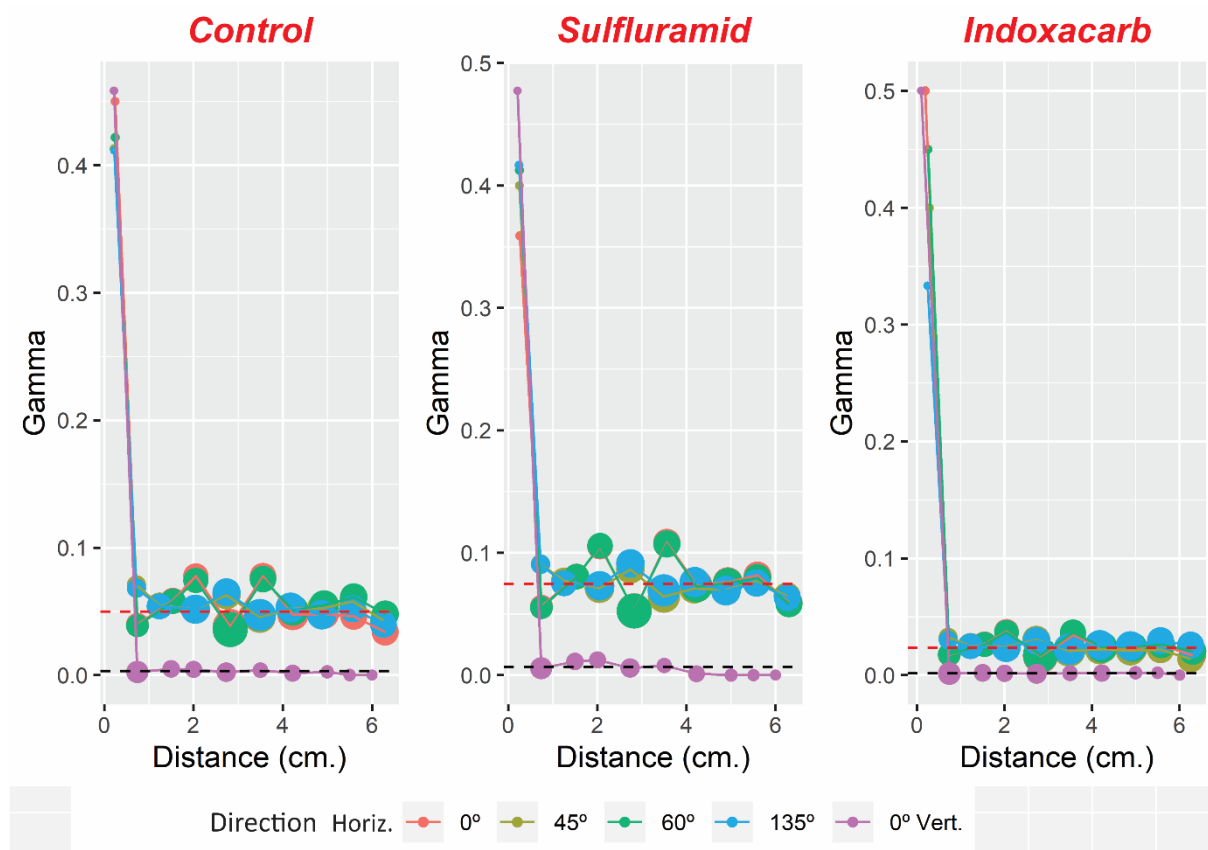


Fig. 1. Colunas de variogramas: controle, sulfluramida e indoxacarbe.

O tamanho dos círculos é proporcional ao número de pares de pontos usados para calcular as variâncias (Fig. 1). Como o primeiro ponto representa apenas 0,042% dos pares de pontos em média, ele aparece representado no gráfico, mas não foi considerado importante para o ajuste do modelo.

Variâncias para as distâncias horizontais são maiores do que variâncias quase nulas das distâncias verticais nos tratamentos controle e sulfluramida. No tratamento com indoxacarbe, as variâncias de ambas as distâncias são quase nulas. A magnitude da variação das distâncias horizontais indica uma densidade dos pellets nas camadas horizontais do fungo e a magnitude da variação das distâncias verticais indica a densidade dos pellets ao longo do perfil de profundidade do fungo. Magnitudes mais altas indicam densidades de pellets mais baixas e vice-versa.

A morfologia do semivariograma apresenta três estruturas importantes e interativas: o efeito pepita (interceptação no eixo y), o patamar (ponto do eixo x onde a variância amostral não aumenta ou se torna aleatória) e amplitude de dependência espacial (distância até o patamar).

Esses variogramas de distribuição aleatória são lineares e têm pouca ou nenhuma inclinação, e o efeito pepita é igual ao patamar. As principais diferenças entre esses variogramas são o baixo coeficiente de determinação e a alta variação encontrada no variograma aleatório. Os coeficientes de determinação variaram de $-0,14$ a $-0,08$. A escala de apresentação dos gráficos dificulta visualização deste fenômeno que caracteriza a aleatoriedade e está presente nos três tratamentos.

Já o número médio de fragmentos de pellets incorporados ao jardim de fungo pelas operárias variou entre os tratamentos ($F_{2,4} = 26,158$, $p\text{val} < 0,05$) (Fig. 2). O teste de comparação múltipla mostrou diferenças estatísticas significativas no número médio de fragmentos incorporados pelas operárias entre os tratamentos controle (A) e indoxacarbe (C) ($q_{3,6} = 4,34$, G.L. = 2, $p < 0,05$). Foi observada diferença estatística significativa no número médio de fragmentos incorporados pelas operárias entre os tratamentos com sulfluramida (B) e indoxacarbe (C) ($q_{3,6} = 4,34$, G.L. = 2, $p < 0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no número médio de fragmentos incorporados pelas operárias entre os tratamentos controle (A) e sulfluramida (B) ($q_{3,6} = 4,34$, G.L. = 2, $p > 0,05$) (Fig. 2).

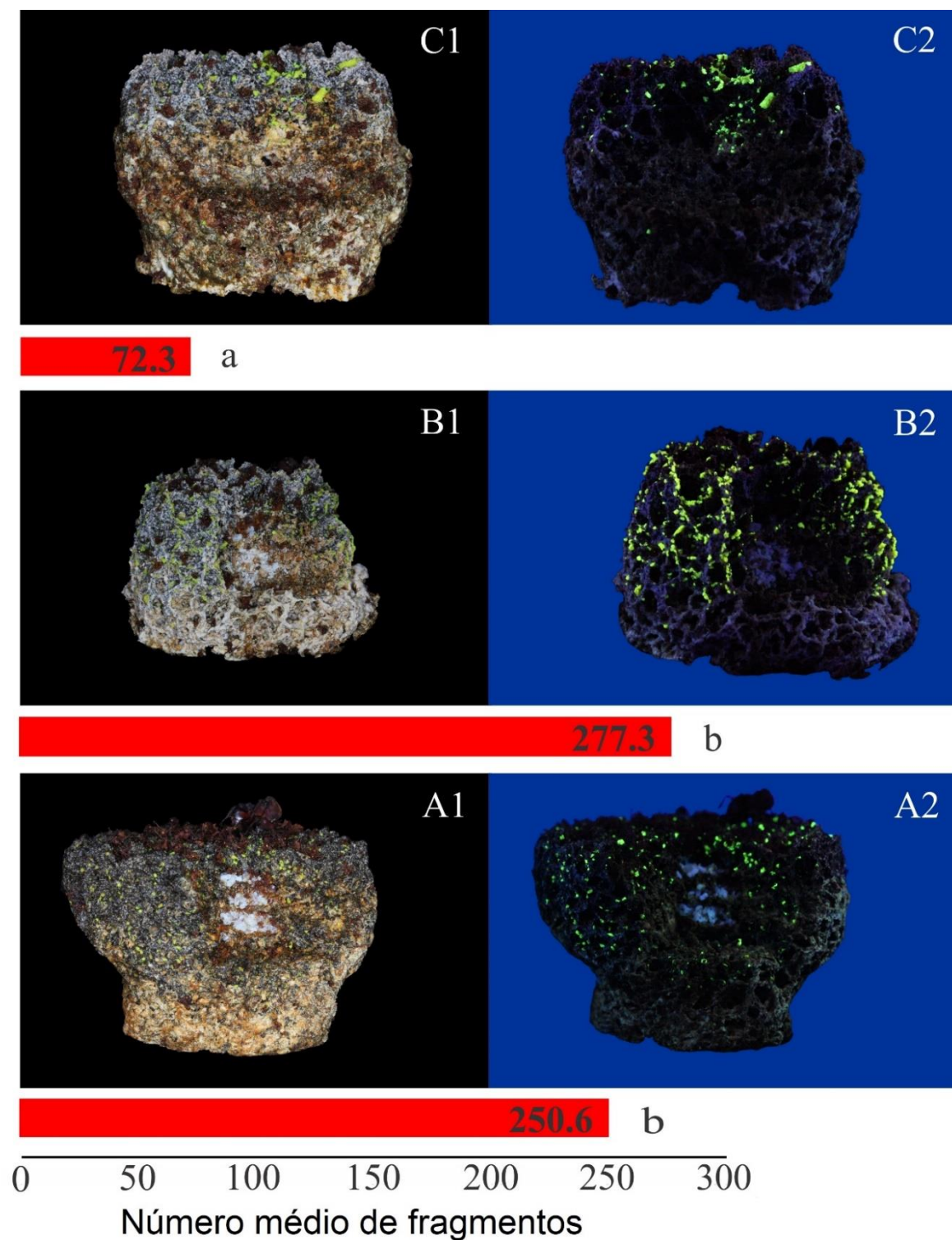


Fig. 2. Distribuição dos fragmentos dos pellets no jardim de fungo, com e sem ingredientes ativos. A2, B2, C2: distribuição dos fragmentos com luz ultravioleta. A1 e A2: pellets sem ingrediente ativo. B1 e B2: pellets com sulfluramida. C1 e C2: pellets com indoxacarbe. A1, B1, C1: distribuição do fragmento sem luz ultravioleta. Os tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Discussão

No presente estudo, a distribuição dos fragmentos de pellets ocorreu de forma aleatória, ou seja, esteve sujeita a variações imprevisíveis decorrentes de fatores incontrolláveis relacionados ao acaso (Underwood, 1997). A distribuição está sujeita à aleatoriedade porque as operárias colocam fragmentos de pellets na região de crescimento do fungo, uma vez que o fungo cresce aleatoriamente (Fig. 1). No entanto, a quantidade de fragmentos foi influenciada pela forma como o ingrediente ativo atua na colônia (Fig. 2). Dessa forma, os resultados confirmam a hipótese de que o modo de ação dos ingredientes ativos em iscas formicidas afeta diretamente as operárias durante o cultivo do fungo e, conseqüentemente, a distribuição dos fragmentos de pellets.

As iscas são processadas pelas operárias que realizam uma série de comportamentos (Diniz e Bueno, 2009). O substrato é levado ao jardim de fungo, onde o lambem até ficar úmido e ao mesmo tempo limpam esse material; elas repicam o substrato e mastigam suas bordas; esses fragmentos são então incorporados ao fungo e posteriormente as hifas são inoculadas (Andrade et al., 2002; Camargo et al., 2017; Garrett et al., 2016; Silva et al., 2015). O ingrediente ativo se dispersa durante o cultivo do fungo, contaminando as operárias (Forti et al., 2019; Silva et al., 2015). O modo de ação dos inseticidas pode afetar a distribuição dos fragmentos da isca, pois as operárias são contaminadas com o inseticida e, portanto, afeta o comportamento durante o cultivo do fungo (Fig. 2). Nos tratamentos com sulfluramida e controle, a distribuição foi semelhante; o mesmo não ocorreu no tratamento com indoxacarbe (Fig. 2).

No tratamento com sulfluramida, os pellets foram todos processados e distribuídos no fungo sem que as operárias percebessem a presença do ingrediente ativo. Inseticida com ação como a sulfluramida, significa maior distribuição do substrato sobre o fungo, permitindo que as operárias realizem todos os comportamentos envolvidos no cultivo do fungo até que comecem a morrer. No entanto, o uso de um ingrediente ativo como o indoxacarbe evita que as operárias concluam o processamento dos pellets (Fig. 2). Isso ocorre devido à ação do inseticida, que resulta na mortalidade da operária em curto espaço de tempo (Dias, 2006).

Como a distribuição é influenciada pelo modo de ação do inseticida, aqueles com ação como a sulfluramida são mais eficientes no controle das formigas cortadeiras, pois atuam por períodos mais longos na colônia, enquanto as mais rápidas atuam nos primeiros dias (Nagamoto, 2003). Este ingrediente ativo interrompe a produção de ATP na mitocôndria, reduzindo a produção de energia do organismo e se tornando letal para os insetos (Schnellmann e Manning, 1990). As operárias apresentam sintomas típicos de intoxicação por sulfluramida, ou seja, movimento lento e diminuição da agressividade devido aos baixos níveis de energia nos seus organismos, que caem até que seu metabolismo seja interrompido, causando sua morte (Britto et al., 2016; Schnellmann e Manning, 1990). Portanto, pela ação da sulfluramida, esse ingrediente ativo permite que as operárias carreguem as iscas, deixando-as expostas ao inseticida durante o cultivo do fungo e distribuindo os fragmentos (Fig. 2); ou seja, sem perceber a presença do ingrediente ativo, os comportamentos de cultivo do fungo não são comprometidos. Isso confirma a eficiência desse inseticida no controle de formigas cortadeiras (Britto et al., 2016; Cruz et al., 1996; Forti et al., 2003; Zanuncio et al., 1999, 1996).

O indoxacarbe é uma substância neurotóxica que bloqueia os canais de sódio, ou seja, compromete a função nervosa, interrompe a alimentação, paralisa, o que pode ocorrer em 2 a 8 horas, causando a morte (Dias, 2006). Porém, devido à sua ação, esse ingrediente ativo interfere na distribuição dos fragmentos de pellets na colônia, pois as operárias morrem durante o processamento (Fig. 2).

Com a hipótese de como ocorre a dispersão dos fragmentos de isca e se está relacionada ao modo de ação do ingrediente ativo, conclui-se que os inseticidas atuantes, como a sulfluramida, permitem a distribuição dos fragmentos e a incorporação ao fungo. Assim, a distribuição dos fragmentos é fundamental para a contaminação de um maior número de operárias.

Fontes de financiamento

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brasil), Código de Financiamento 001. Luiz Carlos Forti foi bolsista do Conselho Nacional da Ciência e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (301-938 / 2017-2).

Contribuição dos autores

GCC, RSC e LCF conceberam, projetaram e realizaram o experimento; GCC, RSC, CAOM e LCF analisaram os dados; GCC, KKAS, RSC, NC, CAOM e LCF escreveram o artigo.

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* 40, 293–306.
- Barr, C.L., 2003. Fire ant mound and foraging suppression by indoxacarb bait. *J. Agric. Urban Entomol.* 20, 143–150.
- Britto, J.S., Forti, L.C., Oliveira, M.A., Zanetti, R., Wilcken, C.F., Zanuncio, J.C., Loeck, A.E., Caldato, N., Nagamoto, N.S., Lemes, P.G., Camargo, R.S., 2016. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int. J. Res. Environ. Stud.* 3, 11–92.
- Camargo, R.S., Puccini, C., Forti, L.C., Matos, C.A.O., 2017. Behaviors in fungus garden cultivation: routes of contamination of leaf cutting ant workers with fat-soluble tracer dye. *Int. J. Agric. Innov. Res.* 5, 555–560.
- Camargo, R.S., Forti, L.C., Lopes, J.F.S., Andrade, A.P.P., Ottati, A.L.T., 2007. Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entomol.* 131, 139–145, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01129.x>.
- Cameron, R.S., 1990. Potential baits for control of the Texas leaf-cutting ant, *Atta texana* (Hymenoptera: Formicidae). In: Vander Meer, R.K., Jaffe, K., Cedeno, A. (Eds.), *Applied Myrmecology: A World Perspective*. Westview Press, Boulder, pp. 628–637.
- Cruz, A.P., Zanuncio, J.C., Zanetti, R., Gomes, O.S., 1996. Eficiência de iscas formicidas à base de sulfluramida e de clorpirifós no controle de *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera, Formicidae), no trópico úmido. *Acta Amaz.* 26, 145–150.
- Delabie, J.H.C., Della Lucia, T.M.C., Pastre, L., 2000. Protocolo de experimentação para avaliar a atratividade de novas formulações de iscas granuladas utilizadas no controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. e *Atta* spp.

(Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) no campo. An. da Soc. Entomológica do Bras. 29, 843–848.

Della Lucia, T.M., Gandra, L.C., Guedes, R.N., 2014. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. Pest Manag. Sci. 70, 14–23, <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3660>.

Dias, J.L., 2006. Environmental Fate of Indoxacarb. Department of Pesticide Regulation, Sacramento - CA.

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

Forti, L.C., Camargo, R.S., Andrade, A.P.P., Catalani, G.C., Sousa, K.K.A., Silva, A.A.C., Caldato, N., Ramos, V.M., 2019. Contamination route of leaf-cutting worker ants analyzed through a fat-soluble tracer dye in toxic bait. Neotrop. Entomol. 48, 349–355, <http://dx.doi.org/10.1007/s13744-018-0652-1>.

Forti, L.C., Nagamoto, N.S., Pretto, D.R., 1998. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. In: Berti Filho, E., Mariconi, F.A.M., Fontes, L.R. (Eds.), Simpósio Sobre Formigas Cortadeiras Dos Países Do Mercosul. FEALQ, Piracicaba., pp. 113–132.

Forti, L.C., Nagamoto, N.S., Ramos, V.M., Andrade, A.P.P., Lopes, J.F.S., Camargo, R.S., Moreira, A.A., Boaretto, M.A.C., 2003. Eficiência de sulfluramida, fipronil y clorpirifos como sebos en el control de *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera: Formicidae). Pasturas Trop. 25, 28–35.

Forti, L.C., Pretto, D.R., Nagamoto, N.S., Padovani, C.R., Camargo, R.S., Andrade, A.P.P., 2007. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology 50, 1149–1164.

Forti, L.C., Silva, M.S., Fujihara, R.T., Caldato, N., Garcia, M.G., 2012. Trajectory of water-and fat-soluble dyes in the grass-cutting ant *Atta capiguara*: evaluation of infrabuccal cavity, post-pharyngeal glands and gaster (Hymenoptera, Formicidae). Sociobiology 59, 511–520, <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v59i2.614>.

Forti, L.C., Silveira Neto, S., 1989. Distribuição de substrato em colônia de *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidae). An. da Soc. Entomológica do Bras. 18, 347–356.

- Fowler, H.G., Pagani, M.I., Silva, O.A., Forti, L.C., Silva, V.P., Vasconcelos, H.L., 1989. A pest is a pest is a pest? The dilemma of neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. *Environ. Manage.* 13, 671–675.
- Garrett, R.W., Carlson, K.A., Goggans, M.S., Nesson, M.H., Shepard, C.A., Schofield, R.M.S., 2016. Leaf processing behaviour in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. *R. Soc. Open Sci.* 3, 150111, <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150111>.
- Isaaks, E.H., Srivastava, R.M., 1989. *An Introduction to Applied Geostatistics*. Oxford University Press, New York.
- Lopes, J.F.S., Forti, L.C., Camargo, R.S., 2004. The influence of the scout upon the decision-making process of recruited workers in three *Acromyrmex* species (Formicidae: Attini). *Behav. Processes* 67, 471–476, <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2004.08.001>.
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z., 2012. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. *Int. J. Pest Manag.* 58, 225–247, <http://dx.doi.org/10.1080/09670874.2012.663946>.
- Moreira, A.A., Forti, L.C., 1999. Distribuição de substratos nas colônias de *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). *Sci. Agric.* 56, 465–469, <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161999000200029>.
- Moreira, A.A., Forti, L.C., Boaretto, M.A.C., Andrade, A.P.P., Rossi, M.N., 2003. Substrate distribution in fungus chambers in nests of *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entomol.* 127, 96–98, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0418.2003.00719.x>.
- Mueller, U.G., Kardish, M.R., Ishak, H.D., Wright, A.M., Solomon, S.E., Bruschi, S.M., Carlson, A.L., Bacci Jr, M., 2018. Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. *Mol. Ecol.* 27, 2414–2434, <http://dx.doi.org/10.1111/mec.14588>.
- Nagamoto, N.S., 2003. Estudos toxicológicos de princípios ativos utilizando como modelo *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae). 234f. Tese (Doutorado em Agronomia: Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- Nagamoto, N.S., Forti, L.C., Andrade, A.P.P., Boaretto, M.A.C., Wilcken, C.F., 2004. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 44, 413–432.
- Nagamoto, N.S., Forti, L.C., Raetano, C.G., 2007. Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic baits for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity. *J. Pest Sci.* 80 (2004), 9–13, <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-006-0143-8>.
- Pretto, D.R., Forti, L.C., 2000. Dyed baits distribution in nests of *Atta sexdens* L. (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entomol.* 124, 37–39, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0418.2000.00431.x>.
- Pretto, D.R., Forti, L.C., 1993. Metodologia para estudo da dispersão de inseticidas em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae), in: International Symposium on Pest Ants. 11º Encontro De Mirmecologia, Belo Horizonte - MG., pp. 61.
- Pretto, D.R., Forti, L.C., Nagamoto, N.S., 1995. Dispersão de inseticida em colônia de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae) no laboratório. In: Brasileiro de Entomologia, Congresso (Ed.), 15º Congresso Brasileiro de Entomologia. Caxambú - MG., p. 437.
- Renard, D., Bez, N., Dsesassis, N., Beucher, H., Ors, F., Freulon, X., 2017. RGeostat: The Geostatistical R Package [V 11.12].
- Schnellmann, R.G., Manning, R.O., 1990. Perfluorooctane sulfonamide: a structurally novel uncoupler of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1016, 344–348, [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90167-3](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728(90)90167-3).
- Silva, L.C., Camargo, R.S., Forti, L.C., Matos, C.A.O., Travaglini, R.V., 2015. Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? *Sociobiology* 62, 484–493, <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.772>.
- Sousa, K.K.A., Camargo, R.S., Forti, L.C., 2017. Communication or Toxicity: What Is the Effect of Cycloheximide on Leaf-Cutting Ant Workers? *Insects* 8, 126, <http://dx.doi.org/10.3390/insects8040126>.
- Stefanelli, L.E.P., 2019. Estudo comparativo dos inseticidas sulfluramida e indoxacarbe para *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). 107p. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- Team, R.C., Vienna, Austria 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]., pp. 2014.
- Underwood, A.J., 1997. Experiments in Ecology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Verza, S.S., Forti, L.C., Matos, C.A.O., Garcia, M.G., Nagamoto, N.S., 2006. Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology 47, 391–399.
- Wilson, E.O., 1980. Caste and division of labour in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. Behav. Ecol. Sociobiol. (Print) 7, 143–156.
- Wing, K.D., Sacher, M., Kagaya, Y., Tsurubuchi, Y., Mulderig, L., Connair, M., Schnee, M., 2000. Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. Crop Prot. 19, 537–545, [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00070-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00070-3).
- Wing, K.D., Schnee, M.E., Sacher, M., Connair, M., 1998. A novel oxadiazine insecticide is bioactivated in lepidopteran larvae. Arch. Insect Biochem. Physiol. 37, 91–103, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1998\)37:1<91::AID-ARCH11>3.0.CO;2-5](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1998)37:1<91::AID-ARCH11>3.0.CO;2-5).
- Zanuncio, J.C., Cruz, A.P., Santos, D.F., Oliveira, M.A., 1996. Eficiência da isca Mirex-S (sulfluramida 0, 3%) no controle de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) em três dosagens. Acta Amaz. 26, 115–120.
- Zanuncio, J.C., Zanuncio, T.V., Pereira, J.M.M., Oliveira, H.N., 1999. Controle de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) com a isca Landrin-F, em área anteriormente coberta com Eucalyptus. Ciência Rural 29, 573–576.

CAPÍTULO 3³
AS OPERÁRIAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS TROCAM SUBSTÂNCIAS
LÍQUIDAS APÓS O FORRAGEAMENTO?

Gabriela Christal Catalani^a, Robeto da Silva Camargo^a, Kátia Kaelly A. Sousa^a, Carlos Alberto Oliveira Matos^b, Nadia Caldato^a, Nilson Satoru Nagamoto^a, Luiz Carlos Forti^a

^a Departamento de Proteção Vegetal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agronômicas. Botucatu-SP, CEP 18603-970, Brasil. E-mail: gchristalcatalani@yahoo.com.br; katiakaelly@gmail.com; nacbiol@gmail.com; nsnagamoto@yahoo.com; luiz.forti@unesp.br

^b Campus Experimental de Itapeva, Universidade Estadual Paulista. Itapeva-SP, CEP 18409-010, Brasil. E-mail: carlos.matos@unesp.br

Resumo

O comportamento de forrageamento líquido e a troca de alimento líquido dentro do ninho dependem do hábito alimentar e da capacidade de armazenar alimento nas espécies de formigas e podem estar relacionados às taxas de trofalaxia. Para avaliar se a ocorrência de trofalaxia está relacionada com a ingestão de substâncias líquidas, avaliou se há forrageamento líquido e troca de alimento líquido em colônias de laboratório de formigas cortadeiras, *Atta sexdens* (L.). Os resultados mostraram que as forrageiras comumente ingerem líquido quando fornecidas com uma fonte líquida. Dentro do ninho, as operárias forrageiras realizaram diversos comportamentos, mas nenhuma troca alimentar (trofalaxia oral) ocorreu durante todo o período de oito horas em que foram observadas. Nas condições experimentais, o forrageamento líquido não teve relação com a trofalaxia oral entre operárias dentro do ninho. Assim, a coleta de

³Este capítulo segue as normas da Behavioral Process, onde o artigo científico foi submetido.

líquidos atende às necessidades individuais das operárias de formigas cortadeiras e não se destina à trofalaxia entre elas, uma vez que esse comportamento é para alimentar a colônia, dependendo principalmente do hábito alimentar e da capacidade de armazenamento dos órgãos de reserva.

Palavras-chave: *Atta sexdens*; comportamento; ingestão de líquidos; trofalaxia oral.

1. Introdução

1.1 A dieta das formigas cortadeiras

A dieta das formigas cortadeiras, dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, é baseada no cultivo de um fungo (*Leucocoprinus gongylophorus* (Heim, 1957)), que é fonte de nutrientes para larvas (Quinlan e Cherrett, 1979) e operárias (Silva et al., 2003). Este fungo é cultivado pelas operárias com várias espécies vegetais frescas (Garcia et al., 2003; Hölldobler e Wilson, 2010; Mueller et al., 2018).

Assim, o fungo simbiote atende de 4,8 a 9% de suas necessidades nutricionais por meio das extremidades das hifas entumecidas, conhecidas como gongilídeos, abundantes em carboidratos, lipídios e proteínas (Bass e Cherrett, 1995; De Fine Licht et al., 2010, 2013, 2014; Quinlan e Cherrett, 1979). Porém, o fungo simbiote não é o único alimento ingerido pelas operárias de formigas cortadeiras. Elas suprem suas necessidades nutricionais com líquidos, como óleos, açúcares e exsudados da seiva de plantas enquanto cortam folhas e cultivam o fungo simbiote (Bass e Cherrett, 1995; Echols, 1966; Littledyke e Cherrett, 1975, 1976; Quinlan e Cherrett, 1979). Essa ingestão de líquido fornece energia para as atividades das forrageiras, como força mandibular para cortar folhas, fazer longas viagens de forrageamento e transportar cargas pesadas (Lewis et al., 1974; Lighton et al., 1987; Roces e Lighten, 1995).

1.2 Forrageamento líquido em formigas cortadeiras

Muitas espécies de formigas visitam fontes de alimento líquido, como nectários extraflorais, essas são especializadas em coletar fluídos e ingerir grandes quantidades de alimentos líquidos, por exemplo, o gênero *Camponotus*, enquanto outras raramente se alimentam de fontes de néctar, como formigas cortadeiras (Paul e Roces, 2003). No entanto, as operárias de *Atta cephalotes* (L.) suprem sua deficiência de líquidos ingerindo água durante períodos secos, ou em laboratório, quando o ar é mais seco do que na natureza (Weber, 1972). Além disso, forrageiras sem carga estão associadas ao transporte, consumo e assimilação de líquidos na forma de néctar vegetal rico em carboidratos (Wirth et al., 2003), mas não há evidências de que isso seja uma rotina no campo (Rytter e Shik, 2016).

Embora há ingestão de substâncias líquidas durante o preparo do substrato a ser incorporado, as operárias saem do ninho para forragear as folhas com o mesêntero cheio (Rytter e Shik, 2016; Schilman e Roces, 2008). No entanto, a dinâmica de alimentação líquida antes do forrageamento apoia a hipótese da “lunchbox”, que elas esgotam para alimentar atividades de forrageamento energeticamente altas.

1.3 Trofalaxia em formigas cortadeiras

A ingestão de líquidos está associada ao comportamento de trofalaxia, ou seja, a troca de líquidos ingeridos, armazenados no papo e regurgitados entre os membros da colônia, é um comportamento típico que tem papel importante na organização social de muitas espécies de insetos sociais (Hölldobler e Wilson, 1990; Wilson, 1971). No entanto, a capacidade de se alimentar de líquidos e regurgitar os alimentos armazenados no papo pode ser determinada por dois parâmetros: a existência de

trofalaxia associada ao armazenamento de alimentos líquidos coletados durante o forrageamento e a existência de um papo bem desenvolvido que pode transportar alimentos líquidos (Eisner, 1957). Em espécies com papo bem desenvolvido, como *Camponotus rufipes* (Fabricius), a taxa de ingestão de líquido é de $6,7 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$, maior que em operárias de *Atta sexdens*, que não ultrapassa $0,6 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$ (Paul e Roces, 2003).

Entretanto, esses gêneros têm hábitos alimentares diferentes. *Camponotus* tem um papo desenvolvido com capacidade de armazenar líquidos ingeridos, que, após o forrageamento, as operárias retornam aos seus ninhos e regurgitam, transferindo-os para suas companheiras via trofalaxia (Hölldobler e Wilson, 1990; Paul e Roces, 2003).

Por sua vez, o percentual de ocorrência após as operárias coletarem alimento líquido em formigas cortadeiras chega a 38% para a espécie *Acromyrmex subterraneus* (Forel) (Moreira et al., 2006), mas essa ocorrência varia com a composição da dieta e da espécie de formiga cortadeira. Para dietas líquidas, semissólidas e sólidas, as taxas de trofalaxia foram de 23, 13 e 3%, respectivamente. Em contraste, as taxas de trofalaxia em *Atta sexdens rufopilosus* (Forel) foram de 13, 3 e 0% para as respectivas dietas (Moreira et al., 2015).

1.4 Objetivo do estudo

Assim, o objetivo foi elucidar o forrageamento líquido e a troca de alimento líquido em colônias de laboratório de formigas cortadeiras, *A. sexdens*.

2. Material e Métodos

2.1 Colônias estudadas

As colônias de *A. sexdens* pertenciam ao Laboratório de Insetos-Sociais Praga (LISP), do Departamento de Proteção Vegetal, localizado na Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP), Botucatu, SP. As colônias eram mantidas em um recipiente cilíndrico transparente com capacidade para 5 l, com uma camada de gesso de 1 cm na parte inferior para manter a umidade do jardim de fungo. Dois orifícios foram feitos em lados opostos do recipiente e, com pedaços de uma mangueira transparente, os dois recipientes foram conectados, um para abastecimento do substrato vegetal e outro para deposição dos resíduos (lixo). A *Acalypha* sp. foi fornecida como substrato vegetal para a manutenção da cultura do fungo. As colônias foram mantidas em sala climatizada, à temperatura de 24 ± 2 °C e umidade relativa de 70%.

Para avaliar a ingestão de líquido pelas operárias e o potencial água do fungo na colônia desidratada, essas receberam apenas substrato seco (laranja desidratada e quirera de milho) por 65 dias antes do início do experimento. Segundo Da Silva et al. (2009), colônias desidratadas favorecem a ocorrência de trofalaxia em formigas cortadeiras. Para verificar se o fungo da colônia estava desidratado, foi medida a atividade água; como controle negativo, também foi mensurada de uma colônia em condições normais.

2.2. Atividade água do jardim de fungo

A atividade água (A_w) mede o status da energia da água dentro de um sistema, indicando a quantidade de água disponível para um micro-organismo se desenvolver, como o fungo; e foi medida para categorizar o fungo de colônia de formiga cortadeira "desidratada" e "não desidratada". É definida como a relação entre a pressão de vapor de água de um determinado substrato e a pressão de vapor da água pura na mesma

temperatura e pressão (Pardo et al., 2004). O potencial hídrico pode interferir na disponibilidade hídrica para as formigas e, conseqüentemente, na sua sobrevivência; uma vez que operárias de *A. cephalotes* suprem a deficiência de líquido ingerindo água durante períodos secos, ou no laboratório, quando o ar é mais seco do que na natureza (Weber, 1972). Assim, o potencial hídrico do fungo ajuda as operárias a superar sua deficiência de líquido.

A atividade água do jardim de fungo nas colônias foi medida por meio de um medidor de potencial de água WP4-T (Decagon Devices, Inc., EUA) (Figura 1). As medições seguiram as recomendações do fabricante, mas alguns detalhes foram desenvolvidos ou adaptados a esse tipo específico de amostra, que é o fungo cultivado pelas formigas cortadeiras. Para isso, uma amostra de aproximadamente 10 a 15 ml de fungo, sem formigas, foi cuidadosamente compactada até cerca de 4-7 ml (7 ml é o limite estabelecido pelo fabricante, para cada amostra, para obter precisão de leitura); foi colocada dentro de uma cápsula de amostragem circular (4 cm de diâmetro x 1 cm de altura) e colocada em uma gaveta de amostra. Em seguida, a gaveta foi fechada e a válvula girada para vedar a câmara. Após alguns minutos (até 5), o WP4-T emitiu um sinal sonoro e exibiu a leitura final do potencial hídrico. Para maior precisão no WP4-T, a primeira leitura foi seguida por uma segunda e uma terceira; para isso, após cada leitura, o botão era novamente girado (vedação da câmara), sem abrir a gaveta. O dispositivo foi calibrado com solução padrão de 0,5 KCl molal, com potencial conhecido de -2,22 MPa, equivalente a 0,984 Aw a 25 °C.

2.3. Estudos Comportamentais

2.3.1. Ingestão de líquido pelas operárias

Para registrar a quantidade ingerida, 45 operárias foram capturadas com uma pinça na arena de forrageamento, e seu peso corporal inicial (P_i) e a largura da cabeça foram determinados; em seguida, as operárias receberam uma marcação no tórax com caneta permanente Edding® e colocadas de volta na arena. A colônia recebeu 7 μ l de uma solução de sacarose 15% e rodamina a 0,7%, oferecida com um micro seringa Hamilton®. Uma vez na arena, elas ingeriram a solução e terminaram a alimentação por auto decisão, afastando-se da gota. Nesse momento, as operárias foram capturadas novamente e seu peso corporal final (P_f) foi determinado. A quantidade líquida (em mg) foi calculada como a diferença entre P_f e P_i . O volume da solução ingerida foi calculado dividindo a quantidade coletada pela densidade da solução, proveniente da tabela de Wolf et al. (1984). Cada operária que foi observada alimentando teve sua massa corporal determinada antes e depois da ingestão (mg), juntamente com o tempo de ingestão (min) e a taxa de ingestão (μ l.min⁻¹) (Paul e Roces, 2003).

O experimento foi registrado por meio de um sistema de filmagem por câmera e captura de imagens no software iuVCR (Camargo et al., 2013; Camargo e Forti, 2015). Assim, o tempo exato de ingestão foi amostrado para cada operária avaliada. Além disso, os vídeos foram analisados caracterizando lambe e a sugar por meio da frequência com que a operária protraia e retraia a glossa em um intervalo de tempo. Os filmes foram publicados no YouTube e os links estão na sessão dos resultados.

2.3.2. Forrageamento líquido para trofalaxia oral entre operárias

Para avaliar a hipótese de que forragamento líquido é para realizar trofalaxia, as forrageiras de *A. sexdens* foram retiradas de sua colônia 24 horas antes da realização do experimento. Cinco operárias de cada grupo receberam uma marcação

no tórax com caneta Edding® cor branca e ficaram em contato com o traçador, 2 µl da solução de sacarose 15% e corante hidrossolúvel Rodamina a 0,7% (4 tratamentos com 5 repetições), por uma hora. Posteriormente, as operárias foram lavadas com água destilada e secas com papel toalha para que a solução com corante fosse retirada de suas estruturas morfológicas externas, evitando que as demais operárias do grupo fossem marcadas realizando os comportamentos de limpeza, partindo da hipótese se ocorreria ou não trofalaxia. Por isso, foi utilizado um corante hidrossolúvel, de modo que pudesse ser removido das estruturas externas com água, sem a utilização de solventes tóxicos para as operárias.

Essas operárias foram colocadas em contato com o grupo para observação das interações sociais entre a operária com traçador e as demais operárias sem traçador, larvas e pupas. As operárias foram transferidas para uma placa de Petri (Lopes et al., 2005) (grupo 1: 60 mm x 15 mm; grupo 2: 90 mm x 20 mm; grupo 3: 90 mm x 20 mm; grupo 4: 140 mm x 15 mm) contendo uma camada de 0,5 cm de gesso na parte inferior com uma pequena quantidade do fungo simbiote e a prole pertencente à colônia de onde foram retiradas as operárias. O delineamento experimental consistiu em 4 tratamentos, com 5 repetições:

- Grupo (1) 1-4: 1 operária com traçador + 4 generalistas + 6 jardineiras + 2 larvas + 1 pupa;
- Grupo (2) 1-9: 1 operária com traçador + 9 generalistas + 13 jardineiras + 4 larvas + 2 pupas;
- Grupo (3) 1-14: 1 operária com traçador + 14 generalistas + 21 jardineiras + 7 larvas + 3 pupas;
- Grupo (4) 1-19: 1 operária com traçador + 19 generalistas + 28 jardineiras + 9 larvas + 4 pupas.

Os grupos foram formados com operárias de tamanho médio, com base na largura da cabeça, de 1,2 a 2,2 mm (Andrade et al., 2002; Camargo et al., 2017b; Wilson, 1980), e de acordo com a porcentagem de castas pertencentes à colônia (Weber, 1972).

Foram registrados todos os atos comportamentais realizados pelas operárias com traçador, outras castas e prole do grupo. Observou os seguintes comportamentos: cuidado com larvas, cuidado com pupas, “self-grooming”, “allogrooming”, contato com o fungo, limpeza da operária com traçador, operária com traçador limpando operárias. As observações foram realizadas por um período de oito horas, com intervalos de 15 minutos, totalizando 32 observações por repetição. O sistema de observação adotado foi o de varredura, descrito por Martin e Bateson (1986), no qual um grupo de indivíduos é observado e seu comportamento é registrado em intervalos regulares. Após as observações, as operárias foram congeladas e dissecadas para avaliação das estruturas morfológicas internas tingidas com o corante traçador.

2.4. Análise Estatística

A taxa de ingestão de líquidos pelas operárias de *A. sexdens* foi comparada com a frequência esperada e a observada, com aplicação do teste qui-quadrado (χ^2) a 5% de probabilidade, confirmando a ingestão de líquidos pelas forrageiras, e se elas eram capazes de realizar trofalaxia. O tempo e a frequência dos atos de lambe e sugar foram comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, com significância de 5%.

Foram estudadas: (a) variáveis comportamentais e (b) frequência de operárias com a cavidade infrabucal e papo corados. A análise comportamental foi realizada por

comparação múltipla usando modelos ANOVA. Cada hipótese nula individual foi especificada por uma combinação linear de parâmetros p do modelo elementar e m hipóteses nulas foram testadas simultaneamente (Bretz et al., 2010).

Um modelo de regressão logística da frequência de operárias coradas e não-coradas foi testado usando o Modelo Linear Generalizado (GLM) com variância binomial e uma função de ligação logit. Além disso, a análise de regressão logística da frequência de indivíduos corados em função da proporção de indivíduos que receberam o corante foi analisada por meio do GLM com distribuição de Poisson e função de ligação logit. A mesma abordagem foi utilizada para a análise de regressão logística da frequência de indivíduos não corados em função da proporção de indivíduos que receberam o corante (Cordeiro e Demétrio, 2008). As análises estatísticas foram processadas no R (Ambiente de Software Livre para Estatística Computacional e Gráfica), versão 2.9.0, para Windows.

3. Resultados

3.1 Ingestão de líquido pelas operárias

A ingestão de líquido por sucção pelas forrageiras foi de $0,12 \pm 0,06 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$, abaixo do esperado ($0,13 \pm 0,07 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$), não diferindo significativamente entre si ($\chi^2 = 0,242$, $p < 0,05$) (Tabela 1). O tempo médio de sucção foi de $33,5 \pm 32,8$ s (Tabela 1). Essa ingestão provavelmente se deve ao fato de o jardim de fungo da colônia estudada estar mais seco que o jardim de fungo de uma colônia não desidratada. Esta observação é confirmada pela diferença no potencial água. A atividade água (A_w) da colônia desidratada foi de $-4,65$ MPa, o que equivale a $0,967 A_w$, valor que deprime drasticamente o crescimento micelial dos fungos basidiomicetos (Griffin, 1981);

enquanto a atividade água da colônia não desidratada era -1,11 MPa, que equivale a 0,992 Aw, adequado para o crescimento da maioria dos fungos (Griffin, 1981).

Ao ingerir a solução fornecida, a forrageira protraí sua glossa em direção à gota e inicia o processo de sucção. Após a ingestão da solução, a glossa se retrai e, por decisão própria, a forrageira retorna ao ninho. As forrageiras também são capazes de lambar, protraí e retrair a glossa várias vezes em um curto período de tempo (Figura

2) (<https://www.youtube.com/watch?v=U78Lt9N7ju0>)

(<https://www.youtube.com/watch?v=3nUwHqoolml>). O número médio da frequência de protração e retração da glossa durante o ato de lambar ($n = 20$; $15,25 \pm 13,87$) é superior ao da sucção ($n = 20$; $3,75 \pm 3,99$), diferindo estatisticamente entre si (Mann-Whitney $U = 26$; G.L. = 19; $p < 0,0001$). O inverso ocorre com o tempo de lambar ($11,90 \pm 12,96$ s), que é menor que para a sucção ($32,30 \pm 46,33$ s) da solução fornecida, diferindo significativamente entre si (Mann-Whitney $U = 95$; G.L. = 19; $p < 0,05$).

3.2 Forrageamento líquido para trofalaxia entre operárias

Sete atos comportamentais foram observados nesta configuração experimental. Esses atos comportamentais foram 1: cuidado com as larvas (<https://www.youtube.com/watch?v=FjbM4RVTVGm>); 2: cuidado com as pupas (<https://www.youtube.com/watch?v=a46a2opii-E>); 3: “self-grooming” (<https://www.youtube.com/watch?v=NEZpr1Uuy8E>); 4: “allogrooming” (<https://www.youtube.com/watch?v=BErfeV4VbTA>); 5: tocar no jardim de fungo (https://www.youtube.com/watch?v=ODxcY_IrHVk); 6: limpeza da operária com traçador por outras operárias (<https://www.youtube.com/watch?v=ETTue8jK9eY>); 7: operária com traçador limpando outras operárias

(<https://www.youtube.com/watch?v=5U7q54zKkvU>). Nenhuma troca de alimento líquido, conhecida como trofalaxia, foi observada entre as operárias durante as 8h de avaliação.

A comparação dos comportamentos entre os grupos mostrou que quanto maior o grupo, maior é a frequência de atos comportamentais entre as operárias, diferindo estatisticamente entre os grupos, exceto para o comportamento que a operária com traçador recebe “allogrooming” (Figura 3). Comparando a frequência de comportamento dentro dos grupos, esses diferem estatisticamente, sendo os comportamentos mais frequentes o contato com o fungo, com a prole (larvas e pupas) e “self-grooming” (Figura 4).

Um modelo de regressão logística para a frequência de operárias com traçador e operárias sem traçador foi testado usando o GLM com variância binomial e uma função de ligação logit. A desviância (uma medida qualidade de ajuste) do modelo não foi significativo ($p = 0,98$), indicando uma falta de evidência contra este modelo. Efeitos significativos para a proporção de operárias com traçador em relação à proporção de operárias sem traçador foram observados para trat01:09 (valor $z = -2,664$, $\Pr(> |z|) = 0,00771$), trat01:14 (valor $z = -4,597$, $\Pr(> |z|) = 4,30e-06$) e trat01:19 (valor de $z = -4,648$, $\Pr(> |z|) = 3,35e-06$) (Tabela 3). Não foi encontrada diferença significativa para atos comportamentais (Tabela 2).

Um modelo de regressão logística para a frequência de operárias com traçador recebendo a limpeza e a frequência de operárias com traçador limpando outras operárias foi testado usando o GLM com variância binomial e uma função de ligação logit. A desviância (uma medida de qualidade de ajuste) do modelo não foi significativo ($p = 0,41$), indicando uma falta de evidência contra este modelo. Efeitos significativos para a proporção de operárias com a cavidade infrabucal corada em relação à

proporção de operárias com a cavidade infrabucal não corada foram observados apenas para o tratamento 01:14 (valor $z = 2,044$, $\Pr(> |z|) = 0,0410$) (Tabela 3). A observação de efeitos significativos indica que operárias com corante evidenciam troca de substâncias por limpeza pelas operárias. No entanto, isso é observado em apenas um grupo (Tabela 3).

Quanto à anatomia interna das operárias, o grupo 01:04 teve 5 operárias com a cavidade infrabucal (CIB) corada (9,09%), sendo 90,91% não corada, 1 com o papo corado (1,82%) e 98,18% com o papo não corado; no grupo 01:09 teve 5 com CIB corada (4,35%) e 95,65% com CIB não corada, 2 (1,74%) tiveram o papo corado e 98,26% não corado; o grupo 01:14 teve 5 com CIB corada (2,78%) e 97,22% com CIB não corada, 3 (1,67%) tiveram o papo corado e 98,33% não corado; o grupo 01:19 teve 6 com CIB corada (2,5%) e 97,5% não corada, 3 (1,25%) com o papo corado e 98,75% não corado (Figura 5).

Um modelo de regressão logística para a frequência de cavidade infrabucal corada foi testado usando o GLM com variância binomial e uma função de ligação logit. A desviância (uma medida de qualidade de ajuste) do modelo não foi significativo ($p = 0,99$), indicando uma falta de evidência contra este modelo. Não foram observados efeitos significativos para a proporção de operárias com a cavidade infrabucal corada em relação à proporção de operárias com a cavidade infrabucal não corada, indicando que não houve troca da solução corante entre operárias com traçador e operárias sem traçador.

Um modelo de regressão logística para frequência de papo corado foi testado usando o GLM com variância binomial e uma função de ligação logit. A desviância (uma medida de qualidade de ajuste) do modelo não foi significativo ($p = 1,00$), indicando uma falta de evidência contra este modelo. Não foram observados efeitos

significativos para a proporção de operárias com o papo corado em relação à proporção de operárias com papo não corado.

4. Discussão

Os resultados mostraram que as forrageiras podem ingerir quantidade significativa de líquido durante o forrageamento, mas não realizam a trofalaxia com outras operárias dentro do ninho. Isso foi demonstrado quando a operária com o traçador ingeriu a dieta, e a mesma não foi compartilhada com as demais operárias do grupo, confirmado pela baixa frequência de operárias marcadas com o corante traçador (Tabela 2). Os resultados diferem de estudos que observaram trofalaxia em formigas cortadeiras *Acromyrmex* (Moreira et al., 2015, 2010, 2007b, 2007a, 2006; Richard e Errard, 2009). No entanto, o comportamento da trofalaxia oral não foi observado durante a avaliação do repertório comportamental de *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Forel) (Camargo et al., 2007) e de *A. sexdens* (Moreira et al., 2007a; Schneider, 2003).

Essa contradição de observações e relatos é recorrente em estudos envolvendo a trofalaxia em espécies de formigas cortadeiras, provavelmente devido à ausência ou baixa frequência desse comportamento. Isso é evidenciado pela baixa ocorrência de trofalaxia, sendo de 13% para dieta líquida e 3% para dieta semissólida, mesmo utilizando as diferentes condições experimentais desta pesquisa, como um grupo de duas operárias observada por 1h (Moreira et al., 2015).

Porém, levando-se em consideração o hábito alimentar das operárias, sabe-se que elas se alimentam da parte líquida do fungo e ingerem seiva durante o corte das folhas (Bass e Cherrett, 1995; De Fine Licht et al., 2014, 2013, Littledyke e Cherrett, 1976, 1975; Quinlan e Cherrett, 1979; Rytter e Shik, 2016; Schneider, 2003; Silva et

al., 2003). Assim, o fungo simbiote supre parcialmente suas necessidades nutricionais, principalmente quanto ao fornecimento de proteínas, mas elas assimilam nutrientes ingeridos fora do ninho – carboidratos, como a glicose – que são armazenados no gáster (Shik et al., 2018). Para a assimilação de nutrientes durante a digestão dos alimentos, há maior nível de atividade enzimática no sistema alimentar das operárias, principalmente a α -glucosidase, e altos níveis dessa enzima indicam sua importância na assimilação da glicose, encontrada no material vegetal (Erthal et al., 2004). Assim, a ingestão de seiva durante o forrageamento de material vegetal indica que o líquido ingerido pelas operárias é para atender às suas necessidades nutricionais/energéticas e não para ser compartilhado com suas companheiras de ninho.

Os resultados para a taxa de ingestão de líquidos, por sua vez, corroboram com estudos anteriores, nos quais a taxa de ingestão de *A. sexdens* é em média $0,6 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ (Paul e Roces, 2003). No entanto, a taxa de ingestão está relacionada à técnica de alimentação, viscosidade da solução e hábito alimentar; pois à medida que a concentração de sacarose aumenta ($> 30\%$), as taxas de ingestão diminuem (Paul e Roces, 2003). As formigas que raramente se alimentam de fontes líquidas não dependem de altas taxas de ingestão de líquidos para melhorar seu desempenho de forrageamento, embora as formigas cortadeiras, como *A. sexdens*, ingerem pequenas quantidades de seiva durante o corte das folhas, e o corte demora mais do que ingerir seiva, elas não precisam ingeri-la rapidamente (Paul e Roces, 2003).

Considerando que, após a ingestão, as operárias armazenam alimento no papo e pode ser compartilhado com as companheiras de ninho, a dieta líquida é determinada por: existência de trofalaxia associada ao armazenamento de líquido coletado durante o forrageamento e existência de um papo bem desenvolvido que

pode transportar alimentos líquidos (Eisner, 1957). Embora as cortadeiras de folhas ingiram uma pequena quantidade de seiva (Littledyke e Cherrett, 1976), essa taxa de ingestão de líquido em *A. sexdens* é considerada baixa, cerca de dez vezes menor do que a de formigas que coletam alimento fluído, como *C. rufipes* (Paul e Roces, 2003). Apesar de as operárias de *A. sexdens* e *C. rufipes* ingerirem alimentos fluídos e possuírem papo capaz de armazenar líquidos, o papo é menos desenvolvido no gênero *Atta* (Caetano, 1984; Paul e Roces, 2003).

Além de possuírem um papo menos desenvolvido, as formigas cortadeiras têm maior probabilidade de transportarem líquidos no ventrículo e reto do que no papo; quando as operárias deixam o ninho para forragear, seus órgãos estão cheios e voltam vazios, com o reto mais cheio que o ventrículo, indicando baixo potencial de transporte para compartilhar alimentos com as companheiras de ninho, uma vez que a digestão é unidirecional após o material passar pelo proventrículo (Rytter e Shik, 2016). Durante o forrageamento, as formigas absorvem o líquido presente no ventrículo e transferem os resíduos para o reto, ou seja, o fungo fornece energia para as operárias forragearem, e o líquido armazenado é utilizado para atender suas necessidades energéticas durante a atividade (Rytter e Shik, 2016). Isso evidencia que é pouco provável que as operárias realizem a trofalaxia (Andrade et al., 2002; Rytter e Shik, 2016), ou talvez isso não ocorra em formigas cortadeiras (Andrade et al., 2002), sugerindo que o líquido ingerido seja para atender às suas necessidades nutricionais (Rytter e Shik, 2016; Shik et al., 2018).

Quanto aos comportamentos observados, contato com o fungo, cuidado com as larvas, cuidado com as pupas e “self-grooming” foram os mais frequentes em todos os grupos, havendo maior interação entre as operárias à medida que os grupos aumentavam de tamanho (Figuras 3 e 4). Os cuidados com a prole (larvas e pupas)

são frequentes em colônias de formigas cortadeiras, conforme observado nas Figuras 3 e 4; embora não quantificados individualmente, os comportamentos mais envolvidos foram lambar e tocar com as antenas. No cuidado com as larvas, o ato de lambar é o mais frequente (Lopes et al., 2005; Schneider, 2003) e é responsável por 10,6% de todos os comportamentos na colônia e 37,4% dos cuidados com a prole (Schneider, 2003).

Ao lambar as larvas, as operárias consomem os líquidos expelidos pela cavidade bucal e anal, além de estimularem a excreção ao tocar com suas antenas, a cabeça e o abdômen das larvas (Wilson, 1976). Quando ingeridas pelas operárias adultas, as secreções das glândulas labiais regurgitadas pelas larvas complementam suas necessidades digestivas (Hölldobler e Wilson, 1990). Além disso, lambar as larvas pode ser um meio de as operárias buscarem informações e protegê-las contra doenças, garantindo que os micro-organismos sejam removidos de suas cutículas, uma vez que as larvas são incapazes de se limparem e não possuem glândulas metapleurais, labiais e mandibulares que secretam substâncias antibióticas (Hughes et al., 2002; Kermarrec et al., 1986; Lopes et al., 2005; North et al., 1997; Poulsen et al., 2002). O cuidado com as pupas é menos frequente em comparação com o cuidado com as larvas; provavelmente, as pupas não precisam de tantos cuidados, como limpeza, uma vez que nesta fase as formigas não se alimentam e, portanto, têm menos chances de serem contaminadas (Schneider, 2003).

O comportamento de limpeza é frequente em insetos sociais e extremamente importante porque, por meio do “allogrooming” e “self-grooming”, as operárias removem organismos patogênicos que podem ser prejudiciais à colônia, que estão presentes na superfície de seus corpos e em suas companheiras de ninho (Wilson, 1971). Esse comportamento de limpeza é importante para passar o odor às

companheiras de ninho, para reconhecê-las, para se protegerem e protegerem o fungo simbiote contra a propagação de micro-organismos, para transferir substâncias entre operárias e dispersarem substâncias entre formigas cortadeiras (Camargo et al., 2017a, 2006; Lopes et al., 2017; Meskali et al., 1995; Morelos-Juárez et al., 2010). Portanto, quando as operárias entram em contato com substâncias, isso reflete no aumento da frequência de comportamentos, como o contato entre operárias e de limpeza, “self-grooming” e “allogrooming” (Camargo et al., 2017a). Assim, o comportamento de limpeza é frequente entre as operárias, bem como em relação a prole.

A ingestão de líquido pelas operárias de *A. sexdens* não leva à trofalaxia dentro do ninho, apenas supre as necessidades individuais das forrageiras. Este estudo tem implicações práticas no controle químico de formigas cortadeiras e nas rotas de contaminação de operárias com iscas tóxicas em sistemas agrícolas, uma vez que o líquido ingerido pelas operárias não seria para realizar trofalaxia e esse comportamento não é um dos principais meios para a contaminação das mesmas com os ingredientes ativos. Vale ressaltar também a importância do estudo de comportamentos dentro das colônias de espécies de interesse econômico, como as formigas cortadeiras.

Agradecimentos: Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brasil), Código de Financiamento 001; e Luiz Carlos Forti foi beneficiário do Conselho Nacional da Ciência e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (301-938 / 2017-2). À Aline de Amorim Costa da Silva pelo desenho da formiga cortadeira da figura 5 e ao Flávio Roces pelas considerações realizadas ao manuscrito.

Declaração de contribuição dos autores: Gabriela Christal Catalani, Roberto da Silva Camargo e Luiz Carlos Forti planejaram, projetaram e executaram os experimentos. Gabriela Christal Catalani, Roberto da Silva Camargo, Carlos Alberto Oliveira Matos e Luiz Carlos Forti realizaram a análise dos dados. Gabriela Christal Catalani, Roberto da Silva Camargo, Kátia Kaelly Andrade Sousa, Carlos Alberto Oliveira Matos, Nadia Caldato, Nilson Satoru Nagamoto e Luiz Carlos Forti escreveram o manuscrito.

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* 40, 293–306.
- Bass, M., Cherrett, J.M., 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entomol.* 20, 1–6.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1995.tb00793.x>
- Bretz, F., Hothorn, T., Westfall, P., 2010. Multiple comparisons using R. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton.
- Caetano, F.H., 1984. Morfologia comparada do trato digestivo de formigas da subfamília Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae). *Pap. Avulsos Zool.* 35, 257–305.
- Camargo, R.S., Lopes, J.F.S., Forti, L.C., 2013. O jardim de fungo atua como um molde para a construção das câmaras em formigas cortadeiras? *Ciência Rural* 565–570.
- Camargo, R.S., Forti, L.C., 2015. What is the stimulus for the excavation of fungus chamber in leaf-cutting ants? *Acta Ethol.* 18, 31–35.
<https://doi.org/10.1007/s10211-014-0181-9>
- Camargo, R.S., Forti, L.C., Lopes, J.F.S., Andrade, A.P.P., Ottati, A.L.T., 2007. Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel,

- 1911 (Hym., Formicidae). J. Appl. Entomol. 131, 139–145.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01129.x>
- Camargo, R.S., Forti, L.C., Lopes, J.F.S., Andrade, A.P.P., Raetano, C.G.,
 Mendonça, C.G., 2006. The role of workers in transferring queen substances
 and the differences between worker castes in the leaf-cutting ant, *Acromyrmex*
subterraneus brunneus (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology 48, 503–513.
- Camargo, R.S., Puccini, C., Forti, L., Matos, C., 2017a. Allogrooming, Self-Grooming,
 and Touching Behavior: Contamination Routes of Leaf-Cutting Ant Workers
 Using a Fat-Soluble Tracer Dye. Insects 8, 59.
<https://doi.org/10.3390/insects8020059>
- Camargo, R.S., Puccini, C., Forti, L.C., de Matos, C.A.O., 2017b. Behaviors in
 Fungus Garden Cultivation: Routes of Contamination of Leaf Cutting Ant
 Workers with Fat-Soluble Tracer Dye. International Journal of Agriculture
 Innovations and Research 5, 555-560.
- Cordeiro, G.M., Demétrio, C.G.B., 2008. Modelos lineares generalizados e
 extensões. Sao Paulo 33.
- Da Silva, A.C., Navas, C.A., Ribeiro, P.L., 2009. Trophallaxis in dehydrated leaf
 cutting colonies of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae).
 Sociobiology 54, 109–114.
- De Fine Licht, H.H., Boomsma, J.J., Tunlid, A., 2014. Symbiotic adaptations in the
 fungal cultivar of leaf-cutting ants. Nat. Commun. 5, 5675.
<https://doi.org/10.1038/ncomms6675>
- De Fine Licht, H.H., Schiøtt, M., Mueller, U.G., Boomsma, J.J., 2010. Evolutionary
 transitions in enzyme activity of ant fungus gardens. Evolution (N. Y). 64, 2055–
 2069. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00948.x>
- De Fine Licht, H.H., Schiøtt, M., Rogowska-Wrzesinska, A., Nygaard, S., Roepstorff,
 P., Boomsma, J.J., 2013. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance
 between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci.
 110, 583–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212709110>
- Echols, H.W., 1966. Assimilation and transfer of mirex in colonies of Texas leaf-
 cutting ants. J. Econ. Entomol. 59, 1336–1338.
<https://doi.org/10.1093/jee/59.6.1336>
- Eisner, T., 1957. A comparative morphological study of the proventriculus of ants
 (Hymenoptera: Formicidae).

- Erthal, M., Peres Silva, C., Ian Samuels, R., 2004. Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *J. Insect Physiol.* 50, 881–891. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.06.009>
- Garcia, I.P., Forti, L.C., Engel, V.L., De Andrade, A.P.P., Wilcken, C.F., 2003. Ecological interaction between *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and the vegetation of a mesophyll semideciduous forest fragment in Botucatu, SP, Brazil. *Sociobiology* 42, 265–283.
- Griffin, D.M., 1981. Water and microbial stress, in: Alexander, M. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, London, pp. 91–136.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 2010. *The leafcutter ants: civilization by instinct*. WW Norton & Company.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. *The ants*. Harvard University Press.
- Hughes, W.O.H., Eilenberg, J., Boomsma, J.J., 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 269, 1811–1819. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2113>
- Kermarrec, A., Febvay, G., Decharme, M., 1986. Protection of leaf-cutting ants from biohazards: is there a future for microbiological control?, in: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (Eds.), *Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management*. Westview Press, Boulder, pp. 339–356.
- Lewis, T., Pollard, G. V, Dibley, G.C., 1974. Rhythmic Foraging in the Leaf-Cutting Ant *Atta cephalotes* (L.) (Formicidae: Attini). *J. Anim. Ecol.* 43, 129–141. <https://doi.org/10.2307/3162>
- Lighton, J.R.B., Bartholomew, G.A., Feener, D.H., 1987. Energetics of Locomotion and Load Carriage and a Model of the Energy Cost of Foraging in the Leaf-Cutting Ant *Atta colombica* Guer. *Physiol. Zool.* 60, 524–537. <https://doi.org/10.1086/physzool.60.5.30156127>
- 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). *Bull. Entomol. Res.* 66, 205–207. <https://doi.org/10.1017/S0007485300006647>
- Littledyke, M., Cherrett, J.M., 1975. Variability in the selection of substrate by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bull. Entomol. Res.* 65, 33–47.

<https://doi.org/10.1017/S0007485300005721>

- Lopes, J.F.S., da Silva Camargo, R., Forti, L.C., Hughes, W.O.H., 2017. The trade-off between the transmission of chemical cues and parasites: behavioral interactions between leaf-cutting ant workers of different age classes. *Rev. Bras. Entomol.* 61, 69–73.
- Lopes, J.F.S., Hughes, W.O.H., Camargo, R.S., Forti, L.C., 2005. Larval isolation and brood care in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Insectes Soc.* 52, 333–338.
<https://doi.org/10.1007/s00040-005-0816-y>
- Martin, P., Bateson, P., 1986. Measuring behaviour: an introductory guide. Cambridge University Press, New York.
- Meskali, M., Bonavita-Cougourdan, A., Provost, E., Bagnères, A.-G., Dusticier, G., Clément, J.-L., 1995. Mechanism underlying cuticular hydrocarbon homogeneity in the ant *Camponotus vagus* (SCOP.) (Hymenoptera: Formicidae): Role of postpharyngeal glands. *J. Chem. Ecol.* 21, 1127–1148.
<https://doi.org/10.1007/BF02228316>
- Moreira, D.D.O., Bailez, A.M.V., Erthal, M., Bailez, O., Carrera, M.P., Samuels, R.I., 2010. Resource allocation among worker castes of the leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* through trophallaxis. *J. Insect Physiol.* 56, 1665–1670.
- Moreira, D.D.O., Dattilo, W., Morais, V., Erthal, M., Silva, C.P., Samuels, R.I., 2015. Diet type modifies ingestion rates and trophallactic exchanges in leaf-cutting ants. *Entomol. Exp. Appl.* 154, 45–52.
- Moreira, D.D.O., Erthal, M., Carrera, M.P., Silva, C.P., Samuels, R.I., 2006. Oral trophallaxis in adult leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Soc.* 53, 345–348.
- Moreira, D.D.O., Viana-Bailez, A.M., Erthal Junior, M., Bailez, O., Samuels, R.I., 2007a. Trophallaxis oral em sete espécies de Attini. *Biológico* 69, 403–404.
- Moreira, D.D.O., Viana-Bailez, A.M., Ferreira, F.F., Erthal Junior, M., Carrera, F., Samuels, R.I., 2007b. Trophallaxis oral entre operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, Forel 1893 (Formicidae: Attini) em mini-formigueiros. *Biológico* 69, 300–402.
- Morelos-Juárez, C., Walker, T.N., Lopes, J.F.S., Hughes, W.O.H., 2010. Ant farmers practice proactive personal hygiene to protect their fungus crop. *Curr. Biol.* 20, R553–R554.

- Mueller, U.G., Kardish, M.R., Ishak, H.D., Wright, A.M., Solomon, S.E., Bruschi, S.M., Carlson, A.L., Bacci Jr, M., 2018. Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. *Mol. Ecol.*
<https://doi.org/10.1111/mec.14588>
- North, R.D., Jackson, C.W., Howse, P.E., 1997. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Trends Ecol. Evol.* 12, 386–389.
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)87381-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)87381-8)
- Pardo, E., Marín, S., Solsona, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2004. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiol.* 21, 267–274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.09.001>
- Paul, J., Roces, F., 2003. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. *J. Insect Physiol.* 49, 347–357.
- Poulsen, M., Bot, A.N.M., Nielsen, M.G., Boomsma, J.J., 2002. Costs and benefits of a general antibiotic defence mechanism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 52, 151–157.
- Quinlan, R.J., Cherrett, J.M., 1979. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecol. Entomol.* 4, 151–160.
- Richard, F.-J., Errard, C., 2009. Hygienic behavior, liquid-foraging, and trophallaxis in the leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* and *Acromyrmex octospinosus*. *J. Insect Sci.* 9, 1–9.
- Roces, F., Lighten, J.R.B., 1995. Larger bites of leaf-cutting ants. *Nature* 373, 392.
<https://doi.org/10.1038/373392a0>
- Rytter, W., Shik, J.Z., 2016. Liquid foraging behaviour in leafcutting ants: the lunchbox hypothesis. *Anim. Behav.* 117, 179–186.
- Schilman, P.E., Roces, F., 2008. Haemolymph sugar levels in a nectar-feeding ant: dependence on metabolic expenditure and carbohydrate deprivation. *J. Comp. Physiol. B* 178, 157–165. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0207-y>
- Schneider, M. de O., 2003. Comportamento de cuidado da prole da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). Universidade Estadual Paulista.
- Shik, J.Z., Rytter, W., Arnan, X., Michelsen, A., 2018. Disentangling nutritional pathways linking leafcutter ants and their co-evolved fungal symbionts using

- stable isotopes. *Ecology* 99, 1999–2009. <https://doi.org/10.1002/ecy.2431>
- Silva, A., Bacci Jr, M., de Siqueira, C.G., Bueno, O.C., Pagnocca, F.C., Hebling, M.J.A., 2003. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *J. Insect Physiol.* 49, 307–313.
- Weber, N.A., 1972. The fungus-culturing behavior of ants. *Am. Zool.* 12, 577–587.
- Wilson, E.O., 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). II: The ergonomic optimization of leaf cutting. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 7, 157–165. <https://doi.org/10.1007/BF00299521>
- Wilson, E.O., 1976. *The Insect Societies*, 4th ed. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Wilson, E.O., 1971. *The Insect Societies*. Belknap Press, Harvard University, Cambridge.
- Wirth, R., Herz, H., Ryel, R.J., Beyschlag, W., Hölldobler, B., 2003. *Herbivory of Leaf-Cutting Ants: A Case Study on Atta colombica in the Tropical Rainforest of Panama*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-05259-4_1
- Wolf, A. V, Brown, M.G., Prentiss, P.G., 1984. Concentrative properties of aqueous solutions: conversion tables, in: West, R.C. (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Florida, pp. D223–D272.



Figura 1. Medidor de potencial de água WP4-T.

Fonte: <http://docplayer.com.br/88444555-Universidade-de-sao-paulo-escola-superior-de-agricultura-luiz-de-queiroz.html>

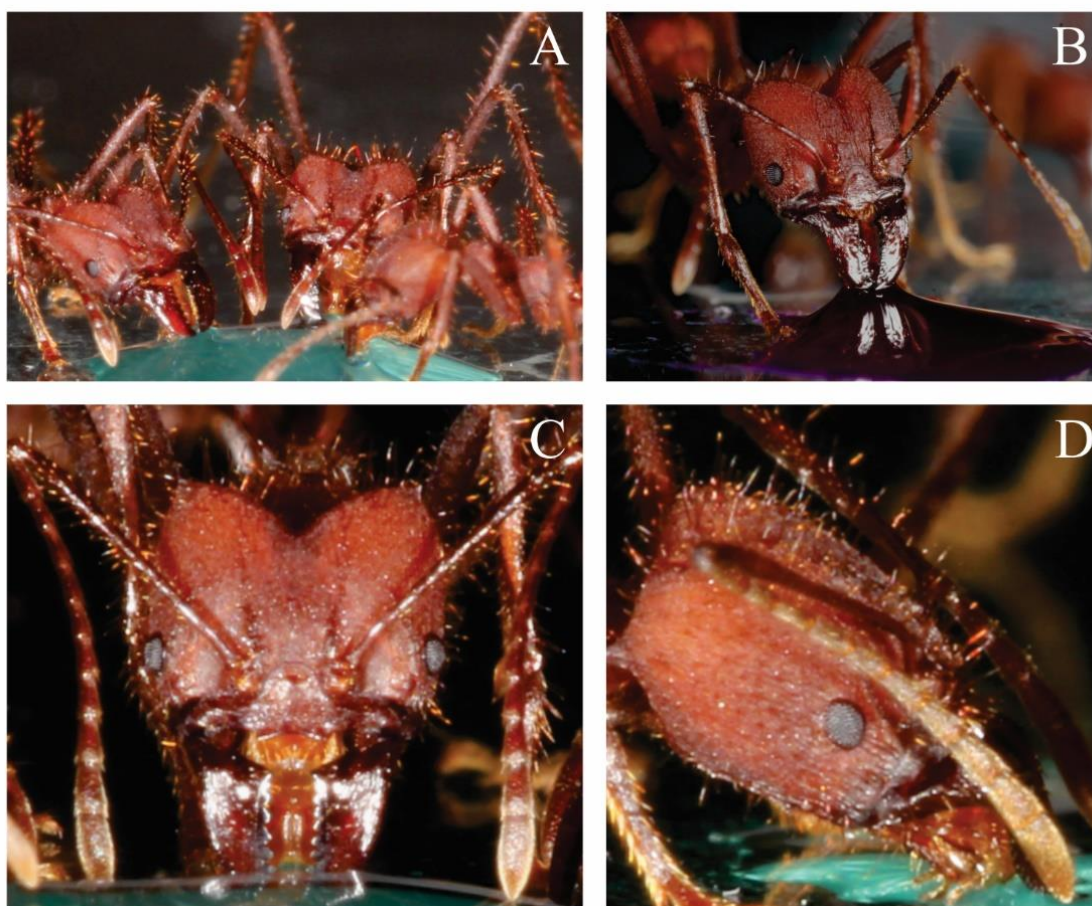


Figura 2. Forrageamento líquido em operárias formigas cortadeiras: A) grupo de operárias sugando solução; B) única forrageira sugando solução com rodamina; C e D) Detalhes da sucção das vistas frontal e lateral.

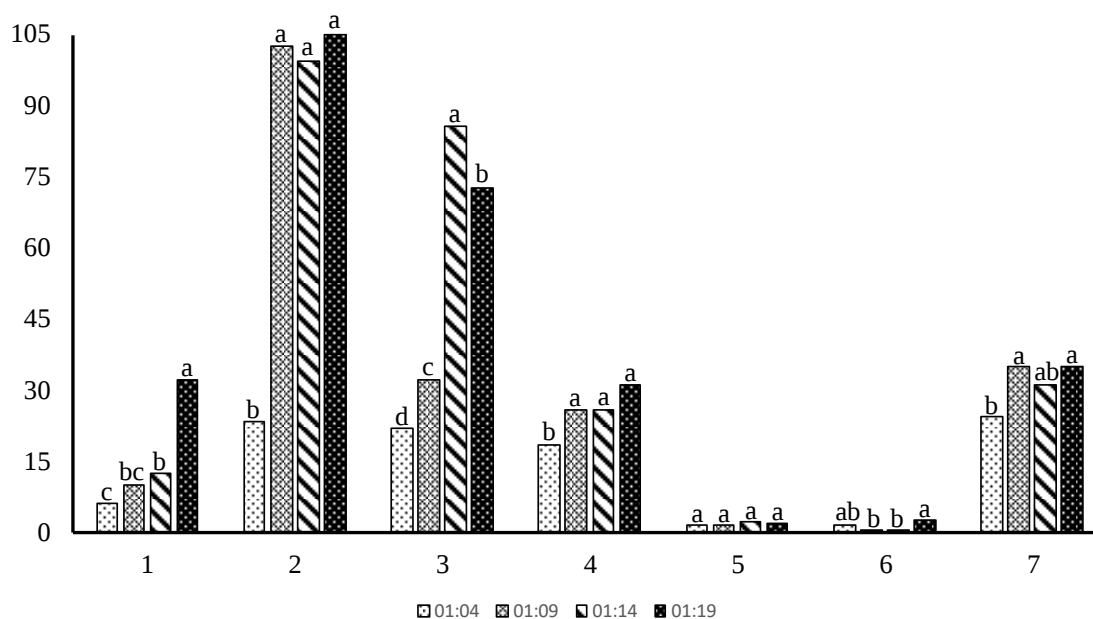


Figura 3. Frequência de atos comportamentais (número médio) realizados pelas operárias de *Atta sexdens*. Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Comportamentos: 1: "allogrooming", 2: contato com o fungo, 3: cuidado com as larvas, 4: cuidado com as pupas, 5: limpeza da operária com traçador por outras, 6: operárias com traçador limpando operárias, 7: "self-grooming".

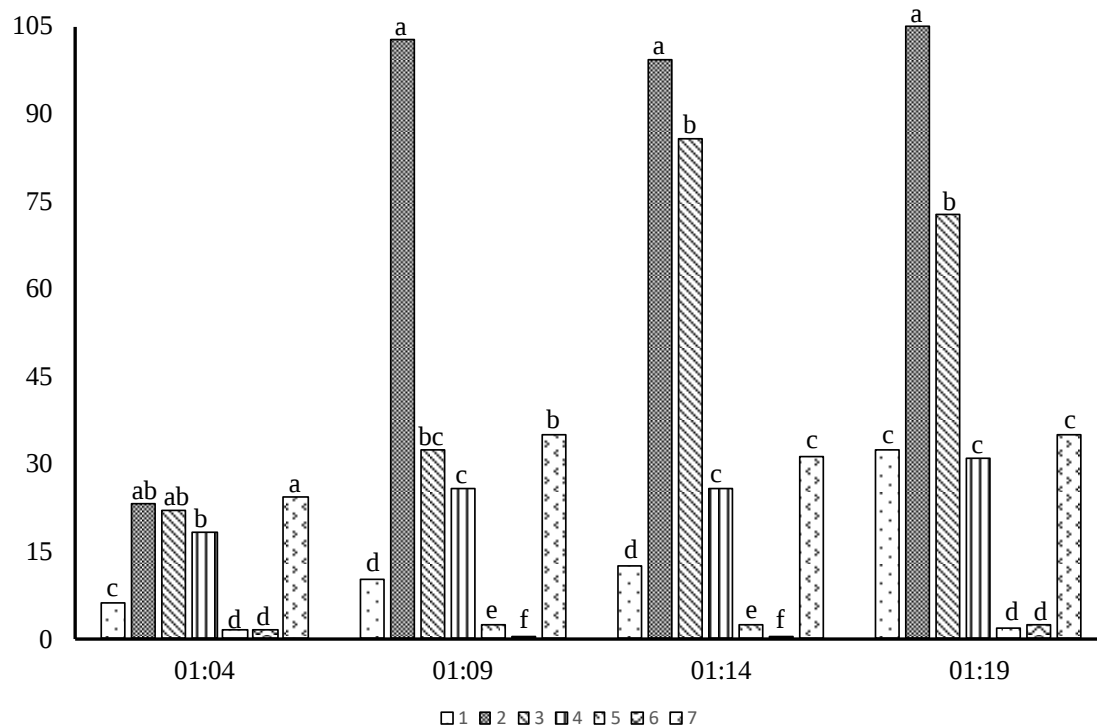


Figura 4. Frequência de atos comportamentais (número médio) realizados pelas operárias de *Atta sexdens*. Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. As barras referem-se a comportamentos realizados pelas operárias: 1: “allogrooming”, 2: contato com o fungo, 3: cuidado com as larvas, 4: cuidado com as pupas, 5: limpeza da operária com traçador por outras, 6: operárias com traçador limpando operárias, 7: “self-grooming”.

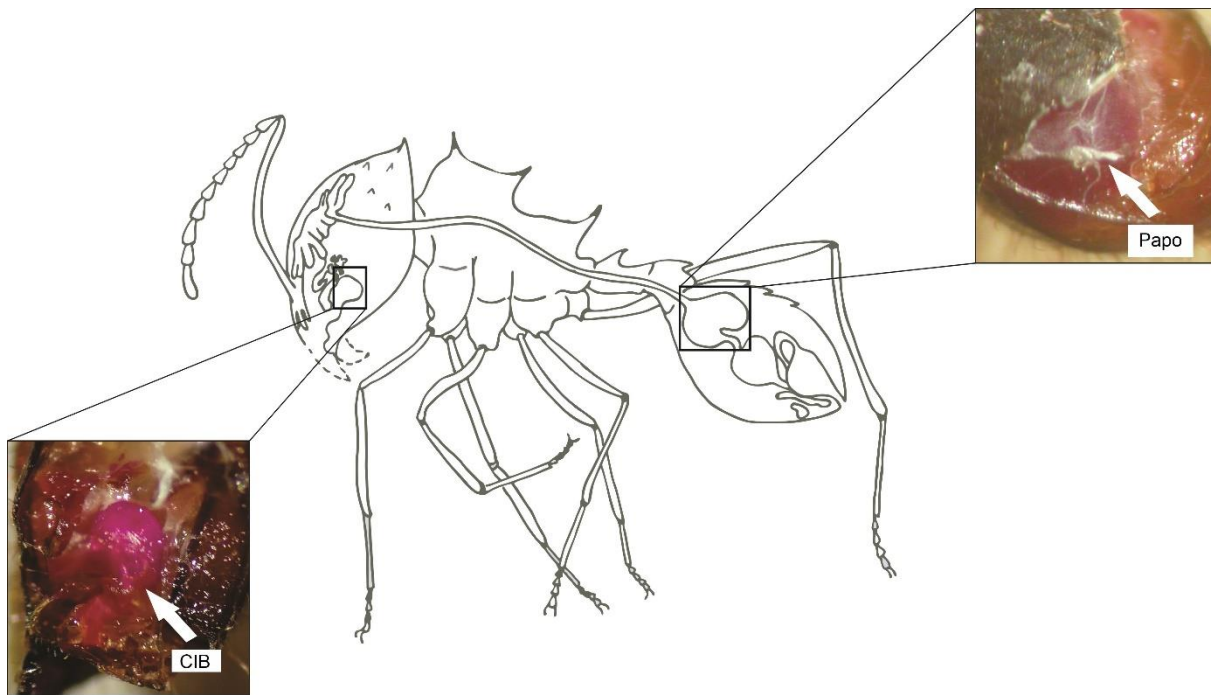


Figura 5. Ilustração e foto da cavidade infrabucal (CIB) e papo da operária de *Atta sexdens*.

Tabela 1. Taxa de ingestão de líquido para operárias de *Atta sexdens* por largura da cabeça.

Largura da cabeça (mm)	Massa antes da ingestão (mg)	Massa após a ingestão (mg)	Diferença de massa (mg)	Tempo de ingestão (min)	Taxa de ingestão esperada ($\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$)*	Taxa de ingestão observada ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Volume de solução ingerido**	χ^2
0.9	1.50	1.51	0.01	0.40	0.029	0.025	0.0094	0.001
0.9	1.28	1.29	0.01	0.55	0.029	0.018	0.0094	0.004
0.9	1.84	1.89	0.05	2.17	0.029	0.023	0.0470	0.001
1.0	2.03	2.05	0.02	0.57	0.047	0.035	0.0188	0.003
1.0	1.89	1.90	0.01	0.28	0.047	0.035	0.0094	0.003
1.1	2.21	2.24	0.03	0.52	0.065	0.058	0.0282	0.001
1.1	2.45	2.46	0.01	0.13	0.065	0.075	0.0094	0.001
1.1	2.24	2.26	0.02	0.30	0.065	0.067	0.0188	0.000
1.1	2.48	2.50	0.02	0.23	0.065	0.086	0.0188	0.007
1.2	2.94	2.96	0.02	0.20	0.083	0.100	0.0188	0.003
1.2	2.54	2.58	0.04	0.78	0.083	0.051	0.0376	0.012
1.2	2.76	2.78	0.02	0.27	0.083	0.075	0.0188	0.001
1.2	2.67	2.68	0.01	0.13	0.083	0.075	0.0094	0.001
1.2	2.69	2.71	0.02	0.25	0.083	0.080	0.0188	0.000
1.2	3.11	3.23	0.12	1.88	0.083	0.064	0.1128	0.005
1.3	3.63	3.76	0.13	1.37	0.101	0.095	0.1222	0.000
1.3	3.93	3.95	0.02	0.18	0.101	0.109	0.0188	0.001
1.3	3.50	3.51	0.01	0.13	0.101	0.075	0.0094	0.007
1.3	3.29	3.38	0.09	0.98	0.101	0.092	0.0846	0.001
1.3	3.19	3.25	0.06	0.98	0.101	0.061	0.0564	0.016
1.4	4.19	4.20	0.01	0.10	0.119	0.100	0.0094	0.003
1.4	4.01	4.08	0.07	0.53	0.119	0.131	0.0658	0.001
1.4	4.69	4.70	0.01	0.10	0.119	0.100	0.0094	0.003

1.4	3.87	4.03	0.16	1.32	0.119	0.122	0.1504	0.000
1.5	5.11	5.13	0.02	0.20	0.137	0.100	0.0188	0.010
1.5	5.17	5.30	0.13	0.87	0.155	0.150	0.1222	0.000
1.5	5.31	5.34	0.03	0.20	0.137	0.150	0.0282	0.001
1.5	5.27	5.31	0.04	0.27	0.137	0.150	0.0376	0.001
1.5	5.65	5.66	0.01	0.08	0.137	0.120	0.0094	0.002
1.5	5.24	5.26	0.02	0.13	0.137	0.150	0.0188	0.001
1.6	5.88	5.93	0.05	0.35	0.173	0.143	0.0470	0.005
1.6	5.80	5.82	0.02	0.20	0.173	0.100	0.0188	0.031
1.6	5.92	6.15	0.23	1.37	0.173	0.168	0.2163	0.000
1.6	5.98	6.18	0.20	1.02	0.173	0.197	0.1881	0.003
1.7	6.36	6.39	0.03	0.17	0.191	0.180	0.0282	0.001
1.8	6.97	6.98	0.01	0.05	0.209	0.200	0.0094	0.000
1.8	6.78	6.88	0.10	0.55	0.209	0.182	0.0940	0.003
1.8	7.02	7.23	0.21	1.08	0.209	0.194	0.1975	0.001
1.8	6.96	7.24	0.28	1.80	0.209	0.156	0.2633	0.013
1.8	7.92	7.95	0.03	0.13	0.209	0.225	0.0282	0.001
1.9	8.66	8.71	0.05	0.27	0.226	0.188	0.0470	0.007
2.0	8.94	9.17	0.23	1.33	0.244	0.173	0.2163	0.021
2.0	10.43	10.44	0.01	0.03	0.244	0.300	0.0094	0.013
2.3	11.91	11.93	0.02	0.08	0.298	0.240	0.0188	0.011
2.3	12.68	12.79	0.11	0.58	0.298	0.189	0.1034	0.040
								0.242

* Valores esperados, conforme Paul & Roces (2003), aplicando esta fórmula: taxa de ingestão = - 0,150 + 0,197 * largura da cabeça.

** Proveniente da tabela de densidade da solução por Wolf et al., (1984).

Tabela 2. Modelo de regressão logística para frequência de operárias com a cavidade infrabucal corada/operárias com a cavidade infrabucal não corada.

Coefficients	Estimate	Std. Error	Z value	Pr (> z)
(Intercept)	-19.1441	1740.5481	-0.011	0.99122
01:09	-0.8380	0.3145	-2.664	0.00771
01:14	-1.5766	0.3430	-4.597	4.30e-06
01:19	-1.6889	0.3633	-4.648	3.35e-06

Tabela 3. Modelo de regressão logística para frequência de limpeza da operária com traçador por outras e frequência de operária com traçador limpando outras operárias.

Coefficients	Estimate	Std. Error	Z value	Pr (> z)
(Intercept)	-3.307e-16	5.345e-01	0.000	1.0000
01:09	1.792e+00	9.322e-01	1.922	0.0546
01:14	2.398e+00	1.173e+00	2.044	0.0410
01:19	-2.877e-01	6.929e-01	-0.415	0.6780

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As formigas cortadeiras são insetos eusociais e cultivam seu fungo simbiote com diversas plantas cultivadas e que são de importância econômica. Visto que um dos principais métodos de controle é o químico com uso das iscas tóxicas, essas também são processadas com uma série de comportamentos e é nesse repertório comportamental que ocorre a contaminação das operárias pelos ingredientes ativos. Entretanto, é argumentado sobre a ocorrência da trofalaxia oral nas formigas cortadeiras e se esse comportamento pode contribuir para a dispersão dos ingredientes ativos na colônia. Por isso, é importante conhecer todos os comportamentos realizados pelas operárias, não só os de cultivo do fungo, para a utilização dos métodos de controle.

Assim, este estudo verificou que os atos comportamentais são os principais meios de contaminação das operárias pelos ingredientes ativos, evidenciando a importância dos comportamentos de contato direto e indireto com as iscas para a contaminação. E ainda que os fragmentos dos pellets são distribuídos aleatoriamente no jardim de fungo, independente do ingrediente ativo utilizado, e é influenciado pelo modo de ação que cada ativo atua na colônia; entretanto, é ideal que as operárias realizem o processamento completo dos pellets, pois permite que um maior número de operárias tenha contato com o inseticida. E por fim, que as operárias ingerem líquido quando fornecidas com uma fonte líquida, dentro do ninho realizam diversos comportamentos, mas não ocorreu nenhuma troca alimentar nas 8h avaliadas, ou seja, a ingestão de líquido pelas operárias é para suprir suas necessidades individuais, evidenciando que a trofalaxia não é uma rota de contaminação com os ingredientes ativos entre as operárias.

Dessa forma, este estudo confirma como ocorre a contaminação das formigas cortadeiras e a ausência de trofalaxia não compromete o mecanismo de contaminação por iscas porque a troca das substâncias químicas é garantida pelo processo de “grooming”. Apesar das operárias ingerirem substância líquida, essa ingestão não pode ser associada com futura ocorrência de trofalaxia, uma vez que esse comportamento depende do hábito alimentar da espécie que, conseqüentemente, tem o órgão de reserva desenvolvido, ou seja, o comportamento é para alimentar a colônia. Portanto não é um comportamento que dispersa ingrediente ativo nas colônias de

formigas cortadeiras. Contudo, ressalta a importância de estudos comportamentais complementares que tem implicações práticas no controle das formigas cortadeiras.

CONCLUSÕES

A contaminação das operárias pelos ingredientes ativos ocorre durante os atos comportamentais realizados pelas mesmas para o cultivo do fungo simbiote e com os comportamentos indiretos: “self-grooming” e “allogrooming”.

O modo de ação dos ingredientes ativos, nas concentrações de sulfluramida e indoxacarbe estudadas, influencia a quantidade de fragmentos incorporados no jardim de fungo.

O forrageamento líquido realizado pelas operárias não implica na ocorrência de trofalaxia oral.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. P. P. et al. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, v. 40, n. 2, p. 293-306, 2002.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1995. doi.org/10.1111/j.1365-3032.1995.tb00793.x
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BOLTON, B. 2017. **An online catalog of the ants of the world**. Disponível em: <<http://antcat.org>>. Acesso em: 25 out 2017.
- BOLTON B. et al. **Bolton's catalogue of the ants of the world: 1758–2005**. Cambridge: Harvard University Press, 2007.
- BRITTO, J. S. et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v. 3, p. 11-92, 2016.
- CAMARGO, R. S. et al. Allogrooming, self-grooming, and touching behavior: contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 59, 2017. doi.org/10.3390/insects8020059
- CAMARGO, R. S. et al. Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 131, n. 2, p. 139-145, 2007. doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01129.x
- CRISTIANO, M. P. et al. *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. **Austral Entomology**, v. 59, n. 4, 643-676, 2020. doi.org/10.1111/aen.12493
- DA SILVA, A. C.; NAVAS, C. A.; RIBEIRO, P. L. Trophallaxis in dehydrated leaf cutting colonies of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 54, n. 1, p. 109-114, 2009.
- DELABIE, J. H. C.; OSPINA, M.; ZABALA, G. Relaciones entre hormigas y plantas: una introducción. In: Fernández, F (ed.). **Introducción a las hormigas de la Región Neotropical**. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003, p.167-180.
- DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas-cortadeiras**. Viçosa: UFV, 1993. 263 p.
- DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-Cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: UFV, 2011. 419 p.

DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Substrate preparation behaviors for the cultivation of the symbiotic fungus in leaf-cutting ants of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 53, n. 3, p. 651-666, 2009.

ECHOLS, H. W. Assimilation and transfer of mirex in colonies of Texas leaf-cutting ants. **Journal of Economic Entomology**, v. 59, n. 6, p. 1336-1338, 1966.
doi.org/10.1093/jee/59.6.1336

FORTI, L. C. et al. Trofalaxia entre operárias-operárias e operárias-larvas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). Resumos do 14º Congresso Brasileiro de Entomologia, Piracicaba, SP. **Anais...Piracicaba**: 1993.

FORTI, L. C. et al. Eficiência de sulfluramida, fipronil y clorpirifos como sebos en el control de *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera: Formicidae). **Pasturas Tropicales**, v. 25, n. 3, p. 28-35, 2003.

FORTI, L. C. et al. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 50, n. 3, p. 1149-1164, 2007.

FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P.; RAMOS, V. M. Biologia e comportamento de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae): implicações no seu controle. **Série Técnica IPEF**, v. 13, p. 103-114, 2000.

FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C. **Formigas Cortadeiras - Biologia, ecologia, danos e controle**. Botucatu: 1997, 61 p.

FOWLER, H. G. et al. Ecologia Nutricional de Formigas. In: PANIZZU, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. p. 131-223.

GARCIA, I. P. et al. Ecological interaction between *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and the vegetation of a mesophyll semideciduous forest fragment in Botucatu, SP, Brazil. **Sociobiology**, v. 42, n. 2, p. 265-283, 2003.

GARRETT, R. W. et al. Leaf processing behaviour in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 1, p. 150111, 2016.
doi.org/10.1098/rsos.150111

GLANCEY, B. M. et al. Filtration of microparticles from liquids ingested by the red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren. **Insectes Sociaux**, v. 28, n. 4, p. 395-401, 1981. doi.org/10.1007/BF02224196

GONÇALVES, C. R. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). **Studia Entomologica**, v. 4, n. 1-4, p. 113-180, 1961.

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich)

(Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, v. 66, n. 2, p. 205-217, 1976. doi.org/10.1017/S0007485300006647

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Variability in the selection of substrate by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, v. 65, n. 1, p. 33-47, 1975. doi.org/10.1017/S0007485300005721

MATHIESON, M.; TOFT, R.; LESTER, P. J. Influence of toxic bait type and starvation on worker and queen mortality in laboratory colonies of Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of economic entomology**, v. 105, n. 4, p. 1139-1144, 2012. doi.org/10.1603/EC12102

MOREIRA, D. D. O. et al. Oral trophallaxis in adult leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes sociaux**, v. 53, n. 3, p. 345-348, 2006. doi.org/10.1007/s00040-006-0879-4

MOREIRA, D. D. O. et al. Trofalaxia oral entre operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, Forel 1893 (Formicidae: Attini) em mini-formigueiros. **Biológico, São Paulo**, v. 69, n. suplemento 2, p. 300-402, 2007a.

MOREIRA, D. D. O. et al. Trofalaxia Oral Em Sete Espécies De Attini. **Biológico, São Paulo**, v. 69, n. suplemento 2, p. 403-404, 2007b.

MOREIRA, D. D. O. et al. Resource allocation among worker castes of the leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* through trophallaxis. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 11, p. 1665-1670, 2010. doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.06.018

MOREIRA, D. D. O. et al. Diet type modifies ingestion rates and trophallactic exchanges in leaf-cutting ants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 154, n. 1, p. 45-52, 2015. doi.org/10.1111/eea.12254

MUELLER, U. G. et al. Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 10, 2414–2434, 2018. doi.org/10.1111/mec.14588.

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

NYAMUKONDIWA, C.; ADDISON, P. Preference of foraging ants (Hymenoptera: Formicidae) for bait toxicants in South African vineyards. **Crop Protection**, v. 30, n. 8, p. 1034-1038, 2011. doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.014

PAUL, J.; ROCES, F. Fluid intake rates in ants correlate with their feeding habits. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 4, p. 347-357, 2003. [doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00019-2)

PEREGRINE, D. J.; CHERRETT, J. M. A field comparison of the modes of action of aldrin and mirex for controlling colonies of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, v. 63, n. 4, p. 609-618, 1974. doi.org/10.1017/S0007485300047842

PEREGRINE, D. J.; CHERRETT, J. M. Toxicant spread in laboratory colonies of the leaf-cutting ant. **Annals of Applied Biology**, v. 84, n. 1, p. 128-133, 1976. doi.org/10.1111/j.1744-7348.1976.tb01742.x

PEREGRINE, D. J.; MUDD, A. The effects of diet on the composition of the post-pharyngeal glands of *Acromyrmex octospinosus* (Reich). **Insectes Sociaux**, v. 21, n. 4, p. 417-423, 1974. doi.org/10.1007/BF02331569

PRETTO, D. R. **Arquitetura dos túneis de forrageamento e do ninho de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (Hymenoptera: Formicidae), dispersão de substrato e dinâmica do inseticida na colônia**. 1996. 110 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1996.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym., Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 25, n. 3, p. 237-245, 1978. doi.org/10.1007/BF02224744

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, v. 4, n. 2, p. 151-160, 1979. doi.org/10.1111/j.1365-2311.1979.tb00570.x

RICHARD, F. J.; ERRARD, C. Hygienic behavior, liquid-foraging, and trophallaxis in the leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* and *Acromyrmex octospinosus*. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2009. doi.org/10.1673/031.009.6301

RYTTER, W., SHIK, J. Z. Liquid foraging behaviour in leafcutting ants: the lunchbox hypothesis. **Animal Behaviour**, v. 117, p. 179-186, 2016. doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.04.022

SCHNEIDER, M. O. **Comportamento de cuidado da prole da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae)**. 2003. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2003.

SCHILMAN, P. E.; ROCES, F. Haemolymph sugar levels in a nectar-feeding ant: dependence on metabolic expenditure and carbohydrate deprivation. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 178, p. 157-165, 2008. doi.org/10.1007/s00360-007-0207-y

SILVA, L. C. et al. Do *Atta sexdens rubropilosa* workers prepare leaves and bait pellets in similar ways to their symbiotic fungus? **Sociobiology**, v. 62, n. 4, p. 484-493, 2015. DOI: 10.13102/sociobiology.v62i4.772

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 4, p. 307-313, 2003. [doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00004-0)

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, v. 12, n. 3, p. 577-587, 1972.

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

WIRTH, R. et al. **Herbivory of Leaf-Cutting Ants: A Case Study on *Atta colombica* in the Tropical Rainforest of Panama**. Heidelberg: Springer, v. 164. doi.org/10.1007/978-3-662-05259-4_1