

KÁTIA KAEELLY ANDRADE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE NINHOS INICIAIS DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE): INTERFERÊNCIAS DOS FATORES FÍSICOS E BIOLÓGICOS NA
NIDIFICAÇÃO**

Botucatu

2023

KÁTIA KAEELY ANDRADE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE NINHOS INICIAIS DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE): INTERFERÊNCIAS DOS FATORES FÍSICOS E BIOLÓGICOS NA
NIDIFICAÇÃO**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia: Proteção de
Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Forti

Coorientador(a): Dra. Nadia Caldato

Botucatu

2023

S725d Sousa, Kátia Kaelly Andrade
Desenvolvimento de ninhos iniciais de *Atta sexdens*
(Hymenoptera: Formicidae): Interferências dos fatores
físicos e biológicos na nidificação / Kátia Kaelly Andrade
Sousa. -- Botucatu, 2023
89 p.

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

1. Attini. 2. Claustal. 3. CO2. 4. Mortalidade. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DESENVOLVIMENTO DE NINHOS INICIAIS DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE): INTERFERÊNCIA DOS FATORES FÍSICOS E BIOLÓGICOS NA NIDIFICAÇÃO

AUTORA: KÁTIA KAEELY ANDRADE SOUSA

ORIENTADOR: LUIZ CARLOS FORTI

COORDENADORA: NADIA CALDATO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:


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


Prof. Dr. CARLOS ALBERTO OLIVEIRA DE MATOS (Participação Virtual)
Coordenadoria de Engenharia Industrial Madeireira / Campus de Itapeva - Unesp


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


Profa. Dra. MARIA APARECIDA CASTELLANI (Participação Virtual)
Universidade Estadual do Sudoeste


Profa. Dra. SANDRA REGINA CARDOSO VITORINO (Participação Virtual)
Centro de Ciências e Educação / Instituto Federal do Piauí

Botucatu, 11 de janeiro de 2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e saúde. A toda minha família por sempre estarem presentes em todos os momentos de minha vida, motivando e torcendo por mim.

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

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Forti, pela confiança, orientação e apoio para a realização e conclusão deste trabalho. À minha coorientadora Nadia Caldato pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso.

Ao pesquisador Dr. Roberto da Silva Camargo pelo apoio, coorientação nos experimentos, pela ajuda e orientação no desenvolvimento dos capítulos e artigos publicados. Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Oliveira de Matos da UNESP - Instituto de Ciências e Engenharia – Itapeva, por realizar as análises estatísticas feitas no presente estudo. Ao Prof. Dr. Alexandre Dal Pai do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Agrônômicas UNESP/Botucatu/SP e seu aluno de Doutorado, Marcus Vinícius Contes Calça, pelo fornecimento de equipamentos e dados para os experimentos realizados na tese. Ao Prof. Dr. Pablo Vidal-Torrado e sua aluna de doutorado, Mariane Chiapini da Universidade de São Paulo (USP) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), pela ajuda e análise das amostras para os experimentos de solos realizados neste estudo. Agradecer também ao Prof. Dr. José Cola Zanuncio da Universidade Federal de Viçosa, MG, pela ajuda da preparação e publicação dos artigos produzidos dessa tese. Aos professores e funcionários do Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP, Câmpus de Botucatu, pelos ensinamentos. A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial aos meus amigos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

RESUMO

A escolha do habitat pelas rainhas fundadoras de ninhos de formigas cortadeiras, pode variar de acordo com fatores abióticos como temperatura, densidade e umidade do solo. A literatura sobre os fatores envolvidos no sucesso da fundação dos ninhos de *Atta* é escassa. Há lacunas de conhecimentos sobre os fatores que influenciam o processo e quais são os mecanismos de regulação envolvidos. Com a finalidade de colaborar com o conhecimento a respeito dos ninhos iniciais de formigas cortadeiras o presente estudo teve como objetivos estudar a influência da temperatura e do sombreamento do solo na profundidade da fundação de ninhos; detectar modificação estrutural do solo de ninhos iniciais por meio de estudos da micromorfologia do solo do interior das câmaras e das áreas externas adjacentes; e estudar a troca gasosa dos ninhos iniciais em campo e laboratório. O estabelecimento das rainhas foi maior e o tempo de fundação do ninho, volume de solo escavado, profundidade e volume da câmara inicial foi menor em solos com menor densidade e maior umidade que naqueles mais densos e secos. A mortalidade das rainhas foi de 3% em solos menos densos e úmidos de 9% a 13% naqueles mais densos e menos úmidos. O desenvolvimento das colônias de *A. sexdens* em dois ambientes diferentes foi melhor em ambiente sombreado. A massa das rainhas foi semelhante nos dois ambientes, mas a mortalidade das mesmas foi maior no ambiente ensolarado. A alta densidade e a baixa umidade do solo aumentam o tempo de escavação do ninho e diminuem o volume de solo escavado, a profundidade do ninho e a sobrevivência das rainhas fundadoras de *A. sexdens*. Por outro lado, a baixa densidade e a alta umidade do solo diminuem o tempo de escavação do ninho e aumentam o volume de solo escavado e a profundidade do ninho, além da sobrevivência das rainhas fundadoras de *A. sexdens*. Os piores parâmetros dos ninhos de *A. sexdens* no ambiente ensolarado se devem à maior irradiância solar, aumento da amplitude de variação da temperatura interna da câmara inicial do ninho dessa formiga cortadeira. Por outro lado, a temperatura interna dessa câmara, mais estável no ambiente sombreado, se deve à menor incidência de irradiância solar e, portanto, mais favorável para a sobrevivência da rainha e a formação e desenvolvimento da colônia de *A. sexdens*. A concentração de CO₂ foi maior nos ninhos de *A. sexdens* de campo, já a população dos ninhos foi maior em laboratório. O solo da parede dos ninhos iniciais de *A. sexdens* é composto

por material grosso, principalmente quartzo e carvão, e material fino composto por argila, matéria orgânica e óxidos de ferro. A porosidade das paredes internas da câmara dos ninhos iniciais foi menor que aquela da matriz do solo externo e adjacente. A concentração de dióxido de carbono em ninhos de *A. sexdens* em campo é maior que a daqueles em laboratório, devido ao acúmulo de CO₂ na câmara do inicial dos mesmos.

Palavras-chaves: Attini; Claustral; CO₂; Mortalidade.

ABSTRACT

The choice of habitat by founding queens, of leaf-cutting ant nests, may vary according to abiotic factors such as temperature, density and soil moisture. Although some studies have already been carried out on the initial nests of *Atta*, there is still little knowledge in the literature about the development of initial nests, how the physical and biological control of the nesting environment is carried out and situations that explain the success of the foundation of the initial nests. In order to collaborate with the knowledge about the initial nests of leaf-cutting ants, the present study aimed to study how the temperature and shading of the soil influence the depth of foundation of the nests; to study the micromorphology of the internal soil of the chambers and surrounding them to verify if there is structural modification of the soil of initial nests; and to study the gas exchange of the initial nests in the field and laboratory. The establishment of queens was longer and the nest foundation time, excavated soil volume, depth and volume of the initial chamber were smaller in soils with lower density and higher humidity than in denser and drier ones. Queen mortality was 3% in less dense and humid soils, and 9% to 13% in denser and less humid soils. The development of colonies of *A. sexdens* in two different environments was better in shaded environment. The queen mass was similar in both environments, but their mortality was higher in the sunny environment. High density and low soil moisture increase nest excavation time and decrease excavated soil volume, nest depth and survival of *A. sexdens* founder queens. On the other hand, low density and high soil moisture decrease the excavation time of the nest and increase the volume of soil excavated and the depth of the nest, in addition to the survival of the founder queens of *A. sexdens*. The worst parameters of *A. sexdens* nests in the sunny environment are due to the greater solar irradiance, increasing the amplitude of variation of the internal temperature of the initial chamber of the nest of this leaf-cutting ant. On the other hand, the internal temperature of this chamber, which is more stable in the shaded environment, is due to the lower incidence of solar irradiance and, therefore, more favorable for the survival of the queen and the formation and development of the *A. sexdens* colony. The concentration of CO₂ was higher in the nests of *A. sexdens* in the field, whereas the composition of the nests was higher in the laboratory. The soil on the wall of the initial nests of *A. sexdens* is composed of coarse material, mainly quartz and coal, and fine material composed of clay, organic matter and iron oxides. The soil porosity of the chamber wall of the initial nests was lower than that of the

adjacent soil matrix and differed between those of the nests. The concentration of carbon dioxide in *A. sexdens* nests in the field is higher than in the laboratory, due to the accumulation of CO₂ in their initial chamber.

Keywords: Attini; Cloister; CO₂; Mortality

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1 - A DENSIDADE E A UMIDADE DO SOLO AFETAM A FORMAÇÃO DO NINHO INICIAL DE FORMIGAS CORTADEIRAS?	18
Introdução	20
Material e métodos.....	21
Coleta de rainhas de <i>Atta sexdens</i> após o voo nupcial.....	21
Área Experimental.....	21
Análise estatística	22
Resultados	22
Discussão.....	24
Referências	26
CAPÍTULO 2 - O HABITAT IDEAL PARA A CONSTRUÇÃO DE NINHOS INICIAIS PELAS RAINHAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS	30
Introdução	32
Resultados	33
Discussão.....	38
Material e métodos.....	41
Coleta de rainhas de <i>Atta sexdens</i> após o voo nupcial.....	41
Áreas de experimento.	41
Desenvolvimento dos ninhos iniciais durante a fase claustral.....	42
Medição de temperatura e radiação.....	42
Análise estatística.	44
Referências	45
CAPÍTULO 3 - NÍVEIS DE DIÓXIDO DE CARBONO EM NINHOS INICIAIS DA FORMIGA CORTADEIRA <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	51
Introdução	53
Resultados	54

Discussão	58
Material e métodos	61
Coleta de rainhas de <i>Atta sexdens</i> após o voo nupcial.	61
Níveis de CO ₂ das colônias de laboratório.....	61
Níveis de CO ₂ das colônias de campo.....	61
Composição da colônia inicial.....	62
Análise estatística.....	62
Referências.....	63
CAPÍTULO 4 - MICROMORFOLOGIA DO SOLO E TROCA DE CO₂ EM NINHOS INICIAIS DE <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	68
Introdução.....	69
Material e métodos	70
Ninhos iniciais de <i>Atta sexdens</i>	70
Medição do nível de CO ₂ dos ninhos	70
Micromorfologia do solo da parede da câmara inicial do ninho	70
Análise estatística.....	73
Resultados.....	73
Discussão	78
Referências.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO GERAL

As formigas pertencem à Família Formicidae dividida em várias subfamílias. Dentre elas está a subfamília Myrmicinae que compreende as formigas da Tribo Attini. A principal característica dessa Tribo é o ato de cultivarem um fungo simbiote do qual se alimentam (MUELLER *et al.*, 1998). A tribo é encontrada somente no continente americano, porém abrangendo uma ampla área geográfica, desde o norte da Argentina até o sul dos Estados Unidos. Dentro dessa faixa, as formigas Attini ocorrem nos mais diversos biomas, como, por exemplo, a floresta amazônica e em ambientes extremos, como o deserto (SOLOMON *et al.*, 2008; WEBER, 1972a).

As formigas cortadeiras do gênero *Atta*, *Acromyrmex* e *Amoimyrmex* são conhecidas popularmente como “saúvas” e “quenquéns”, respectivamente, sendo no Brasil, reconhecidas como pragas na agricultura em florestas plantadas e na pecuária (CHERRETT, 1986ab; CRISTIANO *et al.*, 2020). As formigas cortadeiras apresentam grande especialização na construção de seus ninhos, que normalmente são formados por câmaras subterrâneas ligadas entre si por galerias ou canais que se abrem na superfície do solo (ARAÚJO; DELLA LÚCIA, 1997). Essas câmaras são especializadas em abrigar o fungo simbiote, principal fonte de alimento para as larvas e formigas (BASS; CHERRETT, 1995; SILVA *et al.*, 2003). Essa relação mutualística se originou há aproximadamente 50 milhões de anos e garantiu às formigas maior sucesso no processo de adaptação ao ambiente, grande versatilidade nutricional e alta eficiência na competição com outros herbívoros na colonização de diversos habitats (SCHULTZ; BRADY, 2008; VASCONCELOS; FOWLER, 1990).

Além disso, esses ninhos subterrâneos, promovem proteção para a colônia e ajudam na manutenção de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de imaturos e adultos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), o que requer uma intensa atividade de escavação do solo pelas formigas (HALLEY *et al.*, 2005). O sucesso desse grupo de insetos está relacionado tanto com a organização social e com a interação formiga - planta – fungo (CHERRETT, 1968; DEJEAN *et al.*, 1992; FORTI, 1985; GARCIA *et al.*, 2003).

O gênero *Atta* é considerado um grupo de insetos eusociais por apresentarem sobreposição de gerações, divisão de trabalho e cuidado com a prole (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). A organização social caracteriza-se pelo polimorfismo acentuado e

divisão das tarefas entre os indivíduos (OLIVEIRA, 2006). A casta das operárias jardineiras é responsável pelo cuidado com a prole e manutenção do jardim de fungo; as operárias generalistas exploram novos recursos alimentares, cortam e transportam o substrato vegetal e escavam os ninhos; os soldados defendem a colônia por apresentarem mandíbulas bem desenvolvida e grande tamanho. As formas aladas içás (fêmeas) e bitús (machos) aparecem somente na época de reprodução (DELLA LUCIA, 1993; JUSTI JÚNIOR *et al.*, 1996).

A fundação de uma colônia se inicia com a revoada das formas sexuadas, que geralmente, ocorre após as primeiras chuvas da primavera, sendo que uma grande parte das formas sexuadas dos ninhos, sai dos ninhos para iniciar seu voo nupcial. Ao saírem da colônia, as içás carregam uma pequena porção do fungo simbiote em sua cavidade bucal (JUSTI JÚNIOR *et al.*, 1996). Durante o voo os machos copulam as fêmeas que regressam ao solo, arrancam as asas e começam a buscar um local para a construção de um novo ninho (AUTUORI, 1957; CAETANO *et al.*, 2002). Uma vez escolhido o local, a rainha começa a perfurar no solo com as mandíbulas um canal que culminará em uma pequena câmara, na qual o fragmento do fungo simbiote é regurgitado e que depois de cultivado, servirá de alimento para o saúveiro (JUSTI JÚNIOR *et al.*, 1996). Nesse primeiro passo da fundação a rainha, além da escavação, é responsável por todas as atividades dentro do ninho até emergirem as primeiras operárias e estas iniciarem o forrageamento (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), o que ocorre por volta dos 75 dias a partir da fundação (AUTUORI, 1942).

As formigas desenvolveram uma série de mecanismos e comportamentos que envolvem a proteção de seus cultivares e promovem condições favoráveis para o crescimento do fungo simbiote (OI; PEREIRA, 1993; WEBER, 1972b). Uns desses comportamentos para promover o crescimento do fungo simbiótico são as etapas feitas pelas formigas cortadeiras para a preparação do substrato vegetal antes de ser incorporado no ninho, ocorrendo primeiramente o corte de folhas em pedaços menores em relação ao material carregado para dentro da colônia e posteriormente, é adicionado ao material, saliva e gotículas do líquido proveniente do intestino posterior (reto) das operárias (WEBER, 1972b) para ajudar na incorporação desse novo material vegetal no fungo simbiótico. As operárias apresentam também o comportamento de “lamber” as folhas contribuindo para retirada de epicutículas e microrganismos presentes na folha (QUINLAN; CHERRETT, 1977). Esse

comportamento está relacionado com a estrutura denominada de cavidade infrabucal que atua como filtro, impedindo a entrada de partículas sólidas, incluindo os esporos de fungos coletados durante a limpeza das folhas, do ninho e do próprio corpo das operárias. O material retido é posteriormente regurgitado no “lixo” (QUINLAN; CHERRETT, 1977). Esse regurgito é reunido em pilhas que formam o lixo, e que aparentemente essas pilhas auxiliariam na defesa do jardim contra microrganismos indesejáveis. Portanto, as formigas exercem um papel fundamental na contínua proteção do fungo mutualístico (BASS; CHERRETT, 1994; WEBER, 1957), realizando uma série de atividades que levam ao estabelecimento de um ambiente propício para o desenvolvimento do fungo e saúde da colônia (QUINLAN; CHERRETT, 1977).

A escavação realizada pelas formigas cortadeiras para a construção das estruturas como câmaras e túneis, proporcionam uma modificação do solo, e consequentemente podem afetar a dinâmica de trocas gasosas no interior dos mesmos. Desse modo, o sistema arquitetônico interno criado na construção desses ninhos também pode ter um papel importante no deslocamento e circulação dos gases dentro do ninho. Algumas espécies de formigas cortadeiras apresentam plasticidade durante a nidificação de acordo com a temperatura do solo, como exemplo temos a espécie *Acromyrmex lundii* que usa a temperatura do solo como uma sugestão de orientação para decidir por onde começar cavar e respondem às temperaturas do solo subindo, descendo e movendo-se para locais de escavação alternativos ou parando de cavar, dependendo da alteração de temperaturas (BOLLAZZI *et al.*, 2008; BOLLAZZI; ROCES, 2002), isto é, os ninhos subterrâneos podem estar em locais mais quentes, e serem superficiais em locais mais frios de acordo com a preferência da espécie (BOLLAZZI *et al.*, 2008).

As formigas também modificam a estrutura do ninho visando garantir uma boa estabilidade térmica e umidade no seu interior. No gênero *Acromyrmex*, por exemplo, as operárias constroem o ninho com palha de fragmentos de grama, em vez de solo, permitindo a essa colônia poder atingir uma faixa de temperatura adequada no interior do ninho para o seu crescimento e reprodução, além disso, as operárias podem fechar os orifícios na superfície do ninho, para permitir uma manutenção da umidade interna do ninho (BOLLAZZI; ROCES, 2010b). Assim, essa estrutura permite a termorregulação pela baixa difusividade térmica evitando o superaquecimento diurno pela radiação solar e perdas de calor durante a noite (BOLLAZZI; ROCES, 2010a).

O manejo da troca gasosa no ninho também é manejado de forma adequada pelas operárias, pois as formigas cortadeiras são adaptadas a tolerar elevados níveis de CO₂, cerca de 1,5 - 4,5% em ninhos adultos de *A. capiguara* e *A. laevigata* (BOLLAZZI *et al.*, 2012). Também, são capazes de tolerar uma hipóxia grave (baixo teor de oxigênio) (HEBLING *et al.*, 1992). Essa modificação da atmosférica é controlada pelas operárias através dos orifícios de entrada e saída de gases, ou seja, saída de ar rico em CO₂ e entrada de O₂ dentro dos ninhos. Os níveis desses gases dentro das câmaras de fungo variam com o aumento da profundidade dos ninhos, além disso, a forma externa do ninho também induz a circulação de ar no subsolo, embora a entrada de ar seja incapaz de atingir diretamente as câmaras de fungos.

Alguns estudos afirmam que a respiração da colônia depende completamente dos fluxos difusivos entre o ar da câmara e do ninho, que a circulação de ar, apesar de não renovar diretamente o ar dentro das câmaras dos ninhos, pode contribuir para a respiração da colônia através do aumento de ar nos ninhos e no solo agindo como uma fonte de O₂-CO₂ e um dissipador por causa da diminuição de CO₂ e aumento nos níveis de O₂ (BOLLAZZI *et al.*, 2012). Exemplo interessante são as formigas que habitam os mangues, onde os níveis de dióxido de carbono no interior dos ninhos se tornam elevados durante o fechamento do ninho, chegando a 11% (NIELSEN *et al.*, 2003). Sob estas condições hipercápnicas (aumento de gás carbônico) e hipóxicas (baixo teor de oxigênio), as formigas são capazes de sustentar a respiração aeróbia até concentrações de CO₂ de 15% (NIELSEN *et al.*, 2006; NIELSEN; CHRISTIAN, 2007).

Em ninhos iniciais de *Atta sexdens*, ou seja, na sua fase claustral, também ocorre à emissão de CO₂ pela rainha, as operárias e pelo fungo simbiote (CAMARGO; FORTI, 2013). No entanto, em situação natural, não se sabe se o CO₂ produzido nesta fase é liberado através do solo por difusão, ou se, é acumulado em níveis altos.

Embora se tenham alguns estudos já realizados acerca dos ninhos iniciais de *Atta*, ainda é escassa na literatura o conhecimento do desenvolvimento dos ninhos, de como é feito o controle físico e biológico do ambiente de nidificação e das situações que explicam o sucesso de fundação dos ninhos iniciais.

Com a finalidade de ampliar os conhecimentos a respeito dos ninhos iniciais de formigas cortadeiras o presente estudo teve como objetivos estudar como a

temperatura e sombreamento do solo influenciam na profundidade de fundação dos ninhos; estudar a micromorfologia do solo interno das câmaras e circundantes a elas para verificar se ocorre modificação estrutural do solo de ninhos iniciais; e estudar a interação entre temperatura e troca gasosa dos ninhos iniciais em campo e laboratório e quais são os mecanismos envolvidos nas trocas gasosas.

CAPÍTULO 1

A DENSIDADE E A UMIDADE DO SOLO AFETAM A FORMAÇÃO DO NINHO INICIAL DE FORMIGAS CORTADEIRAS?¹

Kátia K. A. Sousa¹, Roberto S. Camargo¹, Nadia Caldato¹, Adriano P. Farias¹,
Carlos A. O. Matos², José C. Zanuncio³, Luiz C. Forti¹

¹Departamento de Proteção Vegetal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, Brasil. ²Instituto de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Itapeva, Brasil. ³Departamento de Entomologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

SOUSA, K. K., CAMARGO, R. S., CALDATO, N., FARIAS, A. P., MATOS, C. A., ZANUNCIO, J. C., & FORTI, L. C. (2022). Do soil density and humidity affect nest-founding in leaf-cutting ant queens?. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. doi.org/10.1111/eea.13180

Resumo

A escolha do habitat pelas rainhas fundadoras de ninhos de formigas cortadeiras, depende de fatores abióticos como temperatura, densidade e umidade do solo. A hipótese estudada é de que a densidade e a umidade do solo afetam o tempo de escavação, o volume de solo escavado, a profundidade dos ninhos iniciais e a mortalidade de rainhas da formiga cortadeira (FC) *Atta sexdens* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Formicidae). O objetivo foi avaliar o tempo de escavação, o volume de solo escavado, a profundidade dos ninhos e a sobrevivência das rainhas de *A. sexdens* em solos com densidades e umidades diferentes. Trezentas rainhas de *A. sexdens* foram individualizadas em três áreas experimentais em solos com densidades e umidades diferentes. Cada rainha foi colocada na área experimental (25m²) no centro de um quadrado (50x50 cm). O solo (seco) escavado pelas rainhas foi coletado e o tempo de escavação e a mortalidade das mesmas avaliadas após o estabelecimento do ninho. A seguir, os ninhos foram escavados e a profundidade dos

¹ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Entomologia Experimentalis et Applicata**, onde foi publicado.

mesmas medidas. O estabelecimento das rainhas foi maior e o período de fundação do ninho, volume de solo escavado, profundidade e volume da câmara inicial foram menores em solos com menor densidade e maior umidade que naqueles mais densos e secos. A mortalidade das rainhas foi de 3% em solos menos densos e úmidos, e de 9% a 13% naqueles mais densos e menos úmidos. A densidade e a umidade do solo afetam o tempo de escavação do ninho, a quantidade de solo escavado e a profundidade do ninho e isto está relacionado diretamente com a sobrevivência da rainha fundadora de *A. sexdens*.

Palavras-chaves: Attini; Claustral; Mortalidade; Rainhas

Introdução

Ninhos adultos de formigas cortadeiras do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) produzem castas sexuais formadas por machos e fêmeas (Silva et al. 2015). Essas castas deixam o ninho, em períodos chuvosos e quentes, em grandes quantidades para o voo nupcial para acasalamento (Staab & Kleineidam 2014, Sales et al. 2020), após o qual as fêmeas retornam ao solo para a fundação do ninho (Moser et al. 2004). A seleção do habitat pelas rainhas é pouco conhecida, sabe-se que preferem fundar seus ninhos em clareiras formadas por queda de árvores (Vasconcelos 1990). Além disso, mais de 95% das rainhas morrem durante a fundação do ninho devido a fatores ambientais, patógenos microbianos e predação (Marti et al. 2015).

Rainhas de formigas cortadeiras escavam o solo até a profundidade ideal para construir sua câmara, e ao finalizar essa tarefa, se enclausuram (Camargo et al. 2011; Fröhle & Roces 2012). Nessa fase as rainhas utilizam exclusivamente suas reservas corporais para nutrição e cultivo do fungo (Camargo et al. 2011, Sales et al. 2020). A profundidade do ninho de *Atta* depende da transição da escavação vertical para a horizontal construção da câmara (Fröhle & Roces 2012).

As rainhas de *A. vollenweideri* escavam mais rapidamente em condições favoráveis como temperatura de 27°C em solos arenosos e macios (Fröhle & Roces 2012, Vieira et al. 2015). A profundidade do ninho varia com as rainhas escavando seus túneis até determinada profundidade ou por tempo predeterminado (Fröhle & Roces 2012). Rainhas de *A. sexdens*, no campo, escavam túneis mais curtos que quando em laboratório (Ribeiro 1995), mas com períodos de tempo semelhantes para a escavação.

O comportamento de escavação por *Atta* tem sido estudado em laboratório com diferentes densidades e umidades do solo (Stein & Xavier 1984; Fröhle & Roces 2012; Fujihara et al. 2012; Pielström & Roces 2014; Silva et al. 2014), mas com poucos estudos em campo. A hipótese estudada é de que a densidade e a umidade do solo afetem o tempo de escavação, o volume de solo escavado, a profundidade do ninho e a mortalidade das rainhas da formiga cortadeira *A. sexdens*. O objetivo foi avaliar o tempo de escavação, o volume de solo escavado, a profundidade, o volume dos ninhos e a mortalidade das rainhas de *A. sexdens* em solos com densidades e umidades diferentes.

Material e Métodos

Coleta de rainhas de *Atta sexdens* após o voo nupcial

As rainhas de *A. sexdens* foram coletadas na Fazenda Experimental Lageado em Botucatu, Brazil em 2019 (22°50'37.3"S 48°25'38.3"W) durante o voo nupcial dessa formiga em dias ensolarados após fortes chuvas, do final de outubro ao início de novembro. Trezentas rainhas, que haviam retirado as asas, ou seja, recém copuladas, foram coletadas e mantidas em potes com 1 cm de gesso umedecido no fundo.

Área Experimental

As rainhas foram, individualizadas sobre solo, com densidades e umidades diferentes em áreas de: pastagem- ambiente com cobertura exclusiva de grama *Paspalum notatum* Flüggé com 1,73 g/cm³ de densidade (DS) e 5,5 % de umidade (US) do solo (N=100); área protegida- ambiente arado sem plantas, com 1,50 g/cm³ (DS) e 7,5% (US) com tela sombrite 50% (1,50 x 50 MT) (N= 100); mata- ambiente com plantas silvestres de portes diversos, com 1,74 g/cm³ (DS) e 4,0% (US) (N=100).

As rainhas, de *A. sexdens*, foram individualizadas no centro de um quadrado (50x50 cm) e cobertas com um frasco transparente de 20 cm de diâmetro por 12 cm de altura, delimitando o espaço a ser perfurado no solo por rainha fundadora, totalizando 25 m² por área experimental. Após o período de fundação, o solo escavado pelas rainhas foi coletado e seco e o período de escavação registrado. A mortalidade das rainhas por área experimental foi também, avaliada após o período de fundação, retirando-se, aquelas que morreram durante o processo de escavação.

Após a fundação completa do ninho, caracterizado pelo fechamento do túnel, cada um foi escavado anotando-se o perfil do solo e mensurando, com auxílio de um paquímetro, a profundidade do mesmo.

A estimativa de volume de cada câmara de fungo foi baseada no volume do cilindro. Um fator de correção foi usado para calcular o volume porque as câmaras são arredondadas: $V = \pi r^2 (ch + r0,67)$, em que 'r' é o raio da base da câmara e 'ch' a altura do cilindro, medida subtraindo a altura máxima da câmara de seu raio, $ch = h - r$ (Forti et al., 2017).

Análise estatística

Dados do período de escavação, da massa de solo escavado e da mortalidade das rainhas de pelas rainhas de *A. sexdens*, nas áreas de pastagem, área protegida e mata, foram comparados utilizando o G de heterogeneidade pareado submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e os valores, entre as áreas, desses parâmetros, comparados de forma pareada, pelo teste U de Mann-Whitney. Os valores da profundidade dos ninhos foram submetidos à Anova e comparados pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados do volume da câmara inicial foram submetidos ao teste não paramétrico de Scheirer Ray Hare usado para experimento fatorial duplo entrada e ao teste de comparações múltiplas de medianas de Dunn.

O ajuste dos valores P, dos testes pareados, foi feito por meio do método da taxa de falsas descobertas, que controla a taxa de falsas descobertas (a proporção esperada de falsas descobertas entre as hipóteses rejeitadas). Este é um dos métodos mais poderosos para ajustar os valores de P (Benjamini & Hochberg, 1995). As análises estatísticas foram processadas com o software R for Windows.

Resultados

Os ninhos de *A. sexdens* na área protegida foram escavados em menor tempo que nos ambientes de pastagem ($U = 1463,5$, $p < 0,001$) e mata ($U = 1673,5$, $p < 0,001$). O tempo gasto para as rainhas fundarem seus ninhos na área protegida, pastagem e de mata foi de $778,8 \pm 398,2$ min ($n = 97$), $1719,3 \pm 638,7$ min ($n = 87$) e $1672,7 \pm 661,4$ min ($n = 91$), respectivamente (Fig. 1).

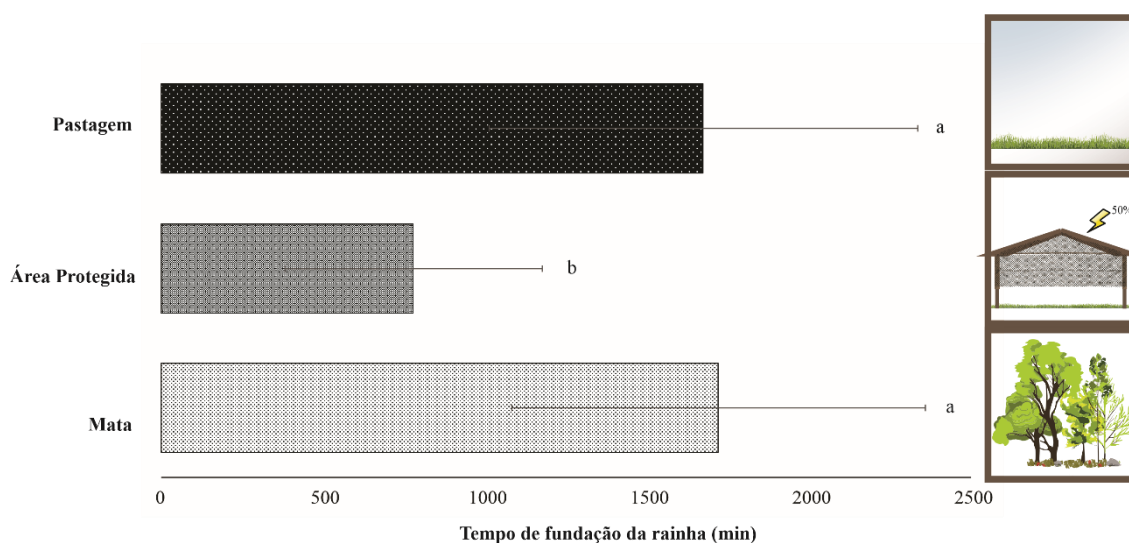


Figura 1. Tempo de escavação pela rainha fundadora de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Medianas seguidas de mesma letra não diferem pelo teste U de Mann-Whitney pareado com ajuste do valor P pelo método da taxa de falsa descoberta.

O volume de solo escavado, após completada a fase de escavação, nas áreas de pastagem, área protegida e mata, foi respectivamente, de $29,24 \pm 9,5$ g (N=87), $31,28 \pm 11,4$ g (N=97) e $27,17 \pm 9,7$ g (N=91). O volume de solo escavado na área protegida foi maior que na de mata ($U=3493,0$, $p<0,05$), sendo o valor desta última semelhante ao da área pastagem ($U=3889,0$, $p>0,05$) (Fig. 2).

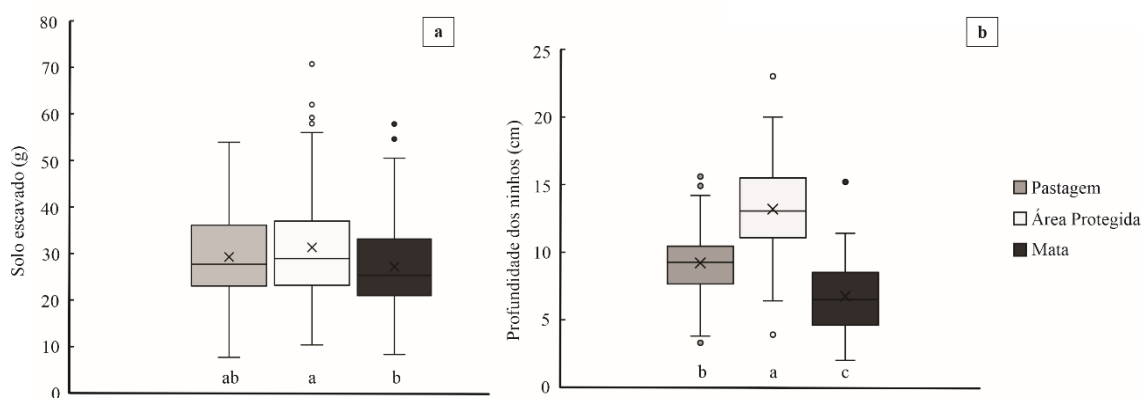


Figura 2. Volume do solo escavado (a) pela rainha fundadora de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Medianas seguidas de mesma letra, por figura, não diferem pelo teste U de Mann-Whitney pareado com ajuste do valor P pelo método da taxa de falsa descoberta. Profundidade (b) dos ninhos escavados pelas rainhas fundadoras de *A. sexdens*. Anova. Medias seguidas de mesma letra não diferem pelo Teste de comparações múltiplas de Tukey.

A profundidade ($F = 52,276$, $p < 0,05$), dos ninhos de *A. sexdens*, foi maior na área protegida ($13,2 \pm 2,7\text{cm}$) que na mata ($6,9 \pm 2,8\text{cm}$), mas sem diferenças entre a pastagem ($9,2 \pm 2,7\text{cm}$) e os demais ambientes (Fig. 2). O volume da câmara dos ninhos, submetido ao teste Scheirer Ray Hare, um teste não paramétrico usado para um experimento fatorial bidirecional, indicou efeito do ambiente ($H = 28,8430$, $p < 0,05$) com maior valor na área protegida ($24,88\text{ cm}^3$) que na pastagem ($8,51\text{ cm}^3$) e mata ($7,30\text{ cm}^3$). Entretanto, o volume da câmara foi semelhante entre os ambientes de pastagem e mata.

A mortalidade das rainhas, de *A. sexdens*, na área protegida (3%) foi menor que nas de pastagem (13%) e na mata (9%) semelhante às duas anteriores (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade de rainhas fundadoras de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em áreas de pastagem, protegida e de mata quando colocadas para escavar em mesmas condições.

Ambientes	Mortas	Vivas	$G\tau^a$
Pastagem	13	87	a
Área Protegida	3	97	b
Mata	9	91	ab

$G\tau^a$ do teste G de heterogeneidade pareado (Sokal & Rohlf 1981).

Discussão

O menor tempo de escavação, pelas rainhas de *A. sexdens* na área protegida ($778,8 \pm 398,2\text{min}$), com solos menos densos e mais úmidos foi maior que o de 360 a 660 min para a formiga cortadeira em solo denso em condições de laboratório (Ribeiro 1995; Camargo et al. 2011, Silva et al. 2015). O maior tempo de fundação dos ninhos em pastagem e mata com solos mais densos e menos úmidos se deve, provavelmente, ao maior esforço de escavação do solo e, conseqüentemente, do tempo de escavação. Esse maior tempo de escavação foi, também, observado quando as rainhas de *A. sexdens* foram submetidas ao esforço contínuo de escavação em solo denso e úmido em condições de laboratório (Camargo et al. 2011, Silva et al. 2015).

O maior volume escavado, pelas rainhas na área protegida, com solo menos denso e mais úmidos, em comparação as áreas de pastagem e mata que têm solos mais secos e menos densos se deve às diferentes situações de esforço na realização desse mecanismo de escavação. A escavação consiste na remoção, pela rainha, de pequenas partículas de solo com suas mandíbulas em mordidas repetidas para a formação da primeira câmara (Römer & Roces, 2015). Essas pequenas partículas de solo escavado são retiradas pela rainha e transportadas para o exterior do ninho (Ribeiro 1995; Camargo et al. 2011; Fröhle & Roces 2012, Silva et al. 2015). Portanto, quando mais duro e seco o solo, maior será o esforço de escavação, e consequentemente, mais tempo gasto escavando o solo, o que explicada o maior tempo gasto, pelas rainhas, para escavar nos ambientes de mata e pastagem. Além disso, a exposição das rainhas na área de mata apresentou um número maior de barreiras físicas (raízes de árvores) do que nas áreas protegidas e pastagens, o que dificulta a escavação para a construção da câmara inicial conforme relatado para *A. vollenweideri* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae) em solo seco e endurecido (Fröhle & Roces, 2012). O volume escavado por rainhas de *A. sexdens* foi menor que o daquelas de *A. vollenweideri*, em laboratório (Fröhle & Roces 2012). Essa diferença pode estar relacionada à densidade do solo fornecido a *A. vollenweideri* e, também, às variações na capacidade de escavação entre rainhas de diferentes espécies de formigas cortadeiras (Fröhle & Roces 2012, Vieira et al. 2015).

A maior profundidade dos ninhos de *A. sexdens*, na área protegida com solo menos denso que nos ambientes de pastagem e mata, com solo mais denso, confirma a relação do microclima com temperatura e umidade adequados com compensação (trade off) entre o gasto de energia e o tempo para completar o comprimento do túnel e, portanto, a profundidade final da câmara inicial (Camargo et al. 2011, Silva et al. 2015). A escavação de uma câmara superficial deve requerer um menor gasto de energia, embora as rainhas sejam expostas ao estresse ambiental, como mudanças de temperatura ou dessecação (Camargo et al. 2011, Camargo et al. 2013). As câmaras profundas, por outro lado, podem ser microclimaticamente mais estáveis, mas demandam um maior esforço para escavar e, além disso, exporiam as rainhas a um maior período de tempo aos predadores durante a escavação (Camargo & Forti, 2013). A profundidade dos ninhos iniciais varia entre as espécies de *Atta* com 7,5 a 12 cm, 6,5 a 13 cm, 15 a 25 cm, 10 a 30 cm, 10 a 15 cm, 11 a 34 cm e 9 a 15 cm para *A. colombica*, *A. cephalotes*, *A. texana*, *A. sexdens rubropilosa*, *A. bisphaerica*, *A.*

capiguara e *A. insulares*, respectivamente (Weber 1937; Bruner & Valdés Barry 1949; Moser 1967; Camargo & Forti 2013; Cardoso et al. 2014; Pielström & Roces 2014). Essa variabilidade pode estar relacionada aos diferentes habitats ocupados por essas formigas (Forti et al. 2020) com solos de diferentes densidades e tipos (Stein & Xavier, 1984). O maior volume de solo escavado, no ambiente de área protegida (solo menos denso e mais úmido) pode ter sido devido, também, aos menores números de barreiras físicas como as raízes de árvores facilitando a escavação da câmara inicial, como relatado para *A. vollenweideri* quando têm obstáculos em condições de laboratório (Fröhle & Roces 2012).

A maior sobrevivência de rainhas de *A. sexdens* na área protegida com solo menos denso e mais úmido que naqueles mais densos e menos úmidos em áreas de pastagem e mata se deve à abrasão cuticular excessiva devido ao aumento do esforço de escavação em solos mais densos, além de perdas de água como descrito para as formigas coletoras de sementes (Johnson, 2000; Johnson e Gibbs, 2004) e ao dano oxidativo excessivo associado ao maior esforço de escavação (Magwere et al., 2006; Sohal & Buchan, 1981). A escavação do ninho a maiores profundidades aumenta o esforço da rainha, reduzindo sua sobrevivência no estágio inicial da colônia (Camargo et al. 2011). Além disso, mais de 95% das rainhas morrem durante o voo nupcial e na escavação de ninhos, principalmente pelo ataque de pássaros, sapos, lagartos, tatus, insetos, como *Canthon* spp. (Coleoptera, Scarabaeidae), formigas (*Solenopsis*, *Paratrechina* e *Nonamyrme*) (Erthal & Tonhasca 2001) e fungos entomopatogênicos (Rodrigues et al. 2010; Marti et al. 2015; Dionisi et al. 2021).

A densidade e umidade do solo afetaram o esforço de escavação das rainhas, resultando em aumento ou redução do período de escavação do ninho, quantidade de solo escavado, profundidade e volume da câmara do ninho, os quais são parâmetros relacionados com a sobrevivência da rainha. A densidade e umidade do solo devem afetar as rainhas devido à uma compensação entre a maximização da profundidade do ninho, para aumentar a proteção contra variáveis ambientais inadequadas, e a minimização do gasto de energia durante a escavação, reduzindo a sobrevivência da mesma.

Referências

Benjamini, Y., Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and

- powerful approach to multiple testing. Statistical Society: Series B (Statistical Methodology) 57, 289–300, 1995.
- Bollazzi, M., & Roces, F. To build or not to build: circulating dry air organizes collective building for climate control in the leaf-cutting ant *Acromyrmex ambiguus*. *Animal Behaviour*, 74(5), 1349-1355. 2007.
- Bruner S.C., Valdés Barry F. Observaciones sobre la biología de la bibijagua (Hymenoptera: Formicidae). *Memorias de la Sociedad Cubana de Historia Natural* 19:135–154, 1949.
- Camargo R., Forti L.C. Queen lipid content and nest growth in the leaf cutting ant (*Atta sexdens rubropilosa*) (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Natural History* 47:65–73, 2013.
- Camargo R.S., Forti L.C., Fujihara R.T., Roces F. Digging effort in leaf-cutting ant queens (*Atta sexdens rubropilosa*) and its effects on survival and colony growth during the claustral phase. *Insectes Sociaux* 58:17–22, 2011.
- Camargo R.S., Forti L.C., Matos C.A.O., Brescovit A.D. Phoretic behaviour of *Attacobius attarum* (Roewer, 1935) (Araneae: Corinnidae: Corinninae) dispersion not associated with predation? *Journal of Natural History* 49:1653–1658, 2015.
- Camargo, R. D. S., Lopes, J. F., & Forti, L. C. Energetic cost of digging behavior in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Revista Brasileira de Entomologia*, 57(4), 401-404. 2013.
- Camargo, R. S., & Forti, L. C. Queen lipid content and nest growth in the leaf cutting ant (*Atta sexdens rubropilosa*) (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Natural History*, 47(1-2), 65-73, 2013.
- Cardoso S. R. S., Forti L.C., Nagamoto N.S., Camargo R.S. First-year nest growth in the leaf-cutting ants *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa*. *Sociobiology*. 61:243–249, 2014.
- Dionisi M., Ozier-Lafontaine H., Laplace D. Control of Amazonian Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae): A Multi-criteria Analysis. *Journal of Economic Entomology* 114:493–504, 2021.
- Erthal M., Tonhasca A. *Attacobius attarum* Spiders (Corinnidae): myrmecophilous predators of immature forms of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Formicidae) 1. *Biotropica*. 33:374–376, 2001.
- Forti L.C., Moreira A.A., Camargo R.S., Caldato N., Castellani, M.A. Nest architecture development of grass-cutting ants. *Revista Brasileira de Entomologia* 62, 46–50,

2017.

- Forti, L.C.; Rando, J. S., Camargo, R. S., Moreira, A. A., Castellani, M. A., Leite, S. A., Sousa, K. K.A, Andrade, Caldato, N. Occurrence of leaf-cutting and grass-cutting ants of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) in geographic regions of Brazil. *Sociobiology*, 67, 514, 2020
- Fröhle K., Roces F. The determination of nest depth in founding queens of leaf-cutting ants (*Atta vollenweideri*): idiothetic and temporal control. *Journal of Experimental Biology* 215:1642–1650, 2012.
- Fujihara R.T., Camargo R.S., Forti L.C. Lipid and energy contents in the bodies of queens of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae): pre-and post-nuptial flight. *Revista Brasileira de Entomologia* 56:73–75, 2012.
- Johnson R.A. Gibbs A.G. Effect of mating stage on water balance, cuticular hydrocarbons and metabolism in the desert harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *Journal of Insect Physiology* 50(10):943–953, 2004.
- Johnson R.A. Water loss in desert ants: caste variation and the effect of cuticle abrasion. *Physiological Entomology* 25: 48–53, 2000.
- Magwere T., Pamplona R., Miwa S., Martinez-Diaz P., Portero-Otin M., Brand M.D., Partridge L. Flight activity, mortality rates, and lipoxidative damage in *Drosophila*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 61(2): 136–145, 2006.
- Marti H.E., Carlson A.L., Brown B.V., Mueller U.G. Foundress queen mortality and early colony growth of the leafcutter ant, *Atta texana* (Formicidae, Hymenoptera). *Insectes Sociaux* 62:357–363, 2015.
- Moser J.C. Mating activities of *Atta texana* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux* 14:295–312, 1967.
- Moser J.C., Reeve J.D., Bento J.M.S., Della Lucia T.M.C., Cameron R.S., Heck N.M. Eye size and behaviour of day-and night-flying leafcutting ant alates. *Journal of Zoology* 264:69–75, 2004.
- Pielström S., Roces F. Soil moisture and excavation behaviour in the Chaco leaf-cutting ant (*Atta vollenweideri*): digging performance and prevention of water inflow into the nest. *PLoS ONE* 9:e95658, 2014.
- R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2020.
- Ribeiro F.J.L. A escavação do solo pela fêmea da saúva (*Atta sexdens rubropilosa*).

Psicol USP 6:75–93 1995.

- Rodrigues A., Silva A., Bacci Jr M., Forti L.C., Pagnocca F.C. Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Applied Entomology* 134:342–345, 2010.
- Römer, D., & Roces, F. (2015). Available space, symbiotic fungus and colony brood influence excavation and lead to the adjustment of nest enlargement in leaf-cutting ants. *Insectes sociaux*, 62(4), 401-413.
- Sales, T. A., Toledo, A. M. O., & Lopes, J. F. S. (2020). The best of heavy queens: influence of post-flight weight on queens' survival and productivity in *Acromyrmex subterraneus* (Forel, 1893) (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux*, 67(3), 383-390.
- Silva E.J., Camargo R.S., Forti L.C., Travaglini R.V. Protein content of leaf-cutting ant queens before the nuptial flight and during the post-claustral phase. *Revista Brasileira de Entomologia* 58:333–336, 2014.
- Silva, E. J., Camargo, R. S., & Forti, L. C. (2015). Flight and digging effort in leaf-cutting ant males and gynes. *Sociobiology*, 62(3), 334-339.
- Sokal R.S. Buchan P.B. Relationship between physical activity and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Experimental Gerontology* 16(2): 157–162, 1981.
- Staab, M., & Kleineidam, C. J. (2014). Initiation of swarming behavior and synchronization of mating flights in the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri* FOREL, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 19, 93-102.
- Stein C., Xavier G.F. Does substrate density affect the nest depth of female *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera, Formicidae)?. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 17:297–300, 1984.
- Vasconcelos H.L. Habitat selection by the queens of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. in Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 249–252, 1990.
- Vieira, A. S., Camargo-Mathias, M. I., & Roces, F. (2015). Comparative morphophysiology of the metapleural glands of two *Atta* leaf-cutting ant queens nesting in clayish and organic soils. *Arthropod structure & development*, 44(5), 444-454.
- Weber N.A. The biology of the fungus growing ants. Part. I. New forms. *Revista de Entomologia* 7:340–378, 1937.

CAPÍTULO 2

O HABITAT IDEAL PARA A CONSTRUÇÃO DE NINHOS INICIAIS PELAS RAINHAS DE FORMIGAS CORTADEIRAS²

Kátia K. A. Sousa¹, Roberto S. Camargo¹, Nadia Caldato¹, Adriano P. Farias¹,
Marcus V. C. Calca², Alexandre Dal Pai², Carlos A. O. Matos³, José C.
Zanuncio⁴, Isabel C. L. Santos⁵ & Luiz C. Forti¹

¹Departamento de Proteção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil. ³Instituto de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Itapeva, São Paulo, Brasil. ⁴Departamento de Entomologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil. ⁵Laboratório de Fitossanidade (FitLab), Instituto Federal de Mato Grosso, Cáceres, Mato Grosso, Brasil.

SOUSA, K. K., CAMARGO, R. S., CALDATO, N., FARIAS, A. P., CALCA, M. V., DAL PAI, A., MATOS, C. A. O., ZANUNCIO, J. C., SANTOS, I. C. L. & FORTI, L. C. (2022). The ideal habitat for leaf-cutting ant queens to build their nests. **Scientific reports**, 12(1), 1-9. doi.org/10.1038/s41598-022-08918-2

RESUMO

Rainhas de *Atta sexdens* Forel (Hymenoptera: Formicidae) enfrentam fatores ambientais bióticos e abióticos no habitat onde fundam seus ninhos. Fatores abióticos como predação, patógenos microbianos, sucesso na regurgitação do fungo simbiote, esforço de escavação e abióticos como luz solar irradiante, temperatura, densidade e umidade do solo exercem, sobre as rainhas, pressão de seleção. A hipótese é que a sobrevivência da colônia inicial, em diferentes ambientes no campo, varie com fatores abióticos como a temperatura e a irradiação solar. Rainhas, da formiga cortadeira *A. sexdens*, foram instaladas em condições ensolaradas e sombreadas para testar essa

² Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Scientific Reports**, onde foi publicado.

hipótese. Duzentas rainhas de *A. sexdens* foram coletadas e individualizadas em duas áreas experimentais (ensolarada e sombreada), na área experimental (25m²) cada rainha foi mantida no centro de um quadrado (50x50 cm). A temperatura, irradiância solar, profundidade do ninho e mortalidade das rainhas foram avaliadas. O desenvolvimento das colônias de *A. sexdens* foi melhor e a profundidade, volume da câmara inicial, biomassa do jardim de fungo e números de ovos, larvas, pupas e operárias do ninho dessa formiga cortadeira foi maior no ambiente sombreado. A massa da rainha foi semelhante nos dois ambientes, mas a mortalidade das mesmas foi maior no ambiente ensolarado. Os piores parâmetros dos ninhos de *A. sexdens* no ambiente ensolarado se devem à maior irradiância solar, aumentando a amplitude de variação da temperatura interna da câmara inicial do ninho dessa formiga cortadeira. Por outro lado, a temperatura interna dessa câmara foi mais estável no ambiente sombreado, isso se deve à menor incidência de irradiância solar e, portanto o ambiente sombreado é o mais favorável para a sobrevivência da rainha e a formação e desenvolvimento de colônia de *A. sexdens*.

Introdução

A vulnerabilidade das rainhas de *Atta sexdens* Forel (Hymenoptera: Formicidae) é alta durante a fase claustral, quando maximizam a escavação do ninho e se protegem contra variáveis ambientais com gasto mínimo de energia para aumentar sua sobrevivência. Essa fase inicia após o voo nupcial quando a rainha escava a primeira câmara do ninho, em média de 10 a 30 cm de profundidade, interligada a superfície por um túnel construído e fechado pelas mesmas e que será aberto, somente, quando as primeiras operárias emergirem¹. A rainha, na clausura, perde cerca de 40% de seu peso por não se alimentar e se manter, exclusivamente, com suas reservas corporais e utilizar as mesmas para cultivar o fungo simbiote. Além disso, cuida e alimenta a prole, com suas reservas corporais, até as primeiras operárias adultas iniciarem o forrageamento, normalmente, após três a quatro meses do voo nupcial^{2,3}.

A sobrevivência da colônia inicial de formigas cortadeiras varia com fatores ambientais bióticos e abióticos no habitat onde a rainha fundou o ninho. Rainhas de *A. sexdens* preferem fundar seus ninhos em clareiras⁴, possivelmente, por serem áreas mais fáceis e seguras para o pouso sem passar pelo dossel das plantas⁵. Além disso, o sucesso de regurgitação do fungo simbiote, a redução do esforço de escavação e a temperatura, densidade e umidade do solo, mais favoráveis, podem explicar o maior sucesso das rainhas nesses locais^{1,2,6-9}.

A temperatura do ambiente e do solo varia com a irradiação solar e afeta a nidificação de formigas cortadeiras, como relatado para espécies de *Atta* nidificando em florestas (locais sombreados) e pastagens (locais a sol pleno)¹⁰⁻¹². A profundidade inicial da câmara exerce a maior pressão de seleção, variando entre espécies de formigas, com câmaras mais profundas para *A. bisphaerica* que para *A. sexdens rubropilosa*¹³. Além disso, o processo de nidificação, hábitos e estratégias de forrageamento diferiram entre *A. bisphaerica* Forel e *A. sexdens*, com a primeira, normalmente, estabelecendo seus ninhos a pleno sol em áreas com forrageiras, predominantemente, gramíneas e a segunda em locais sombreados onde cortam folhas de dicotiledôneas¹⁴. Além disso, diferenças na profundidade dos ninhos, entre essas espécies, podem estar relacionadas com a temperatura do solo, menor nos sombreados⁷. As câmaras de fungos, em ninhos expostos em pastagens, são mais profundas que aqueles em área sombreada dentro de matas com a temperatura do solo se correlacionando, negativamente, com sua profundidade⁷. A umidade e a

temperatura do solo atuam, simultaneamente, devido à termopreferência das operárias construindo ninhos superficiais em solos frios e mais profundos em solos quentes⁷. A umidade, também, varia com a profundidade do solo, afetando o comportamento de escavação de ninhos por formigas cortadeiras^{7,15}.

A irradiação solar e, conseqüentemente, a temperatura, afetou a profundidade da câmara inicial e a sobrevivência de colônias de formigas cortadeiras. A hipótese estudada é que a sobrevivência da rainha fundadora de *A. sexdens* e o desenvolvimento da colônia inicial dessa formiga cortadeira, durante a fase claustral, variem entre ambientes ensolarados e sombreados. O objetivo do estudo foi avaliar os números de ovos, larvas, pupas e adultos, a massa da rainha e a biomassa do jardim de fungo e as dimensões (largura, comprimento, altura e profundidade) dos ninhos dessa formiga cortadeira em solos em ambientes ensolarados e sombreados. A mortalidade da rainha foi obtida durante a fase claustral.

Resultados

Os índices de concordância de Willmott, nos quatro meses, para a temperatura externa e interna, de ninhos de *A. sexdens*, foram maiores, 0,85 a 0,93 e 0,58 a 0,64, nos ambientes ensolarado e sombreado, respectivamente. Esses índices foram menores para a irradiância e diferiram entre os ambientes ensolarado e sombreado, 0,07 a 0,32 (Fig. 1a). Além disso, esses índices, entre a temperatura externa e interna, variaram de 0,44 a 0,47 no ambiente ensolarado e de 0,78 à 0,89 no sombreado (Fig. 1b).

As temperaturas médias externas e internas, dos ninhos da formiga cortadeira *A. sexdens*, nos ambientes ensolarados e sombreados, durante os quatro meses, foram de $23,3 \pm 5,8$; $24,6 \pm 4,7$; $23,9 \pm 4,0$; $22,9 \pm 4,1$ e $25,3 \pm 1,0$; $26,2 \pm 1,0$; $26,0 \pm 0,9$; $24,8 \pm 1,0$ °C com irradiância de $21,3 \pm 7,0$; $19,0 \pm 8,0$; $17,5 \pm 7,1$; $17,8 \pm 4,8$ MJ/m², respectivamente. No ambiente sombreado, as temperaturas médias, externa e interna, foram de $22,1 \pm 3,6$; $23,5 \pm 3,1$; $23,1 \pm 2,8$; $22,0 \pm 2,6$ °C e $23,5 \pm 1,8$; $24,4 \pm 1,7$; $24,3 \pm 1,8$; $23,3 \pm 2,1$ °C e a irradiância de $6,3 \pm 3,8$; $7,5 \pm 2,0$; $3,2 \pm 2,2$; $2,3 \pm 1,5$ MJ/m².

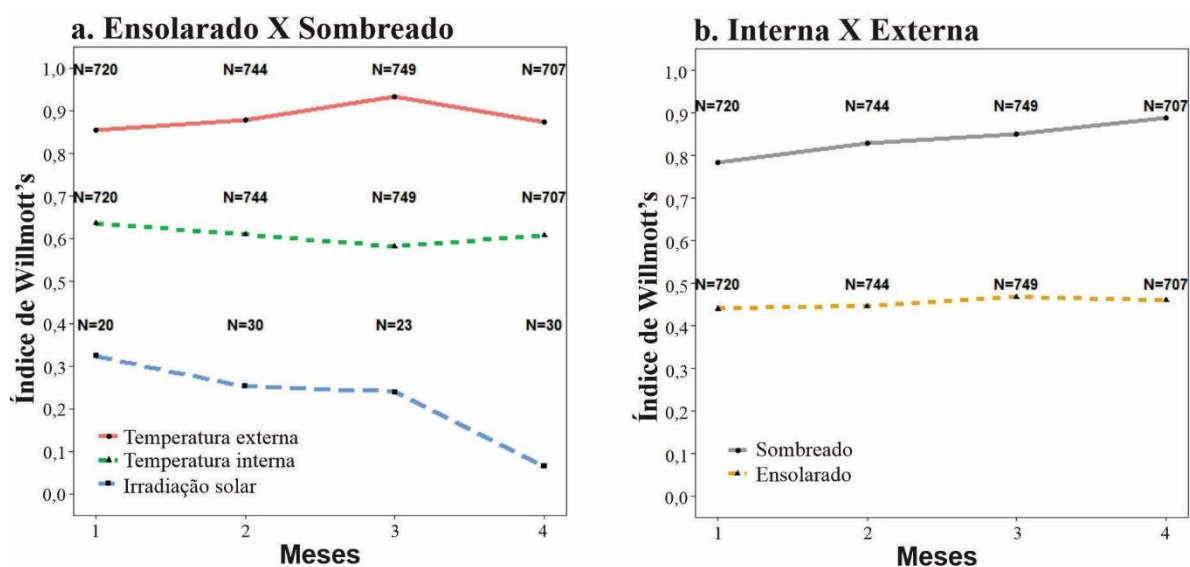


Figura 1. Temperatura e irradiância ao longo de quatro meses de ninhos iniciais de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em ambientes ensolarados e sombreados. Índice de concordância de Willmott da irradiância e das temperaturas interna e externa (a) e entre as temperaturas externa e interna (b) em ambientes ensolarados e sombreados. (N = tamanho da amostra)

A profundidade, largura, comprimento e altura dos ninhos e o volume da câmara inicial de ninhos de *A. sexdens* foram maiores naqueles fundados no ambiente sombreado que no ensolarado (Tabela 1).

Tabela 1. Profundidade (Prof.), largura (Larg.), comprimento (Comp.), altura (Alt.) e volume (Vol.) da câmara inicial dos ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em ambientes ensolarado e sombreado

	Prof.* _(cm)	Larg* _(cm)	Comp* _(cm)	Alt* _(cm)	Vol** _(cm³)
Ensolarado	9,21±0,39b	2,43±0,14b	3,34±0,18b	2,62±0,15b	8,51±0,12b
Sombreado	13,18±0,38a	3,41±0,14a	4,52±0,16a	3,66±0,14a	24,88±0,15a

Resultados dos testes de comparação múltiplas. *Médias seguidas de mesma letra, por coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). **Medianas seguidas de mesma letra, por coluna, não diferem pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$).

A massa das rainhas foi maior e a biomassa do jardim de fungo menor no primeiro que no quarto mês, 658,5 mg e 64,5 mg e 229,45 mg 1354,9 mg, respectivamente (Tabela 2, Fig. 2).

Tabela 2. Massa da rainha (MR) e biomassa (Bio.) do fungo (mg), número de ovos (Ov.), larvas (La.), pupas (Pu.), operárias pequenas (OP) e médias (OM) em ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera) Formicidae) nos primeiro (I), segundo (II), terceiro (III) e quarto meses (IV) em ambientes ensolarado (Ens.) e sombreado (Somb.)

	I	II	III	IV	Ens.	Somb.
MR (mg)	658,5 ^{11,0} a	470,7 ^{40,1} b	278,3 ^{12,5} c	229,4 ^{31,3} c	612,8 ^{69,3} a	425,45 ^{29,0} a
Bio. (mg)	64,5 ^{25,4} b	189,8 ^{30,7} ab	668,3 ^{210,6} a	1354,9 ^{523,1} a	103,1 ^{146,6} b	257,70 ^{170,1} a
Ovos	25,0 ^{5,3} a	71,5 ^{10,2} b	115,5 ^{28,7} b	73,5 ^{28,8} ab	53,0 ^{12,2} b	64,00 ^{13,4} a
Larvas	30,0 ^{6,8} a	54,0 ^{9,0} a	86,5 ^{21,4} a	69,0 ^{31,5} a	51,0 ^{10,1} b	65,50 ^{10,8} a
Pupas	0,0 ^{2,8} a	54,5 ^{8,0} b	32,5 ^{5,6} b	62,5 ^{14,2} b	0,0 ^{6,6} b	32,50 ^{5,7} a
OP.	0,0 ⁰ a	25,0 ^{3,8} b	64,0 ^{7,4} c	66,0 ^{14,5} bc	0,0 ^{8,5} b	28,50 ^{6,4} a
OM.	0,0 ⁰ a	3,0 ^{1,2} b	85,0 ^{2,0} b	7,5 ^{1,8} b	0,0 ^{1,3} b	4,50 ^{1,1} a

Resultados dos testes de comparação múltiplas. *Medianas seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Dunn ($\alpha = 0,05$). Valores em sobrescrito representam o erro padrão.

O número de ovos de *A. sexdens* foi menor no primeiro mês (25,0) que no terceiro (115,5) em campo. O número de larvas foi semelhante nos quatro meses. Os números de pupas e de operárias pequenas e médias foram menores no primeiro que nos segundo, terceiro e quarto meses (Tabela 2, Fig. 2a).

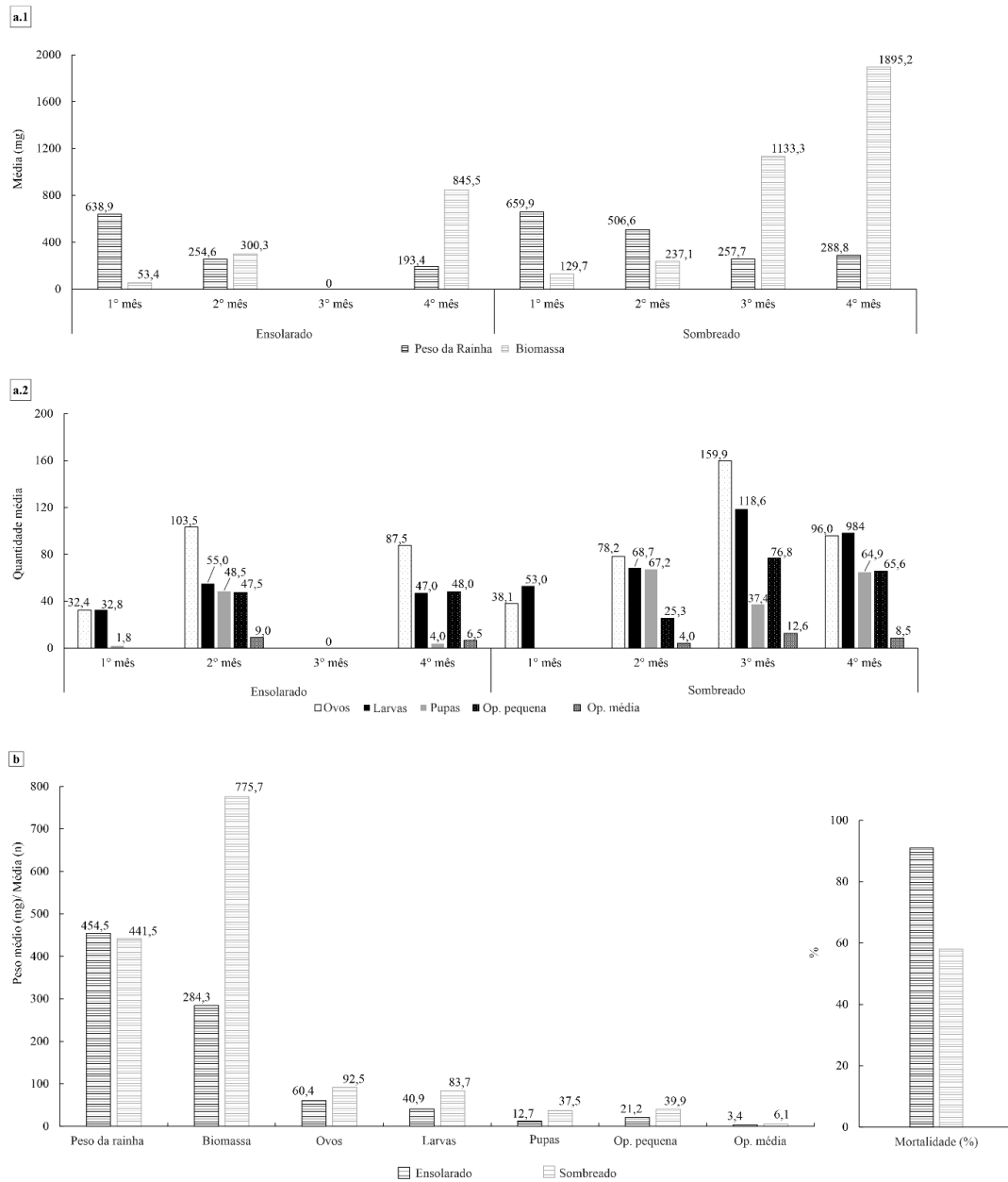


Figura 2. Desenvolvimento de ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente ensolarado e sombreado ao longo de quatro meses (a.1, a.2) e média de quatro meses da biologia e mortalidade (b).

A biomassa do fungo e os números de ovos, larvas, pupas, operárias pequenas e médias foram menores no ambiente ensolarado que no sombreado. A massa corporal de rainhas foi semelhante entre os ambientes (Tabela 2, Figs. 2,3).

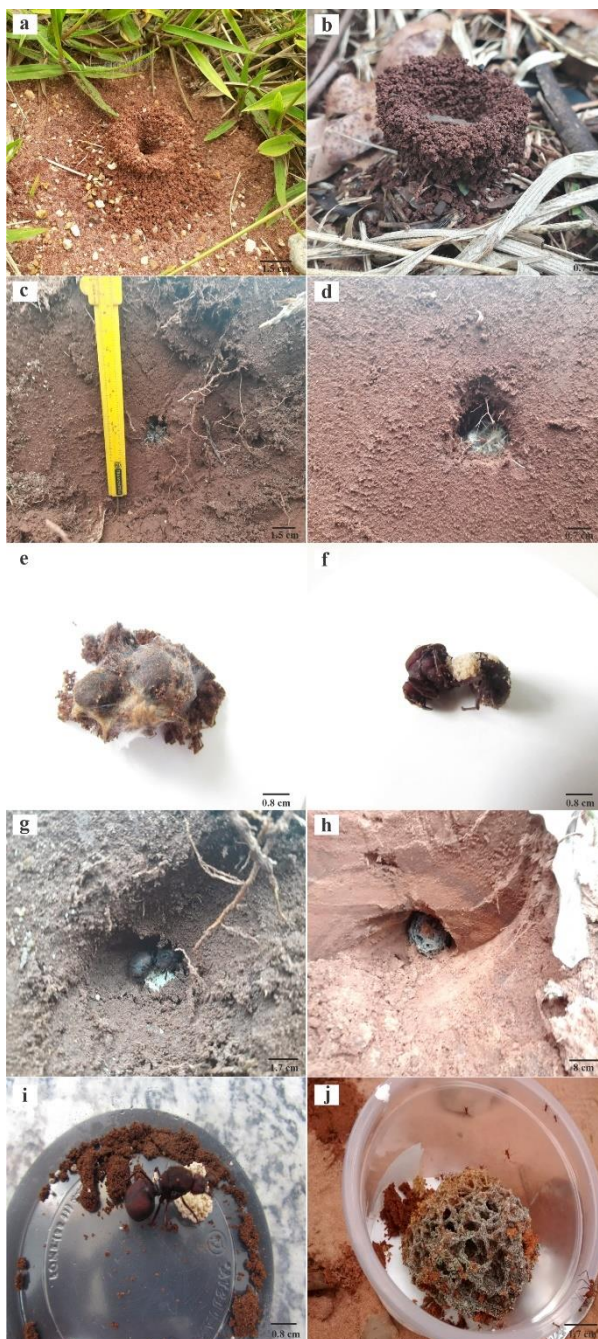


Figura 3. Ninhos da formiga cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente ensolarado e sombreado (a, b); Rainha morta dentro da câmara inicial (c, d); Rainha morta com fungo na superfície do corpo (e, f); A rainha viva em ambiente ensolarado e sombreado (g, h); Colônia retirada do ninho do ambiente ensolarado e sombreado (i, j).

A mortalidade de ninhos de *A. sexdens*, durante a fundação claustral, foi maior no ambiente ensolarado (91%) que no sombreado (58%) ($X^2 = 22,79$, $p < 0,05$) (Fig. 2b).

Discussão

Os maiores índices de concordância de Willmott, nos quatro meses, para as temperaturas externa e interna, nos ambientes ensolarado e sombreado com valores próximos de 1 confirmam que as colônias de *A. sexdens* não foram expostas a temperaturas drasticamente diferentes. Os menores valores desse índice, para a irradiância e diferindo entre os ambientes ensolarado e sombreado para a temperatura interna dos ambientes (na câmara inicial), indicam variações na temperatura interna dos ambientes. Valores próximos de 0 de irradiância entre os ambientes representam diferenças entre os ambientes ensolarado e sombreado, mas a temperatura da câmara inicial não variou. A pressão de seleção pela irradiância e, conseqüentemente, a temperatura, define a profundidade ideal da câmara inicial para as rainhas fundadoras¹⁶ para manter este parâmetro em valores adequados para o jardim de fungo e a prole⁸ no campo. A temperatura semelhante, nos ninhos no ambiente sombreado, concorda com o relatado para essa formiga cortadeira, de 24 °C³, mas isto varia entre espécies desses insetos, sendo de 25-28 °C para *A. sexdens*¹⁷, 27,5 °C para *A. vollenweideri*¹⁸ e 27 °C para *A. heyeri*¹⁹. Essa adaptação de uma profundidade ideal para a construção da câmara inicial permite à *A. sexdens* se adaptar a diferentes habitats de sol pleno como em sombreamento. O processo de nidificação, hábitos e estratégias de forrageamento diferem entre *A. bisphaerica* Forel e *A. sexdens*, com a primeira, normalmente, estabelecendo seus ninhos a pleno sol em áreas com forrageiras, predominantemente, gramíneas e a segunda em locais sombreados onde cortam folhas de dicotiledôneas¹⁴. Além disso, diferenças na profundidade dos ninhos, entre essas espécies, podem estar relacionadas com a temperatura do solo, menor em solo sombreado⁷. Por isto, as câmaras de fungos, em ninhos expostos em pastagens, são mais profundas que as daqueles em área sombreada dentro de matas, pois a temperatura do solo é, negativamente, correlacionada com sua profundidade⁷. A umidade e a temperatura do solo atuam, simultaneamente, devido à termopreferência das operárias resultando na construção de ninhos superficiais em solos frios e mais profundos em solos quentes⁷. A umidade

do solo, também, varia com sua profundidade, afetando o comportamento de escavação de ninhos por formigas cortadeiras^{7,15}.

A temperatura no ambiente sombreado foi mais alta que a relatada para *A. sexdens rubropilosa*, de $24,82 \pm 3,14$ °C a $24,11 \pm 1,30$ °C a uma profundidade de 5 a 25 cm do solo, para o desenvolvimento ideal da prole e, conseqüentemente, redução no conteúdo de lipídios das rainhas em altas temperaturas, sem afetar sua sobrevivência²⁰. Isso se deve a profundidade da câmara inicial escavada pela rainha ser adequada para o sucesso da colônia^{8,16}.

As maiores profundidade e volume da câmara inicial dos ninhos no ambiente sombreado que no ensolarado podem estar relacionadas aos diferentes habitats ocupados pela formiga *A. sexdens*²¹ desde florestas densas a cerrado e caatinga. No entanto, a profundidade dos ninhos iniciais varia entre as espécies de *Atta* com 7,5 a 12 cm, 6,5 a 13 cm, 15 a 25 cm, 10 a 30 cm, 10 a 15 cm, 11 a 34 cm e 9 a 15 cm para *A. colombica*, *A. cephalotes*, *A. texana*, *A. sexdens rubropilosa*, *A. bisphaerica*, *A. capiguara* e *A. insulares*, respectivamente^{1,13,15,22-24}. O volume da câmara inicial está dentro do esperado para *A. sexdens*^{1,13} em ambos os ambientes, como relatado para essa formiga com volume dessa câmara de 24,88 cm³ em área sombreada com plantio de eucalipto¹³. O maior volume da câmara inicial na área sombreada pode ser explicado por diferentes situações de esforço de escavação com a remoção de pequenas partículas de solo pela rainha fundadora com suas mandíbulas em mordidas repetidas²⁵ e retiradas e transportadas para o exterior do ninho^{8,16,26}. A maior irradiação solar em áreas ensolaradas aumenta a temperatura e, quanto maior a temperatura do solo, maior o esforço de escavação e o dano oxidativo^{27,28}, além da perda de água como descrito para formigas coletoras de sementes^{29,30}.

As maiores massas das rainhas de *A. sexdens* no primeiro mês da fase claustral que no quarto, nos ambientes ensolarado e sombreado, se deve à redução da massa corpórea, das mesmas, devido a metabolização do conteúdo lipídico durante os primeiros seis meses após a revoada, mas com recuperação nos meses subsequentes¹. A perda de massa se deve ao uso das reservas corporais pelas rainhas na preparação e manutenção da colônia na fase claustral, pois os lipídios armazenados são importantes na história evolutiva da tribo Attini, de fundação semi-claustral para claustral³¹. A rainha, com a fundação claustral, não se alimenta permanecendo enclausurada no ninho e criando sua prole inicial pela metabolização de suas próprias reservas corporais³², como em *A. sexdens*¹. A pressão de seleção

para a evolução para fundação claustral evita os riscos durante o forrageamento³² e uma adaptação mais viável seria armazenar reservas no corpo, como evidenciado em nosso estudo. A maior biomassa do jardim de fungo no quarto mês se deve ao seu crescimento, mas seus valores foram menores que o relatado para ninhos de quatro meses de *A. sexdens*, de 2000 mg a 3000 mg¹.

O menor número de ovo de *A. sexdens* no primeiro que no terceiro mês é semelhante ao observado em colônias, dessa formiga, de laboratório⁸. A irregularidade na produção de ovos pela rainha se deve a flutuações dos hormônios controlados pelo sistema endócrino, sendo, durante as três ou quatro meses de vida da colônia, correlacionada com o ciclo da atividade dos corpora allata³³. Essa glândula sintetiza o hormônio juvenil, que atua na oviposição das rainhas fundadoras, como verificado em fêmeas que sofreram alatectomia³³. Esse hormônio atua no corpo gorduroso, iniciando a síntese de vitelogenina (glicolipofosfoproteínas, com lipídeos e carboidratos em sua composição) que será depositado no ovócito³⁴. Desta forma, a produção da prole depende das reservas corporais (lipídeos do corpo gorduroso e proteína da massa muscular (alares), pois a rainha não se alimenta durante o período de fundação (fundação claustral). A menor produção de operárias pequenas e médias no primeiro mês que nos segundo, terceiro e quarto concorda com o relatado em ninhos de *A. sexdens*¹. O número semelhante de larvas nos quatro meses e se deve à duração do período larval de *A. sexdens*, em torno de 25 dias⁸, com novos imaturos produzidos, mensalmente, com sobreposição de gerações, comum em insetos eussociais. Essa sobreposição se inicia com larvas no primeiro mês dos ninhos iniciais e pupas, geralmente, no segundo mês de ninhos iniciais em laboratório⁸.

Os menores valores da biomassa de fungo e de números de ovos, larvas, pupas e operárias pequenas e médias de *A. sexdens* em ninhos no ambiente ensolarado podem ser devido a uma maior incidência de irradiância solar aumentando a variação da temperatura interna da câmara inicial. Isto concorda com relato de que uma menor incidência de irradiância solar tenha melhorado a estabilidade da temperatura interna da câmara inicial favorecendo *A. sexdens* com faixas de tolerância térmica estreitas por ser uma espécie subterrânea termicamente protegida¹¹. No entanto, picos frequentes de calor, com consequências fisiológicas específicas do habitat para animais ectotérmicos subterrâneos, são comuns em áreas ensolaradas¹¹. A massa corporal da rainha, semelhante entre ambientes, indica redução semelhante desse parâmetro entre os ambientes e a tolerância das mesmas a variações da temperatura

neste tipo de fundação. A redução da massa de rainhas de *A. sexdens* é esperada desde o voo nupcial ao fim da fase claustral. O gasto energético dessas *A. sexdens*, em carboidratos e lipídeos corporais para o voo nupcial e escavação do ninho, foi estimado em 0,58 J³⁵ e as mesmas, durante a fase claustral, metabolizam lipídeos e proteínas corporais para sobreviver e formar a colônia inicial^{26,36}.

A maior mortalidade de ninhos de *A. sexdens* no ambiente ensolarado, durante a fundação claustral, se deve a uma maior incidência de irradiância solar aumentando a variação da temperatura interna da câmara inicial e, conseqüentemente, o esforço de escavação e o dano oxidativo excessivo às rainhas fundadoras^{27,28}, além de perdas de água como relatado para formigas coletoras de sementes^{29,30}. Essa mortalidade pode estar também, relacionada a entomopatógenos, sucesso de regurgitação do fungo simbiote, esforço de escavação, densidade e umidade do solo^{1,9,37}.

Rainhas fundadoras de *A. sexdens* foram expostas a ambientes ensolarado e sombreado com maior irradiância solar e, conseqüentemente, maior amplitude de variação da temperatura interna da câmara inicial no primeiro ambiente. O ambiente sombreado, com menor incidência de irradiância solar e maior estabilidade da temperatura interna da câmara inicial, foi mais favorável para o desenvolvimento das colônias como confirmado pelos parâmetros biológicos e maior sobrevivência das rainhas de *A. sexdens*.

Material e Métodos

Coleta de rainhas de *Atta sexdens* após o voo nupcial.

As rainhas de *A. sexdens* foram coletadas na Fazenda Experimental Lageado em Botucatu, Brazil em 2019 (22°50'37.3"S 48°25'38.3"W) em dias ensolarados após fortes chuvas, do final de outubro ao início de novembro. Duzentas rainhas, sem as asas e, portanto, fecundadas foram coletadas e mantidas em potes 250 ml com 1 cm de gesso umedecido.

Áreas de experimento.

As rainhas de *A. sexdens* foram individualizadas em duas áreas experimentais: ensolarada – área aberta exposta à “*Global Horizontal Irradiation*” com cobertura exclusiva de grama *Paspalum notatum* Flüggé (N= 100) e sombreada- área exposta

à “*Diffuse Horizontal Irradiation*” (tela sombril 50% - 1.50 x 50 MT), em ambiente arado sem plantas (N= 100)

As rainhas fundadoras de *A. sexdens* foram individualizadas no centro de um quadrado de terreno (50 x 50 cm) cobertas com um frasco transparente de 20 cm de diâmetro por 12 cm de altura, delimitando o espaço a ser perfurado no solo por área experimental de 25 m².

Desenvolvimento dos ninhos iniciais durante a fase claustral.

As rainhas de *A. sexdens* foram avaliadas por quatro meses, pós o período de fundação, para acompanhar o desenvolvimento de seus ninhos. Um total de 25% dos ninhos, com sucesso na fundação, foi escavado por mês retirando-se a colônia com uma pá de jardinagem. Os números de ovos, larvas, pupas e adultos foi contabilizado e a massa da rainha e a biomassa do jardim de fungo obtidos. A profundidade, largura, comprimento e altura, de cada ninho foram mensurados com o auxílio de um paquímetro. O volume estimado de cada câmara do fungo foi baseado em um cilindro. Um fator de correção foi utilizado para calcular o volume da câmara por serem arredondados: $V = \pi r^2 (ch + r0,67)$, em que 'r' é o raio da base da câmara e 'ch' a altura do cilindro, medida pela subtração do altura máxima da câmara de seu raio, $ch = h - r^{38}$. A mortalidade das rainhas foi avaliada durante a escavação de seus ninhos.

Medição de temperatura e radiação.

As temperaturas dos ambientes externo e interno (15 cm de profundidade), em cada área, foram medidas durante quatro meses, com Dataloggers (Testo), após a fundação do ninho pela formiga cortadeira. A “*Global Horizontal Irradiation*” (GHI) foi medida por um Piranômetro Eppley PSP e a “*Diffuse Horizontal Irradiation*” por um Piranômetro Kipp & Zonen CM3 (Tabela 3). As medidas solares foram obtidas em escala temporal de cinco minutos (média de 60 leituras com tempo de varredura a cada cinco segundos) em W/m² por um datalogger modelo CR3000³⁹ e armazenadas em um arquivo ASCII.

Tabela 3. Instrumentos utilizados para medir as irradiâncias solares nos ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) nos ambientes ensolarado e sombreado.

Características	Irradiância Solar	
Sigla	GHI	DHI
Tipo de Instrumento	Piranômetro	Piranômetro
Fabricante	Eppley	Kipp & Zonen
Modelo	PSP	CM3
Intervalo Espectral (nm)	295 - 2800	305 – 2800

Fonte: Campbell Scientific^{40,41}

As medidas, antes de utilizadas, foram submetidas a um procedimento de controle de qualidade para verificar se seus valores estavam de acordo com limiares pré-definidos de irradiâncias solares. Este procedimento consiste em uma série de checagens dos limites fisicamente possíveis por componente medida (Tabela 4). Essas checagens foram feitas de acordo com o processo criado pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE), o qual descarta as medidas errôneas para não prejudicar processos de integração numérica ou processamento de dados.

Tabela 4. Valores mínimos e máximos fisicamente possíveis para cada medida de irradiância solar

Irradiância Solar	Valores Fisicamente Possíveis (Aceitos) ⁴²	
	Mínimo	Máximo
GHI	0 W/m ²	1,20 I _E
DHI	0 W/m ²	I _E

Medidas aceitas como possíveis foram aquelas acima de 0 W/m² e menores que o limite máximo estipulado, por componente, de acordo com a irradiância solar extraterrestre (I_E) (Equação 1), a qual representa o valor máximo que chega no topo da atmosfera, sem atenuação pelos elementos atmosféricos (nuvens, partículas entre

outros). Os valores medidos na superfície terrestre são menores que os no topo da atmosfera. No entanto, fenômeno da multireflexão quando nuvens dispersas e próximas da localização aparente do sol refletem parte da irradiância solar no sensor, aumentam o valor medido, inclusive maiores, em curtos períodos, que a irradiância extraterrestre⁴³. Por essa razão, o valor da irradiância global pode ser até 20% maior que o da extraterrestre.

O 1361 da equação 1, para o cálculo da irradiância extraterrestre, representa a constante solar em W/m^2 ⁴⁴, R a relação da distância média adimensional entre a Terra e o Sol (Equação 2) e Z o ângulo zenital do Sol (Equação 3) em graus^{45,46}.

$$I_E = 1361 (1/R) \cos(Z) \quad (1)$$

$$R = \frac{1 - 0,0009467 \sin(F) - 0,01671 \cos(F) - 0,0001489 (2 F) - 0,00002917 \sin(3 F) - 0,0003438 \cos(4 F)}{1} \quad (2)$$

$$Z = \arccos(\sin(\delta) \sin(\phi) + \cos(\delta) \cos(\phi) \cos(\omega)) \quad (3)$$

O F, na equação 4, é a fração angular da data de interesse em graus, δ , na 5, a declinação solar em graus, o ϕ , na 6, a latitude geográfica da localidade em graus (22,85) e ω , na 6, o ângulo horário em graus.

$$F = 360^\circ D/365 \quad (4)$$

$$\delta = \frac{0,3964 + 3,631 \sin(F) - 22,97 \cos(F) + 0,03838 \sin(2 F) - 0,3885 \cos(2 F) + 0,07659 \sin(3 F) - 0,1587 \cos(3 F) - 0,01021 \cos(4 F)}{1} \quad (5)$$

$$\omega = (12 - Hd) 15 \quad (6)$$

O d, na expressão anterior, representa o dia do ano, de 1 a 365 e o Hd, a hora e o décimo de hora em graus do momento de interesse.

Os valores foram integrados numericamente, após a aplicação do procedimento de controle de qualidade das medidas, obtendo-se um valor de irradiação solar para o dia em MJ/m^2 representando a total de energia recebida, diariamente, em uma superfície horizontal de $1 m^2$.

Análise estatística.

A hipótese nula de que as proporções de mortalidade (probabilidades de sucesso) das rainhas fundadoras de ambos os grupos são as mesmas foi submetida ao teste de proporções iguais. A hipótese nula de que uma amostra de dados era proveniente de uma população com distribuição normal foi submetida ao teste de Shapiro-Wilk.

ANOVA (esquema fatorial completamente randomizado) e teste de Tukey para comparações múltiplas de médias foram utilizados quando a estrutura de dados se ajustava aos pressupostos da ANOVA. O teste de Scheirer Ray Hare é um teste não paramétrico utilizado para um desenho fatorial totalmente randomizado de dupla entrada⁴⁷. Este procedimento é uma extensão do teste de rank de Kruskal-Wallis que permite calcular os efeitos de interação e contrastes lineares e foi utilizado quando a estrutura de dados não se enquadrava nas premissas da ANOVA. O teste de Dunn⁴⁸ de comparações múltiplas de medianas foi realizado com uma correção (o método da taxa de falsa descoberta) para controlar a taxa de erro do experimento.

O Índice de Concordância de Willmott (d) é uma medida padronizada do grau de concordância entre duas séries de dados variando de 0,0 a 1,0 com o valor 1,0 indicando uma correspondência perfeita (dois conjuntos de dados idênticos) e 0 nenhuma concordância⁴⁹. Por exemplo, se, no ambiente ensolarado, os dados de temperatura interna fossem idênticos à temperatura externa d resultaria em 1,0. Quanto mais idênticos, próximos e concordantes forem dois conjuntos de dados, d será mais próximo de 1,0". Seu cálculo é apresentado a seguir onde A e B representam dois conjuntos de dados cuja concordância deve ser avaliada.

$$\hat{A}_i = A_i - \bar{B}$$

$$\hat{B}_i = B_i - \bar{B}$$

$$d = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (A_i - B_i)^2}{\sum_{i=1}^N [|\hat{A}_i| - |\hat{B}_i|]^2}$$

Os pacotes R companion, ggplot2⁵⁰, FSA⁵¹, arrumaverse⁵² e hydroGOF⁵³ utilizados são um ambiente de software livre para computação estatística e gráficos R versão 4.0.454.

Referências

1. Camargo, R. da S. & Forti, L. C. Queen lipid content and nest growth in the leaf cutting ant (*Atta sexdens rubropilosa*) (Hymenoptera: Formicidae). *J. Nat. Hist.* **47**, 65–73 (2013).
2. Van Gils, H. & Vanderwoude, C. Leafcutter ant (*Atta sexdens*) (Hymenoptera: Formicidae) nest Distribution responds to canopy removal and changes in micro-

- climate in the southern colombian amazon. *Fla Entomol.* **95**, 914–921 (2012).
3. Camargo, R. da S., Forti, L. C., de Matos, C. A. O. & Brescovit, A. D. Phoretic behaviour of *Attacobius attarum* (Roewer, 1935) (Araneae: Corinnidae: Corinninae) dispersion not associated with predation? *J. Nat. Hist.* **49**, 1653–1658 (2015).
 4. Corrêa, M. M., Silva, P. S. D., Wirth, R., Tabarelli, M. & Leal, I. R. How leaf-cutting ants impact forests: drastic nest effects on light environment and plant assemblages. *Oecologia* **162**, 103–115 (2010).
 5. Vasconcelos, H. L. Habitat selection by the queens of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. in Brazil. *J. Trop. Ecol.* 249–252 (1990).
 6. Vasconcelos, H. L., Vieira-Neto, E. H. M., Mundim, F. M. & Bruna, E. M. Roads Alter the Colonization Dynamics of a Keystone Herbivore in Neotropical Savannas 1. *Biotropica* **38**, 661–665 (2006).
 7. Bollazzi, M., Kronenbitter, J. & Roces, F. Soil temperature, digging behaviour, and the adaptive value of nest depth in South American species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Oecologia* **158**, 165–175 (2008).
 8. Camargo, R. S., Forti, L. C., Fujihara, R. T. & Roces, F. Digging effort in leaf-cutting ant queens (*Atta sexdens rubropilosa*) and its effects on survival and colony growth during the claustral phase. *Insectes Soc.* **58**, 17–22 (2011).
 9. Baudier, K. M. & O'Donnell, S. Rain shadow effects predict population differences in thermal tolerance of leaf-cutting ant workers (*Atta cephalotes*). *Biotropica* **52**, 113–119 (2020).
 10. Alvalá, R. C. dos S. *et al.* Intradiurnal and seasonal variability of soil temperature, heat flux, soil moisture content, and thermal properties under forest and pasture in Rondônia. *J. Geophys. Res. Atmos.* **107**, LBA-10 (2002).
 11. Baudier, K. M., D'Amelio, C. L., Malhotra, R., O'Connor, M. P. & O'Donnell, S. Extreme insolation: Climatic variation shapes the evolution of thermal tolerance at multiple scales. *Am. Nat.* **192**, 347–359 (2018).
 12. De Frenne, P. *et al.* Forest microclimates and climate change: Importance, drivers and future research agenda. *Glob. Chang. Biol.* **27**, 2279–2297 (2021).
 13. Cardoso, S., Forti, L. C., Nagamoto, N. S. & Camargo, R. First-year nest growth in the leaf-cutting ants *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa*. *Sociobiology* **61**, 243–249 (2014).
 14. Nagamoto, N. S., Carlos, A. A., Moreira, S. M., Verza, G. L. & Forti, L. C.

- Differentiation in selection of dicots and grasses by the leaf-cutter ants *Atta capiguara*, *Atta laevigata* and *Atta sexdens rubropilosa*. *Sociobiology* **54**, 127–138 (2009).
15. Pielström, S. & Roces, F. Soil moisture and excavation behaviour in the Chaco leaf-cutting ant (*Atta vollenweideri*): digging performance and prevention of water inflow into the nest. *PLoS ONE* **9**, e95658 (2014).
 16. Fröhle, K. & Roces, F. The determination of nest depth in founding queens of leaf-cutting ants (*Atta vollenweideri*): idiothetic and temporal control. *J. Exp. Biol.* **215**, 1642–1650 (2012).
 17. Eidmann, H. Zur Kenntnis der Blattschneiderameise *Atta sexdens* L., insbesondere ihrer Ökologie. *Zeitschrift für Angew. Entomol.* **22**, 385–436 (1936).
 18. Kleineidam, C. & Roces, F. Carbon dioxide concentrations and nest ventilation in nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. *Insectes Soc.* **47**, 241–248 (2000).
 19. Bollazzi, M. & Roces, F. Thermal preference for fungus culturing and brood location by workers of the thatching grass-cutting ant *Acromyrmex heyeri*. *Insectes Soc.* **49**, 153–157 (2002).
 20. Camargo, R. S., Silva, E. J., Forti, L. C. & Matos, C. A. O. Initial development and production of CO₂ in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* during the claustral foundation. *Sociobiology* **63**, 720–723 (2016).
 21. Forti, L. C. *et al.* completar autores Occurrence of leaf-cutting and grass-cutting ants of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) in geographic regions of Brazil. *Sociobiology* **67**, 514–525 (2020).
 22. Weber, N. A. The biology of the fungus-growing ants. Part ii.-nestling habits of the bachac (*Atta cephalotes* L.). *Trop. Agric.* **14**, (1937).
 23. Bruner, S. C. & Valdés Barry, F. Observaciones sobre la biología de la bibijagua (Hymenoptera: Formicidae). *Mem. Soc. Cuba. Hist. Nat* **19**, 135–154 (1949).
 24. Moser, J. C. Mating activities of *Atta texana* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Soc.* **14**, 295–312 (1967).
 25. Römer, D. & Roces, F. Available space, symbiotic fungus and colony brood influence excavation and lead to the adjustment of nest enlargement in leaf-cutting ants. *Insectes Soc.* **62**, 401–413 (2015).
 26. Silva, E. J., da Silva Camargo, R. & Forti, L. C. Flight and digging effort in leaf-

- cutting ant males and gynes. *Sociobiology* **62**, 334–339 (2015).
27. Magwere, T. *et al.* Flight activity, mortality rates, and lipoxidative damage in *Drosophila*. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **61**, 136–145 (2006).
 28. Sohal, R. S. & Buchan, P. B. Relationship between physical activity and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp. Gerontol.* **16**, 157–162 (1981).
 29. Johnson, R. A. Water loss in desert ants: caste variation and the effect of cuticle abrasion. *Physiol. Entomol.* **25**, 48–53 (2000).
 30. Johnson, R. A. & Gibbs, A. G. Effect of mating stage on water balance, cuticular hydrocarbons and metabolism in the desert harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *J. Insect Physiol.* **50**, 943–953 (2004).
 31. Seal, J. N. Scaling of body weight and fat content in fungus-gardening ant queens: does this explain why leaf-cutting ants found claustrally? *Insectes Soc.* **56**, 135–141 (2009).
 32. Brown, M. J. F. & Bonhoeffer, S. On the evolution of claustral colony founding in ants. *Evol. Ecol. Res.* **5**, 305–313 (2003).
 33. Barker, J. F. Neuroendocrine regulation of oocyte maturation in the imported fire ant *Solenopsis invicta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **35**, 234–237 (1978).
 34. Hagedorn, H. H. & Kunkel, J. G. Vitellogenin and vitellin in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **24**, 475–505 (1979).
 35. Silva, E. J., Camargo, R. da S., Forti, L. C. & Travaglini, R. V. Protein content of leaf-cutting ant queens before the nuptial flight and during the post-claustral phase. *Rev. Bras. Entomol.* **58**, 333–336 (2014).
 36. Camargo, R. da S., Fonseca, J. A., Lopes, J. F. S. & Forti, L. C. Influência do ambiente no desenvolvimento de colônias iniciais de formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*). *Ciência Rural* **43**, 1375–1380 (2013).
 37. Vieira, A. S., Camargo-Mathias, M. I. & Roces, F. Comparative morpho-physiology of the metapleural glands of two *Atta* leaf-cutting ant queens nesting in clayish and organic soils. *Arthropod Struct. Dev.* **44**, 444–454 (2015).
 38. Forti, L. C., Moreira, A. A., Camargo, R. da S., Caldato, N. & Castellani, M. A. Nest architecture development of grass-cutting ants. *Rev. Bras. Entomol.* **62**, 46–50 (2018).
 39. CAMPBELL SCIENTIFIC. Operator's Manual - CR3000 Micrologger. R. 2/18. Logan, Utah, United States of America. (2018). Available at: <https://s.campbellsci.com/documents/us/manuals/cr3000.pdf>. (Accessed: 2nd April

- 2020)
40. CAMPBELL SCIENTIFIC. Application Note: Eppley PSP - Precision Spectral Pyranometer. Logan, Utah, United States of America. <https://s.campbellsci.com/documents/us/technical-p> (2001). Available at: <https://s.campbellsci.com/documents/us/technical-papers/epp-psp.pdf>. (Accessed: 2nd April 2020)
 41. CAMPBELL SCIENTIFIC. Solar Radiation Sensor - Model CM3. Logan, Utah, United States of America. (2005). Available at: https://s.campbellsci.com/documents/us/product-brochures/b_cm3-series.pdf. (Accessed: 7th April 2020)
 42. Tregenza, P. R. *et al.* Guide to recommended practice of daylight measurement. (1994).
 43. Moreno-Tejera, S., Ramírez-Santigosa, L. & Silva-Pérez, M. A. A proposed methodology for quick assessment of timestamp and quality control results of solar radiation data. *Renew. Energy* **78**, 531–537 (2015).
 44. Gueymard, C. A. A reevaluation of the solar constant based on a 42-year total solar irradiance time series and a reconciliation of spaceborne observations. *Sol. Energy* **168**, 2–9 (2018).
 45. IQBAL, M. *An Introduction to Solar Radiation*. (Academic Press, 1983).
 46. Varejão-Silva, M. A. Meteorologia e Climatologia. (2006). Available at: http://www.icat.ufal.br/laboratorio/clima/data/uploads/pdf/METEOROLOGIA_E_CLIMATOLOGIA_VD2_Mar_2006.pdf. (Accessed: 8th September 2018)
 47. Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. Biometry, 3rd edn WH Freeman and Co. New York (1995).
 48. Dunn, O.J. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* **6**, 241–252 (1964).
 49. Willmott, C. J. On the validation of models. *Phys. Geogr.* **2**, 184–194 (1981).
 50. Ogle, D.H., Wheeler, P., & Dinno, A. FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.9.0. (2011).
 51. Wickham, H. Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis (Springer-Verlag) (2016).
 52. Wickham, H., *et al.* Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* **4**, 1686 (2019).
 53. Zambrano-Bigiarini, M. hydroGOF: Goodness-of-fit functions for comparison of simulated and observed hydrological time series R package version 0.4-0 (2020).

54. Team, R.C. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (2021).

CAPÍTULO 3

NÍVEIS DE DIÓXIDO DE CARBONO EM NINHOS INICIAIS DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)³

Kátia K. A. Sousa¹, Roberto S. Camargo¹, Nadia Caldato¹, Adriano P. Farias¹,
Carlos A. O. Matos², José C. Zanuncio³, Isabel C. L. Santos⁴ & Luiz C. Forti¹

¹Departamento de Proteção Vegetal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, Brasil. ²Campus Experimental de Itapeva, Universidade Estadual Paulista, Itapeva, Brasil. ³Departamento de Entomologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. ⁴Laboratório de Fitossanidade (FitLab), Instituto Federal de Mato Grosso, Cáceres, Brasil.

SOUSA, K. K., CAMARGO, R. S., CALDATO, N., FARIAS, A. P., MATOS, C. A., ZANUNCIO, J. C., SANTOS, I. C.L. & FORTI, L. C. (2021). Carbon dioxide levels in initial nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). **Scientific reports**, 11(1), 1-5. doi.org/10.1038/s41598-021-00099-8

Resumo

A fundação claustral de ninhos por *Atta sexdens* Forel (Hymenoptera: Formicidae) envolve grande esforço da rainha, a única responsável pelo cultivo do fungo e cuidados com sua prole nessa fase. As operárias iniciais, após quatro meses, abrem o acesso ao ambiente externo para forrageamento de plantas para cultivar o fungo simbiote, o qual decompõe os fragmentos de vegetais e produz nódulos de gongilídios como alimento para os indivíduos da colônia. A respiração na colônia e a decomposição da matéria orgânica em ninhos subterrâneos de formigas geram dióxido de carbono (CO₂) emitidos para a atmosfera. A emissão de CO₂ deve-se, também, a respiração aeróbica dos organismos, mas não se sabe se a taxa de produção de dióxido de carbono expelido em colônias iniciais de formigas cortadeiras ou seus níveis em ninhos iniciais de campo são semelhantes aqueles de laboratório com mesma idade. Nossa hipótese é que a concentração de dióxido de carbono de

³ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Scientific Reports**, onde foi publicado.

colônias em campo e laboratório é semelhante. O objetivo foi avaliar a concentração de dióxido de carbono em colônias iniciais de *A. sexdens*, em campo e laboratório, e o desenvolvimento das mesmas. Colônias com rainhas fundadoras de *A. sexdens* foram coletadas e mantidas em laboratório por quatro meses em potes de 250 ml com 1 cm de gesso umedecido no fundo. Essas colônias foram enclausuradas em câmaras herméticas durante 24h e a emissão de CO₂, pelas mesmas, medido em sistema respirométrico fechado com um medidor de CO₂ (Bacharach), com sonda fixa (<http://www.bacharach-inc.com>). Esse ambiente foi retroalimentado por uma bomba peristáltica e, dessa forma, sem perda da atmosfera modificada da câmara das colônias. O nível de CO₂ foi, também, mensurado em colônias em campo com quatro meses de idade, utilizando-se um sistema respirométrico aberto e adaptado com uma entrada de ar atmosférico. O nível de CO₂ do recipiente respirométrico foi lido por meio da introdução de um canículo no orifício de entrada do ninho e o ar succionado por uma bomba peristáltica para a caixa do medidor de CO₂. A composição da colônia inicial foi, também, mensurada após quatro meses de idade, quando a produção da prole (número de ovos, larvas, pupas e operárias adultas) está estabilizada. A composição dos ninhos em campo foi avaliada após escavação dos mesmos utilizando uma pá de jardinagem e esses ninhos foram armazenados em potes de 250 ml com 1 cm de gesso umedecido no fundo. A concentração de CO₂ foi maior nos ninhos de *A. sexdens* de campo que de laboratório. A composição dos ninhos foi maior naqueles de laboratório que de campo. A hipótese de que a concentração de dióxido de carbono das colônias de *A. sexdens* em campo é semelhante àsquelas de laboratório foi rejeitada. A concentração de dióxido de carbono em ninhos de *A. sexdens* em campo é maior que a daqueles em laboratório, devido ao acúmulo de CO₂ na câmara inicial dos mesmos.

Introdução

As formigas cortadeiras são os principais herbívoros nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos (EUA) ao centro da Argentina, com ninhos subterrâneos abrigando colônias com grande número de indivíduos que forrageiam vegetação fresca¹. Esses ninhos, anualmente, liberam castas reprodutivas que irão originar novos ninhos^{2,3}. A fundação de ninhos de *Atta sexdens* Forel (Hymenoptera: Formicidae), claustral, envolve grande esforço da rainha como a única responsável pelo cultivo do fungo e cuidados com sua prole nessa fase^{3,4}.

Após três a quatro meses, pós a fase claustral, operárias médias de ninhos iniciais desobstruem o canal fechado pela rainha fundadora até a superfície do solo⁵. O acesso ao ambiente externo permite as formigas forragearem material vegetal para cultivar o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (A. Møller) Heim⁶. Esse fungo decompõe os fragmentos de vegetais e produz nódulos hifais (gongilídios) que servirão de alimento para os indivíduos da colônia⁷.

A nidificação em camadas profundas do solo facilita o aumento da concentração de dióxido de carbono (CO₂)⁸. Os grandes volumes desse gás, produzidos pela respiração das formigas e decomposição da matéria orgânica contribuem para sua emissão dos ninhos subterrâneos para a atmosfera^{9,10}. As concentrações de CO₂, em ninhos no campo, foram de 0,2% em *Pogonomyrmex badius* (Latreille)¹¹, 1,5 a 4,5% em *Atta capiguara* (Gonçaves) e *Atta laevigata* (Smith), respectivamente⁸ e 5,7% em *Atta vollenweideri* (Forel)¹², excedendo os níveis atmosféricos desse gás que é de 0,04%. Os níveis elevados de dióxido de carbono no ninho *A. vollenweideri*, nativa de solos argilosos, são um problema. A porosidade e a permeabilidade ao ar, desses solos, são baixas¹³, dificultando a liberação de CO₂ das câmaras e o fornecimento de oxigênio no ninho por difusão com o solo circundante. O mecanismo de ventilação, induzida pelo vento, conforme o princípio de Bernoulli¹⁴ facilita as trocas gasosas nos ninhos de *A. vollenweideri*, semelhante à ventilação de tocas do roedor *Cynomys ludovicianus*¹⁵. Esses ninhos têm até 200 aberturas usadas como saídas ou entradas pelas formigas¹⁶ e a entrada e saída de ar pelas mesmas dependem de sua localização no monte de terra solta. O vento de superfície conduz o ar para fora dos túneis centrais, seguido por um influxo de ar na periferia. As formigas constroem torres, no topo das aberturas centrais dos ninhos

para a ventilação dos mesmos, elevando a abertura do túnel e expondo-as a maiores velocidades de vento de superfície¹⁴. Essa troca gasosa em ninhos adultos de formigas é mais bem estudada, mas isto é pouco entendido em ninhos iniciais.

A respiração aeróbica de um organismo libera CO_2 ¹⁷, mas sua taxa de produção expelida em colônias iniciais de formigas cortadeiras é desconhecida. Os níveis de CO_2 em ninhos iniciais em campo podem diferir em relação a colônias de laboratório de mesma idade? O objetivo foi estudar as concentrações de dióxido de carbono em colônias iniciais, de *A. sexdens*, em campo e laboratório e o desenvolvimento das mesmas.

Resultados

A emissão de CO_2 por ninhos de *A. sexdens*, foi menor (coef. $\Phi = -3,70902$, $p < 0,05$) (Tabela 1) e a biomassa do fungo maior (Fig. 1) em colônias de laboratório que em campo com, respectivamente, $0,04 \pm 0,01\%$ e $1,50 \pm 0,38\%$.

Tabela 1. Resumo das estimativas dos coeficientes do modelo $\text{CO}_2 = f(\text{ambiente})$ com Φ variando com os preditores

		Estimativa	Erro padrão	z	Pr(> z)
Coeficientes (modelo médio com link logit):	Intercept	-4,18454	0,05916	-70,74	<2e-16
	Lab	-3,70902	0,08703	-42,62	<2e-16
Coeficientes Φ (modelo de precisão com link de log):	Intercept	7,0359	0,3445	20,423	< 2e-16
	Lab	3,3657	0,4692	7,174	7,30E-13

Log-likelihood: 227 on 4 Df,

Pseudo R-squared: 0,9788

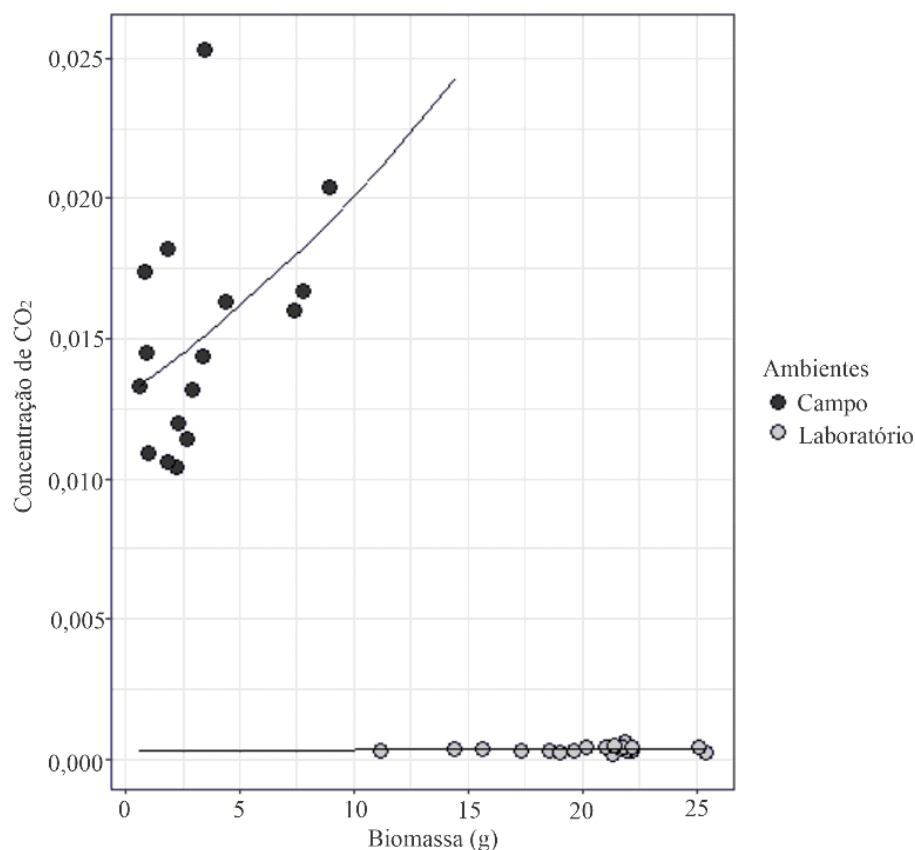


Figura 1. Relação entre a produção de CO₂ e a biomassa de colônias iniciais de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório e campo.

O modelo do CO₂ = f(biomassa) (Coeficiente = 0,00956, p = 0,611) foi semelhante para a biomassa do fungo e a emissão de CO₂ em colônias de *A. sexdens* em laboratório (Fig. 1, Tabela 2). A biomassa das colônias de laboratório foi de 20,18 ± 3,44 (g) e a emissão de CO₂ de 0,037 ± 0,010%.

Tabela 2. Resumo das estimativas dos coeficientes do modelo CO₂ = f(biomassa) – laboratório e campo

Laboratório				
	Estimativa	Erro padrão	z	Pr(> z)
Coeficientes (média de interceptação modelo com link logit): biomassa	-8,08701	0,38696	- 20,899	<2e-16
	0,00956	0,01882	0,508	0,611
Coeficientes Phi (modelo de precisão com link de identidade):				
(phi)	33358	10623	3,14	0,00169

Campo				
modelo com link logit:	Estimativa	Erro padrão	z	Pr(> z)
Coeficientes (média de interceptação	-4,33144	0,09274	-46,705	<2e-16
modelo com link logit): biomassa	0,04426	0,02082	2,126	0,0335
Coeficientes Phi (modelo de precisão com link de identidade):				
(phi)	1353,5	480,3	2,818	0,00483

Laboratório: Log-likelihood: 155,3 on 3 Df, Pseudo R-squared: 0,01306; Campo: Log-likelihood: 68,98 on 3 Df, Pseudo R-squared: 0,2073

O modelo do $\text{CO}_2 = f(\text{biomassa})$ (Coeficiente= 0,04426, $p < 0,05$) diferiu quando se utilizou a biomassa do fungo e a emissão de CO_2 em colônias de campo (Tabela 3), com valores de $4,70 \pm 5,05$ (g) e de $1,498 \pm 0,359\%$, respectivamente.

Tabela 3. Testes de hipótese para semelhança entre medianas (Wilcoxon Rank Sum Test) e médias (t Test) da biomassa do fungo (Bio.) (g), massa da rainha (MR) (mg) e números de ovos (Ov.), larvas (La.), pupas (Pu.), operárias pequenas (OP) e médias (OM) e total de operárias (TP) em ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório e campo

	Laboratório	Campo	Teste	Valor P
Bio.	21,40	2,65	W= 332	0,000
MR	270,09	207,45	t= 6,5374 df =35	0,000
Ov.	271,00	133,00	W=282	0,001
La.	171,50	106,00	W=236	0,046
Pu.	81,00	78,00	W=169	0,988
OP	127,5	98,00	W=219,5	0,135
OM	36,50	24,00	W=277	0,001
TP	164,5	121,00	W=250	0,015

* Média

Os números de ovos, larvas, pupas e operárias pequenas e médias foram correlacionados nas colônias em laboratório e campo (Pearson's Chi-squared test X-squared= 28,158, df= 4, p-value= 1,159e-05).

A biomassa do fungo, massa da rainha, número de ovos e operárias médias diferiram entre colônias em laboratório e campo (Tabela 4, Fig. 2) com valores de $20,18 \pm 3,44$ e $4,70 \pm 5,05$, $279,09 \pm 32,71$ e $206,73 \pm 23,45$ mg, $293,10 \pm 138,03$ e $144,33 \pm 66,31$, $169,80 \pm 65,16$ e $119,61 \pm 79,34$, e $43,10 \pm 22,90$ e $25,67 \pm 9,91$, respectivamente.

Tabela 4. Coeficiente de correlação linear de Pearson entre a biomassa do fungo (Bio.) (g), massa da rainha (MR) (mg) e números de ovos (Ov.), larvas (La.), pupas (Pu.), operárias pequenas (OP) e médias (OM) e total de operárias (TP) em ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório e campo

		Ov.	La.	Pu.	MR	OP	OM
Colônias de campo	Ov.						
	La.	0,77					
	Pu.	0,86	0,80				
	MR	0,27	0,25	0,34			
	OP	0,85	0,75	0,85	0,46		
	OM	0,61	0,65	0,68	0,35	0,82	
	Bio.	0,60	0,36	0,53	0,38	0,42	0,13
		Ov.	La.	Pu.	MR	OP	OM
Colônias de laboratório	Ov.						
	La.	0,74					
	Pu.	0,19	0,41				
	MR	0,08	-0,20	-0,18			
	OP	0,24	0,32	0,27	-0,16		
	OM	-0,46	-0,22	-0,30	-0,25	-0,18	
	Bio.	-0,35	0,09	0,19	-0,17	-0,06	0,14

Valores em negrito são significativos ($\alpha = 0,05$)

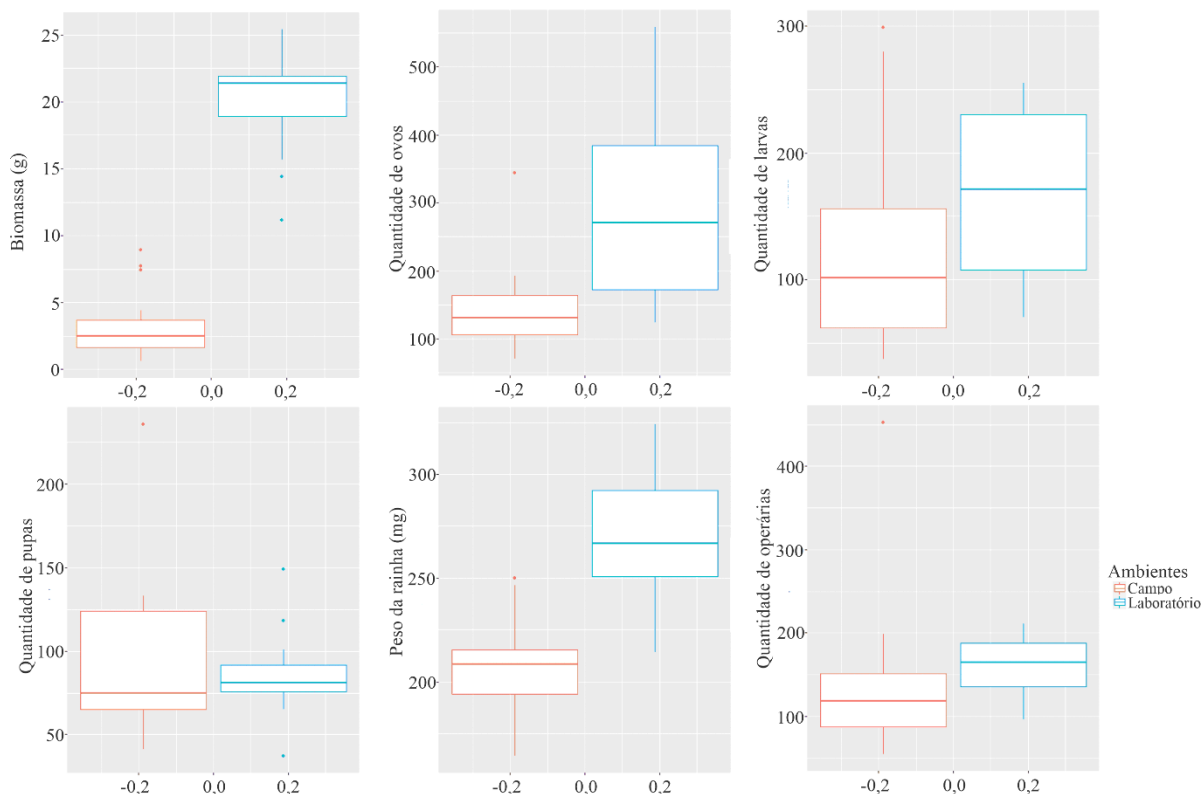


Figura 2. Composição de ninhos iniciais de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório (A) e campo (B) com quatro meses de idade.

Os números de ovos e larvas ($r^2 = 0,77$), ovos e pupas ($r^2 = 0,86$), ovos e operárias pequenas ($r^2 = 0,85$), larvas e pupas ($r^2 = 0,80$), larvas e operárias pequenas ($r^2 = 0,75$), pupas e operárias pequenas ($r^2 = 0,85$) e operárias pequenas e operárias médias ($r^2 = 0,82$) foram, positivamente, correlacionados em colônias de campo. Os números de ovos e larva foram positivamente correlacionados ($r^2 = 0,74$) e os de ovos e operárias medias, negativamente, correlacionados ($r^2 = -0,46$) em colônias de laboratório.

A concentração de dióxido de carbono nas colônias de campo foi maior que naquelas de laboratório com mesma idade.

Discussão

A maior emissão de CO_2 ocorreu em ninhos de *A. sexdens* em campo do que naqueles de laboratório, mesmo tendo uma menor biomassa, isso se deve, pois, ninhos em campo estão expostos a emissões de CO_2 de diversos outros organismos do solo, degradação e principalmente da matriz do solo. Ninhos iniciais de *A. sexdens* são encontrados em profundidade em torno de 15 cm, onde os solos são uma das maiores

reservas globais de carbono. Além disso, a fauna do solo altera a estrutura do solo estimulando ou inibindo o fluxo de CO_2 ^{18,19}. Isso pode explicar a maior emissão desse gás por ninhos iniciais de campo e, mesmo, com maior biomassa, a produção de CO_2 de ninhos iniciais em laboratório é baixa em relação àquela da matriz de solo. Entretanto, com o aprofundamento de ninhos iniciais de *Atta* provoca o aumento de números de câmaras e túneis, gerando mais manipulação do solo e, consequentemente, a quantidade de gases de CO_2 liberada de ninhos adultos de formigas pode ser de 15% a 60% maior do que em áreas mais distantes dos ninhos¹⁹.

O modelo do CO_2 foi constante para a biomassa e emissão de CO_2 em colônias de *A. sexdens* em laboratório. Isto se deve ao fato de colônias de laboratório estarem expostas a uma microbiota mais reduzida que aqueles em campo, e dessa forma, o modelo do CO_2 foi constante para a biomassa e emissão desse gás^{10,19,20}. A cultura de fungo simbiote, de rainhas coletadas após revoadas e mantidas em laboratório, é colocada em ambientes mais assépticos, ao contrário daqueles de campo, em contato com a microbiota de solo²¹. Além disso, rainhas de laboratório não escavam câmaras iniciais e permanecem isoladas sem contato com o solo, ao contrário daquelas em campo que estão em contato com a microbiota do solo, sujeitas a dessecação do fungo simbiote e doenças no solo^{21,22}. Após o início do forrageamento, as formigas coletam muitas plantas para incorporar ao fungo, levando outros para o ninho, além de fungos *Leocoagaricus* para degradar o material vegetal incorporado^{23–25}. O maior número de microrganismos associados ao ninho acelera a degradação do material vegetal, mesmo, com menor biomassa do fungo²⁶. Esse bioma microbiano acelera o metabolismo com maior produção de CO_2 e a câmara funciona como um recipiente de armazenamento desse gás emitido pelo bioma microbiano e pela matriz do solo¹⁹. Diferenças no modelo do CO_2 quando se utilizou a biomassa e emissão de CO_2 em colônias de campo se devem à maior emissão desse gás pela microbiota do solo. Por isso, ninhos de campo, apesar de menor biomassa estão expostos a altas concentrações de concentrações de dióxido de carbono^{10,19,20}. Parâmetros climáticos como umidade, temperatura e a concentração de CO_2 impactam, diretamente, o desenvolvimento do ninho de formigas²⁷. Os níveis de CO_2 , em ninhos de *Acromyrmex lundii* Guering (Hymenoptera: Formicidae) estiveram entre 1 a 3% e suas operárias evitaram níveis elevados desse gás²⁸. Os valores de CO_2 em ninhos gigantes como de *A. vollenweideri* não excederam 28,000 ppm devido às pequenas torres para

facilitar a ventilação do ninho e remoção do dióxido de carbono quando seus níveis estão acima de 5%²⁹. Formigas elicitam reações específicas ao CO₂, através de “*sensillum ampullaceum*”, embutido abaixo da cutícula do antenômero e que abriga células receptoras desse gás^{30,31}.

A correlação entre os números de ovos, larvas, pupas e operárias pequenas e médias nas colônias de *A. sexdens* em laboratório e campo se deve à fatores como temperatura, umidade e plantas favoráveis para seu desenvolvimento. Isto facilita o aumento da biomassa em ninhos de laboratório, enquanto em ambiente naturais, os ninhos estão expostos às barreiras e à variação de temperatura e umidade³². A menor biomassa de ninhos, em campo, também, se deve ao maior gasto de energia para escavar os mesmos e formar a primeira câmara^{33–36}, ao contrário das colônias de laboratório. O maior número de ovos em ninhos iniciais em laboratório se deve ao fato dos mesmos não estarem sujeitos a grandes oscilações de temperatura e umidade²⁷, os quais afetam a oviposição da rainha. O maior número de larvas em colônias de laboratório é um padrão relatado para *A. sexdens*^{4,34} com reduzida variabilidade em condições controladas^{4,5,34}.

A correlação positiva entre os números de ovos e larvas, ovos e pupas, ovos e operárias pequenas, larvas e pupas, larvas e operárias pequenas, pupas e operárias pequenas e operárias pequenas e médias em colônias de campo se deve ao melhor desenvolvimento das colônias de *A. sexdens*. Isto ocorre com a rainha produzindo uma prole mais numerosa, de forma continua, sem perdas por doenças ou predação e sem diminuição significativa do número de indivíduos. Por outro lado, predação ou doenças, podem reduzir a prole aumentando a variabilidade do número de indivíduos e a correlação entre os estágios da prole em ninhos em campo. A maior concentração de dióxido de carbono em ninhos de *A. sexdens* em campo que em laboratório se deve ao fato da câmara do ninho inicial acumular CO₂¹⁹. As fontes biogênicas de CO₂ podem ser por decomposição da matéria vegetal, exsudação da raiz ou da adição de resíduos da planta, decomposição microbiana da matéria orgânica do solo, respiração da raiz e respiração rizomicrobiana (ou decomposição de raízes finas)³⁷.

Material e Métodos

Coleta de rainhas de *Atta sexdens* após o voo nupcial.

As rainhas de *A. sexdens* foram coletadas na Fazenda Experimental Lageado em Botucatu, Brasil em 2018 (22°50'37.3"S 48°25'38.3"W) durante o voo nupcial dessa formiga em dias ensolarados após fortes chuvas em outubro e início de novembro. Essas rainhas, que haviam retirado as asas, ou seja, fecundadas, foram coletadas e mantidas em potes 250 ml com 1 cm de gesso umedecido no fundo. Vinte colônias iniciais mantidas em laboratório e 18 iniciais coletadas em campo com quatro meses de idade após a revoada foram estudadas.

Níveis de CO₂ das colônias de laboratório.

As colônias de *A. sexdens*, com quatro meses de idade, foram enclausuradas em câmaras herméticas durante 24 horas, simulando a fundação claustral em ambiente natural. A emissão de CO₂ foi mensurada por sistema respirométrico fechado (Fig. 3) com medidor de CO₂ (Bacharach) com sonda fixa (<http://www.bacharach-inc.com>) a 25 °C em laboratório. Esse ambiente foi retroalimentado por uma bomba peristáltica evitando a perda da atmosfera modificada da câmara das colônias de *A. sexdens*.

Níveis de CO₂ das colônias de campo.

O estudo foi realizado na Fazenda Santana nas proximidades da Fazenda Experimental Lageado da UNESP, município de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil (22°50'46"S e 48°26'02"W). Ninhos iniciais de *A. sexdens* foram marcados e a concentração de CO₂ medida nos mesmos.

Um sistema respirométrico aberto foi construído e adaptado (Fig. 3) com entrada de ar atmosférico e o nível de CO₂ do recipiente respirométrico (Bacharach) medido com sonda fixa (<http://www.bacharach-32 inc.com>). Essa medição foi realizada com a introdução de um canículo no orifício de entrada do ninho e o ar succionado por uma bomba peristáltica para a caixa do medidor de CO₂³².

Os orifícios dos ninhos foram fechados por 24 horas após a medição do CO₂ e abertos após esse tempo quando novas medições desse gás foram feitas.

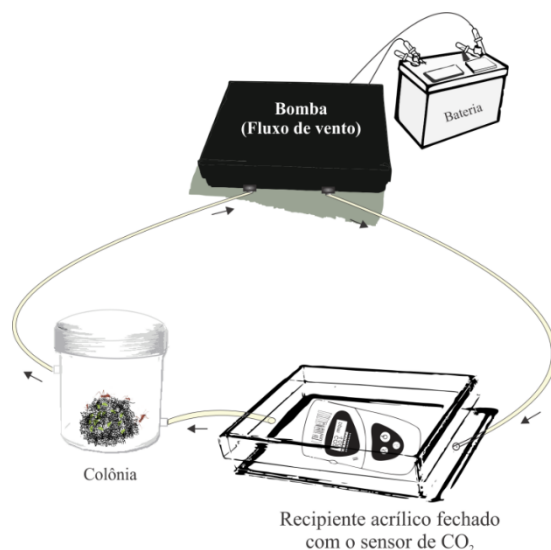


Figura 3. Esquema do sistema respirométrico fechado utilizado no experimento para medição de CO_2 em ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório e campo.

Composição da colônia inicial.

A composição da colônia inicial foi avaliada pela contagem do número de ovos, larvas, pupas e operárias adultas nos ninhos de *A. sexdens* com quatro meses de idade em campo. Essa composição foi obtida escavando-se os ninhos utilizando uma pá de jardinagem e armazenando os mesmos em potes de 250 ml com 1 cm de gesso umedecido no fundo. A prole, de cada colônia, foi contabilizada em laboratório sob microscópio estereoscópio.

Análise estatística.

As análises estatísticas de proporções da produção de CO_2 foram limitadas entre 0 e 1 com variabilidade, comumente, de acordo com a média da resposta não atendendo os pressupostos distribuição normal dos resíduos e variância homogênea das técnicas padrões de análise estatística. A regressão beta é um método de interpretação mais fácil e flexível que as transformações (arco seno(raiz($Y/100$))), etc.) para modelar proporções originadas de medidas contínuas limitadas ao intervalo aberto (0,1) cujos aspectos mais importantes são identificados por aqueles familiarizados com modelos lineares generalizados (GLMs)^{38–40}. Uma parametrização de média-precisão, com μ (para o valor esperado) e ϕ (como uma medida de 'precisão', ou o inverso da dispersão), é mais comumente usada no contexto de regressão beta. ver Caixa 1) Método de estimação de máxima verossimilhança de β e ϕ é usado para o melhor

ajuste dos dados ao modelo. Os coeficientes estimados do modelo estão relacionados com o preditor linear na escala transformada:

$$\begin{array}{ccc} \text{(Intercept)} & X & (\text{phi}) \\ -4,33144 & 0,04426 & 1353,5 \end{array}$$

Os coeficientes estimados na escala das observações originais devem ser transformados com o uso do inverso da função de ligação para que a relação não linear na escala das observações originais seja restaurada. Por exemplo, o valor esperado previsto quando $X = 1$ é:

$$g(E[Y|X = 1]) = -4,33144 + 0,04426 * 1 = -4,28718$$

$$E[Y|X = 1] = \frac{e^{-4,28718}}{1 + e^{-4,28718}} = 0,0135573$$

A hipótese para medianas foi testada com o Wilcoxon Rank Sum Test para as variáveis sem distribuição normal e as médias com o t Test homocedástico nas variáveis com distribuição normal. O nível de significância adotado nesta e em todas as demais análises foi de 5% ($\alpha = 0,05$). As análises de resíduos padronizados em tabela de contingência foram realizadas após o teste de independência χ^2 realizado. O teste de correlação linear de Pearson foi realizado com números ovos, larvas, pupas e operárias pequenas e médias de *A. sexdens*.

Referências

1. Hughes, W. O. H. & Goulson, D. The use of alarm pheromones to enhance bait harvest by grass-cutting ants. *Bull. Entomol. Res.* **92**, 213–218 (2002).
2. Staab, M. & Kleineidam, C. J. Initiation of swarming behavior and synchronization of mating flights in the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol. News* **19**, 93–102 (2014).
3. Sales, T. A., Toledo, A. M. O. & Lopes, J. F. S. The best of heavy queens: influence of post-flight weight on queens' survival and productivity in *Acromyrmex subterraneus* (Forel, 1893) (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Soc.* **67**, 383–390 (2020).

4. Camargo, R. S., Forti, L. C., Fujihara, R. T. & Roces, F. Digging effort in leaf-cutting ant queens (*Atta sexdens rubropilosa*) and its effects on survival and colony growth during the claustral phase. *Insectes Soc.* **58**, 17–22 (2011).
5. Autuori, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.) (Hymenoptera: Formicidae). I. Evolução do saúveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. **12**, 197–228 (1941).
6. Aylward, F. O. *et al.* *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3770–3778 (2013).
7. Costa, A. N., Vasconcelos, H. L., Vieira-Neto, E. H. M. & Bruna, E. M. Do herbivores exert top-down effects in Neotropical savannas? Estimates of biomass consumption by leaf-cutter ants. *J. Veg. Sci.* **19**, 849–854 (2008).
8. Bollazzi, M., Forti, L. C. & Roces, F. Ventilation of the giant nests of *Atta* leaf-cutting ants: does underground circulating air enter the fungus chambers? *Insectes Soc.* **59**, 487–498 (2012).
9. Sousa-Souto, L. *et al.* Increased CO₂ emission and organic matter decomposition by leaf-cutting ant nests in a coastal environment. *Soil Biol. Biochem.* **44**, 21–25 (2012).
10. Hasin, S. *et al.* CO₂ efflux from subterranean nests of ant communities in a seasonal tropical forest, Thailand. *Ecol. Evol.* **4**, 3929–3939 (2014).
11. Tschinkel, W. R. The nest architecture of the Florida harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. *J. Insect Sci.* **4**, 21 (2004).
12. Kleineidam, C. & Roces, F. Carbon dioxide concentrations and nest ventilation in nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. *Insectes Soc.* **47**, 241–248 (2000).
13. Currie, J. A. Gas diffusion through soil crumbs: the effects of compaction and wetting. *J. Soil Sci.* **35**, 1–10 (1984).
14. Kleineidam, C., Ernst, R. & Roces, F. Wind-induced ventilation of the giant nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. *Naturwissenschaften* **88**, 301–305

(2001).

15. Vogel, S., Ellington, C. P. & Kilgore, D. L. Wind-induced ventilation of the burrow of the prairie-dog, *Cynomys ludovicianus*. *J. Comp. Physiol.* **85**, 1–14 (1973).
16. Jonkman, J. C. M. The external and internal structure and growth of nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri* Forel, 1893 (Hym.: Formicidae) Part II. *Zeitschrift für Angew. Entomol.* **89**, 158–173 (1980).
17. Macieira, O. J. D. & Proni, E. A. Influência da temperatura na taxa respiratória de abelhas forrageiras *Trigona spinipes* (Fabricius) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) durante períodos de verão e inverno. *Rev. Bras. Zool.* **22**, 1159–1163 (2005).
18. Gutiérrez, J. L. & Jones, C. G. Physical ecosystem engineers as agents of biogeochemical heterogeneity. *Bioscience* **56**, 227–236 (2006).
19. Fernandez-Bou, A. S. *et al.* The role of the ecosystem engineer, the leaf-cutter ant *Atta cephalotes*, on soil CO₂ dynamics in a wet tropical rainforest. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **124**, 260–273 (2019).
20. Moitinho, M. R. *et al.* Does fresh farmyard manure introduce surviving microbes into soil or activate soil-borne microbiota? *J. Environ. Manage.* **11**, 1–15 (2021).
21. Marti, H. E., Carlson, A. L., Brown, B. V & Mueller, U. G. Foundress queen mortality and early colony growth of the leafcutter ant, *Atta texana* (Formicidae, Hymenoptera). *Insectes Soc.* **62**, 357–363 (2015).
22. Pull, C. D. & Cremer, S. Co-founding ant queens prevent disease by performing prophylactic undertaking behaviour. *BMC Evol. Biol.* **17**, 1–10 (2017).
23. Pagnocca, F. C., Carreiro, S. C., Bueno, O. C., Hebling, M. J. & Da Silva, O. A. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. *J. Appl. Entomol.* **120**, 317–320 (1996).
24. Rodrigues, A. *et al.* Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. *J. Basic Microbiol.* **54**, 1186–1196 (2014).
25. Van Bael, S. A., Seid, M. A. & Wcislo, W. T. Endophytic fungi increase the

processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecol. Entomol.* **37**, 318–321 (2012).

26. Schoenian, I. *et al.* Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 1955–1960 (2011).
27. Roces, F. Variable thermal sensitivity as output of a circadian clock controlling the bimodal rhythm of temperature choice in the ant *Camponotus mus*. *J. Comp. Physiol. A* **177**, 637–643 (1995).
28. Römer, D., Bollazzi, M. & Roces, F. Carbon dioxide sensing in an obligate insect-fungus symbiosis: CO₂ preferences of leaf-cutting ants to rear their mutualistic fungus. *PLoS ONE* **12**, e0174597 (2017).
29. Halboth, F. & Roces, F. The construction of ventilation turrets in *Atta vollenweideri* leaf-cutting ants: Carbon dioxide levels in the nest tunnels, but not airflow or air humidity, influence turret structure. *PLoS ONE* **12**, e0188162 (2017).
30. Kleineidam, C. & Tautz, J. Perception of carbon dioxide and other “air-condition” parameters in the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. *Naturwissenschaften* **83**, 566–568 (1996).
31. Kleineidam, C., Romani, R., Tautz, J. & Isidoro, N. Ultrastructure and physiology of the CO₂ sensitive sensillum ampullaceum in the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Arthropod Struct. Dev.* **29**, 43–55 (2000).
32. Camargo, R. S., Silva, E. J., Forti, L. C. & Matos, C. A. O. Initial development and production of CO₂ in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* during the claustral foundation. *Sociobiology* **63**, 720–723 (2016).
33. Seal, J. N. Scaling of body weight and fat content in fungus-gardening ant queens: does this explain why leaf-cutting ants found claustrally? *Insectes Soc.* **56**, 135–141 (2009).
34. Camargo, R. S. & Forti, L. C. Queen lipid content and nest growth in the leaf cutting ant (*Atta sexdens rubropilosa*) (Hymenoptera: Formicidae). *J. Nat. Hist.*

- 47**, 65–73 (2013).
35. Camargo, R. S., Fonseca, J. A., Lopes, J. F. S. & Forti, L. C. Influência do ambiente no desenvolvimento de colônias iniciais de formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*). *Ciência Rural* **43**, 1375–1380 (2013).
 36. Silva, E. J., Camargo, R. S. & Forti, L. C. Flight and digging effort in leaf-cutting ant males and gynes. *Sociobiology* **62**, 334–339 (2015).
 37. Kuzyakov, Y. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 425–448 (2006).
 38. Cribari-Neto, F. & Zeileis, A. Beta regression in R. *J. Stat. Softw.* **34**, 1–24 (2010).
 39. Ferrari, S. & Cribari-Neto, F. Beta regression for modelling rates and proportions. *J. Appl. Stat.* **31**, 799–815 (2004).
 40. Smithson, M. & Verkuilen, J. A better lemon squeezer? Maximum-likelihood regression with beta-distributed dependent variables. *Psychol. Methods* **11**, 54 (2006).

CAPÍTULO 4

MICROMORFOLOGIA DO SOLO E TROCA DE CO₂ EM NINHOS INICIAIS DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)⁴

RESUMO

Formigas constroem ninhos subterrâneos para proteção de suas colônias e melhoria das condições para sua prole. A escavação de ninhos, por formigas, modifica a estrutura do solo facilitando trocas gasosas e a circulação de gases, o que precisa ser melhor estudado. Ninhos iniciais, também, modificam a matriz do solo da câmara inicial e modificam a troca gasosa? O objetivo foi estudar a micromorfologia do solo da parede da câmara inicial de ninhos da formiga cortadeira *A. sexdens* e como o CO₂ se difunde para a matriz do solo. A concentração de CO₂, em ninhos iniciais de *A. sexdens* com quatro meses de idade, foi medida por sistema respirométrico com medidor desse gás e os orifícios dos ninhos fechados (obliterados) por 24 horas. Após esse período, foram abertos e a concentração de CO₂ medida novamente. Além disso, furos com 15 cm de profundidade, foram feitos no solo distantes 15 e 60 cm do orifício do ninho. O CO₂ foi medido nestes orifícios e, a seguir, os mesmos foram vedados por 24 horas e novas medições feitas após esse período. O conteúdo das câmaras dos ninhos foi retirado, após as medições de CO₂, e a micromorfologia do solo das paredes da câmara inicial, dos mesmos, analisada. A concentração de CO₂ na câmara do ninho foi maior que a do solo nas distâncias de 15 e 60 cm da mesma. O acúmulo de CO₂ não aumentou com a obliteração da entrada do ninho por 24 horas. O solo da parede dos ninhos iniciais, de *A. sexdens*, é composto por material grosso, principalmente, quartzo e carvão, e por fino composto por argila, matéria orgânica e óxidos de ferro. A porosidade do solo, da parede das câmaras dos ninhos iniciais, foi menor que a da matriz do solo adjacente. Ninhos iniciais de *A. sexdens* modificam a matriz do solo da parede de suas câmaras, auxiliando na troca do CO₂ entre a mesma e o solo adjacente.

Palavras-chaves: Attini; CO₂; difusão; porosidade

⁴ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico *Entomologia Experimentalis et Applicata*

Introdução

Ninhos das formigas cortadeiras *Atta*, *Acromyrmex* e *Amoimyrmex* são elaborados em sua construção e, normalmente, formados por câmaras ligadas por galerias ou canais que se abrem na superfície do solo (Cristiano et al., 2020). Essas câmaras abrigam o fungo simbiote, fonte primária de alimento das larvas e de formigas adultas. A atividade intensa de escavação do solo protege e ajuda na manutenção de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da prole dessas formigas (Halley et al., 2005; Mota et al., 2021; Silva et al., 2003).

O ninho é, inicialmente, escavado por uma rainha recém-fecundada, a qual constrói a primeira câmara (Camargo et al., 2011; Fujihara et al., 2012). Essa rainha exerce as atividades dentro do ninho até as primeiras operárias emergirem e iniciarem o forrageamento (Camargo et al., 2011), por volta de quatro meses a partir da fundação do mesmo (Autuori, 1942). As operárias, a partir desse momento, assumem as atividades internas e externas ao ninho, incluindo o cuidado com a prole e com a rainha e escavam novos canais e câmaras (Autuori, 1942).

As formigas, ao escavarem os ninhos, constroem câmaras e túneis modificando o solo para facilitar as trocas gasosas no interior dos mesmos. O sistema arquitetônico interno, criado na construção desses ninhos, pode, também, facilitar o deslocamento e circulação dos gases dentro dos mesmos (Bollazzi et al., 2012; Halboth and Roces, 2017; Hasin et al., 2014). A micromorfologia é adequada para se estudar modificações pelas formigas por identificar a porosidade e a permeabilidade e visualizar alterações estruturais causadas pela compactação e adensamento do solo (Cosarinsky and Roces, 2012; Halboth and Roces, 2017).

A arquitetura do ninho de *Atta vollenweideri* Forel (Hymenoptera: Formicidae), que apresentam torres de ventilação sobre as aberturas centrais, auxilia a movimentação do vento dentro do ninho, o que difere de outras espécies de *Atta* (Cosarinsky and Roces, 2012; Halboth and Roces, 2017) que não apresentam essas torres sobre as aberturas centrais do ninho. Essas aberturas são usadas como entradas conectando as trilhas de forrageamento e, no topo do ninho, formam torres conspícuas facilitando trocas gasosas entre o interior do mesmo e o meio ambiente (Halboth and Roces, 2017; Kleineidam et al., 2001; Kleineidam and Roces, 2000).

Modificações na estrutura do solo por formigas cortadeiras, ao escavarem seus ninhos, aumentam as trocas gasosas e a circulação dos gases no interior dos mesmos, o que precisa ser estudado em outras espécies de *Atta*. Ninhos iniciais,

também, modificam a matriz do solo da câmara inicial e essas modificações auxiliam na troca gasosa nos ninhos? A micromorfologia do solo da parede da câmara inicial de ninhos da formiga cortadeira *A. sexdens* e a taxa de CO₂, emitido por seus ninhos iniciais, foram estudados para responder essas questões.

Material e Métodos

Ninhos iniciais de *Atta sexdens*

Ninhos iniciais de *A. sexdens*, com quatro meses de idade, foram marcados na Fazenda Santana, Botucatu, São Paulo, Brasil em 2018 (22°50'37.3"S 48°25'38.3"W).

Medição do nível de CO₂ dos ninhos

A concentração de CO₂ foi medida nos ninhos iniciais *A. sexdens* utilizando-se um sistema respirométrico (Fig. 1) com medidor desse gás da marca Bacharach por sonda fixa (<http://www.bacharach-32inc.com>). Dez leituras consecutivas, da concentração de CO₂ do recipiente respirométrico, foram feitas para obtenção de uma média. Essa medição foi realizada pela introdução de uma canícula no orifício de entrada e o ar retirado por bomba peristáltica (Camargo et al., 2016).

Os orifícios dos ninhos foram vedados (obliterados) por 24 horas, após a medição do CO₂ nos mesmos e, novamente, abertos quando nova medição foi feita. Furos de 15 cm de profundidade no solo, distantes de 15 e 60 cm do orifício do ninho, foram feitos. A concentração do CO₂ foi medida nestes orifícios que foram, também, vedados por 24 horas, após o que novas medições foram feitas.

Micromorfologia do solo da parede da câmara inicial do ninho

Três amostras, indeformadas, de solo foram coletadas, secas ao ar por 15 dias e, posteriormente, em estufa a 40 °C por 24 horas. Em seguida, foram impregnadas com resina poliéster diluída em monômero de estireno e pigmento fluorescente (Tynopal OB) para a observação e distinção do espaço poroso em luz ultravioleta (UV) (Murphy, 1986). Lâminas delgadas de solo (5 × 9 cm) foram obtidas a partir dos blocos impregnados e secos e descritas (Bullock et al., 1985). Pequenas áreas (0,8 x 0,6 cm), nessas lâminas, foram selecionadas, fotografadas e processadas no programa Noesis Visilog determinando-se a porosidade total (soma das áreas dos tipos de poros/soma

da área total analisada), morfologia dos poros (arredondado, irregular, alongado) e poros nas classes de tamanho de 39 – 3900; 3900 – 39000; >390000 μm (Cooper and Vidal-Torrado, 2005). Feições pedológicas, da seção longitudinal das paredes das câmaras de fungo da formiga cortadeira, foram obtidas por descrição micromorfológica (Tabela 1).

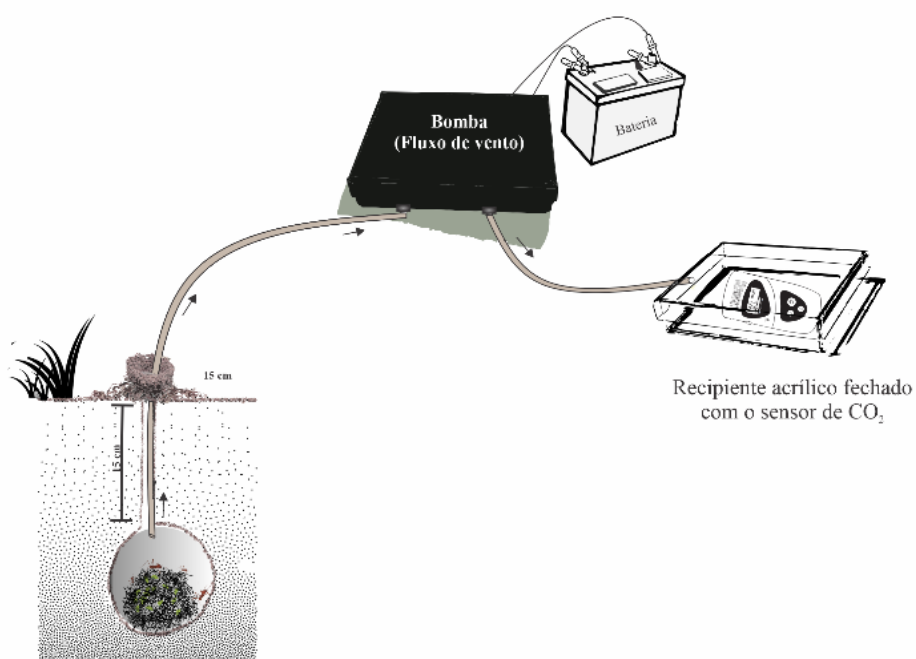


Figura 1 Esquema do sistema respirométrico para medição de CO_2 em ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).

Tabela 1 Microestrutura (Mi.), material grosso (MG), material fino (MF), poros (Po.), distribuição relativa C/F (DR), fábrica-b (Fb) e pedofeições (Pe) do solo e da parede da câmara (PC) de três ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) comparado com *Atta vollenweideri* (Hymenoptera: Formicidae) (Cosarinsky and Roces, 2007).

	PC ninho 1	PC ninho 2	PC ninho 3	<i>Atta vollenweideri</i>
Mi.	Blocos subangulares	Blocos Subangulares	Blocos subangulares	Estruturas cimentadas intergrãos microporosas e maciças alternadas com estruturas microagregadas peliculares e intergrãos.
MG	Quartzo (99%); Carvão (1%)	Quartzo (97%); Carvão (3%)	Quartzo (98%); Carvão (2%)	Quartzo, hematita e feldspato (50-70%)
MF	Argila, matéria orgânica e óxidos de ferro	Argila, matéria orgânica e óxidos de ferro	Argila, matéria orgânica e óxidos de ferro	Argila e óxidos de ferro
Po.	Câmaras, cavidades, canais e fissuras	Câmaras, cavidades, canais e fissuras	Câmaras, cavidades, canais e fissuras	-
DR	Porfírica	Porfírica	Porfírica	-
Fb	Salpicada granida	Salpicada granida	Salpicada granida	-
Pe	Preenchimentos incompletos; raízes	Preenchimentos incompletos; raízes	Preenchimentos incompletos e completos; raízes; excrementos	-

Análise estatística

O melhor ajuste dos dados da concentração de CO₂ ao modelo foi obtido pelo método de estimação de máxima verossimilhança de β e ϕ e seus coeficientes estimados relacionados com o preditor linear na escala transformada:

$$\begin{array}{ccc} \text{(Intercept)} & X & \text{(phi)} \\ -4,431708 & -0,036743 & \mathbf{0,03550} \end{array}$$

O inverso da função de ligação restaura a relação não linear na escala das observações originais. Por exemplo, o valor esperado previsto quando $X=1$ é:

$$g(E[Y|X=1]) = -4,431708 - 0,036743 * 1 = -4,468451$$

$$E[Y|X=1] = \frac{e^{-4,468451}}{1 + e^{-4,468451}} = 0,0113351$$

Os pacotes `plyr`, `tidyverse`, `betareg`, `lme4`, `emmeans`, `plotly`, `htmlwidgets` e `extrafont` do R free software para computação estatística e gráficos foram utilizados na versão 4.0.4.

Resultados

A fábrica do solo é definida pela organização total entre o material grosso, fino e os poros (Bullock et al., 1985). O material grosso é composto por quartzo e fragmentos de carvão variando em porcentagem de ocorrência entre os três ninhos estudados, sendo 99, 97 e 98% para quartzo nos ninhos 1, 2 e 3, respectivamente; e 1, 3 e 2% para fragmentos de carvão nos ninhos 1, 2 e 3. O material fino foi caracterizado pela ocorrência de argila, matéria orgânica e óxidos de ferro inferidos pela coloração da matriz. A distribuição relativa nos três ninhos é caracterizada como porfírica, com microestrutura em blocos subangulares moderadamente desenvolvidos e fábrica-b salpicada granada. Pedofeições, como preenchimentos incompletos e raízes foram encontradas nos ninhos 1 e 2, e preenchimentos completos e incompletos, raízes e excrementos observadas no ninho 3 (Tabela 1).

Os poros observados na matriz do solo e na parede da câmara do fungo dos ninhos de *A. sexdens* foram câmaras, cavidades, canais e fissuras, com maiores valores na câmara do ninho 1 que nas dos 2 e 3, estes com predominância de poros alongados e irregulares e presença de raízes (Fig. 2. d). A porosidade total do solo

das paredes das câmaras dos ninhos foi menor que a da matriz do solo adjacente (Tabela 2, Fig. 2. a,b,c).

Tabela 2 Porosidade total (%) da parede da câmara do fungo (Câmara do fungo) e da matriz do solo (Matriz do solo) adjacente a ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).

	Câmara do fungo	Matriz do solo
Ninho 1	14,1	27,9
Ninho 2	5,9	7,9
Ninho 3	2,9	4,9

A área total ocupada e a distribuição dos poros, determinadas nas imagens representativas de acordo com seu tamanho e morfologia, das câmaras dos ninhos mostraram poros da matriz do solo das câmaras dos ninhos 2 e 3 alongados e arredondados e os do ninho 1 alongados e irregulares (Fig. 3).

A significância da estimativa do coeficiente negativo ($\beta_2 = -0,036743$, $pval < 2e-16$) indicou decréscimo nos valores de CO_2 com o aumento da distância da câmara do ninho da formiga cortadeira *A. sexdens* (Tabela 3), mas sem efeito da obliteração por 24 horas na emissão desse gás ($\beta_1 = -0,057043$, $pval = 0,737$) (Fig. 4, Tabela 3).

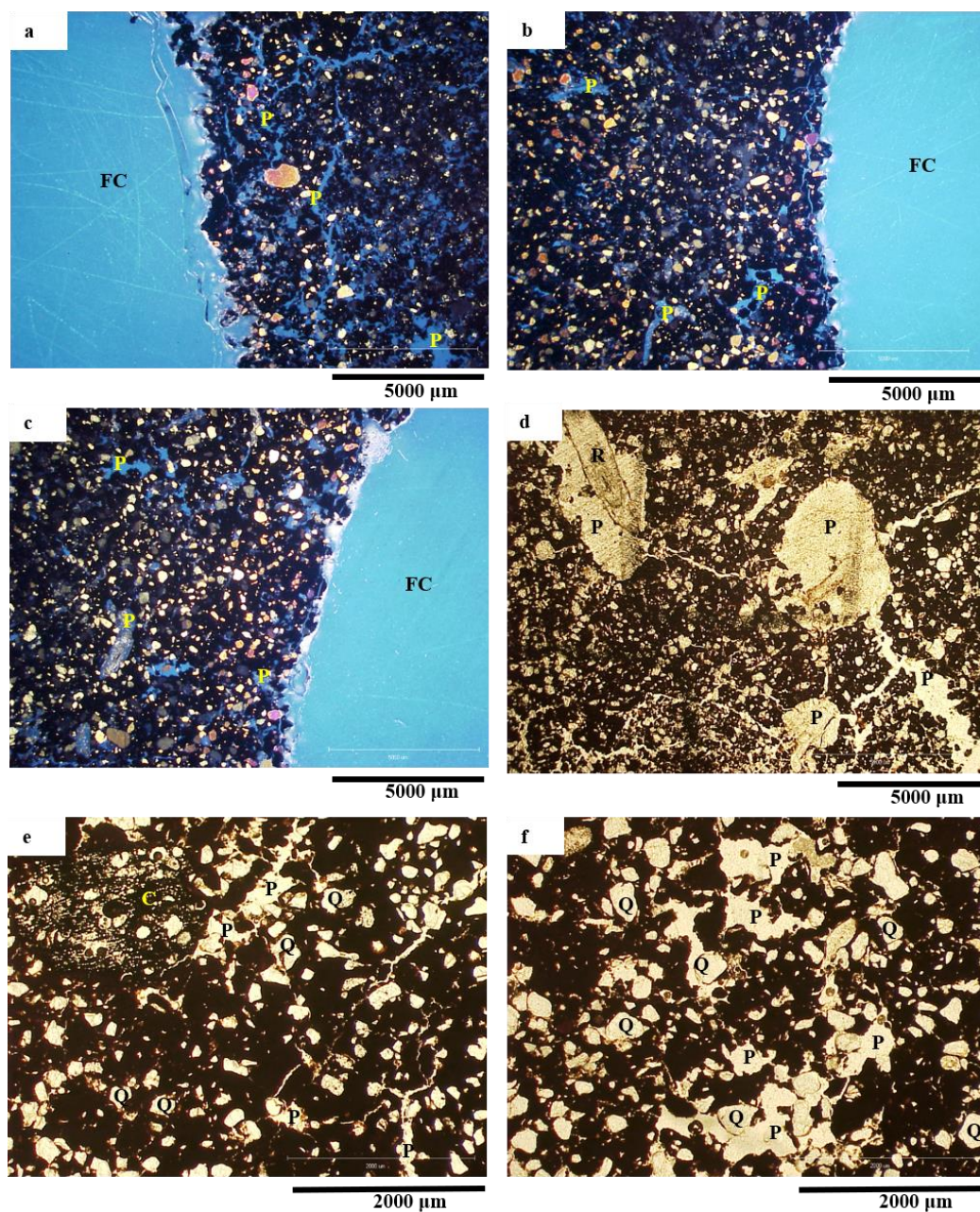


Figura 2 Fotomicrografias dos solos das paredes das câmaras iniciais de ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). a) Limite entre a matriz do solo e a câmara do ninho 1 (FC– câmara de fungo) (XPL (cross polarized light) + UV (luz UV); b) do 2 (FC) (XPL + UV); c) e do 3 (FC) (XPL + UV); d,e,f). Detalhe do tipo de poro dominante (P; câmaras e cavidades) na matriz do solo da câmara dos ninhos 1, 2 e 3 (PPL (plane polarized light)); Q= quartzo; P= poro; FC= câmara de fungo; R= raiz; C= carvão. Figuras 2a, 2b and. Poros com coloração azul, matriz do solo em preto/marrom e os grãos de quartzo como pontos brilhantes/amarelados.

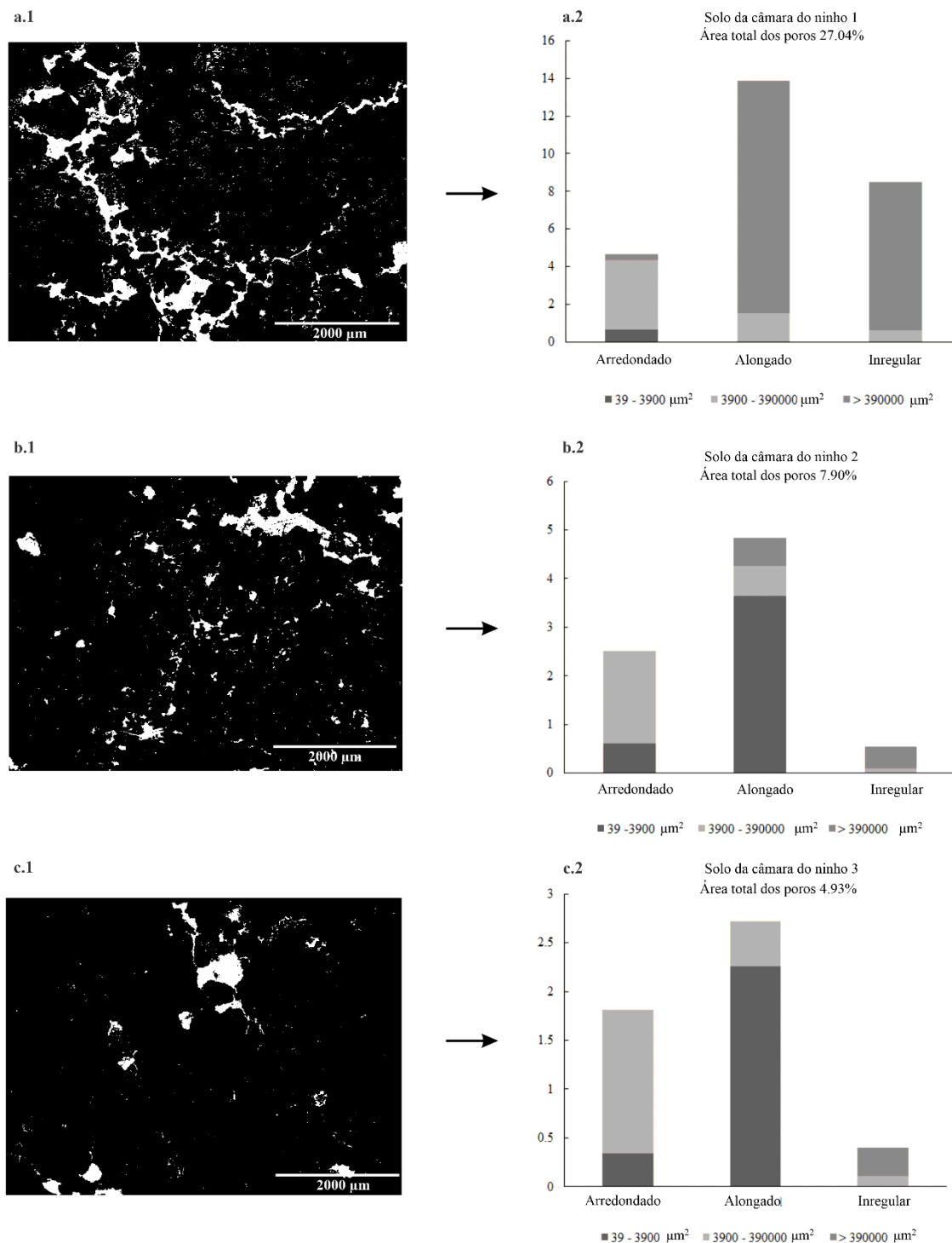


Figura 3 Porosidade total da matriz do solo dos ninhos 1 (a), 2 (b) e 3 (c). 1) Imagens binárias utilizadas na análise das mesmas (poros com coloração branca e a matriz do solo em preto); 2) Distribuição dos poros de acordo com a área e morfologia dos mesmos.

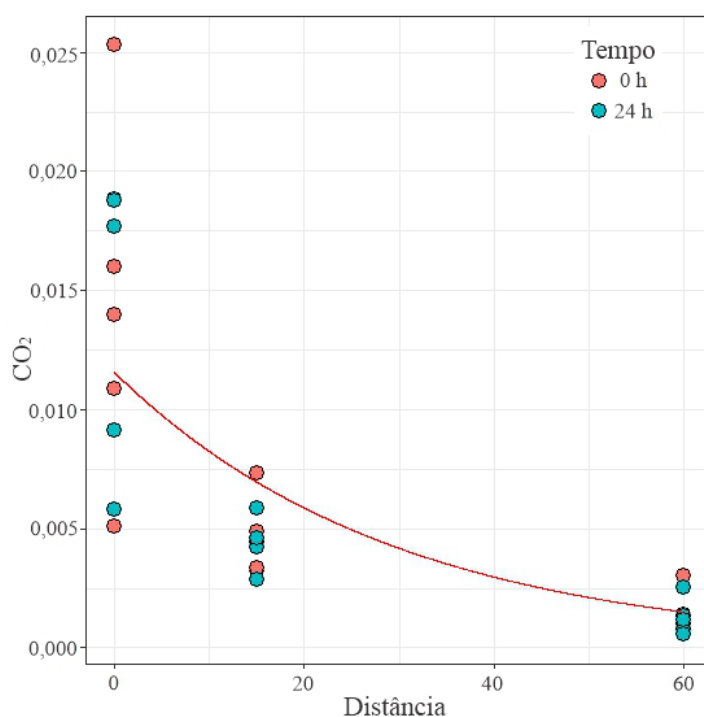


Figura 4 Concentração de CO₂ na câmara dos ninhos iniciais (0) de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) em 15 cm e 60 cm de distância

Tabela 3 Resumo das estimativas dos coeficientes do modelo $CO_2 = f(\text{hora}, \text{distância})$ variando com os preditores

		Estimativo	Erro padrão	Z	Pr(> z)
Coeficientes (modelo médio com link logit):	(Intercept)	-4,431708	0,150195	-29,506	<2e-16
	Fator (hora)	-0,057043	0,170072	-0,335	0,737
	Distância	-0,036743	0,003568	-10,297	<2e-16
Coeficientes Phi (modelo de precisão com link de log):	(Intercept)	5,90963	0,36929	16,003	< 2e-16
	Distância	0,03550	0,01036	3,426	0,000612
Log probabilidade: 142,8 em 5 Df		Pseudo R-quadrado: 0,7817. Pr- probabilidade			

Discussão

A fábrica do solo com material grosso composto por quartzo e carvão, e material fino composto por argila, matéria orgânica e óxidos de ferro, relacionados à distribuição relativa do tipo porfírica com microestrutura em blocos subangulares nos ninhos 1, 2 e 3 foi semelhante à relatada naqueles de *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) e *A. vollenweideri* (Cosarinsky, 2006; Green et al., 1999). A ausência de revestimentos e a presença de bordos serrilhados e irregulares das paredes das câmaras de fungo dos ninhos 1, 2 e 3, juntamente com a menor porosidade das mesmas indicam uma incipiente compactação das paredes das câmaras dos ninhos ao escavar as primeiras câmaras de fungo, levando a uma estrutura mais compacta, a qual estabiliza as paredes das câmaras dos três ninhos de *A. sexdens* (Humphreys, 1994; Castro and Cooper, 2019). No entanto, a micromorfologia do solo da estrutura subterrânea da câmara de ninhos iniciais de *A. sexdens* difere daquela de ninhos adultos de *A. vollenweideri*, estes com estruturas cimentadas intergrãos microporosas e maciças alternadas com estruturas microagregadas peliculares e intergrãos (Tabela 1) (Cosarinsky and Roces, 2007). Esta diferença na estrutura está correlacionada a maturidade dos ninhos, ou seja, quanto mais velho e maduro for o ninho, maior será o retrabalhamento das partículas do solo pelas formigas gerando assim estruturas complexas como as observadas por Cosarinsky and Roces (2007). O quartzo é o mineral com maior percentual nos ninhos de *A. sexdens* e *A. vollenweideri*, mas carvão foi relatado naqueles de *A. sexdens* e hematita e feldspato nos de *A. vollenweideri* (Cosarinsky and Roces, 2007). A presença comum do mineral quartzo é indicativo de uma textura menos argilosa, o que propicia maiores espaços porosos facilitando a difusão do CO₂ (Hillel, 1998). Além disso, argila e óxidos de ferro, com partículas finas, foram encontrados em ninhos dessas duas espécies e, também, matéria orgânica na parede da câmara inicial daqueles de *A. sexdens* (Cosarinsky and Roces, 2007). Diferenças micromorfológicas entre ninhos de *A. sexdens* e *A. vollenweideri* devem estar relacionadas aos ambientes de nidificação dessas espécies, pois, ao contrário de *A. sexdens*, os de *A. vollenweideri* são encontrados, frequentemente, em locais com solo inundado. Além disso, como comentado acima, a maturidade dos ninhos pode interferir nestas diferenças micromorfológicas devido ao maior retrabalhamento das partículas do solo.

A maior porosidade da parede da câmara inicial do ninho 1, de *A. sexdens*, que a dos ninhos 2 e 3 se devem as diferenças durante o processo de escavação do ninho pelas operárias ao aumentar a mesma e ao comportamento para isolamento da câmara com a matriz de solo adjacente (Cosarinsky and Roces, 2007). A porosidade das câmaras dos ninhos de *A. sexdens* com variação muito ampla da área de poros, de $39 \mu\text{m}^2$ à $390000 \mu\text{m}^2$ difere da microestrutura das câmaras de fungo, lixo e túneis em ninhos de *A. vollenweideri*, muito porosas com vazios iguais ou menores que $100 \mu\text{m}$ (Cosarinsky and Roces, 2007). Essa alta variação de porosidade da parede da câmara dos ninhos de *A. sexdens* pode estar relacionada, principalmente, ao fato de ninhos iniciais dessa formiga serem mais superficiais, aproximadamente 15 cm de profundidade e mais expostos a raízes (Fernandez-Bou et al., 2019). Por isto, diferenças na porosidade entre a parede da câmara do ninho e o solo adjacente podem estar relacionadas a trocas gasosas no ninho, por armazenarem CO_2 do solo e, como não são, totalmente, isolados esse gás se difunde de fora para dentro da câmara e vice-versa (Fernandez-Bou et al., 2019). Os maiores espaços e porosidade da câmara do ninho que do solo adjacente facilita a entrada de CO_2 do solo para a mesma como relatado para *A. vollenweideri*, com montes de solo escavado durante o aumento da colônia e do reforço para estabilizar estruturas com função de torres de ventilação (Halboth and Roces, 2017) para as câmaras subterrâneas por mecanismo passivo impulsionado pelo vento (Kleineidam et al., 2001; Kleineidam and Roces, 2000). As trocas gasosas em ninhos iniciais de *A. sexdens* devem ser por difusão passiva, como na maioria dos substratos terrestres (Evans, 1966), pois estruturas como torres não foram relatadas em seus montes de terra.

Os poros arredondados e alongados, dos ninhos 2 e 3 e alongados e irregulares do 1 de *A. sexdens* se devem a variações, durante o processo de escavação pela formiga aumentando sua câmara inicial e, também, ao comportamento para isolamento da câmara da matriz de solo adjacente (Cosarinsky and Roces, 2007). Essas estruturas subterrâneas, resultantes da escavação para formação de câmaras (para fungos e resíduos) e os túneis em ninhos de *A. vollenweideri*, são escavações simples. Além disso, a micromorfologia dessas estruturas não difere do solo adjacente, com frequência máxima de componentes grosseiros nas pelotas de solo de 30% e 50% em outras regiões como no Horizonte Bt (limite de escavação de 20–200 cm). Essa diferença pode resultar da incorporação posterior de argila ao solo

removido ou de forma como os peletes foram formados, como relatado para o comportamento de escavação de formigas em meio natural com microestrutura original e componentes finos e grosseiros desconhecidos (Cosarinsky and Roces, 2007).

A significância da estimativa do coeficiente negativo, indicando decréscimo nos valores de CO₂ com o aumento da distância da câmara do ninho da formiga cortadeira *A. sexdens*, se deve ao acúmulo desse gás reduzindo suas concentrações no solo adjacente (Fernandez-Bou et al., 2019). Por isso, a menor concentração desse gás em solos mais distantes, mesmo com profundidade semelhante, facilita sua penetração, por difusão, na câmara do ninho inicial, reduzindo sua concentração no solo adjacente. A maior concentração de CO₂ na câmara inicial torna necessária mecanismos de ventilação induzidos pelo vento (Kleineidam et al., 2001) como o relatado para trocas gasosas em ninhos adultos de *A. vollenweideri*. Três modelos matemáticos de difusão gasosa foram estudados para explicar trocas gasosas em substratos terrestres, provavelmente, por difusão passiva (Evans, 1966). Esses modelos utilizaram dados empíricos e os atributos físicos e comportamentais de animais fossoriais em tocas subaquáticas e subterrâneas cilíndricas simples em meio impermeável (a), câmara de ninho esférico e cavidades em meio impermeável (b), e câmara de ninho esférica e cavidades cilíndricas em meio permeável (c). Animais ectotérmicos, em tocas em meio impermeável, não podem depender da difusão para atender às suas necessidades metabólicas de excreção de CO₂, a menos que sejam de tamanho, extremamente, pequeno (Withers, 1978) e os ectotérmicos subterrâneos podem depender da difusão gasosa, exceto quando em grandes números (Withers, 1978). Os ninhos iniciais de *A. sexdens* são muito menores com, somente, uma câmara e mais próximos a superfície do solo, o que possivelmente, auxilia na troca gasosa por difusão comparado aqueles adultos com milhares de câmaras e a maiores profundidades.

Modificações na matriz do solo da parede da câmara, em ninhos iniciais de *A. sexdens*, podem auxiliar na troca gasosa entre os mesmos por difusão com o solo adjacente para dentro da câmara do ninho inicial.

Referências

Autuori, M., 1942. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.

- Hymenoptera Formicidae). II. O saueiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). Arq. Inst. Biol. 13, 67–86.
- Bollazzi, M., Forti, L.C., Roces, F., 2012. Ventilation of the giant nests of *Atta* leaf-cutting ants: does underground circulating air enter the fungus chambers? Insectes Soc. 59, 487–498.
- Bullock, P., Fedoroff, N., Jongerius, A., Stoops, G., Tursina, T., 1985. Handbook for soil thin section description. Waine Research.
- Camargo, R.S., Forti, L.C., Fujihara, R.T., Roces, F., 2011. Digging effort in leaf-cutting ant queens (*Atta sexdens rubropilosa*) and its effects on survival and colony growth during the claustral phase. Insectes Soc. 58, 17–22.
- Camargo, R.S., Silva, E.J., Forti, L.C., Matos, C.A.O., 2016. Initial development and production of CO₂ in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* during the claustral foundation. Sociobiology 63, 720–723.
- Castro, S.S., Cooper, M., 2019. Fundamentos de micromorfologia de solos. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa.
- Cooper, M., Vidal-Torrado, P., 2005. Caracterização morfológica, micromorfológica e físico-hídrica de solos com horizonte B nítico. Rev. Bras. Ciência do Solo 29, 581–595.
- Cosarinsky, M.I., 2006. Nest micromorphology of the neotropical mound building ants *Camponotus punctulatus* and *Solenopsis* sp. Sociobiology 47, 329–344.
- Cosarinsky, M.I., Roces, F., 2012. The construction of turrets for nest ventilation in the grass-cutting ant *Atta vollenweideri*: import and assembly of building materials. J. Insect Behav. 25, 222–241.
- Cosarinsky, M.I., Roces, F., 2007. Neighbor leaf-cutting ants and mound-building termites: Comparative nest micromorphology. Geoderma 141, 224–234.
- Cristiano, M.P., Cardoso, D.C., Sandoval-Gómez, V.E., Simões-Gomes, F.C., 2020. *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. Austral Entomol. 59, 643–676.
- Evans, D.D., 1966. Gas movement, in: Black, C.A. (Ed.), Methods of Soil Analysis. American Society of Agronomy, Madison, Wis, pp. 318–330.
- Fernandez-Bou, A.S., Dierick, D., Swanson, A.C., Allen, M.F., Alvarado, A.G.F., Artavia-León, A., Carrasquillo-Quintana, O., Lachman, D.A., Oberbauer, S., Pinto-Tomás, A.A., 2019. The role of the ecosystem engineer, the leaf-cutter ant *Atta*

- cephalotes*, on soil CO₂ dynamics in a wet tropical rainforest. J. Geophys. Res. Biogeosciences 124, 260–273.
- Fujihara, R.T., Camargo, R. da S., Forti, L.C., 2012. Lipid and energy contents in the bodies of queens of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae): pre-and post-nuptial flight. Rev. Bras. Entomol. 56, 73–75.
- Green, W.P., Pettry, D.E., Switzer, R.E., 1999. Structure and hydrology of mounds of the imported fire ants in the southeastern United States. Geoderma 93, 1–17.
- Halboth, F., Roces, F., 2017. The construction of ventilation turrets in *Atta vollenweideri* leaf-cutting ants: Carbon dioxide levels in the nest tunnels, but not airflow or air humidity, influence turret structure. PLoS ONE 12, e0188162.
- Halley, J.D., Burd, M., Wells, P., 2005. Excavation and architecture of Argentine ant nests. Insectes Soc. 52, 350–356.
- Hasin, S., Ohashi, M., Yamada, A., Hashimoto, Y., Tasen, W., Kume, T., Yamane, S., 2014. CO₂ efflux from subterranean nests of ant communities in a seasonal tropical forest, Thailand. Ecol. Evol. 4, 3929–3939.
- Hillel, D., 1998. Environmental soil physics. Academic Press, San Diego.
- Humphreys, G.S., 1994. Bioturbation, biofabrics and the biomantle: An example from the Sydney Basin, in: Ringrose-Voase, A.J., Humphreys, G.S. (Eds.), Micromorphology: Studies in management and genesis. Elsevier, Amsterdam, pp-421–436.
- Kleineidam, C., Ernst, R., Roces, F., 2001. Wind-induced ventilation of the giant nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. Naturwissenschaften 88, 301–305.
- Kleineidam, C., Roces, F., 2000. Carbon dioxide concentrations and nest ventilation in nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. Insectes Soc. 47, 241–248.
- Mota, T.M.M., Stefanelli, L.E.P., Camargo, R. da S., Matos, C.A.O. de, Forti, L.C., 2021. Biological control in leaf-cutting ants, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), using pathogenic fungi. Rev. Árvore 45, e4516.
- Murphy, C.P., 1986. Thin section preparation of soils and sediments. AB Academic Pub., Berkhamsted, UK.
- Silva, A., Bacci Jr, M., de Siqueira, C.G., Bueno, O.C., Pagnocca, F.C., Hebling, M.J.A., 2003. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. J. Insect Physiol. 49, 307–313.
- Withers, P.C., 1978. Models of diffusion-mediated gas exchange in animal burrows. Am. Nat. 112, 1101–1112.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As formigas cortadeiras são pertencentes um grupo de insetos eusociais, conhecidas principalmente como cultivadora de fungo, o qual é mantido em condições favoráveis para seu crescimento pelas formigas cortadeiras. A fundação de uma nova colônia de formiga cortadeira se inicia com a revoada onde as formas sexuadas saem dos ninhos para iniciar seu voo nupcial. Após o voo nupcial as rainhas iniciam o processo de fundação do ninho inicial. Assim com a finalidade de colaborar com o conhecimento a respeito dos ninhos iniciais de formigas cortadeiras este estudo teve como objetivos estudar como a temperatura e sombreamento do solo influenciam na profundidade de fundação dos ninhos; estudar a micromorfologia do solo interno das câmaras e circundantes a elas para verificar se ocorre modificação estrutural do solo de ninhos iniciais; e estudar a temperatura versus troca gasosa dos ninhos iniciais em campo e laboratório e quais são os mecanismos envolvidos nas trocas gasosas.

No primeiro capítulo foi avaliado o tempo de escavação, volume de solo escavado, profundidade, volume dos ninhos e mortalidade das rainhas de *A. sexdens* em solos com densidade e umidade diferentes. O resultado foi que a densidade e umidade do solo afetaram o esforço de escavação das rainhas, resultando em aumento ou redução do período de escavação do ninho, quantidade de solo escavado, profundidade e volume da câmara do ninho, os quais são parâmetros relacionados com a sobrevivência da rainha.

Dando continuidade ao estudo de fundação do ninho inicial, na fase claustral da rainha o segundo capítulo avaliou o número de ovos, larvas, pupas e adultos, a massa da rainha e a biomassa do jardim de fungo e as dimensões (largura, comprimento, altura e profundidade) dos ninhos dessa formiga cortadeira em solos em ambientes ensolarados e sombreados; e também a mortalidade da rainha. Com esse estudo foi possível observar que o desenvolvimento das colônias de *A. sexdens* foi melhor e a profundidade, volume da câmara inicial, biomassa do jardim de fungo e números de ovos, larvas, pupas e operárias do ninho dessa formiga cortadeira foram maiores no ambiente sombreado. Assim o ambiente sombreado foi o ambiente mais favorável para a sobrevivência da rainha e a formação e desenvolvimento de colônia de *A. sexdens*.

No terceiro capítulo foi estudada a concentração de dióxido de carbono em colônias iniciais de *A. sexdens*, em campo e laboratório; e o desenvolvimento das mesmas. Com o estudo foi possível observar que a concentração de CO₂ e a composição dos ninhos foi maior em ninhos de *A. sexdens* de campo que de laboratório.

No quarto capítulo foi estudada a micromorfologia do solo da parede da câmara inicial de ninhos da formiga cortadeira *A. sexdens* e como o CO₂ se difunde para a matriz do solo. Com os resultados desse estudo foi possível observar que os ninhos iniciais de *A. sexdens* modificam a matriz do solo da parede de suas câmaras, de forma a auxiliar na troca do CO₂ entre a mesma e o solo adjacente.

Tais resultados obtidos neste estudo sobre o desenvolvimento inicial de *A. sexdens* fornecem informações valiosas sobre os fatores físicos e biológicos que podem influenciam no sucesso da formação do ninho inicial de formigas cortadeiras. Esse tipo de pesquisas são cruciais para ajudar a entender como fatores bióticos e abióticos que influenciam no sucesso de sobrevivência dos ninhos iniciais de formigas, são tão importantes para a sobrevivência dos mesmos, uma vez que são escassos esses estudos na literatura. Se conseguirmos entender como essa interação influencia no desenvolvimento dos ninhos iniciais, pesquisas futuras, poderão utilizar o conhecimento gerado para auxiliar no desenvolvimento de novas metodologias para estudos com formigas cortadeiras.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. S.; DELLA LÚCIA, T. M. C. Caracterização de ninhos de *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel, em povoamento de eucalipto em Paraopeba (MG). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 205–207, 1997.
- AUTUORI, M. A saúva e seu combate. **Revista Ahembi**, v. 25, n. 74, p. 18, 1957.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.–Hymenoptera–Formicidae). II. O sauveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 13, n. 7, p. 67–86, 1942.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, v. 20, n. 1, p. 1–6, 1995.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology**, v. 19, n. 3, p. 215–220, 1994.
- BOLLAZZI, M.; FORTI, L. C.; ROCES, F. Ventilation of the giant nests of *Atta* leaf-cutting ants: does underground circulating air enter the fungus chambers? **Insectes Sociaux**, v. 59, n. 4, p. 487–498, 2012.
- BOLLAZZI, M.; KRONENBITTER, J.; ROCES, F. Soil temperature, digging behaviour, and the adaptive value of nest depth in South American species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Oecologia**, v. 158, n. 1, p. 165–175, 2008.
- BOLLAZZI, M.; ROCES, F. Control of nest water losses through building behavior in leaf-cutting ants (*Acromyrmex heyeri*). **Insectes sociaux**, v. 57, n. 3, p. 267–273, 2010a.
- BOLLAZZI, M.; ROCES, F. Leaf-cutting ant workers (*Acromyrmex heyeri*) trade off nest thermoregulation for humidity control. **Journal of ethology**, v. 28, n. 2, p. 399–403, 2010b.

BOLLAZZI, M.; ROCES, F. Thermal preference for fungus culturing and brood location by workers of the thatching grass-cutting ant *Acromyrmex heyeri*. **Insectes Sociaux**, v. 49, n. 2, p. 153–157, 2002.

CAETANO, F. H.; ZARA, F. J.; JAFFÉ, K. **Formigas: biologia e anatomia**. FHC, 2002. 2002.

CAMARGO, R.; FORTI, L. C. Queen lipid content and nest growth in the leaf cutting ant (*Atta sexdens rubropilosa*) (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Natural History**, v. 47, n. 1–2, p. 65–73, 2013.

CHERRETT, J. M. History of the leaf-cutting ant problem. In: LOFGREN, C. S.; MEER, R. K. VANDER (Org.). **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder, Colorado, USA: Westview Press, 1986a. p. 10–17.

CHERRETT, J. M. **The biology, pest status and control of leaf-cutting ants**. The biology, pest status and control of leaf-cutting ants., p. 1–37, 1986b.

CHERRETT, J. M. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera, Formicidae). **The Journal of Animal Ecology**, p. 387–403, 1968.

CRISTIANO, M.P.; CARDOSO, D.C.; SANDOVAL-GÓMEZ, V.E.; SIMÕES-GOMES, F.C. *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. **Austral Entomology**, v. 59, p. 643–676, 2020.

DEJEAN, A.; OLMSTED, I.; CAMAL, J. F. Interaction between *Atta cephalotes* and arboreal ants in the Biosphere Reserve Sian Ka'an (Quintana Roo, Mexico): efficient protection of the trees (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology (USA)**, 1992.

DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras**. Sociedade de Investigadores Florestais, 1993. 262p.

FORTI, L. C. Relação entre plantas atacadas e a saúva *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae: Hymenoptera). **Boletim Grupo trabalho formigas Cortadeiras**, v. 2, p. 11–13, 1985.

GARCIA, I. P.; FORTI, L. C.; ENGEL, V. L.; ANDRADE, A. P. P.; WILCKEN, C. F. Ecological interaction between *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and the vegetation of a mesophyll semideciduous forest fragment in Botucatu, SP, Brazil. **Sociobiology**, p. 265–283, 2003.

HALLEY, J. D.; BURD, M.; WELLS, P. Excavation and architecture of Argentine ant nests. **Insectes Sociaux**, v. 52, n. 4, p. 350–356, 2005.

HEBLING, M. J. A.; PENTEADO, C. H. S.; MENDES, E. G. Respiratory regulation in workers of the leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Comparative biochemistry and physiology: A: Comparative physiology (USA)**, 1992.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Harvard University Press, 1990.

JUSTI JÚNIOR, J.; IMINES, S. L.; BREGMANN, E. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C.; ZORZENON, F. J. Formigas cortadeiras. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, v. 4, p. 5–31, 1996.

MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2034–2038, 1998.

NIELSEN, M. G.; CHRISTIAN, K. A. The mangrove ant, *Camponotus anderseni*, switches to anaerobic respiration in response to elevated CO₂ levels. **Journal of insect physiology**, v. 53, n. 5, p. 505–508, 2007.

NIELSEN, M. G.; CHRISTIAN, K.; BIRKMOSE, D. Carbon dioxide concentrations in the nests of the mud-dwelling mangrove ant *Polyrhachis sokolova* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Australian Journal of Entomology**, v. 42, n. 4, p. 357–362, 2003.

NIELSEN, M. G.; CHRISTIAN, K.; HENRIKSEN, P. G.; BIRKMOSE, D. Respiration by mangrove ants *Camponotus anderseni* during nest submersion associated with tidal inundation in Northern Australia. **Physiological Entomology**, v. 31, n. 2, p. 120–126, 2006.

OI, D. H.; PEREIRA, R. M. Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera: Formicidae). **Florida Entomologist**, p. 63–74, 1993.

OLIVEIRA, M. F. S. S. **Controle de formigas cortadeira**. 2006. 119 f. - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

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

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435–5440, 2008.

SILVA, A.; BACCI JR, M.; DE SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 4, p. 307–313, 2003.

SOLOMON, S. E.; BACCI JR, M.; MARTINS JR, J.; VINHA, G. G.; MUELLER, U. G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2738, 2008.

VASCONCELOS, H. L.; FOWLER, H. G. **Foraging and fungal substrate selection by leaf-cutting ants. Applied Myrmecology - A World Preview**. Westview Press, Boulder, CO, USA, 1990.

WEBER, N. A. Gardening ants: the attines (Memoirs of the American Philosophical Society, vol. 92. **The American Philosophical Society, Independence Square**

Philadelphia, 1972a.

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

WEBER, N. A. Weeding as a factor in fungus culture by ants. *In*: ANATOMICAL RECORD, 1957. **Anais** [...]. Wiley-Liss Div John Wiley & Sons INC, 605 Third Ave, New York, NY, 1957. p. 638.