UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DA POLPA CÍTRICA, DO ÓLEO E DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA ATRATIVIDADE DE ISCAS TÓXICAS À *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae).

AMANDA APARECIDA CARLOS

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

BOTUCATU-SP
Novembro – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DA POLPA CÍTRICA, DO ÓLEO E DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA ATRATIVIDADE DE ISCAS TÓXICAS À *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)

AMANDA APARECIDA CARLOS
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Forti

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP
Novembro – 2008

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

Carlos, Amanda Aparecida, 1980-
C2841 Influência da polpa cítrica, do óleo de fungos filamentosos na atratividade de iscas tóxicas à *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera,Formicidae) / Amanda Aparecida Carlos. - Botucatu : [s.n.], 2008.
vi, 82 f.: il., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2008
Orientador: Luiz Carlos Forti
Inclui bibliografia

1. Formiga-cortadeira. 2. Formiga - Comportamento. 3. Iscas tóxicas. 4. Fungos filamentosos. I. Forti, Luiz Carlos. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"(Campus de Botucatu) Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: **INFLUÊNCIA DA POLPA CÍTRICA, DO ÓLEO E DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA ATRATIVIDADE DE ISCAS TÓXICAS A** *Atta sexdens rubropilosa* (*Hymenoptera, Formicidae*).

ALUNA: AMANDA APARECIDA CARLOS

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS FORTI

Aprovado pela Comissão Examinadora

PROF. DR. LUIZ CARLOS FORTI

PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN

PROFA. DRA. MARIA APARECIDA CASTELLANI

Data da Realização: 13 de novembro de 2008.

Ofereço

À José Eduardo e a minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me iluminar e dar coragem para continuar nos momentos mais difíceis;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Forti, pela oportunidade e orientação;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida;

À minha família por entender minha constante ausência;

Ao José Eduardo Bertini, por seu amor e eterno companheirismo;

Aos colegas de laboratório: Ana Paula Protti de Andrade Cruciol, Nádia Caldato, Sandra Regina Cardoso, Rafael Forti Barbieri, Ricardo Toshio Fujihara e Sinara Maria Moreira;

À Nilson Satoru Nagamoto e Juliane Lopes, principalmente, à Sandra Verza e Roberto Camargo, pela paciência, ensinamentos e exemplos de profissionalismo;

Aos meus colegas: André Rodrigues e Martha Maria Passador, obrigada por toda a ajuda e ensinamentos de vital importância para a realização deste trabalho;

Ao Prof. João Batista Fernandes e André Sárria pelo auxílio e ensinamentos nas análises químicas;

Ao Prof. Luciano Barbosa e Gilmar Perbiche Neves pelos tratamentos estatísticos;

Ao Davi, pela amizade e pela constante ajuda;

À Marco Antônio Sanches, Murilo Pimentel, Rafael Ferraz, Sandra Regina Cardoso e Thaise Dias pelo auxílio e companhia em campo;

Aos meus amigos: André, Anne Caroline, Beatriz, Carla, Carolina (Aftosa), Cremilda, Fernando (Xilike), Gabriela, Jéssica, Karolina, Karoline, Lílian, Marcelo (Pururuca), Maria, Márcia, Milena (Capitu), Murilo, Rachel, Rafael (Kiuwi) e Sandra (Cuida)... vocês são meus anjos da guarda;

À todos que direta ou indiretamente me auxiliaram nesse trabalho.

SUMÁRIO

Páginas

RESUMO.....01

SUMMARY.....03

INTRODUÇÃO.....05

CAPÍTULOS.....09

I SELETIVIDADE E PROCESSAMENTO DE DIFERENTES POLPAS CÍTRICAS POR OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* 09

1. Introdução.....10

2. Materiais e Métodos.....13

2.1 Atratividade em laboratório.....14

2.2 Atratividade em campo.....14

2.3 Preparação do substrato para o fungo simbionte.....14

2.4 Análises estatísticas.....15

3.Resultados.....15

4. Discussão.....16

5. Referências.....19

II SELEÇÃO DE DIFERENTES ÓLEOS DE SOJA PARA A FORMIGA CORTADEIRA A*tta sexdens rubropilosa* 30

1. Introdução.....31

2.1 Material e Métodos.....33

2.2 Análise de atratividade.....33

2.3 Análises químicas.....34

3. Resultados.....35

4. Discussão.....40

5. Referências.....43

III PRESENÇA DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM COLÔNIAS DE A*tta sexdens rubropilosa* APÓS O PROCESSAMENTO DE ISCAS TÓXICAS.....47

1. Introdução.....48

2. Material e Métodos.....50

3. Resultados.....52

4. Discussão.....53

5. Referências.....56

IV INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E UMIDADE NO CARREGAMENTO DE SUBSTRATOS POR OPERÁRIAS DE A*tta sexdens rubropilosa* 63

1. Introdução.....64

2. Material e Métodos.....66

2.1 Colônias estudadas.....66

2.2 Avaliação da presença fúngica em polpas cítricas.....66

2.3 Carregamento das iscas.....67

3. Resultados.....68

4. Discussão.....70

5. Referências.....72

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....76

6. CONCLUSÕES.....79

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....80

RESUMO

As espécies de formigas cortadeiras, tais como *Atta sexdens rubropilosa* são consideradas importantes pragas da agricultura e silvicultura brasileira, pois utilizam material vegetal como substrato para o cultivo de seu fungo simbionte. Assim, métodos de controle são necessários para conter esses danos, sendo o uso de iscas tóxicas um dos mais utilizados. Com base nisso, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a atratividade de iscas para as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Para isso, observou-se o carregamento de diferentes constituintes da isca, ou seja, distintas polpas cítricas e óleos de soja. Além disso, verificou-se também a influência de fungos filamentosos sobre as colônias. Para a análise de atratividade em laboratório ofertou-se o material na arena de forrageamento de forma aleatória e observou-se o carregamento. Foram realizados três bioensaios de atratividade: 1. Comparação de diferentes partes do fruto: mesocarpo, industrial, endocarpo e integral (em laboratório e campo); 2. Avaliação da seletividade de distintos óleos de soja: bruto degomado, semi refinado e refinado; 3. Avaliação da influência do fator umidade das iscas e presença de fungos, no carregamento das mesmas. Um quarto biosensaio foi realizado para avaliar a presença de fungos filamentosos nas colônias após o processamento de iscas tóxicas. Para as polpas cítricas, o endocarpo foi o substrato mais atrativo tanto em campo como em laboratório, quanto ao óleo de soja, o bruto degomado foi o mais

carregado e a presença de fungos filamentosos nas iscas não interferiu de forma negativa no carregamento das mesmas. Com esse trabalho pôde-se concluir que a ausência de compostos repelentes permite o carregamento dos substratos pelas operárias e que o desenvolvimento de fungos filamentosos, após o processamento de iscas tóxicas, pode favorecer a eficiência no controle de *Atta sexdens rubropilosa*.

Palavras Chave: *Atta,* controle químico, comportamento, fungos filamentosos.

THE INFLUENCE OF CITRUS PULP, OIL AND FILAMENTOUS FUNGI ON THE ATTRACTIVENESS OF TOXIC BAITS ON THE *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae). Botucatu, 2008. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
Author: AMANDA APARECIDA CARLOS
Adviser: LUIZ CARLOS FORTI

Species of leaf-cutting ants, such as the *Atta sexdens rubropilosa* are considered important pests for the Brazilian agriculture and forestry. These ants cut leaves to provide a substrate for the fungus farms. Therefore, methods of control are needed to contain the damages they cause. One of the most popular methods of control is the use of toxic baits. On that basis, this study was developed with the objective of evaluating the attractiveness of baits on the workers of the *Atta sexdens rubropilosa*. For that, were monitored the transport of different portions of the bait back to the colony, like separate citrus pulp and soybean oil. Moreover, there was also the influence of filamentary fungi on the colonies. For the attractiveness analysis in laboratory the material was offered in the foraging arena, in random, and was monitored its transport. Three bioassays of attractiveness were performed: 1. Comparison of different parts of the fruit: mesocarp, industrial, cored and integral, (in the lab

and in the field), 2. Assessment of the selectivity of different soybean oils: crude degummed, semi refined and refined, 3. Assessment of the influence of the factor of humidity on the baits and the presence of fungi on them when transported. A forth bioassay was conducted to assess the presence of fungi on the colonies after they have processed the toxic baits. For citrus pulp, the endocarp was the most attractive substrate both on the field and in the lab. As for the soybean oil, the crude degummed was the most transported and the presence of fungi in the baits did not interfere in a negative way on their transport. With this study we can conclude that the absence of repellent compounds has allowed the transport of the substrate by the workers and the development of filamentous fungi, and that the processing of toxic baits has promoted with efficiency the control of the *Atta sexdens rubropilosa*.

Keywords: *Atta*, chemical control, behavior, fungi filamentous

INTRODUÇÃO

As formigas são organismos dominantes na maioria dos ecossistemas terrestres (Wilson, 1987), apresentando importantes papéis no fluxo de energia e nutrientes (Rebula, 2003). Como insetos eussociais apresentam sobreposição de gerações, indivíduos estéreis e reprodutivos e o cuidado cooperativo com a prole (Wilson, 1971).

As espécies de formigas da tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) possuem simbiose com um fungo que cultivam (Weber, 1972). Os gêneros mais derivados *Atta* e *Acromyrmex* dependem principalmente deste fungo como alimento para o desenvolvimento larval (Mariconi, 1970; Quinlan e Cherrett, 1979; Hölldobler e Wilson, 1990). Como substrato para o crescimento de seu simbionte, as operárias utilizam material vegetal e as mesmas complementam sua alimentação com líquidos extraídos das folhas, durante a coleta e processamento desse substrato (Bass e Cherrett, 1995; Andrade et al., 2002; Paul e Roces, 2003; Nagamoto et al., 2004).

Assim, há evidências que as operárias apresentam capacidade seletiva em relação ao material a ser cortado (Oliveira et al. 2004), devido a presença de compostos secundários tóxicos, valor nutricional exigido para o simbionte e barreiras químicas e físicas das plantas (Hubbel e Wiemer, 1983). Segundo Rockwood (1976), os compostos secundários e as necessidades nutricionais seriam responsáveis por esta seletividade. De qualquer forma, cabe

ressaltar aqui, que operárias devem aliar às suas necessidades nutricionais com as de seu fungo simbionte, para garantir o sucesso do crescimento da colônia.

Desta forma, embora sejam primariamente fungívoras, as formigas exercem um papel ecológico de herbívoros polifágicos, como ressaltado no estudo de Garcia et al. (2003), que reportaram que *Atta sexdens* forrageia várias dezenas de espécies de plantas, contudo possuem clara preferência por algumas. Assim as formigas cortadeiras, de uma maneira geral são consideradas pragas na agricultura por atacarem muitas plantas cultivadas.

Particularmente, a espécie *A. sexdens,* é considerada uma das principais pragas nas plantações de *Eucalyptus* spp. (Amante, 1967) ocorrendo em várias regiões do país (Gallo et al., 1988). Juntamente com a *Atta laevigata* causam 14% dos prejuízos na produção de *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp. (Boaretto e Forti, 1997).

Existem vários métodos de controle, dentre eles, o uso de iscas granuladas tem-se destacado, sendo considerado um dos mais eficientes (Boaretto e Forti, 1997). As iscas são compostas por mistura de polpa cítrica desidratada (veículo) e ingrediente ativo dissolvido em óleo de soja, com formulação em pellets (Robinson, 1979; Forti et al., 1998). Nesta estratégia de controle a atratividade é um fator de extrema importância a ser considerado (Robinson, 1979).

Para ser eficaz o ingrediente ativo deve atender a algumas especificações: não ocorrer rejeição inicial, a ação retardada deve ocorrer em tempo certo para que se desenvolva toda a contaminação da colônia e apresentar especificidade. Entretanto, a atratividade é o ponto vital na eficiência das iscas granuladas, ela deve ser atrativa mesmo distante do ninho (Etheridge e Phillips 1976, Forti et al., 1998, Nagamoto et al., 2004; Verza et al., 2006).

A polpa cítrica utilizada como veículo e atrativo nas iscas tóxicas, provavelmente é apropriada para o crescimento do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras de dicotiledôneas, por apresentar características como: levemente ácida, alto conteúdo de carboidrato, constituída por nitrogênio, vitaminas e microelementos que fornecem subsídios para o desenvolvimento do fungo simbionte (Boaretto e Forti, 1997).

Contudo, o óleo de soja que é utilizado para solubilizar o princípio ativo, não possui seu papel definido frente as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. De acordo com observações em laboratório de Nagamoto (1998), o óleo de soja provocou uma drástica redução na atratividade para formigas do gênero *Atta*, isso ocorreu possivelmente devido ás forças de coesão que tendem a fazer o óleo de soja envolver superfície corporal das formigas, levando-as à asfixia.

Porém, Boaretto e Forti (1997) verificaram que os fragmentos de celulose contendo diferentes óleos vegetais, inclusive de soja, foram tão ou mais carregados por *Atta capiguara* do que o tratamento controle, apenas água destilada. Para iscas granuladas tudo indica que o óleo de soja não diminui a atratividade (Nagamoto, 1998). No entanto, estudos são necessários para averiguar a questão do porque ora ele ser tido como atrativo ora como repelente nos experimentos científicos.

Para o método de controle com iscas tóxicas, outro fator que pode estar relacionado com a atratividade é a umidade das iscas. Segundo Rodrigues (2004), em seus estudos ocorreu baixa taxa de carregamento no campo de iscas tóxicas, devido ás chuvas no período de fornecimento.

Além disso, alguns estudos aindicam presença de fungos filamentosos em diversas situações, nas colônias, tais como: Luciano et al (1995); Fisher et al (1996), Currie et al. (1999) e Rodrigues (2004). Assim ao se carregar iscas portando microrganismos talvez eles possam contribuir para a eficiência com o controle com iscas tóxicas, pois quando ocorre o desequilíbrio das colônias, favorece o desenvolvimento de outros microrganismos.

Com base nisso, o presente estudo teve como objetivos responder aos seguintes questionamentos:

(1) Tipos de polpas cítricas influenciam os comportamentos de forrageamento, preparação e incoporação desses substratos por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*?

(2) Óleos de soja com diferentes graus de refinição exercem atratividade diferenciada às operárias de *Atta sexdens rubropilosa*?

(3) Quais fungos filamentosos se desenvolvem quando ocorre desequilíbrio nas colônias de *Atta sexdens rubropilosa*?

(4) O carregamento de iscas pelas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* é infuenciado pelo teor de água e presença de microrganismos nos pellets?

Para isso, dividiu-se a dissertação em quatro capítulos: Seletividade e processamento de diferentes polpas cítricas por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*; Seleção de diferentes óleos de soja para a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*; Presença de fungos filamentosos em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* após o processamento de iscas tóxicas e

Influência da contaminação fúngica e umidade no carregamento de substratos por operárias de *Atta sexdens rubropilosa.*

CAPÍTULO I – SELETIVIDADE E PROCESSAMENTO DE DIFERENTES POLPAS CÍTRICAS POR OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)

Journal of Applied Entomology

Resumo

A formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* é considerada uma das principais pragas para a agricultura e silvicultura brasileira, um dos métodos de controle para conter esses danos é a isca tóxica que possui como atrativo polpa cítrica desidratada. Visando aperfeiçoar a atratividade destas iscas, este estudo foi desenvolvido para comparar o carregamento e conhecer aspectos envolvidos no processamento e incorporação do fungo aos substratos de polpa cítrica pelas operárias. Distintas polpas cítricas foram ofertadas aleatoriamente, observando-se o carregamento desse material pelas operárias e através de amostragem instantânea, seis atos comportamentais foram registrados. O endocarpo foi o substrato mais carregado tanto em campo como laboratório. Observou-se que o comportamento de lamber a isca na superfície do fungo foi realizado por maior número médio de operárias e um número médio de operárias responsáveis pelo processamento das iscas foi maior nesse substrato. Portanto, sugere-se que a atratividade das iscas tóxicas pode ser melhorada dependendo do tipo de polpa cítrica a ser oferecida e para a intoxicação das operárias no controle

químico, o endocarpo pode ser o mais apropriado, pois além de ter sido considerado o mais atrativo, um maior número de formigas permaneceu em contato com esse material.

Palavras Chave: *Atta*; comportamento; forrageamento.

1. Introdução

Os insetos eussociais apresentam sobreposição de gerações, indivíduos estéreis e reprodutivos e o cuidado cooperativo com a prole (Wilson, 1971). Com o desenvolvimento dessa unidade social, a colônia, constituída por castas de indivíduos com funções próprias, possui um sofisticado sistema de comunicação. Este sistema controla e coordena os comportamentos dos componentes das colônias em suas mais variadas funções (Shorey, 1973). São sinais olfativos, por exemplo, que permitem o processo de reconhecimento entre os indivíduos (Wilson, 1971) sendo comum a todos do ninho (Bradshaw e Howse 1984).

Dentre esses insetos, as formigas cortadeiras (*Atta* spp. e *Acromyrmex* spp.) apresentam ampla distribuição geográfica e forrageiam plantas nativas e exóticas que utilizam como substrato para o cultivo de seu fungo simbionte (Weber, 1972; Hölldobler e Wilson, 1990).

Estas formigas são insetos sociais abrigados no solo, portanto possuem desenvolvidos sistemas olfativos e táteis, sendo principalmente o químico. Os semioquímicos utilizados na comunicação nestas sociedades contêm muitas informações e baixa volatilidade o que minimiza a habituação sensorial (Howard e Blowquist, 1982). Outra característica é que as formigas cortadeiras no ato da seleção do material a ser forrageado discernem odores e distinguem substâncias químicas através de seus órgãos sensoriais (Littledyke e Cherrett, 1978), utilizando como critério, durante a seleção, esse odor aprendido (Roces, 1990) e a experiência individual (Therrien, 1988; Lopes *et al*., 2004).

O forrageamento é um mecanismo complexo, o qual envolve elementos individual e social que interagem para determinar o carregamento de substratos para a colônia, visando um alto rendimento produtivo (Roces e Hölldobler, 1994). Alguns grupos ou espécies de plantas são tidos como preferidos pelas forrageiras (Fowler e Robinson, 1979; Garcia et al., 2003), mesmo assim elas geralmente não forrageiam por muito tempo uma única espécie vegetal (Diehl-Fleig, 1995).

A diversidade de plantas forrageadas favorece o desenvolvimento adequado do fungo simbionte (Mudd *et al*., 1978; Stradling, 1978; Camargo *et al*., 2003), sendo o desenvolvimento do simbionte inibido quando o substrato é oriundo de apenas uma espécie de planta (Michels *et al.*, 2001).

Além disso, de acordo com Roces (1990) esses indivíduos exibem um grau de recrutamento intenso quando as folhas são mais tenras e quanto maior a taxa de nutrientes presentes nas folhas, mais intenso é o recrutamento das operárias forrageiras para esta fonte (Roces, 1994).

Pinto (1983), utilizando um olfatômetro, observou que as operárias foram influenciadas por um local e não apenas pela atratividade das espécies de *Eucalyptus*. Segundo Specht *et al*. (1994), o fluxo no número médio de operárias durante o forrageamento, varia para cada colônia, fato que parece não ser apenas espécie-específico, mas segundo os autores é considerada também colônia-específico em que depende não só do tamanho, mas da localização da colônia.

No forrageamento as operárias podem também selecionar o material a ser cortado, devido à presença de componentes tóxicos secundários, valor nutricional, propriedades físicas e mecânicas das plantas (Hubbel e Wiemer, 1983). Particularmente, a espécie *Atta sexdens rubropilosa* traz prejuízos principalmente às plantações de *Eucalyptus* e *Pinus* spp. (Boaretto e Forti, 1997).

Em virtude de sua importância econômica, os métodos de controle para formigas cortadeiras vêm sendo empregados, porém eles são extremamente complexos, devido as características de polimorfismo e polietismo das colônias. Um dos mais utilizados atualmente para minimizar os danos causados por esses insetos sociais são as iscas tóxicas, formuladas em pellets contendo o princípio ativo dissolvido em óleo de soja e como veículo e atrativo é utilizado polpa cítrica desidratada.

Essa polpa é obtida por intermédio de tratamento de resíduos (cascas, sementes, e bagaços desidratados) das frutas cítricas, passando por vários processos industriais, tais como: extração do suco e de grande parte dos açúcares, dos óleos essenciais e de outras substâncias que podem conferir a atratividade às formigas cortadeiras (Verza *et al.*, 2006). Após esse processo, a polpa é triturada e seca até o teor de umidade atingir entre 11 e 12%, sendo posteriormente o produto extrusado (van Soest, 1982 *apud* Côrrea *et al*., 2001).

Segundo Mudd *et al.* (1978), tanto componentes lipídicos e não–lipídicos contribuem para a aceitabilidade da polpa. Verza *et al.* (2006) demonstraram que o mesocarpo da laranja (albedo) é

tão atrativo quanto a polpa industrial para as operárias desta mesma espécie; também verificaram que após o carregamento o albedo foi utilizado para o cultivo do fungo simbionte.

Cherrett (1968) menciona que além da necessidade nutricional do fungo, a composição química do material também é importante na seletividade. Alguns estudos sugeriram que os carboidratos demonstram-se atrativos, por serem importantes nutrientes para esses insetos (Abott, 1978; Silva *et al*., 2003). Silva *et al*. (2003) averiguaram que ocorre um aumento da sobrevida desses insetos sociais quando os mesmo ingerem em dieta artificial, a glicose. Esta glicose é proveniente da digestão extracelular do fungo simbionte (Bueno *et al*., 2008).

Após a escolha adequada do substrato que será utilizado para o crescimento do fungo simbionte, cuidados comportamentais e bioquímicos são vitais para a manutenção do mesmo, sendo, portanto as formigas promotoras de seu crescimento. Deste modo, elas contribuem com as etapas de preparação do substrato vegetal, antes de ser incorporado ao ninho, corte em pedaços menores, salivas e gotículas de um líquido proveniente do intestino posterior das operárias são adicionadas ao material (Weber, 1966; Weber, 1972; Quinlan e Cherrett 1977; Quinlan e Cherrett, 1978; Rodrigues, 2004).

O fungo simbionte é a base alimentar das colônias, porém em operárias adultas ocorre ingestão de seiva diretamente das plantas no momento do corte e recorte do material (Quinlan e Cherrett, 1979; Forti e Andrade, 1999). As operárias forrageiras, além de seiva, consomem lipídios presentes em várias estruturas das plantas, entre elas os corpos de alimentação e os elaiossomos das sementes (Bueno *et al*., 2008). Por outro lado, Bass e Cherrett (1995) e Silva *et al*. (2003), enfatizaram que as necessidades energéticas oriundas do fungo simbionte são muito baixas.

Durante o processamento do substrato, ocorre ingestão de seiva pelas operárias ao recortar e prensar as bordas dos fragmentos vegetais, o ato de lamber é freqüente e realizado simultaneamente, pois através dessas bordas ocorre seiva extravasada. As operárias também raspam a superfície da folha removendo a camada de cera epicuticular, (Quinlan e Cherrett, 1977). Tais atos levam as formigas a ingerirem pequenos fragmentos de folhas e ceras que possivelmente servirão de fonte alimentar (Diniz, 2000).

O presente estudo propôs que há diferenças comportamentais expressas pelas operárias de acordo com partes do fruto utilizadas como veículo no controle químico. Para testar tal hipótese foi verificado se ocorre diferença no carregamento e processamento para a incorporação no fungo

simbionte, dependendo da constituição do material, e o papel do estímulo olfatório na escolha desse substrato.

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Insetos Sociais-Praga, na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu. As rainhas foram coletadas na revoada em Outubro de 2006, nas proximidades do Campus e foram mantidas em laboratório, em potes plásticos contendo 1cm de gesso no fundo para a manutenção da umidade. Assim que, essas colônias aumentavam em tamanho eram transferidas para potes maiores, também com gesso, interligados com tubos plásticos a dois outros recipientes sem gesso nas extremidades (câmara de forrageamento e de material exaurido). Foram fornecidas, *ad libitum* folhas de *Acalypha* sp. e de *Ligustrum* sp. às colônias, diariamente.

Assim que essas colônias atingiram um volume de fungo aproximado de 500 mL, o recipiente que continha a câmara de fungo era trocado por caixas retangulares de acrílico transparentes (4,0 x 25,0 cm) adequadas para observar o comportamento de preparação e incorporação do substrato.

As diferentes polpas cítricas de laranja pêra foram confeccionadas: mesocarpo (albedo – tratamento 1), industrial (tratamento 2), endocarpo (bagaço e sementes – tratamento 3) e integral (pericarpo, endocarpo e mesocarpo – tratamento 4).

Para o processamento das polpas (integral e mesocarpo) foi realizada assepsia cuidadosa das laranjas, através de lavagem em água corrente e secagem com o auxílio de papel toalha. No tratamento 4, retirou-se apenas o suco, entretanto, para o albedo conforme Verza *et al.* (2006), além do suco, descartaram praticamente quase toda a casca e sementes das laranjas. No tratamento 3, utilizou-se o bagaço e as sementes, descartando o restante do material. Esses pedaços de frutos foram fragmentados em porções menores e colocados em placas de Petri. Posteriormente, os fragmentos foram acondicionados em estufa a 50ºC, por um período de 48 horas para a secagem.

Após este procedimento, executou-se a moagem, e em seguida adicionou-se água destilada, o suficiente para dar maior consistência ao material, para a peletização. Além disso, para cada tratamento, utilizou-se corantes (marca Quatro Rodas): Azul FCF (integral), Verde Folhas (albedo)

Vermelho Bourdeaux (industrial) e Amarelo Tartasina (endocarpo). Os quatro substratos foram extrusados e deixados para secar durante 24 horas em estufa a 50 ºC.

A polpa cítrica industrial foi fornecida pela empresa Atta-Kill Ltda.

2.1 Atratividade em laboratório

Para este experimento, foram utilizadas cinco colônias (repetições) de *A. sexdens rubropilosa.* Baseando-se na metodologia de Forti *et al.* (1993) para testes de atratividade de iscas tóxicas, 5 pellets de cada tratamento foram oferecidos aleatoriamente, ao mesmo tempo, em uma única apresentação, na câmara de forrageamento e quando um tratamento era totalmente carregado, bloqueava-se essa arena e quantificava os outros tratamentos.

2.2 Atratividade em campo

Nesse bioensaio, utilizou-se cinco placas de Petri teladas por repetição, contendo os seguintes tratamentos: mesocarpo - tratamento 1; industrial - tratamento 2; endocarpo - tratamento 3; integral - tratamento 4 e testemunha (sem pellets) - tratamento 5.

Foram selecionadas quatro colônias no Campus da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu (22º53'; 48º26'W). O material foi ofertado no ponto em que a trilha de forrageamento bifurca.

Os tratamentos foram disponibilizados a cada dois minutos, contava-se o número de formigas presentes nessas placas, totalizando 14 repetições. Após esse período as placas eram trocadas e dispostas em locais diferentes, repetindo-se o procedimento, totalizando cinco apresentações. Em seguida, repetiu-se o experimento, porém as placas foram abertas e após as repetições mudava-se a mesma de local, também totalizando 5 apresentações com 14 oferecimentos cada.

2.3 Preparação do substrato para o fungo simbionte

A partir das cinco colônias utilizadas no experimento de atratividade em laboratório, selecionou-se quatro delas. Após efetuar o bioensaio mencionado, foi realizada uma pausa de 30 minutos para que os outros pellets fossem carregados e iniciou-se as observações de amostragens instantâneas (Del-Claro, 2004), nos seguinte tempos: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 240, 480 e 960 minutos, pela contagem do número de operárias que estavam desempenhando

determinado comportamento sob os tratamentos ofertados. Foram registrados seis atos comportamentais, todos na superfície do fungo: segurar a isca; lamber a isca; repicar a isca; mastigar os fragmentos; mastigar e preguear os fragmentos no fungo e incorporar os fragmentos.

2.4 Análises estatísticas

Os dados foram transformados em log(X+1) submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e em seguida à análise de variância e aos testes *a posteriori* de Tukey ($p = 0,05$) ou t de Student (SAS 9.1, 2003).

3. Resultados

Quanto a atratividade das iscas compostas por distintas polpas cítricas, nos bioensaios em laboratório, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos ($F = 4,56$; $p = 0,017$) para o número de pellets carregados, nos tratamentos, integral e endocarpo, menos carregado e mais carregado, respectivamente (Figura 1A). Os tratamentos mesocarpo e industrial não apresentaram diferenças significativas entre si.

No campo, a média de carregamento também diferiu entre os tratamentos ($F = 4,981$; $p = 0,0180$). A diferença foi constada entre os tratamentos mesocarpo (menos carregada) e endocarpo; entre a integral com o mesocarpo; a integral e o endocarpo que não diferiram no campo foram 100% carregadas nas apresentações (Figura 1B).

No experimento em campo, também avaliou-se o número de formigas presentes nas apresentações, durante o carregamento dos pellets e anteriormente quando as formigas exploravam o material com as placas de petri ainda fechadas. O número total de formigas explorando os distintos tratamentos foram 57 operárias quando as mesmas não podiam ter contato com o substrato e 644 no momento em que tiveram contato ao longo das observações ($t = -6,597$; $p < 0,001$).

Em relação ao número de formigas no decorrer do tempo, nos diferentes tratamentos, quando elas não podiam ter contato, observou-se que não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos (0,415), apenas entre as colônias 1 e 2 ($F = 2,682$; $p = 0,048$). No entanto, quando as operárias tiveram contato com o substrato, os tratamentos ($F = 8,181$, $p < 0,001$) (Figura 2) e as colônias ($F = 8,407$, $p < 0,001$) (Figura 3) diferiram significativamente ($p < 0,050$).

Durante o processamento do material, o número médio de formigas executando algum comportamento em relação as distintas polpas diferiram ($F = 8,74$; $p < 0,001$), sendo que o endocarpo obteve número médio maior ($\bar{X} = 1.48$), quando comparado com a polpa industrial e integral ($\bar{X} = 1.38$ e $\bar{X} = 1.34$, respectivamente) que não diferiram, enquanto o mesocarpo apresentou uma média menor de operárias dentre todos os tratamentos ($\bar{X} = 1.21$) (Figura 4).

Foram registrados seis atos comportamentais, em 242 observações e amostrou-se 1894 operárias durante as observações. Esses atos diferiram, lamber a isca ($N = 1173$; $\bar{X} = 2,24$) apresentou média maior no número de formigas, seguido por segurar a isca ($N = 618$; $\bar{X} = 1,77$), porém os outros, tais como: repicar a isca; mastigar os fragmentos; mastigar e preguear os fragmentos e incorporar os fragmentos, não diferiram estatisticamente entre si (Figura 5).

Além disso, em relação a ocorrência dos atos comportamentais, ao longo do tempo, o comportamento "segurar a isca" ($F = 0,814$; $p = 0,653$) não diferiu dos demais nos tempos avaliados, ou seja, manteve-se os registros ao longo das observações. Lamber a isca até a décima observação permaneceu constante, porém a última observação diferiu nos tempos 90 ($F = 5,229$; $p = 0,018$), 100 ($F = 4,938$; $p = 0,036$) e 240 ($F = 5,250$; $p = 0,041$) minutos com o último avaliado. Repicar a isca ao longo das observações não diferiu, sendo poucas as ocorrências, após a sexta observação (50 minutos). Mastigar os fragmentos ($F = 6,429$; $p < 0,001$); mastigar e preguear ($F = 2,860$; $p < 0,001$) e incorporar a isca ($F = 4,367$; $p < 0,001$) foram observados após a oitava apresentação (70 minutos), devido ao aumento do número de operárias executando nas últimas observações, ocorreu diferença entre os tempos (Figura 6).

4. Discussão

Esse estudo permitiu confirmar a hipótese de que há diferenças comportamentais expressas pelas operárias de acordo com a polpa cítrica. O endocarpo foi o substrato mais atrativo para as operárias das formigas cortadeiras, tanto em campo como laboratório, sendo composto por bagaço e sementes de laranja. Além disso, durante a preparação das iscas para a incorporação no fungo simbionte, o endocarpo foi o mais processado para ser incorporado, ou seja, com maior número de

operárias executando os comportamentos registrados (segurar a isca, lamber a isca, repicar a isca, mastigar os fragmentos, mastigar e preguear os fragmentos e incorporar os fragmentos).

Carlos *et al.* (2007) verificaram que diferentes polpas cítricas (albedo, industrial e integral) são atrativas para operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Esse trabalho corrobora com o presente estudo, devido ao carregamento e processamento observado, reforçam os estudos desses autores, pois afirmam que a polpa cítrica é um material atrativo para as formigas cortadeiras estudadas.

No presente estudo, existiu uma preferência, ao se oferecer essas iscas em laboratório, e em campo, contudo, todas foram carregadas, isso corrobora com os resultados obtidos de Caffarini *et al*. (2006) e Mudd *et al.* (1978), em que a ausência de repelentes ou deterrentes pode ser mais importante do que a presença de estimulantes específicos. Além disso, após 24 horas observou-se incorporação total dos quatro tratamentos fornecidos.

Particularmente, a preferência ao endocarpo como primeiro substrato a ser totalmente carregado, tanto em campo como em laboratório pode ser devido a presença de uma substância, ou mais de uma, além de interação que pode ocorrer entre elas, porém para Cherrett e Seaforth (1970), a atratividade do extrato cítrico é maior quando uma variedade de grupos químicos está presente do que qualquer substância específica. Além disso, sabe-se que as operárias ao ingerirem o seu simbionte, possuem uma alimenteação rica em carboidratos e proteínas e pobre em lipídios (Martin, 1969). Assim, o lipídio é obtido em sua dieta através de várias estruturas do material forrageado, incluindo os corpos de alimentação e elaiossomos das sementes como já mencionado (Bueno *et al.*, 2008), portanto, o endocarpo confeccionado no presente estudo era composto de bagaço e sementes, ou seja, fonte de lipídios para as operárias.

O estímulo olfatório é importante no momento de seleção do substrato, porém apenas ele não garante o recrutamento de outras operárias para a fonte. Na trilha de forrageamento observou-se as operárias exibindo movimentos antenais para baixo e para cima, durante a locomoção, em atividade exploratória em direção ao material ofertado tanto em campo como laboratório. Contudo, quando estas operárias chegavam na fonte, no campo, aonde o material provavelmente atrativo se encontrava, exploravam as placas que continham as iscas, visto a impossibilidade de carregar, ou se alimentar de tal fonte elas abandonavam o local e buscavam outro substrato para forragear, isso pode ser evidenciado pelos dados obtidos no presente estudo.

Vale lembrar que no momento em que as operárias possuem contato com o material considerado atrativo, elas carregam esse substratos e recrutam outras operárias por meio de trilhas

de odor produzida por glândulas presente no abdômen, contatos antenais entre as operárias e aumento no número de operárias após as escoteiras retornarem a colônia. A intensidade do recrutamento é mediado pela quantidade de ferômonio depositado pelas operárias (Hölldobler, 1978), isso depende da qualidade do alimento e do tempo em que a colônia permaneceu sem forragear (Carroll e Jansen, 1973).

Adicionalmente, o recrutamento transmitido pela escoteira às operárias é de vital importância, sendo expresso pelo baixo número das mesmas tentando explorar o material quando não podiam ter contato. Assim, quando ocorre o carregamento, o número de operárias aumenta significativamente, pois existe o recrutamento intenso de outros indivíduos, num processo de retro-alimentação positivo, pois as operarias recrutadas ao voltarem para o ninho também fazem a deposição de feromônio na trilha que se torna cada vez mais forte.

Entre as colônias, no campo, ocorreu diferença no número de operárias; a terceira colônia estava mais ativa, sendo o recrutamento maior quando comparado com à primeira, as outras duas colônias não diferiram. Observou-se que a distância da colônia três em relação ao substrato era um pouco menor, visto que em todas as colônias, foi escolhido o local no ponto em que a trilha bifurca. Esses dados apoiam os estudos de Specht *et al.* (1994), onde ocorre variação, a diferença no fluxo médio provavelmente está relacionada com a idade da colônia ou seu tamanho populacional, já que nesse estudo comparou ninhos da mesma espécie, mesma fonte e com distâncias semelhantes.

No momento de preparação para a incorporação dos substratos, o comportamento de lamber a isca foi executado por um maior número de operárias e depois o de segurar a isca, teve maior média de ocorrência de operárias observadas no decorrer das apresentações. As formigas no início do processamento, momento em que cortam e prensam as bordas do substrato vegetal lambem continuamente a seiva que é extravassada, porém no presente estudo, esse ato esteve sempre associado com operárias segurando os pellets. O registro de maiores ocorrências desses atos, no presente experimento provavelmente é devido a presença de substratos diferentes, pois enquanto alguns pellets eram trabalhados outros eram deixados no fungo, provavelmente para hidratarem, facilitando posteriormente a fragmentação dos mesmos, assim como o reportado por Andrade (2002).

De acordo com Littledyke e Cherrett (1976), o processamento do material vegetal para a incorporação no fungo simbionte envolve duas etapas: lamber a superfície e repicar, mastigar as

bordas. O ato de lamber é o mais demorado, ou seja, o mais freqüente para *Acromyrmex octospinosus* (Littledyke e Cherrett,1976), sendo executado por operárias médias. O mesmo observou-se para *Atta sexdens rubropilosa*, porém esse comportamento é exibido por operárias pequenas, as jardineiras (Andrade *et al*., 2002). No comportamento de preparação das iscas pelas operárias, o ato de lamber também foi o mais freqüente para a espécie estudada.

Esse estudo, portanto permitiu verificar que dentre as diferentes partes do fruto de laranja estudado, o endocarpo é a que possui maior atratividade e durante o processamento e incorporação destes substratos no fungo simbionte é a que maior número de operárias dispõe nesse processamento. A intoxicação das operárias no controle químico pode ser favorável com o uso do endocarpo como veículo, pois um número maior de operárias, provavelmente estará em contato com esse material.

5. Referências

Abbott AA, 1978. Nutrient dynamics of ants. In: BRIAN, M.V. (ed) Production ecology of ants and termites. Cambridge: Cambridge University Press, 233-244.

Andrade APP, 2002. Biologia e Taxonomia Comparadas das subespécies de Acromymex subterraneus Forel, 1893 (Hym., Formicidae) e contaminação das operárias por iscas tóxicas. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas/Zoologia)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Andrade APP, Forti LC, Moreira AA, Boaretto MAC, Ramos VM, Matos CA, 2002. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. Socio, 40, 293-306.

Bass M, Cherrett JM, 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens.* Physiol. Entomol., London, 20 (1), 1-6.

Boaretto MAC, Forti LC, 1997. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Série Técnica, IPEF, 11 (30), 31-46.

Bradshaw JWS, Howse PE, 1984. Sociochemical of ants. In: BELL, W. J.; CARDE, R.T. (ed.). Chemical ecology of insects, London, Chapman and Hall, 429-473.

Bueno OC, Bueno FC, Diniz EA, Schneider MO, 2008. Utilização de alimentos pelas formigas cortadeiras. In: Vilela EF, Santos IA, Schoereder JH, Serrão JE, Campos LAO, Lino-Neto J. (eds.) Insetos Sociais da biologia à aplicação, 96-114.

Camargo RS, Forti LC, Matos CAO, Lopes JF, Andrade APP, Ramos VM, 2003. Post-selection and return of foraged material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). Socio., 42 (1), 93-102.

Carlos AA, Forti LC, Verza SS, Camargo RS, Cardoso SRS, Barbieri RF, 2007. Atratividade de diferentes polpas cítricas para *Atta sexdens rubropilosa.* XVIII Simpósio de Mirmecologia, Resumo Expandido 028.

Carroll CR, Janzen DH, 1973. Ecology of foraging by ants. Annu. Rev. Ecol. Syst., 4, 231–257.

Caffarini P, Carrizo P, Pelicano A, 2006. Extractos cítricos como atrayentes para cebos hormiguitas con substancias naturales. Rev. FCA UNCuyo, Tomo XXXVIII, 1, 19-26.

Cherrett JM, 1968. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera, Formicidae). I. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. J. Anim. Ecol., 37, 387-403.

Cherrett JM, Seaforth CE, 1970. Phytochemical arrestants for the leaf-cutting ants, *Atta cephalotes* (L.) and *Acromymex octospinosus* (Reich), with some notes on the ants' response. Bull. Entomol. Res., 59, 615-625.

Del-claro K, 2004. Comportamento Animal. Uma introdução à ecologia comportamental. Distribuidora / Editora – Livraria Conceito, Jundiaí, SP, 132p.

Diehl-fleig E, 1995. Formigas: organização social e ecologia comportamental. Ed. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 168 p.

Diniz EA, 2000. Comportamento de preparação do substrato vegetal e cuidado com a rainha de *Atta sexdens*. Rio Claro, SP. UNESP. 37f. Trabalho (Conclusão de Curso) – Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro.

Forti LC, Della Lucia TMC, Yassu WK, Bento JMS, Pinhão MAS, 1993 Metodologias para experimentos com iscas granuladas para formigas cortadeiras. In: As formigas cortadeiras, , Editora UFV, Viçosa, 191-211.

Forti LC, Andrade APP, 1999. Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera, Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. Naturalia, 24, 61-63.

Fowler HG, Robinson SW, 1979. Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste and efficiency. Ecol. Entomol., 4, 239-247

Garcia IP, Forti LC, Engel VL, Andrade APP, Wilcken CF, 2003. Ecological interaction between *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and the vegetion of a mesophyll semiodeciduous forest fragment in Botucatu, SP, Brasil. Socio., 42 (2), 265-283.

Hölldobler B, 1978. Ethological aspects of chemical communication in ants. Adv. Study Behav., 8, 75-115.

Hölldobler B, Wilson EO, 1990. The ants. Cambrigde: Havard University Press. p.133-154.

Howard RW, Blomquist GJ, 1982. Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. Annu. Rev. Entomol., 27, 149-172.

Hubbel SP, Wiener DF, 1983. Host plant selection by an Attine ant. In: Jaisson, P. (Ed). Social insects in the tropics. Paris: University of Paris Press, 2, 157-163.

Littledyke M, Cherrett JM, 1976. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by leaf-cuttings ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). : Bull. Entomol. Res., 66, 205-217.

Littledyke M, Cherrett JM, 1978. Olfactory responses of the leaf-cutting ants *A. cephalotes* L) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera: Formicidae) in the laboratory. Bull. Entomol. Res., 68, 273-282.

Lopes JFS, Forti LC, Camargo RS, 2004. The influence of the scout upon the decision-making process of recruited workers in threee *Acromyrmex* species. Behav**.** Processes, 67, 471-476.

Martin MM, Carman RM, Macconel JG, 1969. Nutrients derived from the fungus culture by the attini ant Atta colombica tonsipes. Ann. Entomol . Soc. Am., 62, 1386-1387.

Michels K, Cromme N, Glatzle A, Schultz-Kraft R, 2001. Biological control of leaf-cutting ants using forage grasses: Nest characteristics and fungus growth. J. Agron. Crop. Sci., 259-267.

Mudd ADJ, Peregrine DJ, Cherrett JM, 1978. The chemical basis for the use of citrus pulp as a fungus garden substrate by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera: Formicidae). Bull. Entomol. Res., 68, 673-685.

Pinto, MPH 1983. Seleção de odores de plantas por Atta sexdens rubropilosa Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae), através do uso de olfatômetro. Trabalho de conclusão de curso, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista 51p.

Quinlan RJ, Cherrett JM, 1977. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus, Ecol. Entomol., 2, 161–170.

Quinlan RJ, Cherrett JM, 1978. Studies on the role of the infrabucal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). Insectes Soc., 25, 237-245.

Quinlan RJ, Cherrett JM, 1979. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). Ecol. Entomol., 4, 151-160.

Roces F, 1990. Olfactory conductioning during the recruitment process in leaf-cutting ant. Oecologia, 83, 261-262.

Roces F, 1994. Odour learning and decision-making during food collection in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundi*. Insectes Soc., 41, 235-239.

Roces F, Hölldobler B, 1994. Leaf density and a trade-off load-size selection and recruitment behaviour in the ant *Atta cephalotes*. Oecologia, 97, 1-8.

Rockwood LL, 1976. Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). Ecology, 57, 48–61.

Rodrigues A, 2004. Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.2004.84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SAS 9.1., 2002-2003. The SAS System-Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Specht A, Diehl-Fleig E, Silva ME, 1994. Atratividade de iscas de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. A formiga do gênero Acromyrmex (Hymenoptera: Formicidae). An. Soc. Entomol. Brasil**,** 23, 99-104.

Specht A, Diehl-Fleig E, Silva ME, 1994. Atratividade de iscas de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. A formiga do gênero Acromyrmex (Hymenoptera: Formicidae). An. Soc. Entomol. Brasil, 23, 99-104.

Shorey HH, 1973. Behavioral responses to insect pheromones. Annu. Rev. Entomol., 18, 349-380.

Silva A, Bacci JR. M, Siqueira CG, Bueno OC, Pagnocca FC, Hebling MJA, 2003. Survival of *Atta sexdens rubropilosa* workes on differents foods sources. J. Insect Physiol., 9, 307-313.

Stradling DJ, 1978. Food and feeding habits of ants. In: Brian, M.V. (ed.) Production ecology of ants and termites. Cambridge: Cambridge University Press, p.81-106.

Therrien P, 1988. Individual food choices by foragers from the species Acromyrmex octospinosus (Reich), the leaf-cutting ant. Mem. Entom. Soc. Can., 146, 123-130.

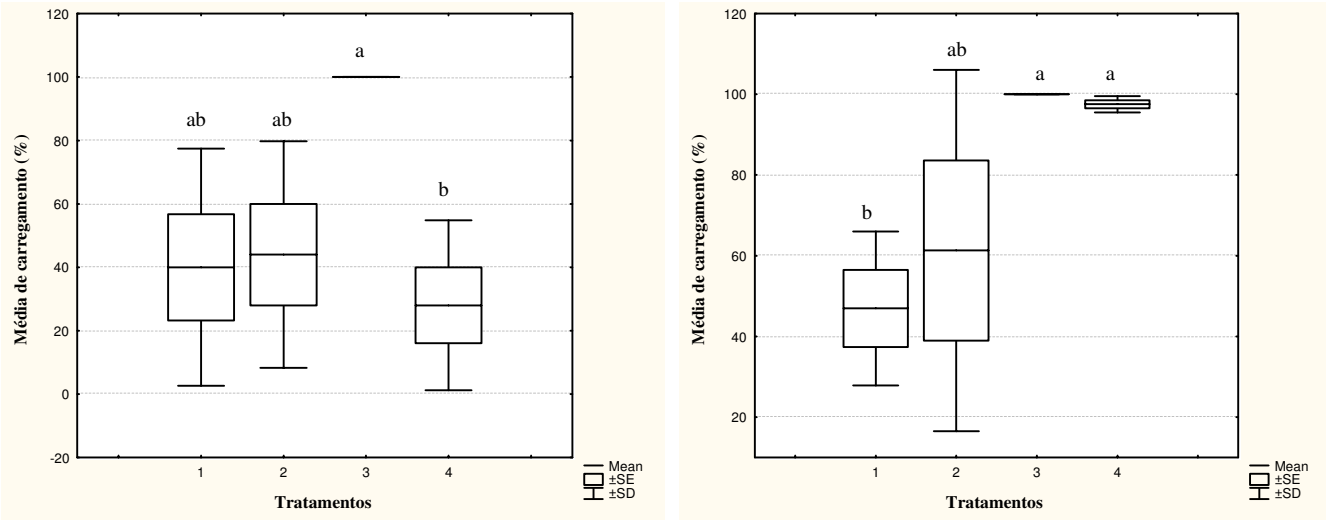
Verza SS, Forti LC, Matos CAO, Garcia MG, Nagamoto NS, 2006. Atractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Socio, 47 (2), 391-399.

van Soest TJ, 1982. Nutricional ecology of the ruminats. Corvallis, Oregon: OB Books Inc 374p.
Apud CÔRREA PC, AFONSO JÚNIOR, PC, ANDRADE ET, 2001. Modelagem matemática da atividade de água em polpa cítrica peletizada. Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambiental, 5 (2):283-287.

Weber NA, 1966. Gardening Ants: The Attines. Science, 153, 584.

Weber NA, 1972. Gardening ants: the attines. Philadelphia: Memoirs of the American Philosophical Society, 146p.

Wilson EO, 1971. The insect societies. Cambridge: Harvard University.548p.



A **B**

Figura 1.A. Média de carregamento de distintas polpas (F = 4,56; p = 0,017) por operárias de *A. sexdens rubropilosa* em laboratório. 1.B. Média de carregamento de distintas polpas (F = 4,981; p = 0.0180) por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* em campo (Tratamentos: 1. mesocarpo, 2. industrial, 3. endocarpo, 4. integral).

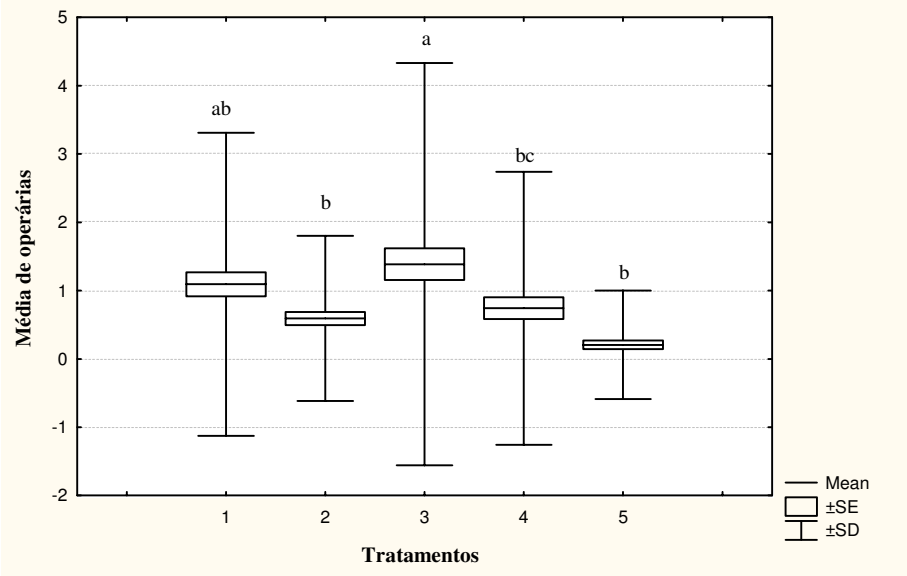


Figura 2. Média de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, que tiveram contato com o substrato no campo, diferença entre os tratamentos. Tratamentos: 1. mesocarpo, 2. industrial, 3. endocarpo, 4. integral, 5. testemunha. Teste de Tukey: $p < 0,001$.

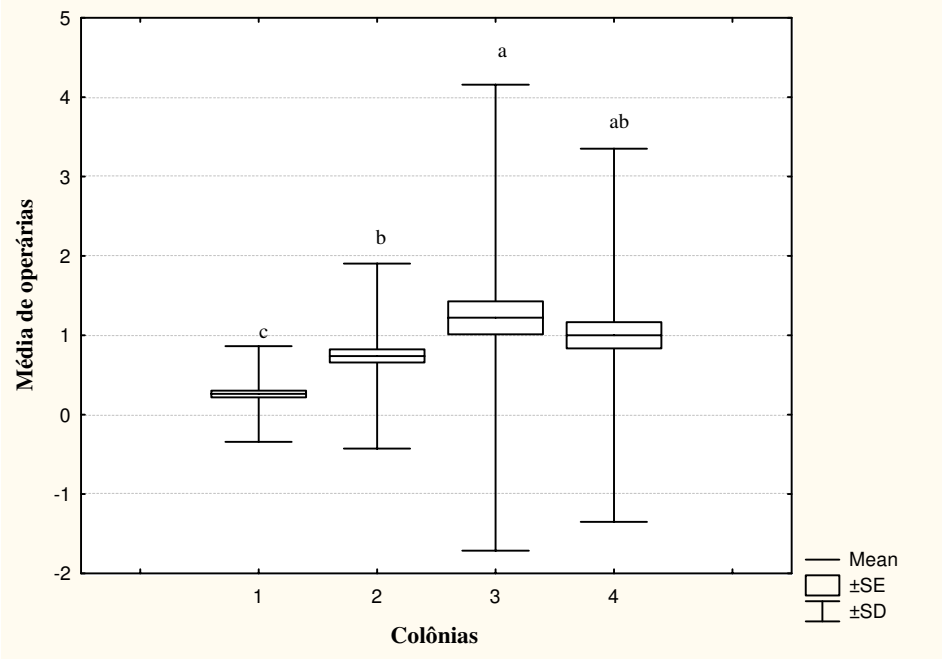


Figura 3. Média de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, que tiveram contato com o substrato no campo, diferença entre as colônias Tratamentos: 1. mesocarpo, 2. industrial, 3. endocarpo, 4. integral, 5. testemunha. Teste de Tukey: $p < 0,001$.

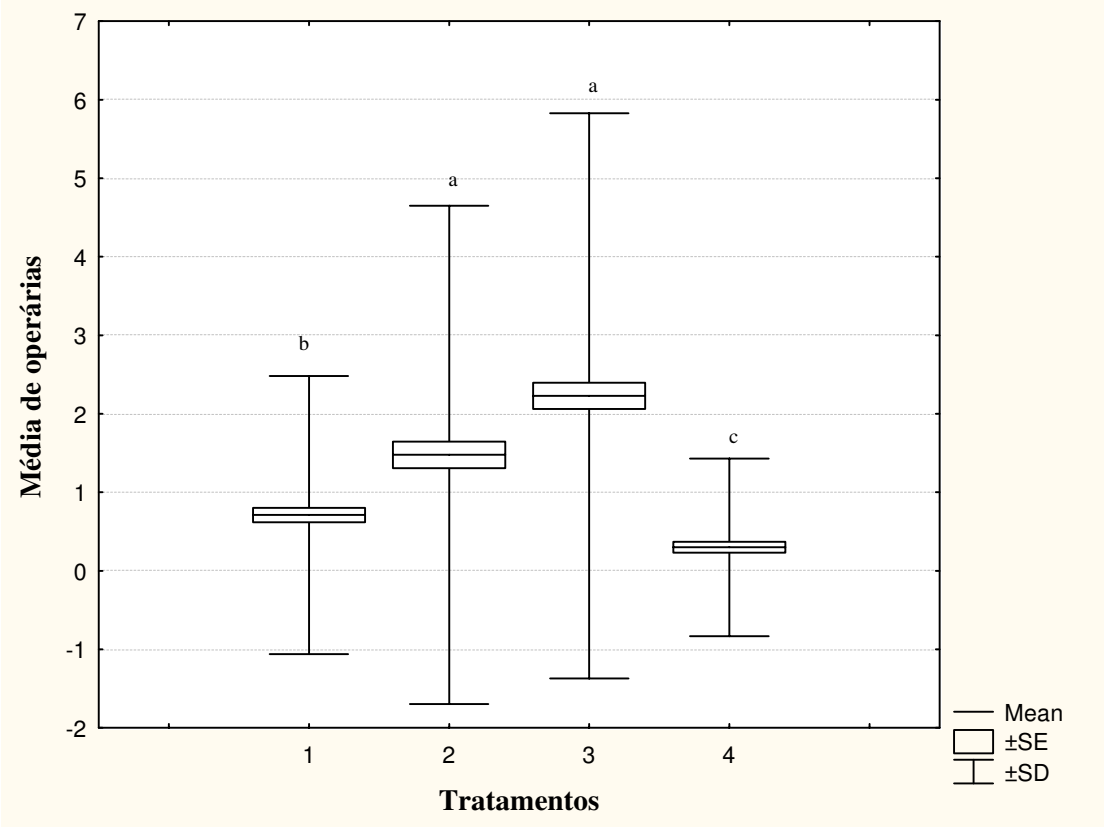


Figura 4. Processamento e incorporação: média de operárias de *A. sexdens rubropilosa* executando um determinado comportamento em distintas polpas cítricas. (F=8,74; p<0,001) (Tratamentos: 1. mesocarpo, 2. industrial, 3. endocarpo, 4. integral).

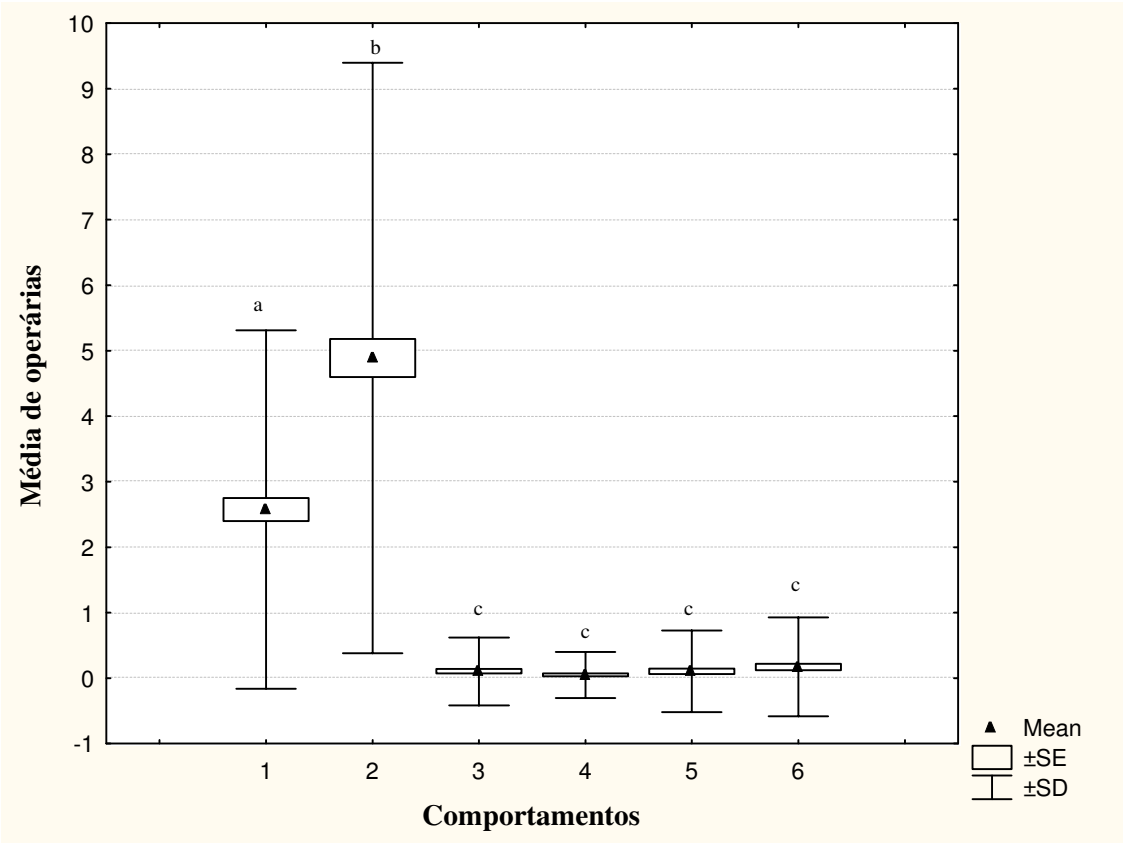


Figura 5. Média de operárias de *A. sexdens rubropilosa* executando diferentes comportamentos durante o processamento de iscas. (F=23,25; p<0,001) (Tratamentos: 1. segurar a isca, 2. lamber a isca, 3. repicar a isca, 4. mastigar os fragmentos, 5. mastigar e preguear os fragmentos e 6. incorporar os fragmentos).

Figura 6. Média do número de operárias de *A. sexdens rubropilosa* executando um determinando comportamentos ao longo das observações.

CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE DIFERENTES ÓLEOS DE SOJA PELA FORMIGA CORTADEIRA *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)

Journal Chemical of Ecology

RESUMO - *Atta sexdens rubropilosa* utiliza plantas dicotiledôneas como substrato para seu fungo simbionte e sob o aspecto econômico é considerada uma das principais pragas para a agricultura e silvicultura brasileira e possui grande aceitabilidade no carregamento de iscas tóxicas comerciais. Estas iscas, utilizadas no controle químico, contêm polpa cítrica que são atrativas para esta espécie, porém outro componente presente na isca tóxica, utilizado na solubilização do ingrediente ativo é o óleo de soja, que não possui seu papel definido em relação as operárias. Com o intuito de verificar a possível atratividade ou repelência de óleo de soja para as forrageiras desta espécie utilizou-se óleos de diferentes graus de refinação em substratos distintos. Os tratamentos foram ofertados aleatoriamente a cinco colônias e observou-se o carregamento desse material pelas operárias em laboratório. Além disso, realizou-se análises químicas, micro extração em fase sólida e reação de transesterificação para verificar a composição do material mais carregado. Constatou-se que, independe dos inertes, os substratos contendo óleo de soja bruto degomado foram os mais carregados (carbonato de cálcio: F=23,39 e p = 0,0001; fragmentos de papel filtro: F = 15,85, p =

0,0001). A presença de hidrocarbonetos como tricosano (C23) e hentriacontano (C31), pode ter favorecido a seleção deste óleo, assim como a interação de diversos compostos presentes no óleo mais carregado. Como a tomada de decisão inicial das escoteiras está intimamente relacionada com o critério olfatório, estas formigas no presente estudo possivelmente foram orientadas a compostos voláteis do óleo.

Palavras chave - ***Atta,* forrageamento.**

INTRODUÇÃO

As espécies de formigas da tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) possuem um mutualismo obrigatório com o fungo que cultivam (Weber, 1972). Os gêneros mais derivados *Atta* e *Acromyrmex*, dependem principalmente do fungo simbionte como alimento para o desenvolvimento larval (Mariconi, 1970; Quinlan e Cherrett, 1979; Hölldobler e Wilson, 1990), pois este serve de fonte de nutrientes, proteína bruta, lipídios e carboidratos, fornecendo balanço nutricional adequado à colônia (Mueller et al., 2001; Mueller, 2002). As operárias dessas formigas utilizam material vegetal para o cultivo de seu simbionte e complementam sua alimentação com os líquidos extraídos das folhas, durante a coleta e processamento desse substrato (Bass e Cherrett, 1995; Andrade et al., 2002; Paul e Roces, 2003; Nagamoto et al., 2004).

No ato de seleção do material a ser forrageado pelas formigas cortadeiras, elas distinguem odores e substâncias químicas que sensibilizam seus órgãos sensoriais (Littledyke e Cherrett, 1978), e utilizam tanto o odor aprendido, no ato de decisão durante a coleta do substrato (Roces, 1990) quanto também sua experiência individual (Lopes et al., 2004). Fatores como a presença de componentes tóxicos secundários, valor nutricional, propriedades físicas e mecânicas das plantas influenciam na seletividade (Hubbel e Wiemer, 1983). No entanto, os fatores químicos dos substratos são mais rapidamente detectados pelas operárias quando comparados com os físicos, estes por sua vez servem como critério para a rejeição ou não do substrato a ser coletado (Verza et al., 2007).

Existem dois momentos de escolha que acontecem durante o procedimento de seleção, um ocorre antes e o outro após o carregamento dos substratos (Verza et al., 2006). Portanto, os materiais impróprios para o cultivo do fungo podem ser rejeitados pelas formigas cortadeiras desde

o momento em que elas cortam e transportam até instantes antes de serem incorporados no jardim de fungo (Camargo et al., 2003).

As formigas cortadeiras, por possuírem hábito de corte de plantas nativas e de interesse agrícola, trazem sérios danos econômicos. Diversos métodos de controle vêm sendo empregados a mais de um século (Fowler e Robinson, 1979; Wilcken e Berti Filho, 1994; Boaretto e Forti, 1997). Dentre eles, o mais utilizado é a isca tóxica (Boaretto e Forti, 1997), que são formulações granuladas secas (pellets), compostas de uma mistura de polpa cítrica desidratada (veículo), ingrediente ativo e óleo de soja (Robinson, 1979; Forti et al., 1998).

Algumas características são necessárias para a eficácia desse produto: possuir atratividade às formigas mesmo à distância do ninho, não provocar rejeição inicial, a ação deve ser retardada, em tempo certo para que se desenvolva toda a contaminação da colônia e possuir baixa toxicidade aos outros indivíduos da comunidade biológica (Etheridge e Phillips, 1976; Forti et al., 1998, 2007; Nagamoto et al., 2004, 2007; Verza et al., 2006). A atratividade é um fator importante a ser considerado, pois caso a isca aplicada com a finalidade de controle não seja bem carregada pelas formigas cortadeiras, diversos outros animais não-alvos podem ter contato com esse material acarretando a intoxicação dos mesmos.

Quando se oferece iscas granuladas de polpa cítrica para *Atta sexdens rubropilosa*, estas são bem carregadas, devido a mesma preferir forragear plantas dicotiledôneas (Boaretto e Forti, 1997; Carlos et al., 2007). Entretanto, outro componente presente na isca tóxica, o óleo de soja, ora é tido como atrativo ora como repelente. Em observações em laboratório, o óleo de soja em formulações líquidas, provocou drástica redução na atratividade para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, aparentemente devido à adesão do óleo à superfície corpórea (Nagamoto 1998).

Porém, Boaretto e Forti (1997) verificaram que fragmentos de celulose contendo diferentes óleos vegetais, inclusive de soja, foram tão ou mais carregados por *Atta capiguara* do que o tratamento controle (apenas água destilada). Para as iscas tóxicas comerciais, tudo indica que o óleo de soja não diminui a atratividade (Nagamoto, 1998; Nagamoto et al., 2004), porém, não se sabe se esse componente isoladamente pode ser um deterrente para formigas cortadeiras.

Na obtenção dos diversos tipos de óleos de soja pelo método convencional, são necessários os seguintes processos: preparação para extração do óleo, extração mecânica ou por solvente, degomagem, neutralização, branqueamento (clarificação) e desodorização. O óleo bruto degomado passa pelos processos somente até a degomagem, o semi-refinado até a neutralização e o refinado é

obtido após a etapa da desodorização (ANVISA, 2000; Ribeiro et al., 2005). O óleo bruto apresenta diversas substâncias, tais como: vitaminas lipossolúveis, lecitina, pigmentos, fitoesteróis e enzimas; contudo, este se deterioriza rapidamente aumentando sua acidez e oxidação. Já no óleo refinado praticamente todas essas substâncias são removidas. No entanto, o óleo semi-refinado mantém as vitaminas e fitoesteróis como o gama-orizanol, mas não a lecitina e a acidez (Bellaver e Snizek Jr.1999, Gaiotto, 2004). Vale lembrar aqui que em iscas tóxicas comerciais o óleo utilizado é o refinado (Boaretto e Forti, 1997).

Neste estudo, testou-se a hipótese de que existe diferença na atratividade para formigas cortadeiras por distintos tipos de óleos de soja. Estudou-se a possível atratividade ou repelência, dos seguintes óleos de soja: bruto degomado, clarificado e refinado; em dois substratos distintos, carbonato de cálcio granulado e fragmentos de papel filtro. Adicionalmente, análises químicas do óleo considerado mais atrativo foram realizadas com o intuito de verificar quais possíveis componentes possa ter interferido nessa seleção pelas formigas, para compreender a causa de seu carregamento e também verificar sua possível aplicação industrial na formulação de iscas tóxicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Colônias estudadas

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Laboratório de Insetos Sociais-Praga, Botucatu, São Paulo, Brasil. As rainhas foram coletadas na revoada em outubro de 2006, nas proximidades do Campus e foram mantidas em laboratório, em potes plásticos contendo 1 cm de gesso na base para a manutenção da umidade. Assim que essas colônias aumentavam em tamanho foram transferidas para potes maiores, também com gesso, interligados com tubos plásticos a dois outros recipientes, sem gesso, nas extremidades (câmara de forrageamento e de material exaurido). Foram fornecidas folhas de *Acalypha* sp. e *Ligustrum* sp. às colônias, e quando estas atingiram um volume de fungo aproximado de 500 mL, iniciou-se os experimentos.

Análise de atratividade

Para cada bioensaio foram utilizadas cinco colônias de *Atta sexdens rubropilosa,* sendo que 24 horas antes de se iniciar os experimentos, cessou-se o fornecimento de folhas.

Quatro tratamentos foram utilizados para avaliar a seleção das operárias. A testemunha foi o substrato não contendo óleo e os outros tratamentos foram impregnados com os diferentes óleos de soja: bruto degomado (tratamento 1), clarificado (tratamento 2) e refinado (tratamento 3). Além disso, para verificar o carregamento, esses inertes foram separados em placas de petri e marcados, com um pequeno ponto. Para o carbonato de cálcio granulado, utilizou-se diferentes tintas atóxicas (tratamento 1: amarelo; tratamento 2: rosa; tratamento 3: vermelho e tratamento 4: branco), já nos fragmentos de papel filtro, foram numerados os respectivos tratamentos utilizando grafite. Os inertes de carbonato de cálcio e papel filtro permaneceram em uma capela de exaustão por 30 minutos para que o material utilizado na marcação não interferisse na seleção do material pelas formigas. Posteriormente, o inerte de cada tratamento foi colocado em placas de Petri e totalmente imerso no óleo correspondente, durante cinco minutos, e depois foram secos com papel toalha.

Para cada experimento, os tratamentos foram oferecidos aleatoriamente na arena de forrageamento, 5 pellets de cada tratamento e quando um tratamento era totalmente carregado, bloqueava-se a arena e quantificava o carregamento, baseado na metodologia de Forti et al (1993). Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico ANOVA, a 5% de probabilidade.

Análises químicas

Os óleos utilizados foram fornecidos pela empresa Granol Indústria Comércio e Exportação S/A (São Paulo, SP, Brasil) (Tabela 1), foram feitas análises químicas da acidez, umidade e sabões presentes nos distintos óleos.

TABELA 1. ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS DE SOJA (DATA DE FABRICAÇÃO E ANÁLISE: 25/04/2007).

Óleo de soja	Acidez, expressa em ácido oléico - método AOCS Ca-40 (%)	Umidade/voláteis –método AOCS Ca 2d-25 (%)	Sabões – método AOCS Cc 17-19 (ppm)
Bruto degomado	0,60	0,19	18
Clarificado	0,028	0,03	0
Refinado	0,07	0,02	0

Para o óleo mais carregado pelas operárias realizou a análise da constituição do óleo em relação aos ácidos graxos livres (compostos voláteis) por Micro Extração em Fase Sólida (SPME) e a constituição dos triglicerídeos por reação de transesterificação.

Assim, em relação aos compostos voláteis, o óleo de soja, foi acondicionado em um frasco com tampa e deixado por 30 minutos a temperatura constante de 21,0 ± 0,1ºC. Ao fim deste período foi introduzida a seringa de SPME, com o revestimento carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB), 65 µm de espessura, no espaço de cabeça do frasco, a qual permaneceu no frasco durante 45 min.

Em seguida a seringa foi injetada em aparelho de Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG-MS), QP5000 Shimadzu, equipado com uma coluna HP5 30 m, 0,25 mm de diâmetro, modo de injeção splitlles, gás de arraste N_2. Sendo as condições de injeção: temperatura do injetor 250 ºC, 50 ºC/1min, 5 ºC até 150 ºC, 10 ºC e até 260 ºC 10 min. Os dados foram analisados pelo software CLASS 5000.

Visando identificar os ácidos graxos, o óleo de soja bruto degomado foi derivatizado com soluções de Fluoreto de Boro e Metanol, posteriormente, foi realizada a extração líquido-líquido. Separaram-se, portanto os ésteres dos radicais através de um rotoevaporador. A solução foi injetada em CG-MS. Uma solução com padrões de hidrocarbonetos foi injetada para possibilitar a identificação dos constituintes voláteis através do índice de retenção de Kovats.

Para verificar uma possível reação na formulação do óleo mais carregado com o princípio ativo utilizado atualmente no mercado (formulação das iscas), analisou a reatividade de sulfluramida e do óleo de soja, sendo realizados ensaios com misturas de ambos nos tempos 1, 6 dias a frio e com aquecimento na temperatura de 80 ^{o}C por 1 hora, realizando a análise em espectro de IV.

RESULTADOS

Os inertes contendo óleo de soja bruto degomado (tratamento 1), foram os mais carregados nos dois experimentos, e em ambos os testes, a testemunha foi o menos carregado. Para o veículo carbonato de cálcio ($F = 23,39$ e $p = 0,0001$) (Figura 1A) em comparação do tratamento 1 com os demais, este foi o mais carregado, e entre os outros tratamentos não ocorreu diferença significativa. No segundo experimento, utilizando fragmentos de papel filtro ($F = 15,85$ e $p = 0,0001$) (Figura 1B), o óleo clarificado (tratamento 2) também diferiu do óleo bruto degomado (mais carregado) e da testemunha (menos carregado).

Comparando os dois inertes (carbonato de cálcio e fragmentos de papel filtro) utilizados para avaliar a atratividade dos diferentes óleos, não se verificou diferença significativa (p = 0,939) no carregamento desses inertes.

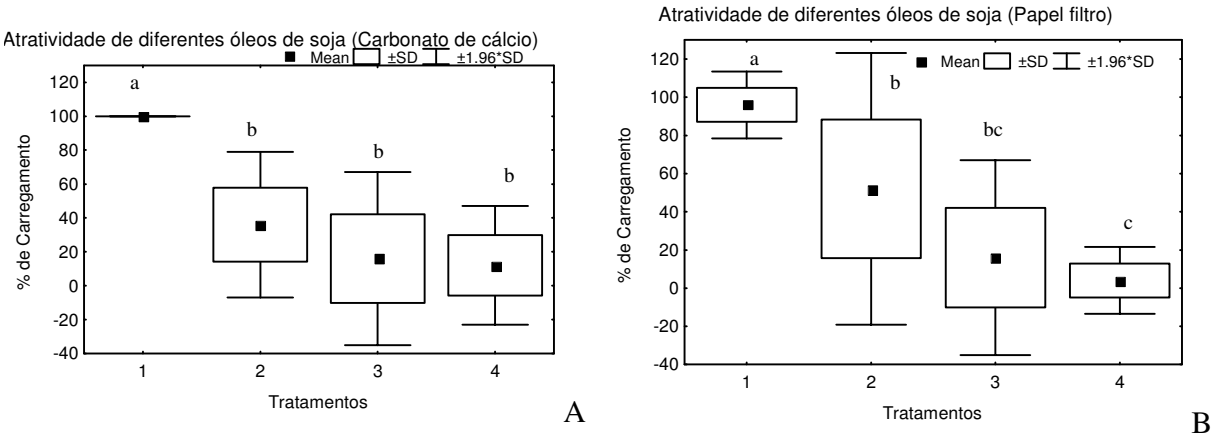


Figura 1. Média e desvio padrão dos tratamentos aplicados para verificar a atratividade dos diferentes óleos de soja por meio de dois inertes para operárias de *A. sexdens rubropilosa*: A. carbonato de cálcio e B. papel filtro. (Legenda: 1. óleo bruto degomado; 2. óleo clarificado; 3. óleo refinado e 4. testemunha).

Após 24 horas foi avaliada a incorporação do material e verificou-se que o carbonato de cálcio granulado foi incorporado integralmente, ou seja, as operárias não fragmentaram o produto. Os fragmentos de papel filtro, contendo óleo de soja bruto degomado na maioria foram integralmente incorporados, porém, alguns foram mais fragmentados para serem incorporados ao fungo simbionte. A devolução após esse período também foi observada, para ambos inertes estudados, apenas a testemunha exibiu pellets devolvidos na arena de lixo.

No estudo químico, foram realizadas as análises com o óleo bruto degomado, considerado o mais atrativo, devido a 100% de carregamento por operárias de *Atta sexdens rubropilosa.* Isso permitiu identificar misturas de ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeias longas. Através da reação de transesterificação dos triglicerídeos e técnica de micro extração de fase sólida (SPME), foi possível observar esses compostos (Tabela 2 e Tabela 3).

TABELA 2. NOME DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO BRUTO DEGOMADO IDENTIFICADOS NO CROMATOGRAMA.

Pico	Compostos identificados por CG-MS	Ácido Correspondente	Nome comum
1	Dodecanoato de metila	Dodecanóico	Láurico
2	Tetradecanóico de metila	Tetradecanóico	Miristico
3	Hexadecanoato de metila	Hexadecanóico	Palmítico
4	Ácido hexadecanóico	Hexadecanóico	Palmítico
5	ZZ 9,12-octadecadienoato de metila	ZZ 9,12-octadecadienóico	Linoléico
6	E -Octadecenoato de metila	E –Octadecenóico (trans)	Eláidico
7	Z - Octadecenoato de metila	Z –Octadecenóico (cis)	Oléico
8	Octadecanoato de metila	Octadecanóico	Esteárico

TABELA 3. SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS PRESENTES NO ÓLEO DE SOJA BRUTO DEGOMADO E SEUS TEMPOS DE RETENÇÕES.

Pico	Tempo retenção	Substância
1	30,376	C23 tricosano
2	39,668	C31 untriacontano

Ao verificar a reatividade de sulfluramida e o óleo de soja bruto degomado, foram obtidos os espectros de IV do óleo puro e da sulfluramida pura como padrões. A análise do espectro de IV do óleo de soja degomado (Figura 2) indica a presença dos picos característicos de triglicerídeos: 3008 cm^{-1} característico das ligações C-H de carbonos sp^2 e 2924, 2853 cm^{-1} de C-H de carbonos sp^3, 1746 cm^{-1} (a mais relevante para a análise comparativa) intensa de C=O (carbonila), 1656 cm^{-1} fraca de C=C (duplas ligações carbono-carbono), 1237 e 1163 cm^{-1} de C=O-O (ésteres).

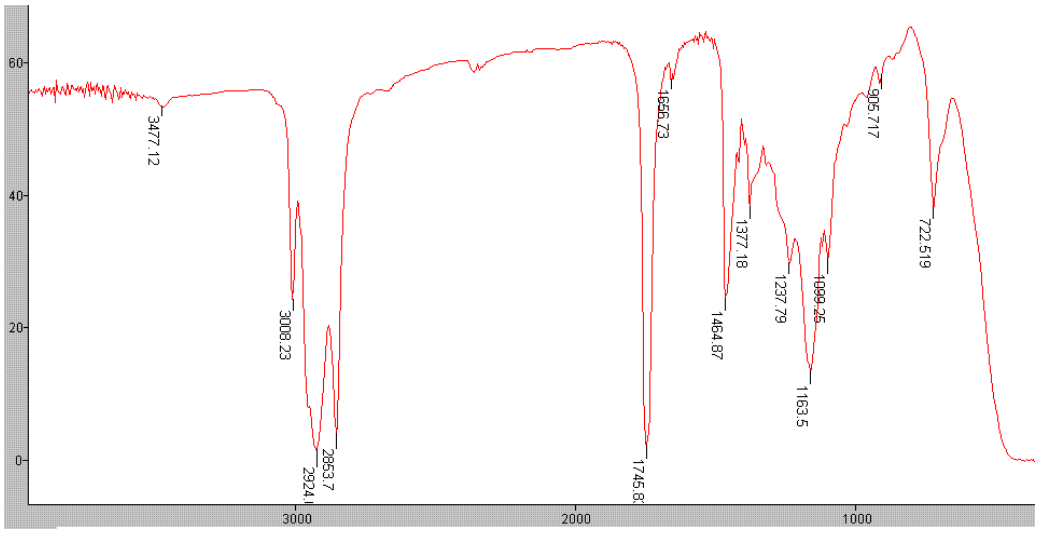


Figura 2. Espectro de IV do óleo de soja degomado.

A análise do espectro de IV da sulfluramida (Figura 3) indica a presença dos picos característicos das funções presentes na mesma: 3310 cm^{-1} característico das ligações N-H, 2980, 2867 cm^{-1} de C-H de carbonos sp^3, 1635 cm^{-1} C-N-H, 1369 e 1127 cm^{-1} (as mais relevantes para a análise comparativa) S=O (sulfóxido).

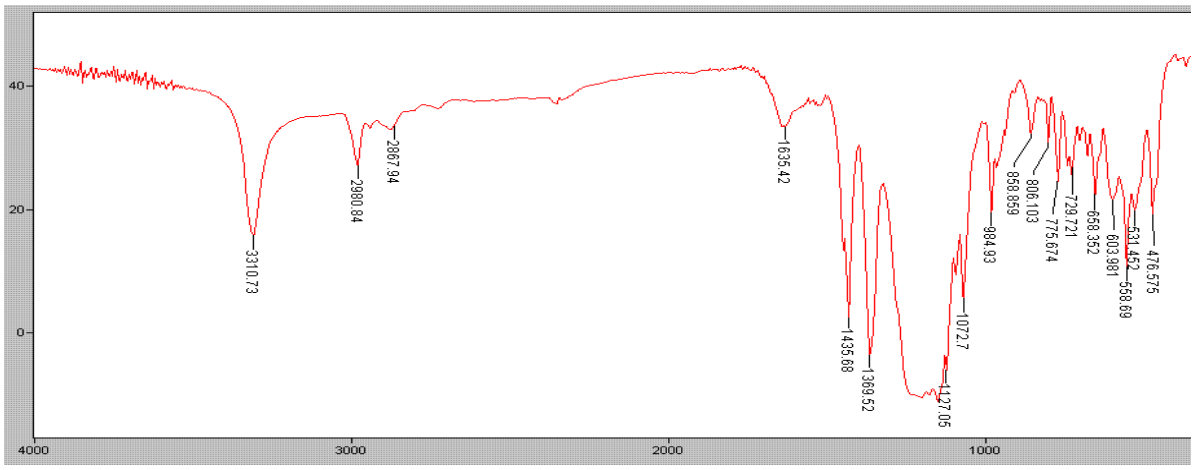


Figura 3. Espectro de IV da sulfluramida.

A análise do espectro da mistura após aquecimento (Figura 4) mostra além das bandas dos compostos presentes na mistura inicial, indicadas acima, com redução da intensidade da banda em 1739 cm^{-1} indicando a transformação da carbonila de ester (triglicerídeo) quando em contato com a sulfluramida. O aparecimento das bandas largas, entre 2000 a 3500 cm^{-1} e 1653 cm^{-1}, esta última com intensidade maior que aquela do ester 1739 cm^{-1}, indica a hidrólise do triglicerídeo formando ácido carboxílico livre.

A análise dos espectros de infravermelho (Figuras 5 e 6) indica que ocorre a reação de hidrólise a frio no primeiro dia em pequena proporção, uma vez que a intensidade das bandas dos ácidos são fracas e que há um aumento na concentração após 6 dias de contato, porém menor que aquela sob aquecimento. A temperatura usada no aquecimento foi próxima daquela usada para autoclavar (esterelizar) as iscas, e indicou a possível presença de grande quantidade de ácidos graxos livres nas iscas.

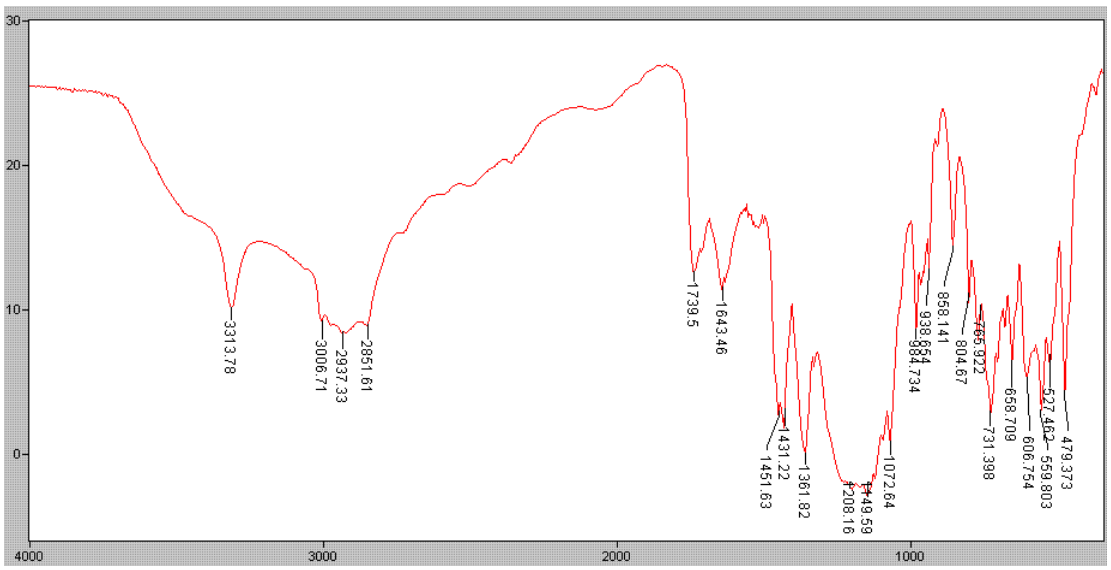


Figura 4. Espectro de IV da mistura de óleo de soja degomado e solução de sulfluramida (1:1) aquecida a 80 ^{o}C.

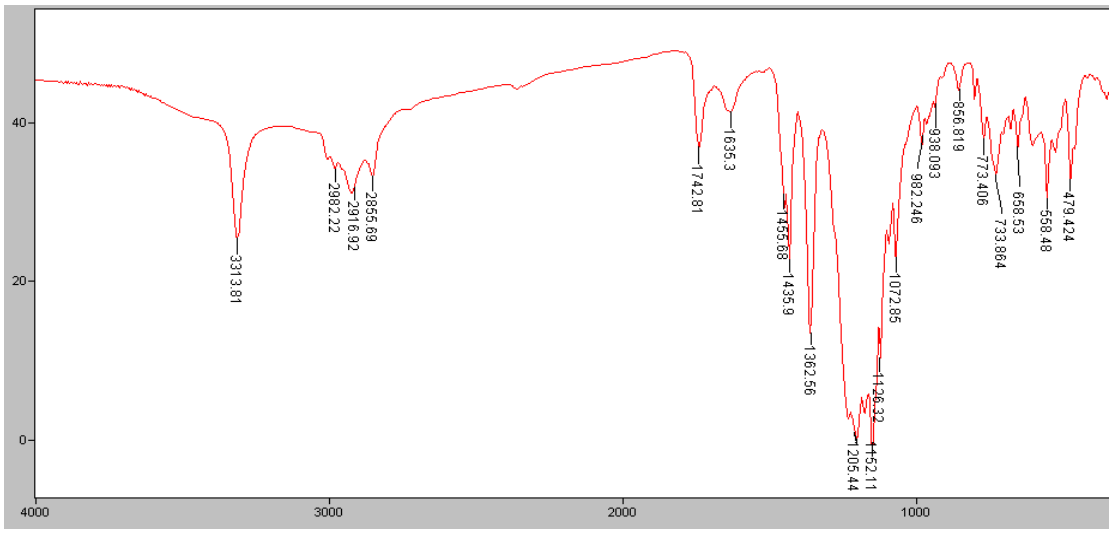


Figura 5. Espectro de IV da mistura de óleo de soja degomado e solução de sulfluramida (1:1) após 1 dia de contato a frio.

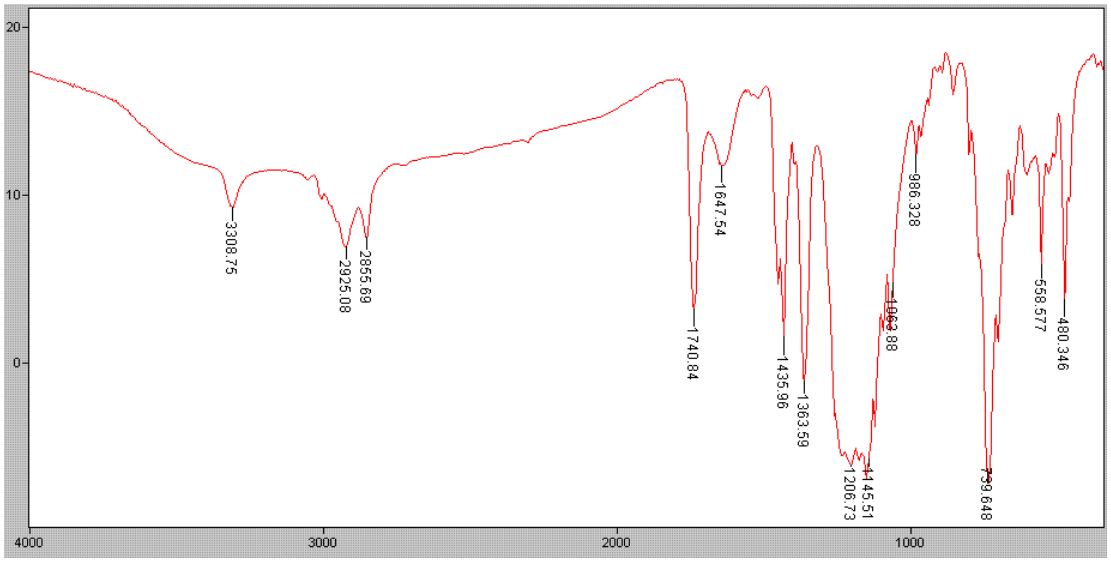


Figura 6. Espectro de IV da mistura de óleo de soja degomado e solução de sulfluramida (1:1) após 6 dias de contato a frio.

DISCUSSÃO

As operárias da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* demonstraram claramente a preferência pelo óleo bruto degomado, esse carregamento ocorreu devido a presença de substâncias atrativas, tais como: misturas de ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeias longas, identificados nesse óleo e que podem ter auxiliado na atratividade desse substrato.

A presença de hidrocarbonetos no óleo mais carregado pode ter desencadeado um reconhecimento desse material, como os insetos o fazem em sua comunicação levando-os a carregar os inertes impregnados com esse óleo. Sabe-se que em insetos sociais a comunicação química desempenha um papel importante, como a discriminação ou reconhecimento de indivíduos na colônia (Wilson, 1971). Os compostos presentes na cutícula externa de formigas desempenham além do papel fundamental para o reconhecimento das colônias, é utilizado na comunicação entre os membros (Howard e Blomquist, 2005). Robinson e Cherrett (1974), estudando *Atta cephalotes* também explorando esse reconhecimento químico investigaram a possibilidade da utilização da atração de formas jovens às operárias para incrementar a atratividade de iscas granuladas no controle de pragas.

O hentriacontano (C31) foi um dos hidrocarbonetos identificado no óleo bruto degomado e que pode ter contribuído para a alta taxa de carregamento. Chippendale (1978) postulou que os insetos utilizam essas substâncias para aumentar seu tempo de sobrevivência ou aumentar a

fertilidade, talvez no presente trabalho explique a sua possível atratividade. Porém, não só a presença de uma substância pode ter contribuído para os resultados obtidos, mas sim a interação, ou a presença de várias delas.

O presente estudo verificou a atratividade de diferentes óleos de soja, mas caso os mesmos fossem ofertados repetitivamente talvez fosse observada uma resposta deterrante no carregamento dos inertes como nos estudos de Salatino et al. (1998). Esses autores observaram que constituintes de ceras epicuticulares de *Didymopanx vinosum* na atividade de forrageamento, com a mesma espécie, *Atta sexdens rubropilosa*, verificaram uma taxa de carregamento de 66% de C30 quanto comparado com C28 e C12, cuja porcentagem foi de 22 e 12% respectivamente, sendo considerado esses tratamentos deterrantes apenas após a quinquagésima apresentação.

Os resultados obtidos por Salatino et al. (1998), podem ser explicados, pois o desenvolvimento adequado do fungo simbionte depende da diversidade de plantas forrageadas (Mudd et al., 1978; Stradling, 1978; Camargo et al., 2003), sendo o desenvolvimento do fungo simbionte inibido quando o substrato provém de apenas uma espécie de planta (Boaretto et al, 1999; Michels et al, 2001). Nos bioensaios realizados com os distintos óleos, esse fato foi desnecessário já que atendeu aos requisitos básicos para a eficiência no carregamento de uma isca tóxica, como a atratividade e não ocorrer rejeição inicial. Esse material não seria ofertado em muitas apresentações para efetuar o controle, assegurando, portanto a atratividade do produto.

Neste trabalho, verificou-se um intenso recrutamento ao óleo bruto degomado comparado com os demais tratamentos, pois talvez esse material contenha nutrientes importantes para o desenvolvimento do fungo simbionte dessas operárias. Assim, as formigas cortadeiras são capazes de distinguirem odores e substâncias químicas como proposto por Littledyke e Cherrett (1978), utilizam o odor aprendido, (Roces, 1990) e a experiência individual (Lopes et al., 2004) e aumentam o recrutamento das operárias forrageiras para fonte com maior taxa de nutrientes (Roces, 1994).

Observa-se, portanto que as operárias detectam mais rapidamente os fatores químicos dos substratos do que os físicos e são importantes no ato de rejeição (Verza et al., 2007). Porém neste caso, apenas alguns inertes de testemunha foram rejeitados posteriormente (24 horas), mas provavelmente não foi o fator físico que influenciou, pois os inertes que continham óleo foram carregados e após 24 horas já estavam totalmente incorporados no fungo simbionte. Possivelmente

isso pode ter ocorrido devido ao baixo valor de nutrientes e ausência de atrativos como substrato para o desenvolvimento do fungo simbionte.

O que pode ser destacado também, é que os inertes ofertados foram incorporados ao fungo simbionte sem obedecer todo o repertório comportamental na preparação e incorporação do substrato como já descrito para essa espécie (por exemplo, Andrade et al., 2002), isso provavelmente ocorreu devido ao tamanho dos veículos fornecidos, tamanho em que os substratos são incorporados ao fungo simbionte (Weber, 1956). Para Verza et al (2007), esse tipo de incorporação também pode se enquadrar como atípica já que os substratos não foram trabalhados e sim incorporados diretamente.

Apesar de não ocorrer todo o processamento do substrato, como o repertório comportamental que se observa na superfície do fungo: segurar a isca; lamber a isca; repicar a isca; mastigar os fragmentos; mastigar e preguear os fragmentos e incorporar os fragmentos, o material deve ser considerado como atrativo, pois os inertes contendo os óleos carregados foram na maioria incorporados integralmente e pode-se verificar tufos de hifas do fungo simbionte sobre os substratos. No caso dos fragmentos do papel filtro alguns inertes foram repicados, assim a dureza do material pode ser um fator, pois o carbonato de cálcio talvez dificultasse esse comportamento.

Atualmente o óleo de soja refinado (tratamento 3) é o utilizado pelas indústrias para o controle químico com iscas tóxicas, provavelmente ele contribui apenas na solubilização do ingrediente ativo, não interferindo na atratividade do produto conforme já sugerido anteriormente (Nagamoto, 1998; Nagamoto et al. 2004).

Mas, o óleo bruto degomado pode contribuir na atratividade de iscas tóxicas, devido a presença de alguns compostos. Adicionalmente, nesse trabalho, o óleo ao ser formulado juntamente com um dos princípios ativos, presente no mercado, ocorre a liberação de ácidos graxos, que de acordo com Penaflor et al. (2006), diversos deles podem ter ação inseticida sobre as formigas ou ao seu fungo simbionte. Porém, sua utilização pode ser imprópria devido a sua rápida deteriorização. Estudos mais detalhados podem avaliar se a presença desse componente na formulação das iscas fará com que as mesmas continuem atendendo aos requisitos básicos para a eficácia do produto, podendo ainda incrementar na atratividade e na toxicidade.

Assim, o óleo bruto degomado quando comparado com outros óleos em diferentes graus de refinação (clarificado e refinado) é o mais atrativo para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, este fato é devido a substâncias presentes no mesmo, contudo, mais estudos são necessários para

confirmar o que confere essa atratividade. Em formulações de iscas, esse óleo pode exercer uma possível ação de atratividade para a espécie estudada.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.P.P., FORTI, L.C., MOREIRA, AA., BOARETTO, M.A.C., RAMOS, V.M., e MATOS, C.A. 2002. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. Socio, v. 40, p. 293-306.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 482, de 23 de setembro de 1999. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 13 de outubro de 1999, republicada em 20/06/2000.

BASS, M. e CHERRETT, J.M. 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens.* Physiol. Entomol., London, v. 20, n. 1, p. 1-6.

BELLAVER, C. e SNIZEK, P.N. Jr. 1999. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. In: Congresso Brasileiro de Soja, 1999, Londrina. Anais do I Congresso Brasileiro de Soja. Londrina-PR : Embrapa soja documentos, 1999. v.1, p.183-198.

BOARETTO, M.A. e FORTI, L.C. 1997. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Série Técnica, IPEF, v.11, n. 30, p. 31-46.

BOARETTO, M.A., FORTI, L.C., e FENILLE, R.C. 1999. Efeito de extratos de gramíneas forrageiras no crescimento do fungo simbionte de *Atta capiguara* Gonçalvez (Hymenoptera: Formicidae). Naturalia v.24, p. 37-39

CAMARGO, R.S., FORTI, L.C., MATOS, C.A.O., LOPES, J. F., ANDRADE, A.P.P., e RAMOS, V.M. 2003. Post-selection and return of foraged material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera : Formicidae). Socio, v. 42, n. 1, p. 93-102.

CARLOS, A.A., FORTI, L.C., VERZA, S.S., CAMARGO, R.S., CARDOSO, S.R.S., e BARBIERI, R.F. 2007. Atratividade de diferentes polpas cítricas para *Atta sexdens rubropilosa.* XVIII Simpósio de Mirmecologia, Resumo Expandido 028.

CHIPPENDALE, G.M. 1978. The function of carbohydrates in insect life processes. In: ROCKSTEIN, G. M. Biochemistry of insects. New York Academic Press, p. 2-54.

ETHERIDGE, P. e PHILLIPS, F.T. 1976. Laboratory evaluation of new insecticides and bait matrices for the control of leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae). Bull. Entomol. Res., v. 66, p. 569-578.

FORTI, L.C., DELLA LUCIA, T.M.C., YASSU, W.K., BENTO, J.M.S., e PINHÃO, M.A.S. 1993 Metodologias para experimentos com iscas granuladas para formigas cortadeiras. In: As formigas cortadeiras: p. 191-211.

FORTI, L.C., NAGAMOTO, N.S., e PRETTO, D.R. 1998. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. In: Anais do Simpósio sobre formigas cortadeiras dos países do Mercosul:p. 113-132.

FORTI, L.C., PRETTO, D.R., NAGAMOTO, N.S., PADOVANI, C.R., CAMARGO, R.S., e ANDRADE, A.P.P. 2007. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Socio., v. 50, n. 3, p. 1149-1163.

FOWLER, H.G. e ROBINSON, S.W. 1979. Foraging by Atta sexdens (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste and efficiency. Ecol. Entomol., v. 4, p. 239-247,

GAIOTTO, J.B. 2004. Determinação da energia metabolizável de gorduras e sua aplicação na formulação de dietas para frango de corte. 82f. Tese (Doutorado em Agronomia/Ciência Animal e Pastagens)Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

HOWARD, R.W. e BLOMQUIST, G.J. 2005. Ecological, behaviour, and chemical aspects of insects hydrocarbons. Annu. Rev. Entomol, v.50, p.371-393.

HÖLLDOBLER, B. e WILSON, E.O.1990. The ants. Cambrigde:Havard University Press.732p.

HUBBEL, S.P. e WIENER, D.F. 1983. Host plant selection by an Attine ant. In: JAISSON, P. (Ed). Social insects in the tropics. Paris: University of Paris Press, v.2, p. 157-163.

LITTLEDYKE, M. e CHERRETT, J.M. 1978. Olfactory responses of the leaf-cutting ants *A. cephalotes* L) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera: Formicidae) in the laboratory. Bull. Entomol. Res., v. 68, p. 273-282.

LOPES, J.F.S., FORTI, L.C., e CAMARGO, R.S. 2004. The influence of the scout upon the decision-making process of recruited workers in threee *Acromyrmex* species. Behav**.** Processes, v. 67, p. 471-476.

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

MICHELS, K., CROMME, N., GLATZLE, A., e SCHULTZ-KRAFT, R. 2001. Biological control of leaf-cutting ants using forage grasses: Nest characteristics and fungus growth. J. Agron. Crop. Sci., v.187, p.259-267.

MUDD, A.D.J., PEREGRINE, D.J., e CHERRETT, J.M. 1978. The chemical basis for the use of citrus pulp as a fungus garden substrate by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich.) (Hymenoptera: Formicidae). Bull. Entomol. Res., v. 68, p. 673-685.

MUELLER, U.G., CURRIE, C.R., ADAMS, R.M.M., e MALLOCH, D. 2001. The origin of the attine ant-fungus symbiosis. Q. Rev. Biol., v. 76, p. 169-197.

MUELLER, U.G., SCHULTZ, T., CURRIE, C., ADAMS, R., e MALLOCH, D. 2002.Ant versus Fungus versus mutualism ant-cultivar conflict and the desconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. Amer. Nat., v. 160, p. 568-598.

NAGAMOTO, N.S. 1998. Metodologia para seleção de inseticidas visando confecção de iscas tóxicas para formigas cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae).1998. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

NAGAMOTO, N.S., FORTI, L.C., ANDRADE, A.P.P., BOARETTO, M.A.C., e WILCKEN, C.F. 2004. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). Socio, v. 44, n. 2, p. 413 – 432.

NAGAMOTO, N.S., FORTI, L.C., e 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 Sc., v. 80, n. 1, p. 9-13.

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

PENAFLOR, M.F.G.V, VICTOR, S.R., BUENO, O.C., HEBLING, M.J.A., PAGNOCCA, F.C., LEITE, A.C., FERNANDES, J.B., VIEIRA, P.C., e SILVA, M.F.G.F. 2006. Toxicity of straight-chain fatty acids to leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Socio, v.47, n.3, 843-858.

QUINLAN, R.J. e CHERRETT, J.M.1979. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). Ecol. Entomol., v. 4, p 151-160.

ROBINSON, S.W. e CHERRETT, J.M. 1974. Laboratory investigations to evaluate the possible use of pheromones of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Formicidae: Attini) as a component in attractive bait. Bull. Entomol. Res., v.63, n.3, p.519-529.

SALATINO, A., SUGAYAMA, R.L., NEGRI, G., e VILEGAS, W. 1998. Effect of constituents of the foliar wax of *Didymopanax vinosum* on the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa.* Entomologia Experimentalis et Applicata, v.86, p. 261-266.

STRADLING, D.J. 1978. Food and feeding habits of ants. In: BRIAN, M.V. (ed.) Production ecology of ants and termites. Cambridge: Cambridge University Press, p.81-106.

RIBEIRO, A.P B., SOARES, M.S., MOURA, J.M.L.N., CACERES, M.C., e GONÇALVES, L.A.G. 2005. Aplicações da tecnologia de membranas no processamento de óleos vegetais. Boletim do Centro de Pesq. e Proc. de Alimentos, v. 23, n. 1, p.1-22.

ROBINSON, S.W. 1979. Leaf-cutting ant control schemes in Paraguay, 1961-1977. Some failures and some lessons. Pans: Pest Art. N. Summaries, 25, p.386-390.

ROCES, F. 1990. Olfactory conductioning during the recruitment process in leaf-cutting ant. Oecologia v.83, p.261-262.

ROCES, F. 1994. Odour learning and decision-making during food collection in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundi*. Insectes Soc., v. 41, p. 235-239.

VERZA, S.S., FORTI, L.C., MATOS, C.A.O., GARCIA. M.G., e NAGAMOTO, N.S. 2006. Atractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Sócio., v. 47, n.2, p. 391-399.

VERZA, S.S., FORTI, L.C., LOPES, J.F.S., CAMARGO, R.S., e MATOS, C.A.O. 2007. Influence of physical and chemical factors during foraging and culture of the symbiont fungus in Atta sexdens rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae). Insect Sci., v. 14, p. 295-300.

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

WEBER, N.A. 1972. Gardening ants: the attines. Philadelphia: Memoirs of the American Philosophical Society, 146p.

WILCKEN, C.F. e BERTI FILHO, E. 1994. Controle biológico de formigas cortadeiras. In: Anais do III Curso de atualização no controle de formigas cortadeiras. 1-5p. ESALQ, 1994.

WILSON, E.O.1971. The insect societies. Cambridge: Harvard University. 548p.

CAPÍTULO III: PRESENÇA DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM COLÔNIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* APÓS O PROCESSAMENTO DE ISCAS TÓXICAS

Folia Microbiologica

RESUMO

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* possuem uma relação de simbiose com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus,* promovendo o seu crescimento e livrando-o de possíveis competidores. No presente estudo, observou-se a presença de fungos filamentosos em cada câmara das colônias: forrageamento, jardim de fungo e lixo; após as mesmas serem submetidas ao controle químico com iscas tóxicas. Para tal, testou-se em colônias da formiga cortadeira, *Atta sexdens rubropilosa* iscas granuladas contendo sulfluramida como princípio ativo. Após 72 horas, as culturas fúngicas desenvolveram-se significativamente e foi realizada a observação em microscópio óptico para a identificação e escolha do material a ser isolado. Assim, foi realizado o isolamento e após sete dias, foram isoladas noventa e três linhagens de fungos, sendo três micélios

estéreis. Identificou-se sete isolados até gênero e treze espécies. Os dados foram submetidos ao teste do Qui-quadrado a 5% de significância e a freqüência relativa dos fungos filamentosos foi estimada. *Penicillium* sp. (25,80%) esteve presente em todos os tratamentos que continham polpa cítrica exceto no veículo (carbonato de cálcio). Dentre as câmaras das colônias não ocorreu diferença significativa ($p > 0.4182$) na presença desses fungos. Existe uma constante assepsia pelas operárias do material a ser forrageado, no jardim de fungo, e no lixo, entretanto, as colônias são locais de potenciais microrganismos oportunistas e competidores. Assim, como já observado em outros estudos, quando ocorre um desequilíbrio nas colônias, fungos filamentosos desenvolvem-se, este fato, no controle químico, com iscas tóxicas, portando esses microrganismos pode favorecer na eficiência desse controle.

INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae: tribo Attini) mantêm uma simbiose com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus.* O mutualismo obrigatório da tribo Attini originou-se a aproximadamente 50 milhões de anos (Mueller, 2001; Schultz e Brady, 2008).

As operárias consomem uma pequena porcentagem desse fungo, sendo a maior parte oriunda das folhas cortadas para o fornecimento como substrato para o crescimento de seu simbionte (Bueno et al. 2008). Segundo Weber (1972), o fungo produz na extremidade de suas hifas uma estrutura denominada gongilídeo, cujas larvas dessas formigas utilizam como uma fonte primária de nutrientes. No entanto, caso o suprimento de folhas seja mais escasso, as operárias consomem mais *staphyla* (i.e. conjunto de gongilídeos), podando os fungos para que essas

estruturas se desenvolvam (Bass, 1997). Devido a essa relação, estas formigas são consideradas os herbívoros mais bem sucedidos, cortando uma vasta diversidade de plantas nativas e cultivadas (Hölldobler e Wilson, 1990).

Além disso, o sucesso evolutivo das formigas cortadeiras ocorre graças a alguns processos envolvidos como a divisão de tarefas e a diferenciação de castas morfológicas, comportamentais e/ou fisiológicas que auxiliam na nidificação, contribuem também para a grande diversidade de espécies forrageadas que reflete na quantidade de habitats, trazendo assim também um sucesso ecológico (Wilson, 1987).

As formigas cortadeiras dispõem de barreiras contra microrganismos que possam intervir no crescimento de seu simbionte, sendo secreções de glândulas como a mandibular e metapleural, além de comportamentos das operárias no processamento desse substrato, desde o carregamento até a incorporação, grooming e limpeza na superfície do fungo. Sendo assim, ocorre assepsia cuidadosa do material a ser incorporado, proporcionando um desenvolvimento adequado ao fungo simbionte (Schildknecht e Koob, 1970; Andrade et al., 2002; Marsaro Júnior et al. 2001; Fernandez-Marín et al., 2006; Rodrigues et al. 2008).

Existem alguns estudos sobre a presença de fungos filamentosos em colônias de formigas cortdeiras, Möeller (1941), em jardins de *Acromyrmex* sp, sem operárias, verificou a presença de *Mucor* sp, *Rizopus* sp e *Aspergillus* sp. Nestas mesmas condições, Kreisel (1972) *apud* Rodrigues (2004), relatou a presença de *Escovopsis* sp., além deste, *Cunninghamella* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp.

Em jardins de fungo de *Acromyrmex heyeri,* Luciano et al. (1995), isolaram *Aspergillus* sp*., Penicillium* sp. *e Nigrospora* sp. Fisher et al. (1996), em estudos com *Atta cephalotes*

identificaram vários outros fungos filamentosos, que possivelmente tiveram origem do substrato ou da cutícula das formigas.

Após estresse com iscas inseticidas a base sulfluramida e hidrametilnona em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas no laboratório, Rodrigues (2004) e Rodrigues et al. (2005) identificaram diversos fungos, dentre eles, os mais freqüentes foram *Escovopsis weberi*, *Syncephalastrum racemosum* e *Trichoderma harzianum.* Esses autores sugeriram a hipótese de que microrganismos possuem seu desenvolvimento favorecido, com o desequilíbrio do mutualismo obrigatório existente entre as formigas cortadeiras e seu simbionte *Leucoagaricus gongylophorus.*

Assim, para aumentar o conhecimento sobre a presença e desenvolvimento desses microrganismos nas colônias que se encontram em desequilíbrio, o presente trabalho realizou um levantamento de fungos filamentosos que cresceram em ninhos de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa*, após os mesmos serem submetidos ao controle com diversas iscas tóxicas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (Unesp), Laboratório de Insetos Sociais-Praga, Botucatu, São Paulo, Brasil. As rainhas foram coletadas na revoada em Outubro de 2006, onde foram mantidas em laboratório sob condições de 24 ± 1ºC de temperatura e 70 ± 10% de umidade relativa. Essas colônias foram mantidas em potes plásticos contendo gesso na arena do fungo, interligados com tubos plásticos a dois outros recipientes nas extremidades (câmara de forrageamento e material exaurido). Foram utilizadas folhas de *Acalypha* sp. e *Ligustrum* sp. para a manutenção e desenvolvimento das colônias e quando elas atingiram um volume de fungo aproximado de 300 mL iniciou-se os experimentos.

No presente estudo testou-se em sete colônias, 7 tratamentos (0,500 g para cada repetição): testemunha (1); veículo (2); isca tóxica 1 (3); princípio ativo, sem óleo (4); princípio ativo, com óleo de soja bruto degomado (5); isca tóxica 2 (6) e isca tóxica 3 (7). A partir dessas amostras observou-se a prevalência de fungos filamentosos nesse material. Nos tratamentos 1, 2, 4 e 5 utilizou-se um novo veículo no lugar da polpa cítrica: carbonato de cálcio granulado (10,33g para cada tratamento). Os tratamentos 3 e 6 foram iscas tóxicas, sendo o princípio ativo sulfluramida, de diferentes lotes, fornecidas pela empresa Atta Kill Ltda, o 7 também, porém ele difere destes por ser confeccionado com o reaproveitamento de polpas utilizadas no processo de pelletização.

A testemunha foi composta de carbonato de cálcio granulado e polpa cítrica, sendo o tratamento 2 apenas o veículo. No tratamento 4, além dos componentes do tratamento 1, adicionou-se sulfluramida (0,0370g) diluída em álcool etílico absoluto. Posteriormente, nesse tratamento o material permaneceu durante 24 horas em uma capela de exaustão para evaporação total do álcool. No tratamento 5, além do princípio ativo (0,0370g) e álcool etílico, foi adicionado 2 mL de óleo de soja bruto degomado, sendo também realizada a secagem do material. Assim como a testemunha, os tratamentos 4 e 5 foram envolvidos em 4,75g de polpa cítrica industrial moída e peneirada para assegurar a atratividade do material.

Após 72 horas, os fungos já haviam crescido significativamente e foi realizada a observação em microscópio óptico para a identificação dos gêneros de fungos filamentosos encontrados. Posteriormente, foi realizado o isolamento em placas de Petri contendo meio BDA retirando-se uma pequena porção do micélio, contendo esporos dos fungos, com uma agulha. As placas foram mantidas em uma câmara de temperatura controlada (BOD), a 24 ºC no escuro. Após 7 dias, as culturas já apresentaram crescimento significativo e foram observadas em microscópio óptico, para verificar os gêneros isolados.

Coletou-se amostras de 28 colônias e suas respectivas arenas (forrageamento, jardim de fungo e lixo), sendo sete tratamentos ofertados a quatro repetições. As identificações foram realizadas seguindo os critérios propostos na literatura (Alexopoulos et al. 1996; Barnett, 1998 e Samson, 2000) considerando as características morfológicas (macro e microscópicas). Os isolados foram preservados pelo método de Castellani.

Os dados foram submetidos ao teste de Qui-quadrado a 5% de significância, considerando-se o somatório total da de fungos filamentosos por local (câmara) e tratamento com maior freqüência de ocorrência. Foi realizada a freqüência relativa (freqüência fúngica) com o somatório total de fungos por tratamento para verificar a distribuição desses microrganismos nos tratamentos.

RESULTADOS

Os tratamentos 1 e 2, não apresentaram alteração na atividade das colônias, os demais tratamentos atingiram mortalidade de 100% das operárias devido a intoxicação com iscas, após 168 horas (7 dias). Foram isoladas 93 linhagens de fungos, sendo alguns micélios estéreis. Ao todo foram identificadas treze espécies, e mais algumas foram identificadas até gêneros, sendo sete e já outras amostras não foram identificadas devido ao micélio ser estéril.

Entre os tratamentos ocorreu diferença significativa quanto a freqüência de ocorrência de fungos filamentosos. O tratamento 7 (sete espécies e quatro gêneros) apresentou maior número de espécies, porém em relação a freqüência de ocorrência ($p > 0,8273$) ele não diferiu dos demais, entretanto, o tratamento 2, apenas carbonato de cálcio, foi o que apresentou o menor valor de ocorrência ($p > 0.0046$) e somente quatro espécies foram identificadas. No tratamento 3, duas espécies foram observadas, e três gêneros em que as espécies não foram identificadas, sendo

Fusarium sp a mais representativa, porém também foi um tratamento com baixa freqüência de ocorrência ($p > 0.0164$) diferindo dos demais (Tabela 1).

Quanto à presença de fungos nas colônias, o jardim de fungo e o lixo apresentaram a mesma freqüência (36,56%) e a câmara de forrageamento com um menor número (26,88%), esse tipo de análise descritiva verificou a distribuição desses microrganismos nos tratamentos (Figuras 1, 2 e 3), porém a comparação de número de fungos filamentosos entre essas câmaras ($p > 0,41882$) não diferiram.

O fungo *Penicillium* sp. esteve presente em todos os tratamentos, exceto no tratamento 2, nas câmaras, de forrageamento (28%), jardim de fungo (20,59%) e lixo (29,41 %) foi o de maior prevalência, a freqüência de ocorrência não diferiu entre os locais da colônia ($p > 0.6870$), porém existe diferença em sua ocorrência nos tratamentos ($p > 0.0191$). *Acremonium butyri, Fusarium solani, Mucor circenelloides, Mucor stolonifer e Penicillium subgenus Aspergilloides* foram fungos com baixa freqüência relativa (1,07 %). Eles diferiram em relação a sua presença e ausência nos tratamentos, juntamente com *Escovopsis* sp., *Mucor racemosus, Rhizopus stolonifer* e *Trichoderma harzianum*, pois foram identificados em apenas um tratamento (Tabela 1).

DISCUSSÃO

O presente estudo sugere que fungos filamentosos presentes nas colônias ou oriundos do substrato fornecido, desenvolvem-se quando a simbiose encontra-se em desequilíbrio corroborando com os resultados encontrados por Rodrigues et al. (2005) Neste trabalho, foram testadas diferentes iscas tóxicas que ocasionaram a intoxicação das operárias. Com o número reduzido de operárias, barreiras que as mesmas fornecem como secreções das glândulas metapleural e mandibular (Marsaro Júnior et al, 2001; Fernandez-Marín et al., 2006; Rodrigues et

al., 2008), aliada aos comportamentos que inibem o desenvolvimento de microrganismos ficaram afetadas. Assim, devido ao baixo número de operárias e com o estabelecimento destes fungos ocorreu a morte total das colônias.

O fungo parasita do jardim de fungo das formigas cortadeiras, *Escovopsis* sp., esteve presente em duas colônias no tratamento 5, porém apenas se desenvolveu no jardim de fungo. Sabe-se, porém, que esse parasita especializado também pode ser encontrado no lixo de certas espécies de formigas cortadeiras (Bot et al. 2001). Os outros fungos, tais como, *Penicillium* sp. estiveram presentes nas mesmas colônias, mas em outras câmaras, portanto, possivelmente este fungo possui um desenvolvimento frágil quando existe a presença de outros microrganismos ou outros fungos não conseguem se desenvolver quando ele prevalece.

Assim como vários fungos isolados nesse trabalho, o gênero *Aspergillus* pode ser isolado do solo, água, vegetação, material em decomposição e ar, além de apresentar uma reduzida necessidade nutricional (Berchieri e Macari, 2000), as espécies desse fungo identificadas no presente estudo, apareceram em todas as câmaras, portanto, esporos desse fungo poderiam estar presentes no material fornecido as mesmas. Além disso, a presença desse fungo, bem como *Fusarium* sp, por exemplo, além dessas duas formas de origem, poderia ser oriundos das folhas oferecidas para a manutenção das colônias, já que os bioensaios ficaram 24 horas sem fornecimento de folhas tempo insuficiente para o aproveitamento e descarte do material (Weber, 1972). A predominância de *Penicillium* sp. que esteve presente em todos os tratamentos que continha polpa cítrica, menos no tratamento 2, provavelmente sugere que este foi oriundo das iscas contendo esse tipo de veículo, fato também observado por Rodrigues (2004) e Rodrigues et al. (2005).

Syncephalastrum racemosum, ao contrário de Rodrigues (2004), que encontrou maior incidência no jardim de fungo, provavelmente devido a esse fungo, utilizar os açúcares para crescerem e colonizarem o ambiente de maneira rápida (Alexoupoulos et al. 1996) e Fisher et al. (1996), que o encontrou apenas no lixo, no presente estudo ele foi encontrado em ambas as câmaras, porém com maior freqüência no lixo, o mesmo foi existente nos tratamentos que continham princípio ativo e naquele que consistia apenas de polpa cítrica.

As espécies de fungo de *Acremonium* sp., estiveram presentes em todos os tratamentos, exceto no 3, sendo que em 6 foi a maior freqüência e foi o único tratamento em que *Acremonium butyri* foi identificado. Em relação as câmaras das colônias de formigas cortadeiras, a presença foi maior no lixo. No tratamento 1, verificou-se a presença de esporos mas não a colonização e crescimento desse fungo.

Dentre as câmaras das colônias não ocorreu diferença significativa ($p > 0.4182$) na presença de fungos filamentosos. Existe uma constante assepsia pelas operárias do material a ser forrageado, no jardim de fungo, e no lixo, apesar de todo o controle de higiene realizado pelas operárias, portanto os esporos presentes nos locais de nidificação, nos substratos forrageados desenvolvem quando a simbiose sofre um desequilíbrio, sendo essas colônias locais de potenciais microrganismos oportunistas e competidores.

Assim, o que pode ser observado de uma maneira geral é que quando as colônias apresentaram um desequilíbrio, os fungos que ali se encontravam, agiram como oportunistas, colonizando e desenvolvendo-se, causando efeitos deletérios as colônias*Acremonium kiliense*, *Acremonium butyri, Acremonium* sp*, Aspergillus versicolor, Syncephalastrum racemosum, Fusarium* sp, *Moniliella* sp, *Penicillium* sp, não conseguiram colonizar nesses locais.

Comparando os tratamentos, o 2, que continha apenas carbonato de cálcio, foi o que apresentou o menor valor de ocorrência, pois os substratos oferecidos a esse grupo, era oriundo de apenas um componente, assim os fungos, poderiam ser provenientes dele ou das colônias. O tratamento 3, composto por isca tóxica, também diferiu do 2 e diferiu do restante, devido a sua baixa freqüência de ocorrência de fungos filamentosos, porém devido ao desequilíbrio causado na simbiose, a mortalidade das colônia que utilizaram esse material foi de 100%.

Do total de isolados obtidos no tratamento 7, apesar dele ter diferido dos outros tratamentos, um maior número de fungos filamentosos foram descritos, quatro gêneros e 9 até espécie, provavelmente isso pode ter sido devido ao tipo de formulação dessa iscas, onde é reaproveitada diversas polpas utilizadas no processo de pelletização e confeccionado esse material, talvez conferindo a uma maior contaminação por microrganismos.

Sugere-se, portanto, que os fungos oportunistas, se estabelecem quando ocorre um desequilíbrio, fato importante no controle químico, pois iscas contendo inseticidas, aliadas ao substrato com esse tipo de microrganismo provavelmente potencializa o controle de formigas cortadeiras. As diversas espécies de fungos encontradas podem ser benéficas no ponto de vista do controle químico. Fungos prejudiciais tanto para as formigas, quanto para o fungo simbionte podem ser aliados no controle dessas pragas agrícolas.

REFERÊNCIAS

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

Andrade A.P.P.; Forti, L.C.; Moreira, AA.; Boaretto, M.A.C.; Ramos, V.M.; Matos, C.A.: Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. *Socio.*, **40**, 293-306 (2000).

Barnett, H.L. e Hunter, B. E.: Illustred genera of imperfect fungi. 4th ed. Saint Paul: American Phytopalogical Society, 218p. (1998).

Bass, M. e Cherrett, J. M.: Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entomol*., **20** (1), 1-6 (1995).

Bass, M.: The effects of leaf deprivation on leaf-cutting ants and their mutualistic fungus. *Ecol. Entomol*., **22** (4), 384-389, (1997).

Berchieri, A.J.; Macari, M.: Enfermidades Micóticas, Doenças das Aves. FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas, São Paulo, 369 – 375 (2000).

Bot, A.N.M.; Currie, C.R.; Hait, A.G.; Boomsma, J.J.: Waste management in leaf-cutting ants. Ethology, Ecology & Evolution. *Florence*, **13** (3), 225-237, (2001).

Bueno, O.C.; Bueno, F.C.; Diniz, E.A.; Schneider, M.O.: Utilização de alimentos pelas formigas cortadeiras. In: Vilela, E. F.; Santos, I. A.; Schoereder, J. H.; Serrão, J. E.; Campos, L. A. O. and Lino-Neto, J. (eds.) Insetos Sociais da biologia à aplicação, 96-114, Editora UFV, Viçosa (2008).

Fernanez-Marín, H.; Zimmerman, J.K.; Rehner, S.A.: Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc. R. Soc. B*, **273**, 1689-1695 (2006).

Kreisel, H.: Pilze aus pilzäerten von *Atta insularis* in Kuba Zustschreft für Algemeine Mikobiologie. Berlin, **12**, (8), 643-654 1972 (1972). *apud* Rodrigues, A.: Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.2004.84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, (2004).

Luciano, H.M.; Diehl-Fleig, E.; Silva, M.E.: Organismos associados a uma colônia de Acromyrmex heyeri (Hymenoptera: Formicidae) mantidas em laboratório. *Acta Biol. Leopoldensia*, **17** (2), 47-56 (1995).

Fisher, P.J; Stradling D.J; Sutton, B.C.; Petrini, L.E.:. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant Atta cephalotes: a preliminary study. *Mycol. Res.*, **100** (5), 541-546.(1996).

Marsaro, A.L.Jr.; Della Lucia, T.M.C.; Barbosa, L.C.A.; Maffia, L.A.; Morandi, M.A.B.: Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea. Pres. Fr. Neotr. Entomol.*, **30** (3), 403-406 (2001).

Möller, A.: As hortas de fungo de algumas formigas sul-americanas. Tradução de A. P. VIÉGAS; ZINK. Rio de Janeiro: [s. n.]. 120p. (1941). Tradução de Die Pilzgaerten Einiger Suidamerikanischer Ameisen. Publicado na *Rev. de Entomol*., supl. (1).

Mueller, U.G.; Currie, C.R.; Adams, R.M.M.; Malloch, D.: The origin of the attine ant-fungus

symbiosis. *Q. Rev. Biol*, **76**, 169-197 (2001).

Rodrigues, A.: Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.2004.84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, (2004).

Rodrigues, A.; Pagnocca, F. C.; Bacci, M. Jr.; Hebling, M. J. A.; Bueno, O. C.; Pfenning, L. H.: Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia Microbiol.*, **50** (5), 421-425 (2005).

Rodrigues A., Carletti C.D., Bueno O.C.; Pagnocca F.C. 2008. Leaf-cutting ant fecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. *Braz. J. Microbiol.*, v. 39, p. 64-67 (2008).

Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O**.:** Introduction to food-borne fungi. 4.ed. Baar: Centralalbureau voor Schimmelcultures, 322p. 1995.

Schildknecht, H e Koob, K.: Plant bioregulators in the metathoric glands of mymicine ants. *Angew. Chem*., Int. Ed. Eng., **9**, 173-178 (1970).

Weber, N.A.: Gardening ants: the attines. Philadelphia: Memoirs of the American Philosophical Society 146p. (1972).

Wilson, E. O.: Causes of Ecological success the case of ants. *J. Anim. Ecol.*, **56**, 1-9 (1987).

Tabela 1. Presença de fungos filamentosos em colônias de *Atta sexdens rubropilosa*, nas câmaras de forrageamento, jardim de fungo e lixo.

	Tratamentos							
Espécies de fungos	X^2	1	2	3	4	5	6	7
Acremonium butyri	0,0588 *	0	0	0	0	0	1	0
Acremonium kiliense	0,2568	1	1	0	2	0	5	2
Acremonium sp.	0,7055	1	0	0	1	0	0	1
Aspergillus niger	0,2568	0	1	1	0	2	1	1
Aspergillus versicolor	0,2568	0	1	0	0	0	0	2
Escovopsis sp.	0,0588 *	0	0	0	0	2	0	0
Fusarium solani	0,0588 *	0	0	0	1	0	0	0
Fusarium sp.	0,2568	1	0	3	2	2	0	2
Micelio estéril	0,7055	1	0	0	0	1	2	0
Moniliella sp.	0,2568	1	0	0	0	0	0	1
Mucor racemosus	0,0588 *	0	2	0	0	0	0	0
Mucor circenelloides	0,0588 *	0	0	0	0	0	0	1
Mucor stolonifer	0,0588 *	0	0	0	0	0	0	1
Mucor sp.	0,2568	0	0	2	0	0	1	0
Penicillium citrinum	0,2568	0	0	1	0	2	0	0
Penicillium sp.	0,0588*	1	0	2	2	10	4	5
Penicillium subgenus Aspergilloides	0,0588*	0	0	0	0	3	0	0
Rhizopus stolonifer	0,0588*	0	0	0	0	0	0	1
Syncephalastrum racemosum	0,7055	1	0	0	3	0	1	1
Trichoderma harzianum	0,0588*	0	0	0	3	0	0	0
Trichoderma sp.	0,2568	0	0	0	1	0	2	0

Tratamentos: testemunha (1); veículo (2); isca tóxica 1 (3); princípio ativo, sem óleo (4); princípio ativo, com óleo de soja bruto degomado (5); isca tóxica 2 (6) e isca tóxica 3 (7). * X^2 a 5% (presença e ausência de fungos).

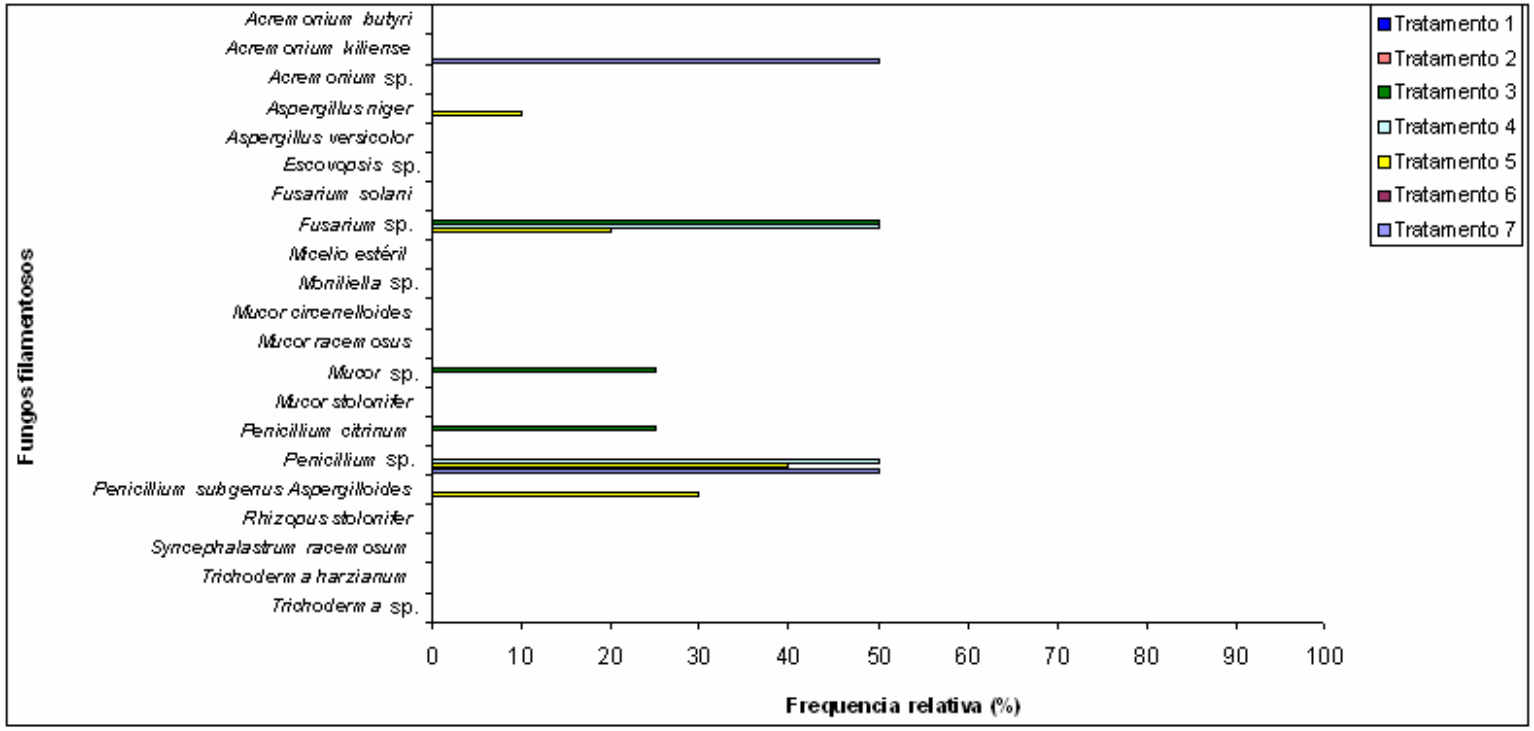


Figura 1. Presença de fungos filamentosos na arena de forrageamento em colônias de Atta *sexdens rubropilosa* após o processamento de iscas tóxicas. Legenda. Tratamentos: testemunha (1); veículo (2); isca tóxica 1 (3); princípio ativo, sem óleo (4); princípio ativo, com óleo de soja bruto degomado (5); isca tóxica 2 (6) e isca tóxica 3 (7).

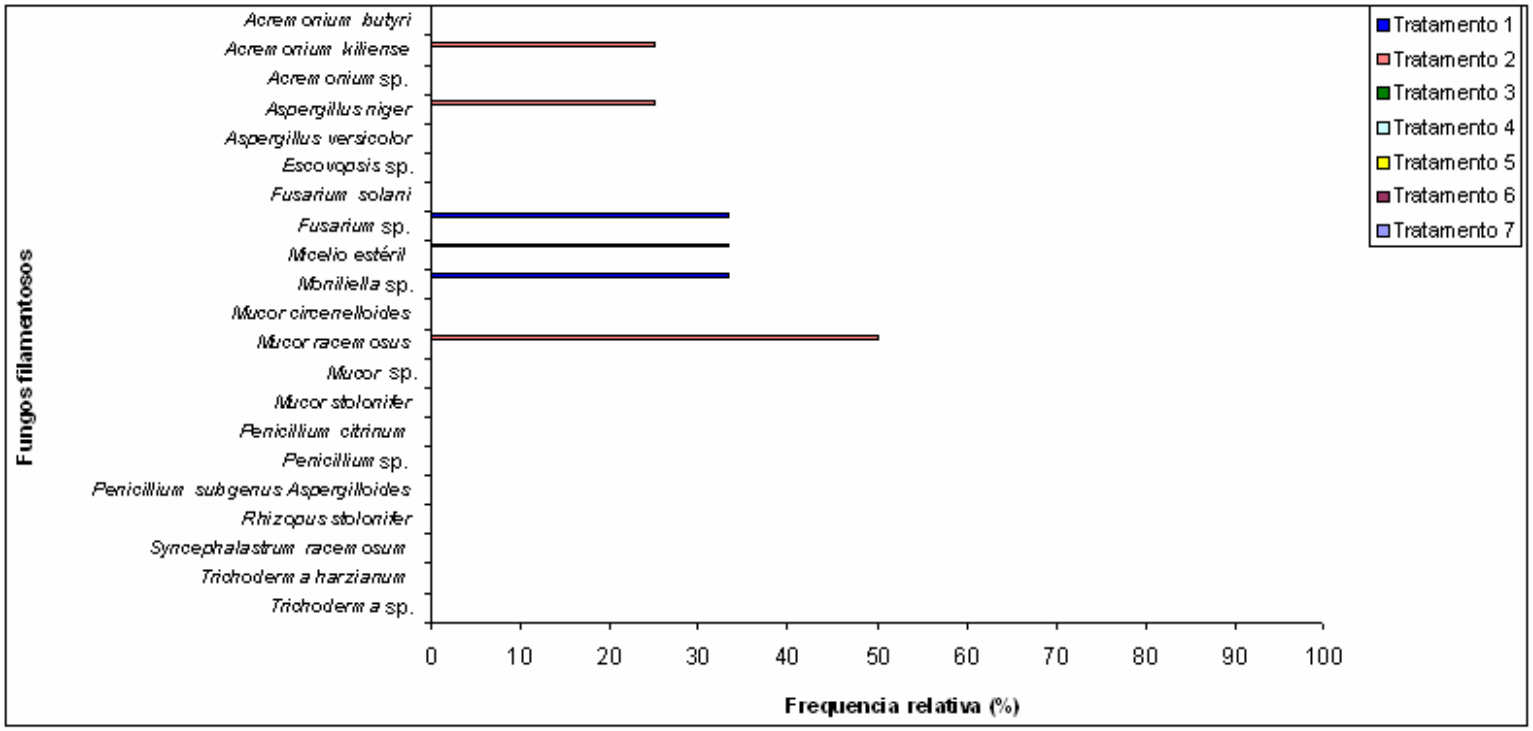


Figura 2. Presença de fungos filamentosos no jardim de fungo em colônias de Atta *sexdens rubropilosa* após o processamento de iscas tóxicas. Legenda. Tratamentos: testemunha (1); veículo (2); isca tóxica 1 (3); princípio ativo, sem óleo (4); princípio ativo, com óleo de soja bruto degomado (5); isca tóxica 2 (6) e isca tóxica 3 (7).

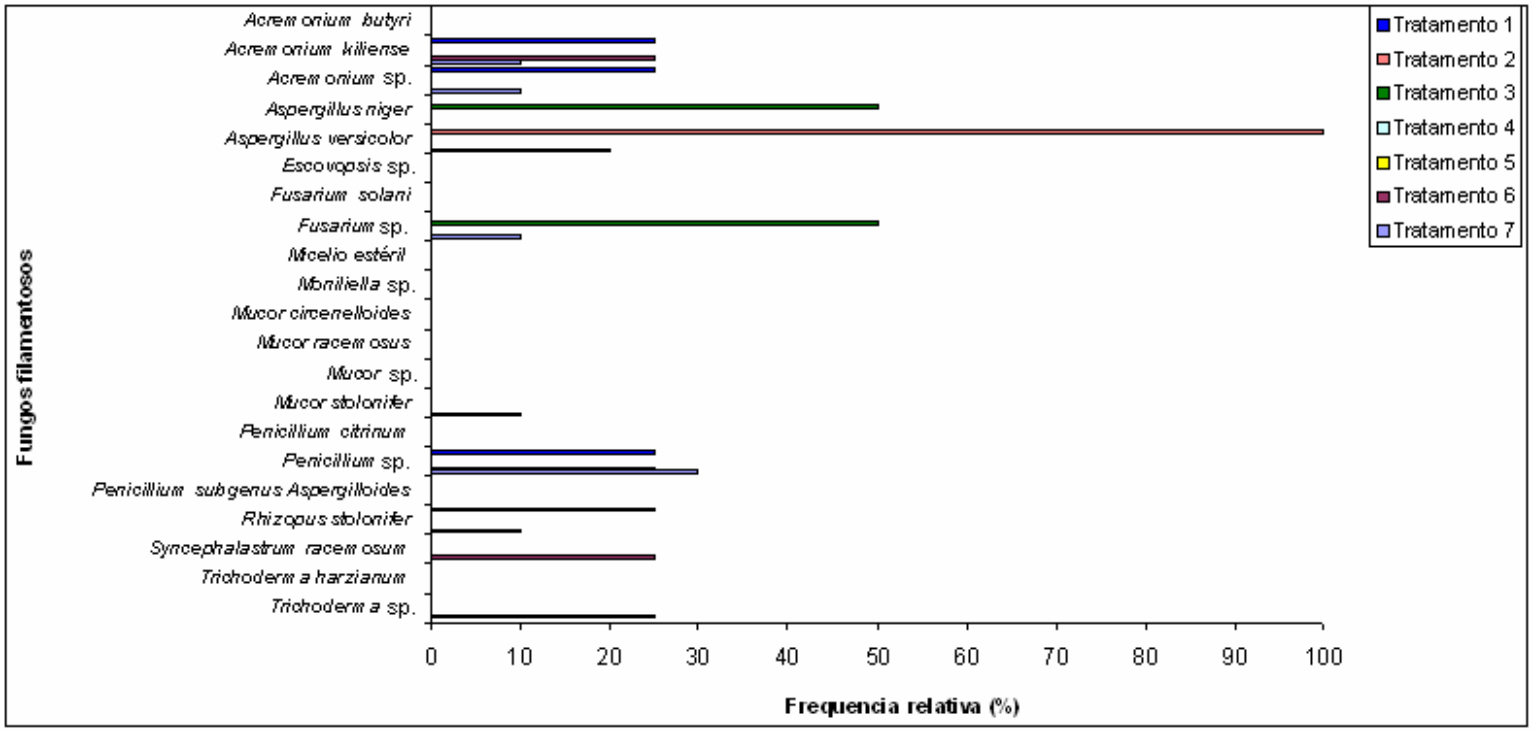


Figura 3. Presença de fungos filamentosos no lixo em colônias de Atta *sexdens rubropilosa* após o processamento de iscas tóxicas. Legenda. Tratamentos: testemunha (1); veículo (2); isca tóxica 1 (3); princípio ativo, sem óleo (4); princípio ativo, com óleo de soja bruto degomado (5); isca tóxica 2 (6) e isca tóxica 3 (7).

CAPÍTULO IV – INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E UMIDADE NO CARREGAMENTO DE SUBSTRATOS POR OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa*

Sociobiology

RESUMO

As formigas cortadeiras utilizam folhas e flores para cultivar um fungo mutualista do qual se alimentam. Tais insetos são considerados pragas, havendo a necessidade de métodos de controle. Até o momento, a isca tóxica é a mais utilizada e sua composição é uma mistura de polpa cítrica desidratada com um ingrediente ativo dissolvido em óleo de soja, sendo formuladas em pellets. O objetivo do presente estudo foi avaliar alguns fatores que possam interferir no carregamento desse produto por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, como a influência do teor de água e a presença de fungos filamentosos. Em principio, foi selecionada dentre duas polpas utilizadas para a formulação de iscas tóxicas, a com maior presença de fungos. Posteriormente, com a polpa selecionada foram utilizadas cinco colônias para cada apresentação, sendo os seguintes tratamentos: polpa autoclavada seca (1), autoclavada úmida (2), não autoclavada úmida (3) e não autoclavada seca (4). A isca tóxica confeccionada com esta polpa, continha *Aspergilus*

niger, *Paecilomyces* sp. e *Penicillium funiculosum*, observou-se portanto que esses fungos se desenvolveram quando presentes as condições ideais para seu crescimento, revelando que o processo de formulação não inviabilizou esses microrganismos. Na primeira apresentação, os fungos não se desenvolveram visivelmente, e ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) no carregamento entre os tratamentos, sendo que o 3 e 4 foram os mais carregados diferindo de 1 e 2, menos carregados ($p = 0,0154$; $F = 4,71$). Posteriormente, foram realizados três bioensaios nos quais uma das formulações apresentava crescimento visível do micélio e as outras duas um crescimento maciço do micélio e desenvolvimento das estruturas de reprodução dos fungos. Em todos os experimentos, os quatro tratamentos foram carregados e não diferiram estatisticamente. Na pré-seleção de um material com alto teor de água e sem microrganismos e outro com fungos já bem desenvolvidos esperava-se uma resposta negativa, porém ambos foram carregados, este fato é discutido no presente trabalho.

Palavras Chave: *Atta*, forrageamento, fungos filamentos.

INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras (*Atta* spp. e *Acromyrmex* spp.) podem ser consideradas herbívoros dominantes em muitos ecossistemas terrestres do continente americano (Wilson, 1987). Um aspecto relevante destes insetos é a simbiose que mantêm com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Fisher et al., 1994), uma grande inovação na evolução desses insetos (Chapela et al., 1994; Schultz e Brady, 2008).

Cuidados comportamentais e químicos são vitais para a manutenção do fungo, sendo as formigas promotoras de seu crescimento (Weber, 1972). As operárias forrageiam principalmente folhas e flores frescas e as utilizam como substrato para o cultivo do simbionte. Os fragmentos vegetais antes de serem incorporados à cultura fúngica, passam por uma limpeza, assim, ocorre a higienização e retirada de barreiras como ceras presentes na superfície das folhas. Posteriormente, é realizado o corte em pedaços menores, adição de saliva e fluido fecal. Tais secreções podem conter substâncias, consideradas inibidoras de microrganismos indesejáveis a cultura do fungo (Weber, 1972; Quinlan e Cherrett, 1977,1978; Andrade et al., 2002; Rodrigues et al., 2008).

A temperatura e a umidade também influenciam no crescimento do fungo simbionte (Quinlan e Cherrett, 1977), as operárias controlam esses dois fatores para o desenvolvimento fúngico. O teor de umidade encontrada nos vegetais coletados é uma fonte de água para as formigas e também para a manutenção da umidade do fungo (Cherrett, 1972).

Devido ao mutualismo obrigatório, ou seja, a utilização de material vegetal como substrato para o desenvolvimento do simbionte, as formigas cortadeiras causam danos econômicos, sendo necessários métodos de controle. O químico, com iscas tóxicas, é um dos mais empregados que combina praticidade e eficiência. Em sua composição possui uma mistura de isca cítrica desidratada misturada com um inseticida dissolvido em óleo de soja, posteriormente são formuladas em pellets (Robinson, 1979; Boaretto e Forti, 1997; Forti et al., 1998).

Para a eficácia desse produto ele deve atender algumas especificações: atratividade as formigas, mesmo a uma distância do ninho; que não ocorra rejeição inicial e a ação retardada ocorra em tempo certo para que se desenvolva toda a contaminação da colônia; e que possua baixa toxicidade aos outros indivíduos da comunidade biológica (Etheridge e Phillips 1976, Forti et al., 1998; Nagamoto et al., 2004).

A ação inseticida retardada pode ser definida como: mortalidade ≤ 15% com 24 horas e ≥ 90% com 21 dias, em operárias adultas (Nagamoto et al., 2004, 2007). Entretanto, essa ação deve condizer com o tempo limitante de exposição aos inseticidas, pois eles podem ser carregados, mas após um período, rejeitados quando julgados impróprios.

Neste método de controle, se a devolução das iscas for excessiva (Forti et al. 2003), constitui-se um problema, pois envolve custo elevado podendo a eficiência do produto ser comprometida. As rejeições podem ser entendidas como proposto por Knapp (1990), no entanto, o que precisa ser esclarecido quais fatores podem interferir na rejeição desse material, e isso pode envolver desde o atrativo até o princípio ativo utilizado.

Um fator que pode interferir, mesmo que as características básicas de eficácia do produto sejam atendidas, é a umidade das iscas. Rodrigues et al. (2005) observaram que ocorre baixa taxa de carregamento de iscas tóxicas.

Desta forma, postulou-se a hipótese de que fatores como a umidade e microrganismos possam influenciar negativamente no forrageamento de iscas granuladas. Para isso, avaliou-se o carregamento e a rejeição de substratos com alto teor de água e com o desenvolvimento de fungos filamentosos por operárias *de Atta sexdens rubropilosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Colônias estudadas

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Laboratório de Insetos Sociais-Praga, Botucatu, São Paulo, Brasil. As rainhas foram coletadas na revoada em outubro de 2006, nas proximidades do campus, foram mantidas em laboratório, em potes plásticos contendo 1 cm de gesso na base para a manutenção da umidade. Assim que essas colônias aumentavam em tamanho eram transferidas para potes maiores, também com gesso, interligados com tubos plásticos a dois outros recipientes, sem gesso, nas extremidades (câmara de forrageamento e de material exaurido). Foram fornecidas folhas de *Acalypha* sp. e *Ligustrum* sp. às colônias, e quando estas atingiram um volume de fungo aproximado de 500 mL, iniciou-se os experimentos.

Avaliação da presença fúngica em polpas cítricas

Foi realizada uma avaliação da presença fúngica de diferentes polpas cítricas. Assim, testou-se três fontes para verificar qual continha maior número de espécies e início de colonização mais rápida. Visto isso, a amostra com maior número de espécies, que supostamente poderia interferir significativamente no carregamento das iscas foi utilizada no bioensaio em diferentes fases de colonização do fungo no substrato.

As fontes dessas polpas foram das empresas, Atta Kill Ltda e Dinagro, que utilizam essas polpas para a formulação de iscas tóxicas, e a outra procedeu de laranjas colhidas do pomar existente no campus (Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu).

Separou-se uma amostra contendo 10 g de cada fonte, adicionou-se água destilada, o suficiente para dar maior consistência ao material, para o processo de pelletização. Os três distintos substratos foram pelletizados e deixados para secar durante 24 horas em estufa a 50 ºC.

Posteriormente, cinco pellets de cada fonte foram dispostos em 5 placas de Petri de 5 cm de diâmetro, sendo estas placas inseridas em conjunto (fundo + tampa) dentro de placas de Petri maiores (cerca de 10 cm de diâmetro). Estas por sua vez continham o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), fornecendo umidade dentro desse sistema, que foi considerado como a

câmara úmida no presente estudo. Essas placas foram acondicionadas em uma câmara de temperatura controlada (BOD) a 24 ºC, no escuro.

Diariamente, observou-se esse material até que ocorresse o início do crescimento fúngico em toda a superfície dos fragmentos de polpa. Assim que isso foi observado, com o auxílio de uma agulha, inoculou-se o material em BDA suplementado com penicilina G. As placas foram incubadas à 24º C, no escuro. Posteriormente, foi analisado esse material e identificadas as espécies de fungos filamentosos presentes.

Carregamento de iscas

Adicionou-se água destilada o suficiente para dar consistência em uma porção de 20 gramas da polpa com maior número de espécies de fungos filamentosos, para o processo de pelletização. Posteriormente esses pellets foram secos em estufa a 50 ºC durante 24 horas. Os seguintes tratamentos foram confeccionados com esse material: polpa autoclavada seca (1), autoclavada úmida (2), não autoclavada úmida (3) e não autoclavada seca (4). Os tratamentos 1 e 2 foram autoclavados durante 15 minutos, sendo que o primeiro substrato foi acondicionado em estufa a 50 ºC, durante 24 horas e o segundo foi acondicionado em câmara úmida de placas de Petri, juntamente com o tratamento 3, porém esse tratamento não foi autoclavado. Já o tratamento 4 também não foi autoclavado, mas permaneceu em estufa por 24 horas.

Esses tratamentos foram oferecidos às operárias em diferentes tempos de crescimento fúngico: 24 (desenvolvimento não visível), 48 (desenvolvimento visível) e 72 (desenvolvimento maciço) horas. Sendo no primeiro tempo fornecida apenas uma apresentação à cinco colônias, e nos outros tempos (48 e 72 horas), duas apresentações para cada, sendo uma em um dia e a outra após um intervalo de 24 horas, para as mesmas colônias previamente utilizadas, porém quanto ao substrato, o tempo de desenvolvimento fúngico permaneceu o mesmo.

Esse critério de duas apresentações do mesmo material, com maior desenvolvimento fúngico às mesmas colônias, foi proposto para avaliar a ocorrência de um comportamento de rejeição retardada. Assim, para verificar o carregamento das iscas, foram utilizadas cinco colônias (repetições) de *A. sexdens rubropilosa* para cada tempo de crescimento fúngico.

Baseando-se na metodologia de Forti et al. (1993), para testes de atratividade de iscas tóxicas, os tratamentos foram oferecidos aleatoriamente na arena de forrageamento, 5 pellets de cada e quando um tratamento era totalmente carregado, bloqueava-se a arena de forrageamento e

quantificava os outros tratamentos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk após serem transformados em log(X+1), prosseguiu-se utilizando ANOVA e teste de Tukey ($p>0,05$).

RESULTADOS

A fonte considerada com maior número de espécies de fungo, pertencente a empresa Atta Kill Ltda. (*Aspergilus niger*, *Paecilomyces* sp. e *Penicillium funiculosum)*, apresentou três espécies de fungos distintas, sendo, portanto a escolhida para realizar o bioensaio. O crescimento fúngico foi observado após 24 horas, pois o micélio já se encontrava desenvolvido sob o substrato.

Na primeira apresentação, os fungos não se desenvolveram visivelmente, ocorreu diferença significativa ($F = 4,71$; $p = 0,0154$) entre os tratamentos carregados, sendo o tratamento 3 (sem autoclavar úmida) mais carregado, igual ao tratamento 4 e ambos diferiram de 1 (menos carregado) e 2 (Figura 1).

O carregamento dos substratos com o desenvolvimento fúngico de 48 e 72 horas não diferiram (Figura 2) nas duas apresentações ($F = 0,61$; $p = 0,6194$ e $F = 1,96$; $p = 0,1606$; respectivamente). Ao repetir essas duas apresentações (48 e 72 horas), não ocorreram diferenças no carregamento, tanto para 48 horas ($F= 0,76$; $p = 0,6277$) quanto 72 horas ($F = 0,24$; $p = 0,8712$).

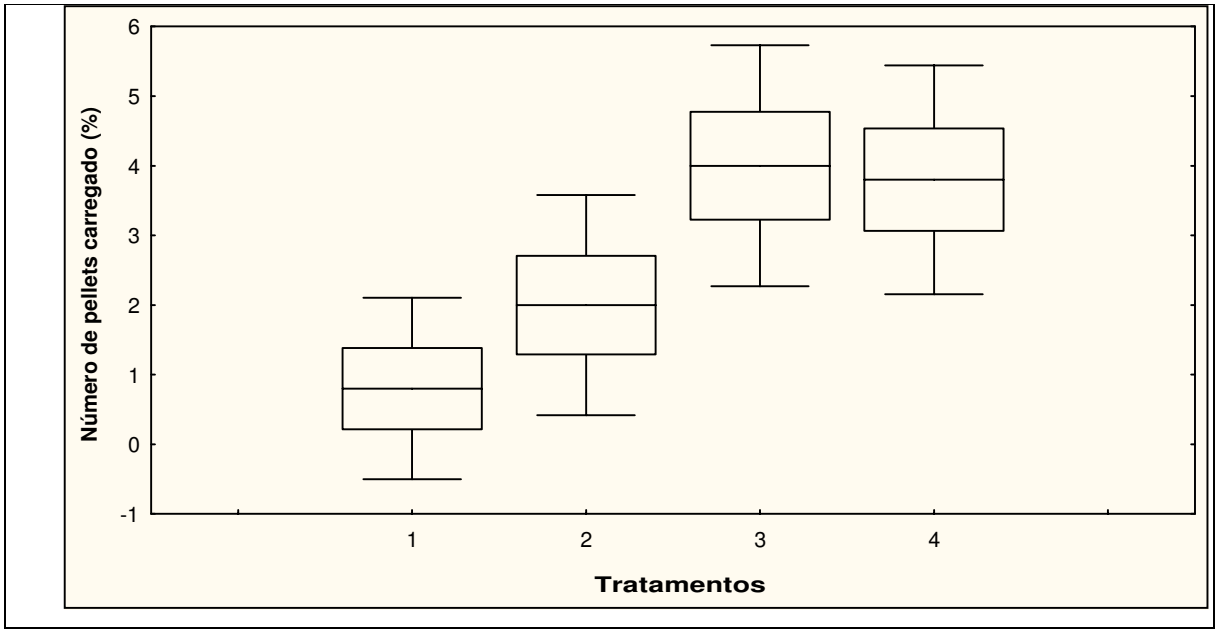


Figura 1. Média de carregamento de pellets por operárias (F = 4,71; p = 0,0154). Tratamentos: polpa autoclavada seca (1), autoclavada úmida (2), não autoclavada úmida (3) e não autoclavada seca (4).

Além disso, foram colocadas amostras da isca tóxica em câmara úmida (no sistema de placas de Petri), produzida pela empresa que utiliza como veículo a polpa com maior número de espécies de fungos (Atta Kill Ltda) em suas formulações. Assim, observou-se que os fungos anteriormente identificados (*Aspergilus niger*, *Paecilomyces* sp. e *Penicillium funiculosum*) no veículo se desenvolveram quando presentes as condições ideais de temperatura e umidade para eles, revelando que o processo de formulação não inviabilizou esses microrganismos.

Figura 2. Polpas carregadas por formigas cortadeiras com crescimento maciço de fungos (72 horas). Legenda: A e B. polpa não autoclavada úmida; C. polpa não autoclavada seca.

DISCUSSÃO

Este estudo permitiu verificar que a hipótese proposta é válida, porém apenas o fator teor de água infuenciou negativamente. O processo de autoclavar, devido a alta pressão cria-se um vapor d'agua, aumentando provavelmente o teor de umidade das polpas. Isso ocorreu quando foram ofertadas, após o desenvolvimento fúngico de 24 horas, demonstrando a preferência no carregamento de polpas sem autoclavar. No tratamento 4, apesar de ser mantido em câmara úmida (confeccionadas com placas de Petri e meio de cultura BDA), possivelmente não atingiu o teor de umidade tão elevado como no processo de autoclavar.

Contudo, além do carregamento, avaliou-se a possível rejeição desse material pelas operárias, porém foi um fato não observado, os substratos foram processados e incorporados totalmente no fungo simbionte como observado após 24 horas da apresentação.

O presente estudo corrobora com os dados de Rodrigues (2004), em que o teor de umidade das iscas influenciou negativamente no carregamento das mesmas no campo por *A. sexdens rubropilosa*. Roces e Kleineidam (2000), verificaram que operárias de *A. sexdens rubropilosa* são capazes de detectar diferentes gradientes de umidade, sendo um parâmetro importante para o desenvolvimento de seu simbionte. De acordo com os autores, a umidade alta é preferida pelas operárias em seu jardim de fungo, porém no ato de seleção do material a ser forrageado, esse teor de água do substrato não condiz com o que é mantido no jardim de fungo. Talvez um material com alta umidade não seja ideal no processamento para a incorporação no fungo simbionte, sendo esse mais um fator que influencia na seletividade do substrato a ser forrageado.

No campo, ocorre o não carregamento das iscas possivelmente devido a alta umidade das mesmas. Os fungos que por ventura estão presentes na isca ou no ambiente, podem estar presentes ou colonizarem o substrato, mas seu desenvolvimento provavelmente não é detectado ou ainda devido as barreiras que as formigas possuem contra esses microrganismos não é a presença deles que prejudica o carregamento das iscas. Outro fator crucial é a presença de outras fontes possibilitando as formigas escolherem um substrato que seja mais adequado ao cultivo de seu simbionte.

Além disso, podemos inferir que a atratividade do material após o processo de autoclavagem possa ter sido diminuída, sendo outro fator a ser considerado, já que é de primordial importância na seleção de um substrato no momento do forrageamento. Segundo Cherrett (1968),

no ato de seleção, as necessidades nutricionais do fungo, a composição química do material é importante. Visto isso, e a diversidade de plantas forrageadas que a simbiose com o fungo *L. gongylophorus* permite, já que seu simbionte promove a digestão extracelular desses substratos, fica evidente que quanto a fatores biológicos, como a presença de microrganismos que possam influenciar negativamente no desenvolvimento de seu simbionte, essas formigas livram-no de possíveis competidores por intermédio de suas barreiras.

Porém, essa atratividade talvez possa ter contribuído para o carregamento destes fungos, principalmente nas iscas com desenvolvimento após 48 e 72 horas. A polpa cítrica é um substrato extremamente atrativo para a espécie *A. sexdens rubropilosa,* os fungos isolados e utilizados nesse experimento como *Aspergillus niger* e *Penicillium funiculosum,* quando cultivados acumulam ácido cítrico (2-hidroxipropan-1,2,3-tricarboxílico) (Siebert e Shulz, 1979) que é o principal constituinte dos frutos cítricos e é responsável pela acidez das frutas.

Não se sabe ao certo qual componente ou o conjunto deles presente na polpa cítrica que confere a atratividade desse substrato. Porém, a presença desse composto, o ácido cítrico, pode ter auxiliado nos resultados obtidos nesse experimento, pois apesar de não ocorrer diferença significativa em todas as apresentações os substratos com a presença desses contaminantes foram os primeiros a serem explorados e carregados.

O comportamento de lamber essas iscas foi muito acentuado, mesmo durante o carregamento elas trabalhavam o material na câmara de forrageamento, enquanto outros indivíduos ao explorarem os distintos tratamentos carregavam os mesmos para a câmara do jardim de fungo. Provavelmente ao entrar em contato com o substrato com a presença de fungos, tocando esse material, ocorreu uma necessidade de uma assepsia cuidadosa desse substrato antes de carregá-lo, pois nessas iscas também continha o fungo do gênero *Paecilomyces* que reconhecidamente apresentam espécies patogênicas aos insetos.

Portanto, apesar das repetições nas apresentações das iscas com maior desenvolvimento fúngico (48 e 72 horas), as operárias continuaram carregando esses substratos e não ocorreu qualquer um dos tipos de rejeições propostos por Knapp (1990), o material deveria ter um efeito deletério às colônias, fato que não foi observado. Então, o carregamento de iscas colonizadas por fungos filamentosos, em colônias que estavam bem estabelecidas, apesar de incorporarem esse material não sofreram nenhum dano em seu fungo simbionte, demonstrando a eficiente barreira das formigas cortadeiras.

Assim, o presente estudo demonstra o sofisticado sistema de defesa contra fungos que possam competir com o simbionte das formigas cortadeiras, devido a secreções oriundas das glândulas metapleural e mandibular, servindo como uma barreira. A glândula mandibular é conhecida pela produção de feromônio desencadeador de alarme e defesa (Brown et al., 1970). Em estudos de Marsaro Júnior et al. (2001), foi verificado que quanto maior a concentração de soluções contendo secreções dessa glândula maior foi a inibição de conídios de *Botrytis cinerea.* Rodrigues et al. (2008) demonstraram que a secreção mandibular de operarias de *A. sexdens* inibem a germinação de esporos dos fungos patogênicos aos ninhos desses insetos.

Além disso, segundo Della Lucia e Araújo (1993), o fungo simbionte também pode contribuir na assepsia contra microrganismos, pois existem evidências de que ele secrete ácido fenilacético, que inibe o crescimento bacteriano e ácido D-3-hidroxidecanóico que atua na inibição de outros fungos.

Já as secreções da glândula metapleural possuem uma ação antibacteriana e antifúngica, ela foi evidenciada inibindo conídios (Schildknecht e Koob, 1970; Fernandez-Marín et al., 2006). Porém, sua produção não é discriminada, mas é utilizada, durante o grooming entre as operárias e a rainha, para o jardim do fungo simbionte e nos substratos, isso ocorre na presença de agentes que venham causar alguma injúria (Fernandez-Marín et al., 2006).

Assim, pode-se afirmar que não existiu contaminação das colônias, pois o sistema de assepsia que essas formigas possuem é muito eficiente, e esse é um dos principais problemas a ser resolvido, como driblar essa questão para avanços no controle biológico desses insetos sociais. Conclui-se, portanto que o mutualismo entre as formigas cortadeiras e seu simbionte, aliada aos comportamentos e funções de ambos nessa relação permite um maior sucesso adaptativo a eles.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.P.P., L.C. FORTI, A. A. MOREIRA, M.A.C BOARETTO, V.M. RAMOS & C.A. MATOS, 2002. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. Sociobiology 40: 293-306.

BOARETTO, M. A. & L. C. FORTI, 1997. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Série Técnica, IPEF 11 (30): 31-46.

BROWN Jr., W.L., T. EISNER, & R. H. WHITTAKER 1970. Allomones and kairomones: transpacific chemical messengers. Bioscience 20: 21-22.

CHAPELA, I.H., S.A. REHNER, T.R. SCHULTZ, & U.G. MUELLER 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungus. Science 266: 1691-1694.

CHERRETT, J.M. 1968. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera, Formicidae). I. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. Journal of Animal Ecology 37: 387-403.

CHERRETT, J.M. 1972. Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae), in tropical rain forest. Journal of Animal Ecology 41: 647-660.

ETHERIDGE, P. & PHILLIPS, F.T. 1976. Laboratory evaluation of new insecticides and bait matrices for the control of leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae). Bulletin of Entomological Research 66: 569-578.

FORTI, L.C., T.M.C. DELLA LUCIA, W.K YASSU, J.M.S BENTO & M.A.S. PINHÃO 1993 Metodologias para experimentos com iscas granuladas para formigas cortadeiras. In: *As formigas cortadeiras*:191-211.

FORTI, L.C., N.S. NAGAMOTO & D.R. PRETTO 1998. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. In: Anais do Simpósio sobre formigas cortadeiras dos países do Mercosul:113-132.

FORTI, L.C., N.S NAGAMOTO, V.M. RAMOS, A.P.P. ANDRADE, J.F.S. LOPES, R.S. CAMARGO; MOREIRA, A. A. e BOARETTO, M. A. C. (2003). Eficiência de sulfluramida, fipronil y clorpirifos como sebos em el control de *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera: Formicidae). Pasturas Tropicales 25 (3): 28-34.

KNAPP, J.J., P.E. HOWSE, & A. KERMARREC 1990. Factors controlling foraging patterns in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich).In: VANDER MEER, R.K., K. JAFFÉ & A. CEDENO (ed.) *Applied Myrmecology: a world perspective*, CO, USA: Westview Press, Boulder: 382-409.

MARSARO, A.L.Jr., T.M.C. DELLA LUCIA, L.C.A BARBOSA, L.A. MAFFIA, & M.A.B. MORANDI 2001. Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea.* Pres. Fr. Neotropical Entomology 30 (3): 403-406.

NAGAMOTO, N.S., L.C. FORTI, A.P.P. ANDRADE, M.A.C. BOARETTO, & C.F. WILCKEN 2004. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology 44 (2): 413 – 432.

NAGAMOTO, N.S., L.C. FORTI, & C.G. RAETANO 2007. Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic baits for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity. Journal of Pest Science 80 (1):9-13.

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

QUINLAN, R.J. & CHERRETT, J.M. 1978. Studies on the role of the infrabucal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae). Insectes Sociaux 25: 237-245.

ROCES, F. & KLEINEIDAM, C. 2000. Humidity preference for fungus culturing by workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. Insectes Sociaux 47: 348-350.

ROBINSON, S.W. 1979. Leaf-cutting ant control schemes in Paraguay, 1961-1977. Some failures and some lessons. Pans: Pest Articles and News Summaries 25: 386-390.

RODRIGUES, A. 2004. Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas. 2004.84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

RODRIGUES, A.; F.C. PAGNOCCA, M. Jr. BACCI, M.J.A HEBLING, O.C. BUENO & L.H. PFENNING 2005. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. Folia Microbiologica, Prague 50 (5): 421-425.

RODRIGUES, A., C.D CARLETTI, O.C. BUENO & F.C. PAGNOCCA 2008. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 64-67.

SCHILDKNECHT, H & KOOB, K. 1970. Plant bioregulators in the metathoric glands of mymicine ants. Angewandte Chemie (International ed. in English) 9:173-178.

SCHULTZ, T.R. & S.G. BRADY 2008. Major evlolutionary transitions in ant agriculture. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 105:5435-5440.

SIEBERT, D. & G. SCHULZ 1979. Citric acid production by fermentation. In: INTERNATIONAL MICROBIOLOGYCAL FOOD INDUSTRY CONGRESS, v.2, Paris, p.55-71.

WEBER, N. A. 1972. *Gardening ants: the attines*. Philadelphia: Memoirs of the American Philosophical Society 146p.

WILSON, E. O. 1987. Causes of Ecological success the case of ants. Journal Animal Ecology 56: 1-9.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao hábito de corte de diversas plantas nativas e cultivadas, as formigas cortadeiras são consideradas importantes pragas, devido a esse cunho econômico, vários métodos de controle são empregados e estudados, porém eles são extremamente complexos, devido as características das colônias. Dentre os métodos, um dos mais utilizados para minimizar esses danos, são as iscas tóxicas, formuladas em pellets. Esse material contém um princípio ativo dissolvido em óleo de soja e como veículo e atrativo é utilizado polpa cítrica desidratada.

A polpa cítrica é o substrato considerado atrativo para as operárias de formigas cortadeiras de plantas dicotiledôneas. Porém, determinadas partes do fruto utilizado na confecção desse substrato, diferem na atratividade. No presente trabalho, verificou-se que o endocarpo é considerado o mais atrativo, sendo o mais e o primeiro a ser carregado tanto em campo como em laboratório. No momento do processamento e incorporação das distintas polpas, ele foi processado por um maior número de operárias quando comparado com os outros tratamentos (mesocarpo, integral e industrial). Sugere-se que a presença de sementes neste material, sendo uma possível fonte de lipídios para as operárias, pode ter contribuído para esses resultados.

Além disso, pode-se verificar que o estímulo olfatório é de vital importância na identificação de fontes, ou seja, de materiais a serem forrageados, porém o contato com o substrato é essencial para que ocorra o recrutamento de outros indivíduos.

O óleo de soja, outro componente presente nas iscas tóxicas, que ora é tido como atrativo ora como repelente nos estudos, quando está presente na formulação das iscas tóxicas, não interfere no carregamento. Assim, possui apenas a função de solubilização do princípio ativo. Contudo, dependendo do grau de refinação desse óleo, ele é considerado atrativo às operárias, como constatado no presente trabalho.

O óleo de soja bruto degomado é atrativo às operárias devido a presença de uma determinada substância ou um conjunto delas, ou ainda, a interação entre elas, pode ter resultado nesse comportamento. Compostos como tricosano, hentriacontado e ácidos graxos provavelmente influenciaram na tomada de decisão das operárias para forragearem esse material.

Através desses dois bioensaios, pode-se inferir que a ausência de compostos repelentes nos substratos permite o carregamento dos mesmos pelas operárias, porém uns podem ser mais atrativos do que outros. Particularmente, o endocarpo além de contribuir na atratividade pode auxiliar na intoxicação das operárias, pois um maior número das mesmas, trabalharam no processamento e incorporação dos pellets.

Os fungos filamentosos, outro assunto abordado, são descritos presentes nos locais aonde as colônias nidificam e quando as mesmas sofrem um desequilíbrio na relação de simbiose, outros microrganismos se desenvolvem. Além disso, esses microrganismos podem ser oriundos do substrato fornecido, provavelmente favorecendo o controle com a desestruturação da colônia e desenvolvimento dos mesmos que podem ser deletérios a elas. Portanto, provavelmente iscas tóxicas contendo fungos filamentosos podem contribuir adicionalmente no controle do que o mesmo material com ausência desse fator.

A relação de mutualismo obrigatório entre as formigas cortadeiras e seu simbionte permitem um sucesso evolutivo, gerando uma maior gama de exploração de recursos benéficos para ambos nessa interação. Barreiras que eles possuem principalmente as formigas cortadeiras envolvem não só secreções de glândulas, mas também atos comportamentais contribuem para essa adaptação. O presente estudo permitiu observar a eficiência dessas barreiras através do carregamento de substratos contendo fungos filamentosos, que poderiam ser deletérios às formigas cortadeiras e seu simbionte. No entanto, apesar da umidade no jardim de fungos ser

alta e de aparentemente as operárias dependendo do substrato deixar os mesmos hidratando antes do processamento e incorporação, no momento do carregamento existe uma tendência a uma resposta negativa quando existe um alto teor de água no substrato a ser forrageado.

Assim, para melhorias no controle, mais estudos levando em consideração, aspectos biológicos, químicos e comportamentais das formigas cortadeiras e seu simbionte devem ser mais explorados para que o controle das mesmas se torne mais efetivo.

5. CONCLUSÕES

- Existem diferenças comportamentais expressas pelas operárias frente a diferentes polpas cítricas, sendo o endocarpo a mais atrativa e processada pelas operárias;

- Os óleos de soja em diferentes graus de refinação são distintos na atratividade para as operárias, sendo o óleo de soja bruto degomado o mais carregado;

- Os fungos filamentosos que estão presentes no substrato ou nas colônias desenvolvem-se quando as mesmas sofrem desequilíbrio;

- A presença de fungos filamentosos em iscas granuladas não interferiu de forma negativa no carregamento das mesmas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANTE, E. Prejuízos causados pela formiga saúva em plantações de *Eucalyptus* e *Pinus* no Estado de São Paulo. **Silvicultura**, São Paulo, v. 6, p. 355-363, 1967.

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**, Chicago, v. 40, p. 293-30, 2002.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens.* **Physiological Entomology**, London, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1995.

BOARETTO, M. A.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.

CURRIE, C. R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999.

ETHERIDGE, P.; PHILLIPS, F. T. Laboratory evaluation of new insecticides and bait matrices for the control of leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 66, p. 569-578, 1976.

FISHER, P. J. et al. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant Atta cephalotes: a preliminary study. **Mycological Research**, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1996.

FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S.; PRETTO, D. R. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. In: SIMPÓSIO SOBRE FORMIGAS CORTADEIRAS DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1998. **Anais...** p.113-132.

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

GALLO, D. O. et al. **Manual de entomologia agrícola**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649 p.

HÖLLDOBLER, B, WILSON, E. O. **The ants**. Cambrigde: Havard University Press, 1990. 732p.

HUBBEL, S. P.; WIENER, D. F. Host plant selection by an Attine ant. In: JAISSON, P. (Ed). **Social insects in the tropics**. Paris: University of Paris Press, 2003. v. 2, p. 157-163.

LUCIANO, H. M.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. Organismos associados a uma colônia de *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae) mantidas em laboratório. **Acta Biológica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 17, n.2, p.47-56, 1995.

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

NAGAMOTO, N. S. **Metodologia para seleção de inseticidas visando confecção de iscas tóxicas para formigas cortadeiras (Hymenoptera, Formicidae)**.1998. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

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

OLIVEIRA, H. G. et al. Atratividade de *Atta sexdens rubropilosa* por plantas de eucalipto atacadas previamente ou não por *Thyrinteina arnobia.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 3, p. 285-287, mar. 2004.

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

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, p. 151-160, 1979.

REBULA, C. A.; MORAIS, H. C.; ALVES, F. S. Estudo de altas concentrações de alumínio na dieta de *Atta sexdens* aspectos da dinâmica colonial. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2003, Fortaleza. **Anais…** 2003. p. 406-407.

ROBINSON, S. W. Leaf-cutting ant control schemes in Paraguay, 1961-1977: some failures and some lessons. **Pans**: Pest Articles and News Summaries, v. 25, p. 386-390, 1979.

ROCKWOOD, L. L. Plants selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). **Ecology**, v. 57, p. 48-61, 1976.

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

VERZA, S. S. et al. Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 391-399, 2006.

WEBER, N. A. **Gardening ants**: the attines. Philadelphia: Memoirs of the American Philosophical Society, 1972. 146 p.

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

WILSON, E. O. Causes of ecological success the case of ants. **Journal Animal Ecology**, v. 56, p. 1-9, 1987.