

FATORES QUE INFLUENCIAM A SELETIVIDADE DE PLANTAS
PELA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta sexdens*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

ANÁLIA ARÊDES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2018

FATORES QUE INFLUENCIAM A SELETIVIDADE DE PLANTAS
PELA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta sexdens*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

ANÁLIA ARÊDES

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutorado em Produção Vegetal

Orientador: Prof.^a Ana Maria Matoso Viana Bailez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Abril – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A678

Aredes, Analia.

FATORES QUE INFLUENCIAM A SELETIVIDADE DE PLANTAS PELA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta sexdens* (HYMENOPTERA : FORMICIDAE) / Analia Aredes. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

63 f. : il.

Bibliografia: 59 - 63.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.
Orientadora: Ana Maria Matoso Viana Bailez.

1. Formiga-cortadeira. 2. Fungo simbiote. 3. Seletividade de plantas. 4. Aprendizagem associativa. 5. Discriminação ao odor da planta. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

FATORES QUE INFLUENCIAM A SELETIVIDADE DE PLANTAS
PELA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta sexdens*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

ANÁLIA ARÊDES

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutorado em Produção Vegetal

Aprovada em 25 de abril de 2018

Comissão Examinadora

Prof. James Montoya Lerma (Ph.D., Parasitologia Médica) - Univalle

Prof.^a Maria Cristina Canela (D.Sc., Ciências) - UENF

Prof. Omar Eduardo Bailez (Ph.D., Biologia do Comportamento) - UENF

Prof.^a Ana Maria Matoso Viana Bailez (Ph.D., Biologia do Comportamento) - UENF
(Orientadora)

*Dedico este trabalho
a minha mãe Oneida, meu pai José Nicolau,
minhas irmãs Aline, Aída, Agda e irmão Alan,
exemplos de perseverança e atitude
cujo apoio e incentivo me permitiram chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade concedida para a realização do curso;

À minha orientadora professora Ana Maria Matoso Viana Bailez pela excelente orientação, ensinamentos, amizade, confiança e profissionalismo com que conduziu este trabalho. E ao meu coorientador professor Omar Eduardo Bailez pelos ensinamentos, auxílio nos delineamentos experimentais e amizade. Agradeço-lhes por contribuírem para o meu crescimento profissional, científico e humano;

À professora Maria Cristina Canela por sua generosidade, conhecimento transmitido, sugestões, grande ajuda nas análises químicas e oportunidade concedida de estar no Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI - UENF) desenvolvendo este trabalho;

Aos integrantes da banca examinadora, professores James Montoya Lerma, Maria Cristina Canela e Omar Eduardo Bailez, pela revisão da tese;

Às professoras Daniela Barros de Oliveira Ribeiro e Karla Silva Ferreira pelas sugestões e oportunidade de desenvolver as análises nutricionais no Laboratório de Tecnologias de Alimentos (LTA - UENF);

Ao amigo Jonathan Rodriguez pela ajuda com a interpretação dos cromatogramas e realização da análise discriminante;

Ao amigo Jean Carlos Lima pela ajuda com os experimentos;

Aos colegas do LTA Larissa, Lázaro, Lorena, Juliana e Valdinéia pelo acompanhamento e auxílio durante as análises nutricionais;

Ao LCQUI pelos equipamentos de cromatografia e ao LTA pelos equipamentos utilizados nas análises nutricionais, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos do Setor de Comportamento de Insetos (LEF - UENF), Alexandre, Amanda, Arli, Fabíola Pimentel, Fabíola Endringer, Gabriela, Igor, Jean, Jonathan, Pedro, Renata e Willians pelos cuidados com os ninhos, agradável convivência, amizade e troca de conhecimentos;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ - UENF) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu esposo Bruno e meu filho Murilo por todo amor dedicado, compreensão principalmente nos momentos de ausência, apoio e incentivo, fundamentais para que eu desenvolvesse de forma centrada este trabalho;

E a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. As formigas-cortadeiras	3
2.2. Forrageamento em formigas cortadeiras	4
2.3. Seletividade na exploração do recurso vegetal pelas formigas-cortadeiras	5
2.4. Influência do fungo simbiote na seleção de plantas.....	6
3. TRABALHOS	8
3.1 SINAIS QUÍMICOS DO FUNGO SIMBIONTE INTERFEREM NA SELEÇÃO DE RECURSO POR <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	8
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	13
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	28
RESUMO E CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
3.2 INTERAÇÃO FORMIGA-FUNGO SIMBIONTE NA SELEÇÃO DE SUBSTRATO VEGETAL POR OPERÁRIAS DE <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA : FORMICIDAE)	36

RESUMO	36
ABSTRACT	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	49
RESUMO E CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
4. RESUMO E CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

RESUMO

ARÊDES, Anália, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2018. Fatores que influenciam a seletividade de plantas pela formiga-cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Orientadora: Ana Maria Viana Bailez. Coorientador: Omar Eduardo Bailez.

As formigas-cortadeiras são herbívoros dominantes da região neotropical. Estes insetos vivem em simbiose com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* para o qual coletam grande variedade de material vegetal fresco. Entretanto, apresentam comportamento seletivo em relação ao material a ser coletado. A seletividade das plantas estaria baseada nas preferências das próprias forrageadoras ou nos efeitos do recurso vegetal sobre o fungo. Este estudo tem o objetivo de verificar se o fungo simbiote participa no processo de escolha de recurso vegetal e qual seria a interação com a formiga *Atta sexdens*. Para isto, foram realizados dois trabalhos. De acordo com o primeiro trabalho, as formigas aprendem a evitar um recurso que é inadequado ao fungo. Odores de plantas usadas como recurso foram associados pelas formigas com consequências negativas produzidas pela ação de fungicidas sobre o jardim de fungo. Alterações quantitativas nos compostos voláteis emitidos pelo jardim de fungo foram associadas com alterações na preferência das forrageadoras. Desta forma, substâncias nocivas sobre o substrato forrageado pelas formigas alteram o perfil das emissões de compostos voláteis do jardim de fungo e estes foram associados pelas formigas por meio de processos de condicionamento associativo ao odor do substrato alterando a posteriori o nível de preferência pelo mesmo substrato. No

segundo trabalho, se comprovou que recursos preferidos em situações de escolha proporcionam maior crescimento do fungo simbiote. O nível de carboidrato relacionou-se positivamente com o nível de preferência das formigas e de crescimento do fungo. Extratos de *Ricinus communis* (mamona) e de *Gallesia integrifolia* (pau d'algo), inibiram significativamente o crescimento do fungo em meio de cultivo. Substâncias emitidas pelo fungo podem influenciar na escolha de recurso vegetal pela formiga-cortadeira *A. sexdens*.

ABSTRACT

ARÊDES, Anália, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2018. Factors influencing the selectivity of plants by the cutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Advisor: Ana Maria Viana Bailez. Co-advisor: Omar Eduardo Bailez.

The leaf cutter ants are dominant herbivores of the Neotropical region. These insects live in symbiosis with the fungus *Leucoagaricus gongylophorus* for which they collect a great variety of fresh plant material. However, they show selective behavior in relation to the material to be collected. The selectivity of the plants would be based on the preferences of the foragers themselves or effects of the vegetal material in the fungus. This study aims to determine if the symbiont fungus interfere in the selection of the vegetable resource by the *Atta sexdens*. For this, two works were carried out. This study aims to verify if the symbiotic fungus participates in the process of choosing plant resource and what would be the interaction with the ant *Atta sexdens*. According to the first work, the ants can learn how to avoid a resource that is inappropriate fungus. Odors of the plants used as a resource were associated with ants with negative consequences produced by the fungicide action on the fungus garden. Quantitative changes in the volatile compounds emitted by the fungus garden were associated with changes in the preference of foragers. Thus, harmful substances on the substrate foraging by the ants alter the emission profile of volatile compounds of the fungus

garden and these were associated by the ants by means of associative conditioning processes to the odor of the substrate, altering the level of preference by the same substrate. In the second study, it was verified that preferred features in situations of choice provide greater growth of the symbiotic fungus. The carbohydrate level was positively related to the ant preference level and fungus growth. Extracts of *Ricinus communis* and *Gallesia integrifolia* significantly inhibited the growth of the fungus in culture medium. Substances emitted by the fungus may influence the selection of plant resources by the *A. sexdens* cutter ant.

1. INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae), conhecidas popularmente como saúvas e quenquéns respectivamente, ocorrem exclusivamente na região Neotropical. Elas cortam material vegetal fresco e o utilizam como substrato para cultivo de seu fungo simbiote. E exploram grande variedade de espécies vegetais cultivadas, e pela intensidade das perdas que ocasionam são consideradas pragas importantes (Della Lucia, 2003).

A espécie *Atta sexdens* vive uma relação simbiótica com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. O fungo é a principal fonte de alimento para os membros da colônia (Forti e Andrade, 1999) que, em troca, fornecem material vegetal para seu desenvolvimento (Nickele et al., 2013). A manutenção do fungo simbiote depende do fornecimento de plantas adequadas selecionadas pelas operárias durante o forrageamento (Ribeiro e Marinho, 2011).

Geralmente as forrageiras não coletam uma única espécie vegetal por muito tempo (Diehl-Fleig, 1995), porque compromete o desenvolvimento do fungo (Michels et al., 2001). A diversidade de recurso proporciona um crescimento adequado do fungo (Camargo et al., 2003), portanto, a sobrevivência da colônia depende da seleção de material apropriado durante o forrageio (Camargo et al., 2004).

As necessidades nutricionais do fungo simbiote (Howard, 1988) e a presença no substrato vegetal de compostos prejudiciais ao fungo (Herz et al.,

2008) parecem influenciar a seleção de recurso. Quando um material nocivo é incorporado ao jardim de fungo, as formigas passam a evita-lo futuramente (Herz et al., 2008). É possível que este comportamento seja mediado por processos de aprendizagem que envolvem o fungo simbiote, mas, se desconhece o mecanismo e os estímulos envolvidos neste processo de comunicação entre os dois organismos (Herz et al., 2008). Ridley et al. (1996) e North et al. (1999) sugerem que as formigas detectam mudanças no fungo ou respondem a semioquímicos liberados por este.

Alguns autores (Quinlan e Cherrett, 1978; Boaretto, 2000; Noronha Júnior, 2006), sugerem que a seletividade de material estaria relacionada com a preferência da formiga pela planta e não com a adequabilidade do substrato para o crescimento do fungo simbiote. Mudd e Bateman (1979) e Lapointe et al. (1996) sugerem que o crescimento do fungo pode ser mais afetado por inibidores de crescimento presentes nas plantas do que pela proporção de nutrientes. No entanto, não foram realizadas correlações entre valor nutricional do substrato vegetal e o nível de preferência das formigas e crescimento do fungo simbiote.

Desta forma, os fatores que regem a seleção de recurso pelas formigas-cortadeiras são pouco compreendidos. É desconhecido qual é a participação do fungo simbiote no processo de seletividade de material vegetal. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar se o fungo simbiote participa no processo de escolha de recurso e qual seria a interação com a formiga *Atta sexdens*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As formigas-cortadeiras

As formigas-cortadeiras fazem parte da Tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae). Elas cultivam um fungo simbiote sobre o material vegetal fresco coletado. O fungo *Leucoagaricus gongylophorus* é cultivado no substrato dentro do ninho, onde desenvolve seu estágio vegetativo. Sua aparência esbranquiçada e esponjosa é denominada “jardim de fungo”. Nas extremidades das hifas são produzidas estruturas diferenciadas denominadas gongilídeos, que agrupadas em cachos são chamados estáfilos. Estas estruturas armazenam os carboidratos utilizados como fonte de energia pelas formigas (Silva, 2004).

As operárias mantêm no ninho as condições apropriadas para o desenvolvimento do fungo simbiote (Silva, 2004), que fornece carboidratos, proteína bruta e lipídios à colônia (Mueller et al., 2001; Mueller, 2002). O fungo é o principal alimento da colônia, mas as operárias adultas se alimentam também de seiva das plantas no momento do corte (Forti e Andrade, 1999). A manutenção do fungo depende do fornecimento de material vegetal criteriosamente selecionado pelas formigas durante o forrageio (Ribeiro e Marinho, 2011).

Formigas-cortadeiras são consideradas pragas severas de plantações e de difícil controle. Essa dificuldade no controle é atribuída às suas características biológicas e comportamentais, como a complexa organização social, a

comunicação química, a sensibilidade olfativa, a capacidade de aprendizagem, a seletividade de recurso e a produção de substâncias antibióticas (Marinho et. al., 2006).

As operárias lambem a superfície dos fragmentos vegetais antes de incorporá-los ao fungo simbiote, a fim de evitar a contaminação do fungo. Neste processo de assepsia, os microrganismos patogênicos são retirados, armazenados na cavidade infrabucal e em seguida regurgitados na câmara de lixo (Little et al., 2006). Além disso, secreções antimicrobianas provenientes de glândulas exócrinas são depositadas nos fragmentos de folha para inibirem o desenvolvimento de microrganismos (Pagnocca, 1997).

As substâncias de reconhecimento de companheiras de ninho são produzidas por glândulas e disseminadas no corpo das formigas por meio de grooming e trofalaxia. Formigas que entram em contato com compostos estranhos e nocivos à colônia podem ser discriminadas por suas companheiras de ninho. Esta capacidade de detectar moléculas tóxicas dificulta as tentativas de controle, pois os materiais podem vir a ser rejeitados posteriormente (Marinho et. al., 2006).

Entre os meios de controle utilizados contra estas formigas, os químicos se destacam pela sua eficiência, principalmente os baseados no uso de iscas com inseticida (Laranjeiro e Zanúncio, 1995). As iscas são elaboradas em base a uma mistura de substrato atrativo e o princípio ativo tóxico (Oliveira 2006). As formigas apresentam seletividade em relação ao material coletado (Oliveira et al., 2004), e portanto, nem todo material vegetal ou iscas oferecidas são transportados para o ninho (Marinho et. al., 2006).

2.2. Forrageamento em formigas cortadeiras

O forrageamento em formigas-cortadeiras consiste na busca de material vegetal, corte em fragmentos menores e transporte ao ninho (Ribeiro e Marinho, 2011). As forrageadoras se orientam até o recurso pelos sinais do ambiente como os odores de plantas. Misturas de odores percebidas pelas formigas são comparadas com informações armazenadas na memória antes de exibir a resposta de atração ou rejeição ao recurso (Hölldobler e Wilson, 1990; Burd e Howard, 2005).

O comportamento de forrageio é um mecanismo complexo, que engloba decisões individuais e coletivas (Roces e Hölldobler, 1994), além de ser altamente flexível (Dussutour et al., 2009). De acordo com Silva et al., (2013), algumas espécies de formigas-cortadeiras são capazes de gerar redes de trilhas flexíveis que lhes permitem modular o recrutamento quando surgem novos recursos mais palatáveis. Esta flexibilidade permite ajustar rapidamente a estratégia de forrageamento de acordo com as mudanças que ocorrem no ambiente (Silva et al., 2013, Dussutour et al., 2009).

As forrageiras geralmente não forrageiam por muito tempo uma única espécie vegetal mesmo sendo muito atrativas (Diehl-Fleig, 1995). A diversidade de plantas exploradas proporciona desenvolvimento adequado do fungo simbiote (Camargo et al., 2003). Segundo Michels et al. (2001), o desenvolvimento do fungo é inibido quando o substrato é proveniente de apenas uma espécie de planta. A sobrevivência da colônia depende da diversidade quanto ao material forrageado (Camargo et al., 2004).

2.3. Seletividade na exploração do recurso vegetal pelas formigas-cortadeiras

A seletividade de plantas pelas operárias pode ser causada pela presença de barreiras físicas e químicas das mesmas (Cherrett, 1972), pelos metabólitos secundários (Hubbel et al., 1984; Howard 1987, 1988), pelas necessidades nutricionais do fungo simbiote (Howard, 1988) ou pelos compostos prejudiciais a este presentes no vegetal (Herz et al., 2008).

O teor de umidade das folhas é um dos fatores que influencia a preferência. As cortadeiras têm preferência por plantas com baixo teor de umidade, devido à maior concentração de nutrientes e à redução de substâncias repelentes (Vasconcelos e Cherrett, 1996). No entanto, o comportamento de escolha é provavelmente influenciado por características físicas e químicas e não apenas por um único fator isolado (Cherrett, 1972).

As defesas físicas das plantas são fatores importantes a serem considerados (Hubbell et al., 1984, Howard 1987). Tricomas podem interferir na

antenação das formigas e dificultar a obtenção de informações sobre o vegetal (Howard, 1988). Formigas geralmente selecionam folhas menos resistentes ao corte (Howard, 1988; Cherrett 1972).

Dentre as propriedades químicas das plantas a qualidade nutricional, a presença de látex, compostos secundários tóxicos ou repelentes e substâncias atrativas podem influenciar a seleção das mesmas (Hubbell et al. 1984, Howard 1987). Terpenoides e taninos são evitados pelas cortadeiras (Howard et al. 1989, Sugayama e Salatino 1997). As formigas podem evitar plantas impalatáveis, mesmo quando estas contêm boa qualidade nutricional para o crescimento do fungo (Hubbell et al., 1984). É mais comum encontrar nas plantas substâncias repelentes para as forrageadoras que substâncias atrativas (Hubbell et al., 1984). Para Silva et al. (2003), os carboidratos são atrativos às forrageadoras, devido à sua importância nutricional que aumentaria a sobrevivência desses insetos.

2.4. Influência do fungo simbiote na seleção de plantas

A seletividade de material pelas formigas parece estar mais relacionada com a preferência da formiga à planta do que com o crescimento do fungo simbiote (Quinlan e Cherrett, 1978; Boaretto, 2000; Noronha Júnior, 2006). Todavia, Ridley et al.(1996) , North et al. (1999) e Herz et al., (2008), observaram que as formigas percebem e rejeitam substratos que prejudicam o fungo simbiote. Segundo North et al. (1997), o fungo simbiote poderia selecionar seu substrato controlando o forrageamento das formigas por meio de substâncias químicas. Com isso, as formigas evitariam cortar plantas com substâncias antifúngicas, mesmo não sendo tóxicas para elas (Hubbell et al., 1984, Sugayama e Salatino 1997).

A escolha do recurso pode ocorrer em dois momentos, antes ou após o carregamento do substrato para o ninho (Verza et al., 2006). A rejeição do material antes de ser transportado ao ninho pode envolver palatabilidade e barreiras de defesa da planta. A rejeição depois de transportado ao ninho, ou rejeição tardia, é acompanhada de um prejuízo ao fungo e estaria mediada pela ação do mesmo (Herz et al., 2008). Herz et al. (2008) consideram que algumas mudanças no jardim de fungo seriam responsáveis pela indução da rejeição

tardia, através de aprendizagem associativa por aversão. Os autores Ridley et al. (1996) e North et al. (1999) sugerem que as formigas detectariam diretamente essas mudanças ou responderiam a semioquímicos liberados pelo fungo.

Na rejeição tardia, os substratos considerados inadequados ao fungo são removidos e transportados pelas operárias para fora do ninho. As operárias inicialmente aceitam estes materiais, mas, posteriormente, não são incorporados ao fungo (Herz et al., 2008). Ainda não é conhecido qual estímulo indica a inadequação de um substrato (Herz et al., 2008). Segundo North et al., (1999), a informação pode ser obtida no contato direto das forrageiras com o fungo ou com as operárias jardineiras (que processam diretamente o substrato).

Em ambientes diversos e variáveis é vantajoso para uma colônia ser capaz de evitar plantas com substâncias tóxicas ao fungo e não somente as forrageadoras que tomam a decisão no local de corte (Herz et al., 2008).

3. TRABALHOS

3.1 SINAIS QUÍMICOS DO FUNGO SIMBIONTE INTERFEREM NA SELEÇÃO DE RECURSO POR *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

RESUMO

As formigas cortadeiras são herbívoros dominantes da região neotropical. Estes insetos são polívoros, mas utilizam plantas específicas para servir de substrato ao fungo simbiote. A seletividade de plantas estaria baseada na preferência das próprias forrageadoras ou nos efeitos que o recurso vegetal provoca sobre o fungo. Este trabalho tem como objetivo verificar se o fungo simbiote participa no processo de escolha de recurso vegetal e qual seria a interação com a formiga *Atta sexdens*. Testes de escolha foram realizados em 24 subcolônias constituídas com operárias, larvas, pupas e fungo, utilizando quatro colônias de *A. sexdens*, de criação em laboratório. Foi verificada a ausência de preferência das operárias por dois recursos vegetais: *Rosa alba* L. ou *Ligustrum japonicum*. Foram condicionadas 12 subcolônias com folhas de *R. alba* e as outras 12 subcolônias com folhas *L. japonicum*, ambas espécies impregnadas com o fungicida cicloheximida. Após 24h lhes foram oferecidas folhas de *R. alba*

ou *L. japonicum*, sem fungicida, e as formigas mostraram preferência pelas folhas da planta que não foram previamente associadas ao fungicida. Em outro teste de escolha, as operárias não discriminaram os fragmentos vegetais (de *R. alba* ou *L. japonicum*) impregnados com fungicida dos fragmentos sem fungicida. Foi verificado que as formigas discriminaram o odor (extrato) da planta (*R. alba* ou *L. japonicum*) após condicionamento associativo com material vegetal inadequado ao fungo. Em um último experimento, voláteis do jardim de fungo foram capturados de três subcolônias alimentadas com folhas de *R. alba* impregnadas com ciclohexamida e de três subcolônias alimentadas com folhas da mesma espécie, mas sem fungicida. Os compostos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GCMS), e verificou-se que alguns compostos voláteis do jardim de fungo tiveram modificada sua importância relativa após a inoculação de fragmentos com fungicida. Alterações na produção de voláteis do fungo poderiam explicar as alterações na preferência das forrageadoras. Desta forma, substâncias inadequadas contidas no substrato forrageado pelas formigas podem alterar as emissões de compostos voláteis do jardim de fungo que seriam associadas pelas formigas ao odor do substrato forrageado para modificar seu comportamento forrageador após processos de condicionamento associativo.

ABSTRACT

The leaf cutter ants are dominant herbivores of the Neotropical region. These insects are polyphagous, but they use specific plants that serve as a substrate for the symbiotic fungus. The selectivity of the plants would be based on the preferences of the foragers themselves or in the effects of the vegetal resource on the fungus. This work aims to verify if the symbiotic fungus participates in the process of choosing plant resource and what would be the interaction with the ant *Atta sexdens*. Selection tests were carried using four laboratory colonies of *A. sexdens*, 24 queenless colonies with workers, larvae, pupae and fungi. We verified the lack of preference of the workers for two vegetal resources: *Rosa alba* L. or

Ligustrum japonicum. We conditioned 12 subcolonies with leaves of *R. alba* and the other 12 subcolonies with leaves of *L. japonicum*, both species impregnated with the fungicide cycloheximide. After 24 h were offered leaves of *R. alba* or *L. japonicum*, without fungicide, and the ants showed preference for leaves of the plant that were not previously associated with the fungicide. In another test of choice, workers did not discriminate plant fragments (from *R. alba* or *L. japonicum*) impregnated with fungicide from fragments without fungicide. We verified that the ants discriminated the odor (extract) of the plant (*R. alba* or *L. japonicum*) after associative conditioning with vegetal material unsuitable for the fungus. In a last experiment, volatiles from the fungus garden were captured from three subcolonies fed *R. alba* leaves impregnated with cyclohexamide and from three subcolonies fed leaves of the same species, but without fungicide. The compounds were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GCMS), was verified that some volatile compounds of the fungus garden had their relative importance modified after the inoculation of fragments with fungicide. Changes in volatile fungus production could explain changes in forager preference. In this way, inappropriate substances contained in the substrate foraging by the ants can alter the emissions of volatile compounds of the fungus garden that would be associated by the ants to the odor of the forage substrate to modify their foraging behavior after associative conditioning processes.

INTRODUÇÃO

Os animais buscam recurso alimentar por meio de um comportamento denominado forrageio. Cada animal possui uma capacidade sensorial para localizar o alimento, por meio de pistas sonoras, visuais, olfativas ou químicas (Alcock, 2011). Esta procura pode ser feita individualmente, para usufruir individualmente o recurso encontrado, ou em grupo quando o indivíduo depende dos companheiros quanto a transferência de informação sobre localização do alimento (Azevedo, 2009). Insetos sociais como abelhas, formigas, vespas e

cupins desenvolveram métodos sofisticados para transferir esse tipo de informação.

As abelhas da espécie *Apis mellifera* informam suas companheiras sobre a localização da fonte alimentar mediante um complexo sistema de transmissão de informação denominado “dança das abelhas” (von Frisch, 1967). As formigas formam trilhas para orientar suas companheiras ao recurso. Após encontrar um recurso, a formiga exploradora retorna à colônia depositando substâncias químicas (ferômonio de trilha) que servem de orientação às operárias recrutadas até a fonte alimentar (Wilson 1962; Viana-Bailez et al., 2011).

O recurso alimentar coletado pelas abelhas é utilizado na sua própria alimentação e dos outros membros da colônia (Camazine, 1993). Nas formigas cortadeiras de folhas *Atta sexdens*, o recurso serve de substrato para o fungo simbiote, que fornecerá alimento para todos os membros da colônia (Forti e Andrade, 1999). Nesta relação mutualística, as formigas se beneficiam com o alimento fornecido pelo fungo, e este se beneficia com o material vegetal fornecido pelas formigas que serve para seu crescimento, e com a proteção contra outros micro-organismos efetuada pelas formigas (Nickele et al., 2013).

As formigas-cortadeiras, de modo geral, se orientam até o recurso por meio de sinais do ambiente como os odores de plantas que servem como critério decisivo para explorar ou não uma planta. Misturas de odores de um vegetal são comparadas com informações da memória antes de responder se dirigindo ou se afastando de um recurso (Hölldobler e Wilson, 1990; Burd e Howard, 2005). Barreiras físicas nas plantas (Cherret, 1972), metabólitos secundários defensivos (Hubbel et al., 1884; Howard 1987, 1988), nutrientes específicos requeridos pelo fungo simbiote (Howard, 1988) ou compostos nocivos a este (Herz et a., 2008) são outros fatores que irão determinar a escolha ou não de um recurso.

A escolha de um recurso vegetal pode ocorrer antes ou após o carregamento do substrato (Verza et al., 2007). A rejeição de material antes de ser introduzido no ninho requer que a planta seja reconhecida pelas operárias forrageadoras. A rejeição depois de introduzida no ninho ou tardia, envolve reação do fungo simbiote a esse substrato e consiste no transporte do substrato para o exterior do ninho e estaria mediado por alguma resposta do fungo. Alterações no fungo ocorridas após a incorporação de substratos nocivos

poderiam provocar o comportamento de rejeição das operárias mas, são pouco compreendidas (Herz et al., 2008).

O comportamento de forrageamento envolve aprendizagem, memorização, navegação e comunicação (Nominato, 2015). Uma forma de aprendizado relativamente simples que é observada em muitas espécies de animais vertebrados e invertebrados, é a aprendizagem associativa (Souza, 2012; Sobol, 2015). Aprendizagem associativa pode ocorrer por meio de condicionamento clássico ou operante. No condicionamento clássico ou Pavloviano o indivíduo associa um estímulo condicional (estímulo inócuo que sozinho não provoca resposta) a um estímulo incondicional que provoca uma resposta comportamental determinada após a apresentação sucessiva desses dois estímulos juntos (Desmedt et al., 2017). *Camponotus aethiops*, após ter suas antenas estimuladas com solução de sacarose estende seu aparelho bucal para absorver o líquido. Se um odor frutal é apresentado simultaneamente, as formigas associam esse cheiro com a recompensa da solução de sacarose e estendem o aparelho bucal após a simples apresentação do odor, enquanto que formigas não submetidas a esse condicionamento não apresentam esta resposta (Guerrieri e d'Ettorre, 2010).

No condicionamento operante, o animal associa um ato comportamental à determinada consequência, positiva (recompensa) ou negativa (punição). A probabilidade de ocorrência do ato comportamental pode ser aumentada ou diminuída por meio de recompensa ou punições, respectivamente (Souza, 2012). Mamíferos com dietas generalistas como o rato da Noruega e algumas espécies de morcegos aprendem a evitar alimentos que lhes causam desconforto intestinal (Alcock, 2011). Desta forma, os animais podem prever a ocorrência de eventos futuros se baseando na experiência adquirida e suas consequências após a manifestação de seu próprio comportamento (Souza, 2012).

As formigas-cortadeiras não são diretamente recompensadas ou punidas após a coleta de um recurso forrageiro determinado porque o recurso destina-se ao desenvolvimento do fungo simbiote. Devido a esta íntima relação entre organismos mutualísticos, pode-se esperar que o fungo exerça influência na escolha do recurso. Entretanto, se desconhece como o fungo pode atuar nos mecanismos que determinam a aceitação ou rejeição do recurso. Nossa hipótese

é que sinais químicos emitidos pelo fungo atuariam para transmitir informação sobre a qualidade do recurso.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação de subcolônias

Quatro colônias de *A. sexdens* foram coletadas no Município de São Francisco de Itabapoana, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Com cada colônia foram formadas 6 subcolônias que continham operárias, larvas, pupas e fungo simbiote. Depois de estabelecidas, as subcolônias apresentaram características comportamentais similares a uma colônia (Loeck 1991, 1994; Jaccoud et al., 1999).

Cada subcolônia foi preparada com aproximadamente 50 g de fungo, 800 operárias e 200 larvas e pupas, que foram acondicionadas em recipiente plástico de 500 mL com um orifício de saída que serviu de ninho. Cada ninho foi colocado no interior de uma bandeja plástica (46 x 28 x 12 cm) utilizada como arena de forrageamento. Um recipiente plástico de 50 mL serviu de câmara de lixo na mesma arena. As 24 subcolônias foram mantidas em salas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade $80 \pm 10\%$. Diariamente lhes foram oferecidas folhas de *Acalypha wilkesiana* como recurso vegetal para desenvolvimento do fungo.

Testes preliminares:

1. *Toxicidade do cicloheximida às operárias*

Dez caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) foram forradas no fundo com papel filtro. Em cinco caixas o papel foi umedecido com 1 mL de solução aquosa 0,02% de cicloheximida (Sigma®) e nas outras cinco com 1 mL água destilada. Esperou-se o papel secar por cerca de uma hora. Em seguida, foram colocados sobre o papel um tubo de ensaio (6 mL) com água destilada tampado com algodão e uma

lâmina com uma gota (10 μ L) de solução de sacarose a 10 %. A manutenção da sacarose foi feita diariamente com auxílio de uma pipeta. Em cada caixa foram colocadas 20 operárias forrageadoras. Após 7 dias, o número de formigas mortas foi quantificado e um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (SigmaPlot 12.5) foi realizado.

2. *Preferência por diferentes formatos de fragmentos vegetais*

Fragmentos circulares (feitos com furador) e quadrados (feitos com cortador de legumes) foram feitos a partir de folhas de acalifa (*Acalypha wilkesiana*), ambos com 20 mm², e foram colocados separadamente em duas placas de Petri ($\varnothing = 3,5$ cm). Na arena de forrageamento de cada uma das subcolônias foram colocadas uma placa contendo 20 fragmentos de folhas de formato circular e a outra 20 de quadrado. O número de fragmentos de cada formato transportado para a câmara do fungo foi quantificado duas horas depois ou até que todo o material vegetal de uma das placas fosse transportado. Em seguida, os dados foram analisados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Experimento 1: Teste de preferência

Fragmentos circulares feitos com furador ($\varnothing = 5$ mm) a partir de folhas de rosa (*Rosa alba L.*) e ligustrum (*Ligustrum japonicum*) foram colocados separadamente em duas placas de Petri ($\varnothing = 3,5$ cm). Na arena de forrageamento de cada uma das subcolônias foram colocadas uma placa contendo 20 fragmentos de folhas de rosa e a outra 20 de ligustrum. O número de fragmentos de cada espécie de planta transportado para a câmara do fungo foi quantificado duas horas depois ou até que todo o material vegetal de uma das placas fosse transportado. O teste foi realizado no período vespertino entre 15 e 18 horas. O tempo até que todos os fragmentos de uma das placas fossem coletados foi registrado. Os dados foram submetidos a testes de homogeneidade de variância e normalidade dos erros (Shapiro-Wilk) em 5% de probabilidade e quando estes pressupostos não foram cumpridos, as variáveis foram analisadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (SigmaPlot 12.5).

Experimento 2: Condicionamento com folhas de rosa ou ligustrum

Durante cinco dias, doze subcolônias receberam diariamente folhas de rosa (*Rosa alba L.*) e outras doze receberam folhas de ligustrum (*Ligustrum japonicum*) no centro da arena de forrageamento. No sexto dia, foi oferecido às formigas de cada grupo de subcolônias (condicionadas com folhas de rosa ou condicionadas com folhas de ligustrum) 20 fragmentos de folhas de rosa em uma placa de Petri ($\varnothing=3,5\text{cm}$) e 20 fragmentos de folhas de ligustrum em outra, no centro da arena, distanciadas de 5 cm uma da outra. O número de fragmentos de cada espécie vegetal transportados pelas operárias até o jardim de fungo foi registrado durante 2h ou até que todo o material vegetal de uma das placas foi transportado. Os dados foram analisados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Experimento 3. Condicionamento aversivo

1ª Fase: Condicionamento

Doze subcolônias receberam, cada uma, 40 fragmentos de rosa no centro da arena de forrageamento e outras doze receberam 40 fragmentos de ligustrum. Todos os fragmentos foram impregnados com 1 μL /fragmento de solução aquosa 0,02% de cicloheximida (Sigma®), duas horas antes de introduzido na arena de forrageamento no interior de uma placa de Petri ($\varnothing = 9$ cm). A cicloheximida é um produto nocivo para o fungo mas, indetectável e inócuo às formigas (Ridley et al., 1996; Herz et al., 2008).

2ª Fase: Teste de discriminação de recurso associado a um efeito nocivo ao fungo

Após 24h de condicionadas foi oferecido às formigas de cada grupo de subcolônias (condicionadas com fragmentos de rosa + fungicida ou condicionadas com fragmentos de ligustrum + fungicida) 20 fragmentos de folhas de ligustrum em uma placa de Petri ($\varnothing=3,5\text{cm}$) e 20 fragmentos de folhas de rosa em outra, no centro da arena, distanciadas 5 cm uma da outra. Nenhum dos fragmentos foi impregnado com fungicida. O número de fragmentos transportados de cada espécie pelas operárias até o jardim de fungo foi registrado durante 2h ou até que

todo o material vegetal de uma das placas fosse transportado. Os fragmentos rejeitados tardiamente sobre a tampa da câmara de fungo, na lixeira ou na arena de forrageamento foram também contabilizados. O número de fragmentos transportados pelas operárias de cada grupo de subcolônias e o número de fragmentos rejeitados foram analisados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Experimento 4. Capacidade das formigas de detectar o fungicida

As doze subcolônias, as quais lhes foram oferecidas 7 dias antes folhas de rosa impregnadas com fungicida, receberam na arena de forrageamento 20 fragmentos de folhas de rosa impregnados com solução aquosa 0,02% de cicloheximida (1 μ L/fragmento) e outros 20 fragmentos impregnados com água destilada (1 μ L/fragmento). Duas placas de Petri ($\varnothing=3,5$ cm) foram posicionadas no centro da arena de forrageamento.

A identificação dos fragmentos do tratamento e do controle foi feita pelo observador em base ao diferenciado formato dos fragmentos (circular e quadrado) mas, ambos de 20 mm².

O número de fragmentos transportados ao ninho do tratamento e do controle rejeitados foi quantificado quando todo o material de uma das placas foi transportado ou duas horas após o início do teste.

O mesmo experimento foi realizado com as subcolônias condicionadas previamente com folhas de ligustrum impregnadas com cicloheximida. Neste caso, as opções oferecidas às forrageadoras foram 20 fragmentos de folhas de ligustrum impregnados com cicloheximida 0,02% (1 μ L/fragmento) vs 20 fragmentos impregnados com água destilada (1 μ L/fragmento). Os dados foram analisados mediante Kruskal-Wallis.

Experimento 5. Discriminação ao odor da planta

O material vegetal fresco junto com solvente foi adicionado no interior de um béquer (250 mL), macerado com bastão de vidro, e posteriormente o extrato resultante foi filtrado com papel filtro e utilizado imediatamente nos testes.

Extratos de folhas de rosa e ligustrum foram preparados separadamente com água ou pentano (Tedia®) na proporção de 8%.

5.1 Alteração de preferência mediante extratos de planta

Doze subcolônias condicionadas 14 dias antes com folhas de rosa impregnadas com fungicida receberam na arena de forrageamento 20 fragmentos de ligustrum impregnados com extrato aquoso de rosa ($1 \mu\text{L}$ /fragmento) e outros 20 com água destilada ($1 \mu\text{L}$ /fragmento). Os fragmentos de folhas foram cortados nas formas de círculo e quadrado (ambos com 20 mm^2). O número de fragmentos transportados pelas operárias até a câmara de fungo foi quantificado 2h após o início do teste ou quando todo o material de uma das placas foi transportado.

Um experimento similar foi feito com 12 subcolônias condicionadas 14 dias antes com folhas de ligustrum impregnadas com fungicida. Entretanto, a estas subcolônias foram oferecidos na arena de forrageamento 20 fragmentos de rosa impregnados com extrato aquoso de ligustrum ($1 \mu\text{L}$ /fragmento) e 20 com água destilada ($1 \mu\text{L}$ /fragmento).

5.2 Verificação de aprendizagem olfativa

Fragmentos feitos de papel filtro (20 mm^2) impregnados com $1 \mu\text{L}$ de extrato aquoso de folhas de rosa ou com $1 \mu\text{L}$ de extrato aquoso de ligustrum foram oferecidos separadamente em números de 20 em duas placas de Petri a cada uma das 24 subcolônias na arena de forrageamento. O teste foi realizado 21 dias após o condicionamento com material vegetal impregnado com fungicida. O número de fragmentos transportados pelas operárias até a câmara de fungo foi quantificado 2h após o início do teste ou quando todo o material de uma das placas foi transportado.

Um teste de idêntico procedimento foi realizado utilizando extratos feitos com solvente pentano 28 dias após o condicionamento aversivo.

Análise estatística: Os dados obtidos nos três testes deste experimento foram comparados mediante o teste de Kruskal-Wallis.

6. Análise química de extratos fúngicos

Preparação das amostras

a) Extração por solvente: Seis subcolônias foram elaboradas com aproximadamente 800 operárias, 200 larvas e pupas e 60 g de jardim de fungo, e acondicionados em um recipiente plástico de 1000 mL. Cada ninho foi colocado no interior de uma bandeja plástica (46 x 28 x 12 cm) que funcionou como arena de forrageamento, onde receberam folhas de rosa diariamente por cinco dias.

Foi retirado de cada uma das 6 subcolônias 3 amostras de fungo de 200 mg e introduzidas cada uma em um tubo vials de 5 mL. Adicionou-se 3 mL do solvente hexano (Tedia®) a cada tubo e foram armazenados a ± 4 °C durante dois dias.

Posteriormente três subcolônias receberam 40 fragmentos circulares de folhas de rosa (\varnothing 5 mm) impregnados com solução aquosa de cicloheximida a 0,02% (1 μ L/fragmento). As outras três subcolônias receberam 40 fragmentos de folhas de rosa impregnadas com água destilada (1 μ L/fragmento). Após 48h foi retirado de cada subcolônia três novas amostras de fungo (200 mg), adicionou-se junto a 3 mL de hexano em um tubo vials de 5 mL e permaneceu armazenado a ± 4 °C durante dois dias.

Após o período de repouso os tubos com fungo foram colocados em banho ultrassônico (Kondortech®) por 10 minutos para facilitar a extração dos compostos químicos das amostras. O sobrenadante de cada amostra triplicata juntou-se em outro tubo vials, e foram secos em gás argônio (Ar). Posteriormente adicionou-se 90 μ L de hexano e 10 μ L de solução padrão de eicosana diluída em hexano, na concentração de 1100 ng/ μ L. Cada amostra foi logo injetada em um volume de 1 μ L no Cromatógrafo a Gás modelo GC-17A acoplado a Espectrômetro de Massas modelo GCMS-QP5050A (Shimadzu®).

b) Captura de voláteis por meio de resinas: No interior de cada câmara de fungo colocou-se um frasco plástico (\varnothing 5 cm) contendo 1 g de Ambierlite XAD 4 e um tubo de vidro preenchido com 150 mg de Tenax® TA (Supelco®). Após 48 horas a amostra de XAD foi transferida para tubo de ensaio de 10 mL, adicionou-se 5 mL de acetato de etila (Tedia®) e foi mantido durante 10 minutos em banho ultrassônico (Kondortech®). O sobrenadante foi posteriormente transferido para

outro tubo, o líquido foi evaporado sob gás argônio até obter um volume concentrado de 500 μL , e 1 μL e injetado no cromatógrafo. A análise química do conteúdo de voláteis dos tubos de Tenax® TA foi feita por dessorção térmica, conectando-os diretamente ao aparelho. Os voláteis capturados em resina, foram analisados em Cromatógrafo a Gás modelo GC-2010, Espectrômetro de Massas modelo GCMS-QP2010 Plus e Sistema de Dessorção Térmica modelo TD-20 (Shimadzu®).

As condições da análise cromatográfica foram: Coluna DB-5 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 μm de espessura do filme; hélio (He) como gás de arraste; ionização por impacto de elétrons (IE) 70 eV e obtenção do fragmentograma de íons totais (TIC). Os extratos à base de hexano foram submetidos a uma pressão interna da coluna de 100 kPa; fluxo de gás na coluna 1,5 mL/min; temperatura inicial da coluna: 80°C (1 min), temperatura final da coluna 280°C (10 min); temperatura do injetor 280°C; temperatura do detector 280°C. Já os voláteis capturados em resina, foram submetidos à pressão interna da coluna de 95 kPa; fluxo de gás na coluna 1,62 mL/min; temperatura inicial da coluna: 48°C (5 min), temperatura final da coluna 230°C (5 min); temperatura do injetor 200°C; temperatura do detector 300°C.

A identificação dos compostos foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados (NIST05, NIST05s, NIST21 e NIST107) do sistema GCMS Solution 4.20. A abundância relativa de cada composto identificado foi mensurada com base na área do pico. Para comparar os perfis químicos dos extratos, as proporções dos hidrocarbonetos foram transformadas pela função arco-seno da raiz quadrada e submetidas à Análise Discriminante (Statistica 12. 0).

RESULTADOS

Testes preliminares:

1. Toxicidade do cicloheximida às operárias

A mortalidade das operárias que tiveram contato com o papel impregnado com cicloheximida foi de 27% ± 1,8, enquanto que, para as forrageadoras que ficaram em contato com papel umidecido com água foi de 28% ± 2,9, este resultado não demonstrou diferença estatística ($H_{(0,05; 1)} = 0,103$; $P = 0,841$).

2. Preferência por diferentes formatos de fragmentos vegetais

As operárias transportaram 91% ± 0,6 dos fragmentos de acalifa em formato de quadrado e 84% ± 1,4 de fragmentos na forma de círculo, não evidenciaram preferência por nenhum dos formatos de fragmentos ($H_{(0,05; 1)} = 0,0252$; $P = 0,874$).

Experimento 1: Teste de preferência

As operárias transportaram 72% ± 6,7 dos fragmentos de folha de rosa e 90% ± 2,5 de folha de ligustrum mas, não evidenciaram preferência por nenhuma das plantas ($H_{(0,05; 1)} = 1,722$; $P = 0,189$).

Experimento 2: Condicionamento com folhas de rosa ou ligustrum

As forrageadoras que receberam folhas de rosa durante cinco dias, não evidenciaram preferência por nenhuma das plantas. Coletaram 78% ± 9,1 de fragmentos de folha de rosa e 82% ± 7,9 de ligustrum ($H_{(0,05; 1)} = 0,308$; $P = 0,579$). Resultado similar ocorreu com as operárias que receberam folhas de ligustrum, coletaram 81% ± 7,3 dos fragmentos de folhas de rosa e 82% ± 8,1 de fragmentos de folhas de ligustrum ($H_{(0,05; 1)} = 0,215$; $P = 0,643$).

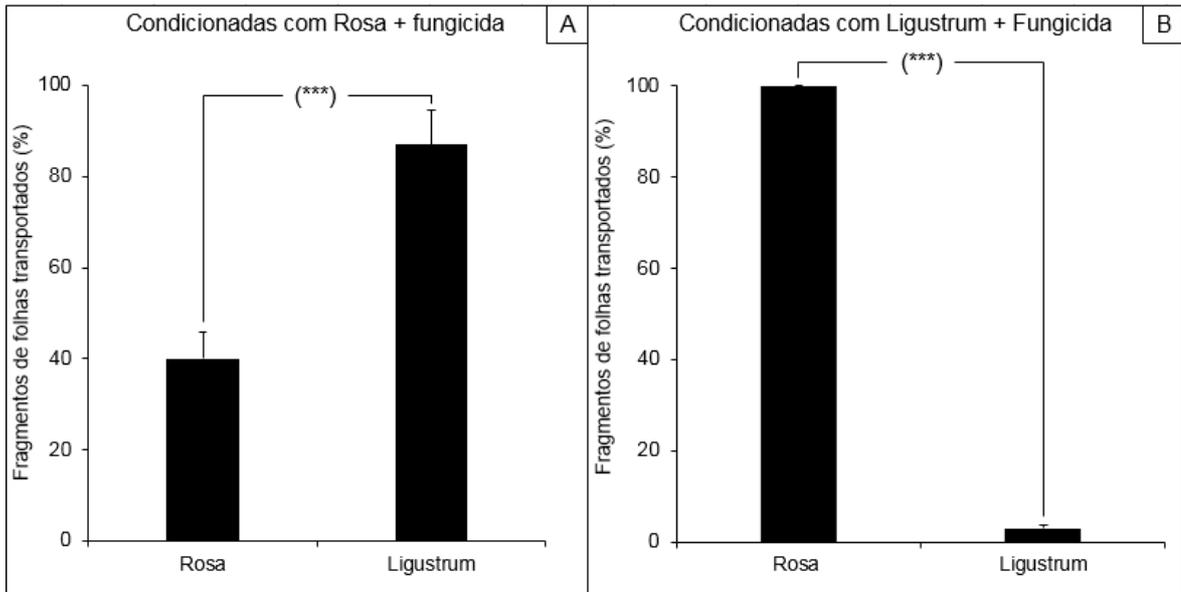


Figura 1. Porcentagem de fragmentos de folhas de rosa (*R. alba*) e ligustrum (*L. japonicum*) transportados ao ninho por operárias de *A. sexdens*: A) Condicionados 24h antes com folhas de rosa impregnadas com fungicida; B) Condicionados 24h antes com folhas de ligustrum impregnadas com fungicida. (Teste de Kruskal-Wallis, ***: diferença significativa $p < 0,001$).

Experimento 3. Condicionamento aversivo

1ª Fase: Condicionamento

A totalidade de fragmentos impregnados com o fungicida foi transportada para dentro da câmara do jardim de fungo em menos de 30 minutos. Não houve rejeição nas primeiras 24 horas e o material foi incorporado ao fungo simbiote.

2ª Fase: Teste de discriminação de recurso associado a um efeito nocivo ao fungo

As forrageadoras que receberam fragmentos de folhas de rosa com fungicida na fase de condicionamento coletaram mais fragmentos de ligustrum que rosa (87% vs 40%, $H_{(0,05; 1)} = 10,494$; $P < 0,001$) (Fig. 1A). Após 2h de transportados 42% dos fragmentos de folhas de rosa foram rejeitados, enquanto que, não houve rejeição de fragmentos de folhas de ligustrum ($H_{(0,05; 1)} = 9,119$; $P = 0,003$).

As operárias condicionadas com folhas de ligustrum e fungicida coletaram 100% dos fragmentos de folhas de rosa, enquanto que, apenas 3% de fragmentos de folhas de ligustrum foram transportados ($H_{(0,05; 1)} = 20,508$; $P < 0,001$) (Fig. 1B). Após 2h, houve 100% de rejeição dos fragmentos de ligustrum, enquanto que, não ocorreu rejeição de folhas de rosa ($H_{(0,05; 1)} = 9,471$; $P = 0,002$).

Experimento 4. Capacidade das formigas de detectar o fungicida

Depois de condicionadas com fragmentos de rosa ou ligustrum junto ao fungicida, as operárias não mostraram capacidade de discriminação de fragmentos de folhas com ou sem fungicida. Tanto as subcolônias condicionadas com folhas de rosa e fungicida (Fig. 2A) quanto aquelas tratadas com folhas de ligustrum e fungicida (Fig. 2B). Forragearam em quantidades similares fragmentos da mesma folha com ou sem fungicida ($H_{(0,05; 1)} = 1,486$; $P = 0,223$; $H_{(0,05; 1)} = 0,980$; $P = 0,322$, respectivamente).

Rejeição de material coletado de folhas tratadas com fungicida ou água foi observada sobre a câmara de fungo após 2h de teste. Subcolônias condicionadas com folhas de rosa e fungicida rejeitaram $33\% \pm 6,9$ dos fragmentos de rosa com fungicida que haviam sido coletados anteriormente e $18\% \pm 2,7$ daqueles impregnados com água ($H_{(0,05; 1)} = 1,213$; $P = 0,271$). As subcolônias condicionadas com folhas de ligustrum mais fungicida rejeitaram $38\% \pm 7,3$ dos fragmentos de folhas de ligustrum com fungicida e $37\% \pm 4,2$ daquelas impregnadas com água ($H_{(0,05; 1)} = 0,0455$; $P = 0,831$).

Experimento 5. Discriminação ao odor da planta

5.1 Alteração de preferência mediante extratos de planta

As operárias das subcolônias condicionadas com folhas de rosa e fungicida transportaram mais fragmentos de folha impregnados com água que aqueles impregnados com extrato de folha de rosa ($H_{(0,05; 1)} = 19,744$; $P < 0,001$) (Fig. 3A). Nas subcolônias tratadas com folhas de ligustrum e fungicida as operárias também transportaram menos fragmentos com extrato da planta

utilizada no tratamento com fungicida, ou seja, ligustrum ($H_{(0,05; 1)} = 16,107$; $P < 0,001$) (Fig. 3B).

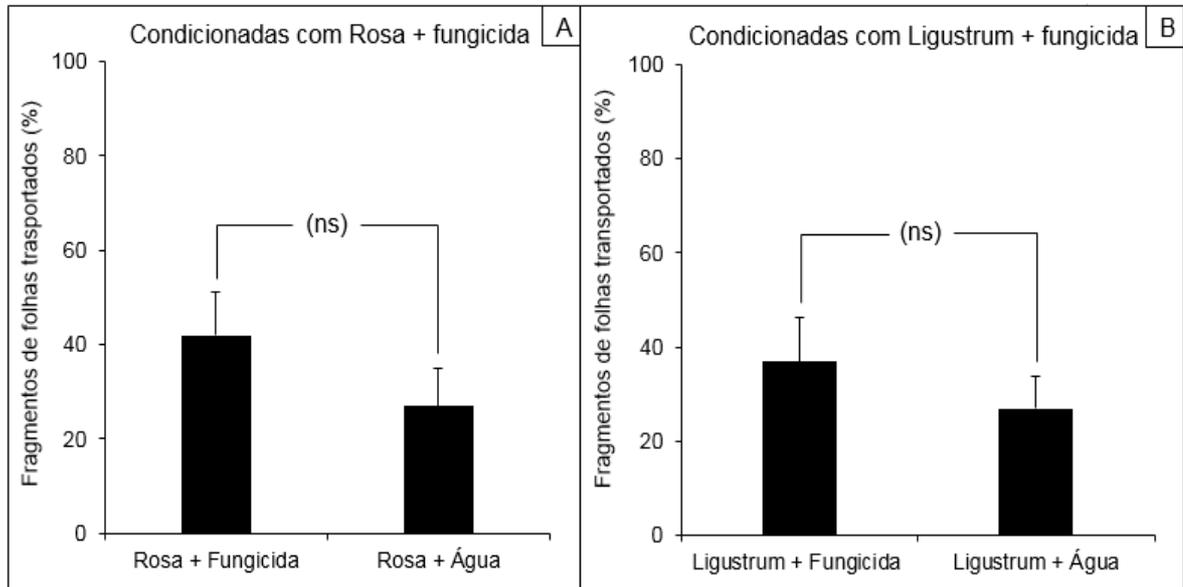


Figura 2. Porcentagem de fragmentos de folhas de rosa (*R. alba*) e ligustrum (*L. japonicum*) transportados por operárias de *A. sexdens* ao ninho após sete dias de serem condicionadas com folhas + fungicida. A) Subcolônias condicionadas com folhas de rosa impregnadas + fungicida; B) Subcolônias condicionadas com folhas de ligustrum + fungicida. (Teste de Kruskal-Wallis, ns: diferença não significativa).

5.2 Verificação de aprendizagem olfativa

a) Testes com extrato aquoso

As subcolônias tratadas com fragmentos de rosa e fungicida coletaram mais fragmentos de papel filtro impregnado com extrato aquoso ligustrum que aqueles impregnados com extrato aquoso de folhas de rosa ($H_{(0,05; 1)} = 15,132$; $P < 0,001$) (Fig. 4A). Inversamente as subcolônias condicionadas com folhas de ligustrum e fungicida coletaram mais fragmentos impregnados com extrato de rosa ($H_{(0,05; 1)} = 10,725$; $P = 0,001$) (Fig. 4B).

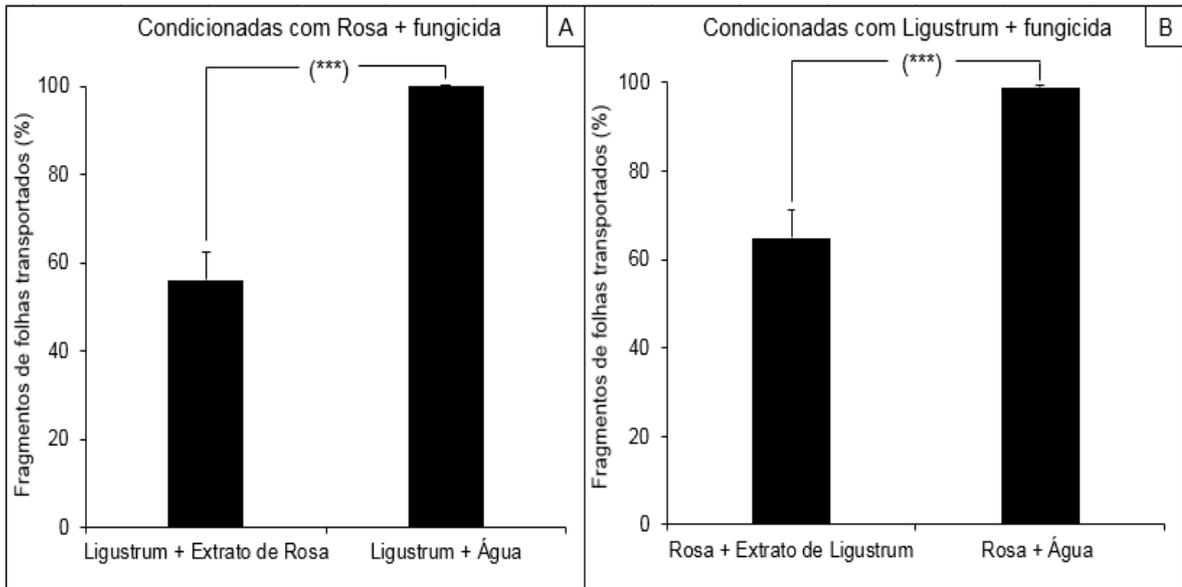


Figura 3. Porcentagem de fragmentos de folhas transportados por operárias de *A. sexdens* ao ninho: A) Condiçionadas com fragmentos de folha de rosa + fungicida; B) Condiçionadas com fragmentos de ligustrum + fungicida (Teste de Kruskal-Wallis, ***: diferença significativa $p < 0,001$).

b) Testes com pentano

As subcolônias condiçionadas com rosa e fungicida coletaram mais fragmentos impregnados com extrato de ligustrum, planta não associada ao fungicida ($H_{(0,05; 1)} = 22,154$; $P < 0,001$). Inversamente as subcolônias condiçionadas com ligustrum e fungicida coletaram mais fragmentos impregnados com extrato de rosa ($H_{(0,05; 1)} = 21,495$; $P < 0,001$, respectivamente, Fig. 5A, B).

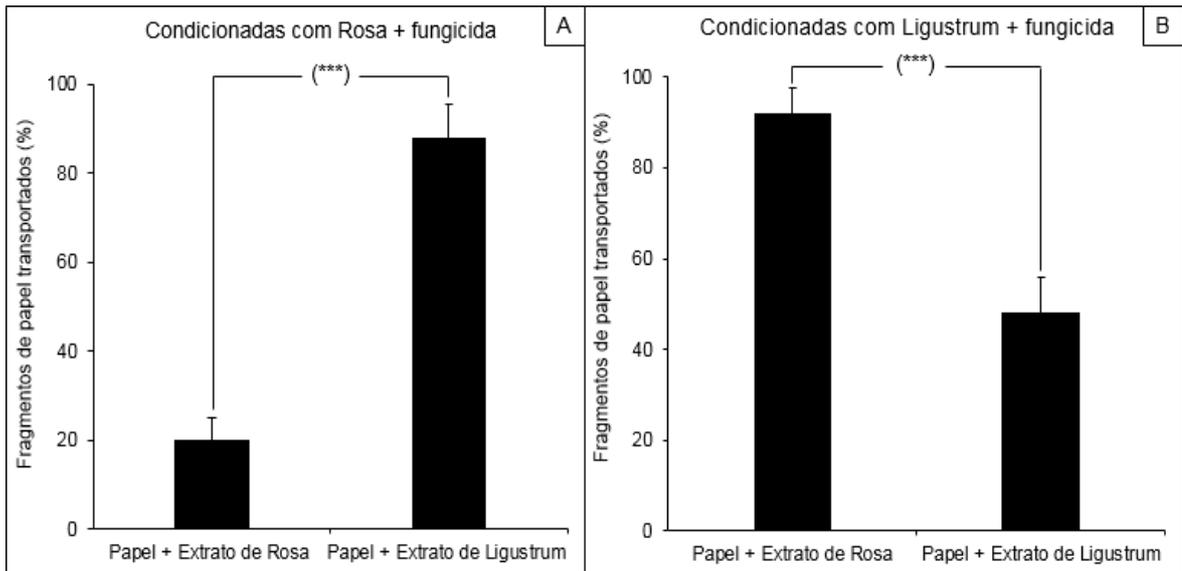


Figura 4. Porcentagem de fragmentos de papel filtro impregnados com extrato aquoso de folhas de rosa (*R. alba*) ou de ligustrum (*L. japonicum*) coletados por operárias de *A. sexdens*: A) Condicionadas com folhas de rosa impregnadas com fungicida; B) Condicionadas com folhas de ligustrum impregnadas com fungicida (Teste de Kruskal-Wallis, ***: diferença significativa $p < 0,001$).

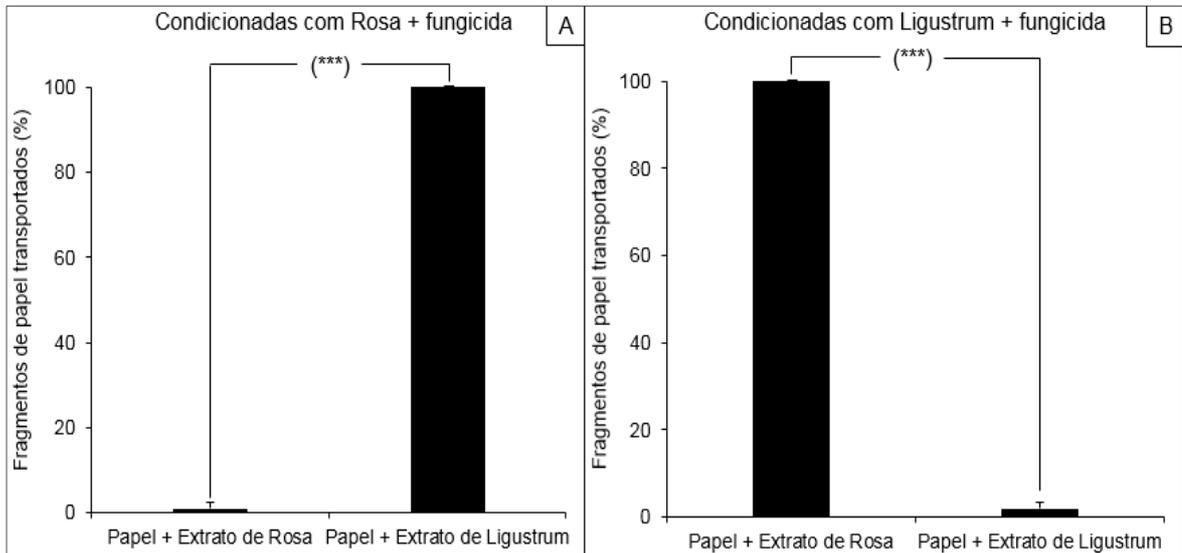


Figura 5. Porcentagem de fragmentos de papel filtro impregnados com extrato de pentano de folhas de rosa (*R. alba*) ou de ligustrum (*L. japonicum*) coletados por operárias de *A. sexdens*: A) Condicionadas com folhas de rosa + fungicida; B) Condicionadas com folhas de ligustrum + fungicida (Teste de Kruskal-Wallis, ***: diferença significativa $p < 0,001$).

6. Análise química de extratos fúngicos

Na tabela 1 são apresentados os dados quantitativos dos compostos coletados por meio de extrações em solvente de jardim de fungo 48h antes do tratamento com fungicida (0h) e 48h depois do tratamento. Um controle de jardim de fungo não tratado com fungicida foi feito também 48h após retirada da primeira amostra.

A análise discriminante dos componentes evidenciou a separação entre os três grupos. Mostrando assim, que o perfil químico do jardim de fungo se modifica quando transcorre 48h, porém existe um maior distanciamento do grupo que foi tratado com folhas impregnadas com fungicida em relação aos outros dois grupos ($F_{(12; 8)} = 11,012$; $P < 0,001$, Fig. 6).

Não houve diferença quantitativa e qualitativa para amostragem dos compostos voláteis capturados com as resinas Tenax TA® e Ambierlite XAD 4.

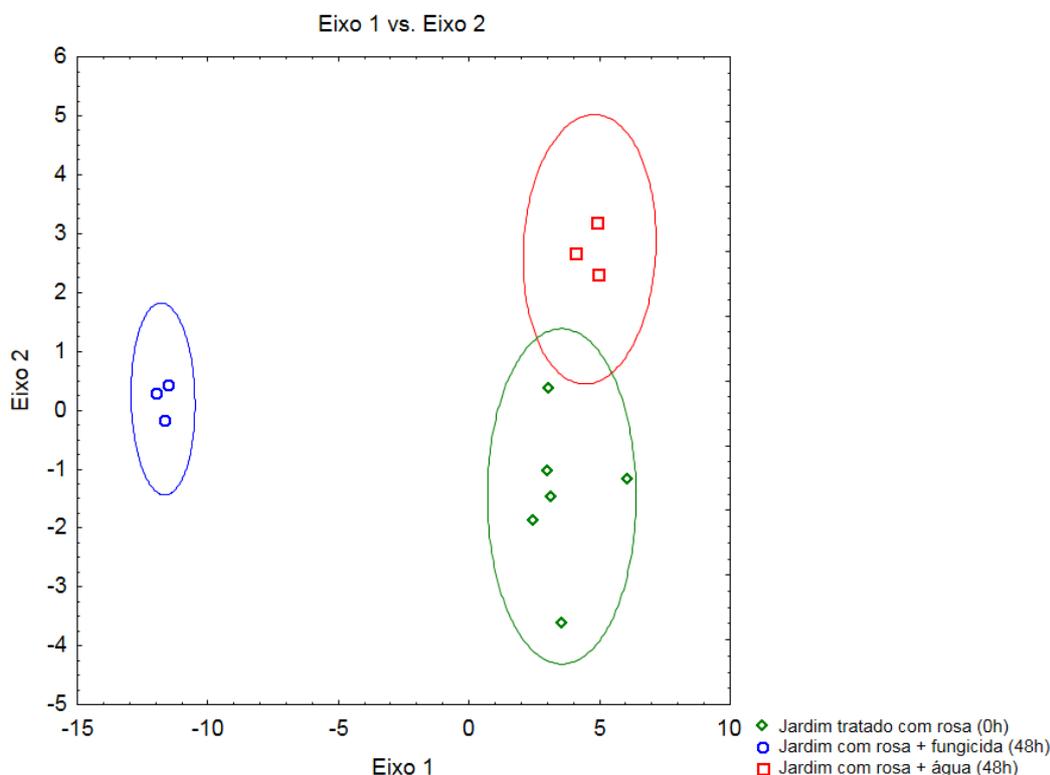


Figura 6. Análise discriminante de dados quantitativos dos compostos químicos extraídos do jardim de fungo antes do tratamento com cicloheximida (0h) (n=6), 48 horas após tratamento (n = 3) e 48 horas sem tratamento (controle).

Tabela 1. Compostos químicos coletados do jardim de fungo de *A. sexdens* mediante extração com solvente hexano e analisados por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Os compostos foram extraídos 48h antes do tratamento com fungicida (0h) e 48h depois

Compostos	Área do pico		
	Jardim tratado com folhas de rosa (0h) ◆	Jardim tratado com rosa + água (48h) ▣	Jardim tratado com rosa + fungicida (48h) ○
Alcanos			
dodecano	6.822.600	10.307.956	2.542.963
6-metil-dodecano	8.041.031	13.943.323	1.954.094
tridecano	37.173.849	57.609.702	11.594.867
3-metil-tridecano	14.735.850	23.598.398	3.967.269
6-metil-tridecano	10.944.395	17.698.789	3.333.878
tetradecano	44.544.892	67.648.904	14.033.618
pentadecano	23.987.433	34.114.804	6.560.223
2,6,10-trimetil-pentadecano	16.115.899	23.403.605	4.276.162
hexadecano	10.481.608	14.040.607	2.780.293
heptadecano	17.039.105	23.109.742	3.836.422
eicosano*	89.760.043	53.651.441	33.737.321
heneicosano	8.301.532	10.436.220	1.544.124
heptacosano	7.105.552	9.859.592	10.193.468
nonacosano	86.174.388	110.312.115	99.576.498
hentriacontano	121.845.486	147.855.520	130.646.228
9,13-dimetil-hentriacontano*	9.430.983	11.488.224	10.014.395
8,12-dimetil-dotriacontano	30.116.301	43.858.895	27.287.210
tritriacontano	55.330.636	38.472.519	80.712.951
9,11-dimetil-tritriacontano	33.513.143	46.550.691	30.374.072
Ácidos			
ácido hexadecanoico	173.898.153	193.110.092	69.597.939
ácido 9,12-octadecadienoico	179.362.762	291.692.558	66.153.482
ácido 9,12,15-octadecatrienoico*	50.551.583	—	39.348.611
Alcenos			
1-heptacoseno	18.746.370	12.676.802	23.568.974
Aldeídos			
hexadecanal	4.457.248	6.401.091	2.115.351
triacontanal	17.921.167	28.803.495	17.325.208
não identificado	26.170.871	21.031.798	29.141.030
Triterpenóide			
esqualeno*	117.316.230	114.597.892	35.617.486

*Compostos excluídos da análise estatística, pois não estiveram presentes em pelo menos 50% das amostras.

DISCUSSÃO

Folhas de rosa e ligustrum foram transportadas sem diferença, o que evidenciou ausência de preferência entre estas espécies. Entretanto, após as subcolônias terem incorporado ao jardim de fungo folhas de qualquer uma dessas espécies impregnadas com fungicida, as operárias passaram a rejeitar a espécie coletada previamente que foi acompanhada do fungicida. A mais provável explicação a este fenômeno é que um fenômeno de condicionamento associativo ocorreu a essas subcolônias e as operárias associaram algum estímulo com ocorrência negativa do fungicida sobre o fungo.

O condicionamento associativo é um mecanismo de aprendizagem facilmente comprovado em laboratório (Sobol, 2015). No condicionamento clássico ou Pavloviano, um estímulo neutro é transformado em estímulo condicionante, e por meio da associação deste com o estímulo incondicional, que produz uma resposta condicionada (Souza, 2012). Formigas *Camponotus aethiops* condicionadas a um odor (estímulo neutro/condicionado) associado a calor excessivo (estímulo incondicionado) no corpo, respondem de forma condicionada com abertura de mandíbula ao odor neutro apresentado sozinho como consequência de uma aprendizagem associativa aversiva (Desmedt et al., 2017).

Nas condições experimentais de nosso trabalho se condicionamento associativo clássico fosse o mecanismo que explicasse a mudança de comportamento, uma das questões a responder seria qual estímulo condicional foi associado ao evento negativo (ação do fungicida) e como o efeito do fungicida ao fungo representa para as formigas um evento negativo. A situação mais clara seria que o fungicida fosse este estímulo negativo e que este fosse percebido pelas formigas. Porém, o experimento 3 demonstra que após condicionadas com substrato vegetal impregnados com o fungicida, as formigas não discriminaram substrato com ou sem fungicida. Isto sugere que o princípio ativo não é detectado pelas formigas com experiência negativa da colônia.

Uma outra hipótese seria que as formigas associaram voláteis da folha utilizada como veículo com a reação que essa folha (contendo o fungicida) causou no jardim de fungo. Neste caso, uma aprendizagem aversiva poderia ter

ocorrido se as formigas associaram efeitos tóxicos no fungo causados pelo fungicida contido nas folhas. Desta forma, ao perceber o odor das folhas associadas ao fungicida novamente, as formigas mudaram sua preferência original. Isto poderia ser consequência de associação do ato de inoculação no fungo de substrato inadequado, com a consequência causada ao jardim de fungo que representaria o estímulo condicionado. Portanto, formigas sensíveis às consequências de sua resposta comportamental a um estímulo (odor de planta), podem associar estímulo à resposta comportamental com o evento negativo (consequência) e assim prever que este evento negativo não ocorra futuramente mediante um condicionamento associativo operante. O condicionamento operante, também denominado aprendizagem por tentativa e erro, permite a um animal associar uma ação realizada por este com as suas consequências (Skinner, 1966).

Operárias de cortadeiras reconhecem e evitam odores de plantas encontradas fora do ninho quando esta planta teve efeitos nocivos ao jardim do fungo, mas, os mecanismos que conduzem a esta resposta são desconhecidos (Saverschek e Roces, 2011). Nosso trabalho demonstra que as formigas são capazes de reconhecer e discriminar o odor da planta que esteve associada ao fungicida quando apenas compostos solúveis das folhas extraídos com pentano oferecidos às formigas provocaram uma redução significativa no forrageamento. Sinais químicos são essenciais no reconhecimento do recurso durante o forrageio, desse modo é provável que as formigas reconheçam o recurso como nocivo ou negativo após aprendizagem associativa da própria planta (Viana-Bailez et al., 2011).

Em ambientes nos quais muitas espécies vegetais possuem compostos nocivos ao fungo com capacidades nas forrageiras para discriminar e evitar essas plantas inadequadas seria uma vantagem para a colônia (Saverschek e Roces, 2011). Para ser eficiente a aprendizagem de evitação de plantas nocivas ao jardim de fungo deveria acontecer no menor período de tempo possível (Herz et al., 2008). Além disso, a memorização de estímulos associados a substratos específicos inadequados deveria perdurar por longos períodos, a fim de evitar reincidências (Herz et al., 2008).

Segundo Herz et al., (2008), os fragmentos de plantas são mastigados e incorporados ao fungo pelas jardineiras nas primeiras 48 horas depois de

coletados, e se desconhece que características da planta são identificáveis após a sua incorporação. Acredita-se que o desencadeador que provoca a mudança do comportamento de forrageamento seria produzido no jardim do fungo nos primeiros dois dias, com a emissão de sinais químicos no jardim de fungo que seriam associados aos sinais químicos da planta coletada.

Uma aprendizagem aversiva (ou de evitação) no qual as operárias associaram o odor da planta com sinais indicativos dos efeitos negativos ao fungo, provocados pelo fungicida poderia ser o fenômeno explicativo de mudança comportamental. As formigas não sofreram diretamente efeitos negativos do fungicida mas, a resposta aversiva poderia ser consequência de uma resposta a um odor da planta forrageada que foi associada a alguma manifestação do fungo que representaria um estímulo negativo para as formigas. Segundo Saverschek e Roces, (2011) as operárias podem associar estímulos gustativos e olfatórios aos efeitos nocivos do substrato no fungo.

O perfil químico dos compostos do fungo simbiote modificou com o passar do tempo, mas teve mudanças importantes em alguns compostos após a incorporação do substrato com fungicida no jardim de fungo. Uma hipótese provável é que alguns desses compostos representem para as formigas um estímulo negativo, também indicativo da nocividade para o jardim de fungo.

A análise discriminante separou significativamente os perfis químicos do fungo de subcolônias antes e depois do tratamento com fungicida. Dentre os compostos identificados na tabela 1, seis desses (ácido hexadecanoico; ácido 9,12-octadecadienoico; triacontanal; heneicosano; 8,12-dimetil-dotriacontano; 2,6,10-trimetil-pentadecano) constituíram o modelo que separou os três grupos indicados no gráfico (fig. 6). Os compostos heneicosano e 8,12-dimetil-dotriacontano foram os que mais contribuíram para a separação dos grupos, pois a quantidade destes foi menor quando o jardim de fungo foi tratado com o fungicida. As subcolônias sem fungicida (0h) exibiram 8.301.532 de heneicosano e 30.116.301 de 8,12-dimetil-dotriacontano, subcolônias que receberam o fungicida tiveram a concentração destes compostos diminuída para 1.544.124 de heneicosano e 27.287.210 de 8,12-dimetil-dotriacontano. Enquanto que, o jardim de fungo controle (48h) teve 10.436.220 de heneicosano e 43.858.895 de 8,12-dimetil-dotriacontano, abundância superior à obtida na primeira análise das subcolônias antes de serem tratadas. As operárias podem ter percebido alguma

dessas alterações no perfil como efeito negativo para a colônia evitando posteriormente esse recurso inadequado.

Alteração de proporções em compostos pode funcionar como um sinal químico de reconhecimento pelas formigas. Choe et al. (2009), demonstraram na formiga *Linepithema humile* que dois compostos (dolichodial e iridomirmecina) presentes na cutícula das formigas vivas desaparecem 1 h após a morte e a ausência destes compostos desencadeia o mecanismo. Esse fenômeno suporta um mecanismo de necroforese das formigas, no qual o reconhecimento e a remoção rápida de companheiros mortos são provocados pelo desaparecimento desses sinais químicos associados à vida. A remoção de organismos mortos antes que ocorra decomposição, limita o risco de infecção no interior da colônia por patógenos oportunistas (Choe et al., 2009).

Os autores Ridley et al. (1996) e North et al. (1999) sustentam que as formigas poderiam detectar alterações no jardim do fungo e responderiam a sinais químicos liberados por este. De acordo com North et al. (1999), não há produtos voláteis envolvidos neste processo. Ridley et al. (1996) sugerem que, o semioquímico liberado pelo fungo danificado circula por trofalaxia e grooming. Para estes autores a rejeição é uma resposta condicionada a um odor do material forrageado associado ao sinal químico liberado pelo fungo. Porém, ainda é desconhecido como este sinal atinge as forrageiras, e se as operárias mínimas que cuidam do jardim de fungo participam deste processo. É desconhecido também como a informação da inadequação de um substrato é distribuído na colônia (Herz et al., 2008). Segundo North et al. (1999), seriam obtidas no contato direto das forrageiras com o fungo ou com operárias mínimas. Arenas e Roces (2016) sugerem que, jardineiras pelo estreito contato com o fungo, seriam mais susceptíveis a associar substrato e efeitos nocivos ao fungo. Esta casta seria a responsável pela interrupção do processamento e incorporação de fragmentos de folhas nocivas ao jardim de fungo. As mudanças no comportamento na arena de forrageamento indicam que embora tardiamente as forrageadoras também participam da seletividade do recurso e indiretamente da preservação do jardim de fungo.

RESUMO E CONCLUSÕES

As operárias de *A. sexdens*, após uma única experiência com um substrato inadequado para o fungo simbiote, aprenderam a discriminar o recurso vegetal inadequado. O reconhecimento de recurso impróprio para o desenvolvimento do jardim de fungo ocorreria mediante sinais químicos da planta. Alterações quantitativas do perfil químico do fungo ocorrem após receber substrato e alguns compostos do perfil modificado seriam provavelmente associados a sinais químicos da planta utilizada como substrato e a resposta das formigas seria modificada frente a recursos vegetais inadequados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcock, J. (2011) *Comportamento Animal: uma abordagem evolutiva*. 9^a ed. Porto Alegre: Artmed, 624 p.
- Arenas A., Roces F. (2016) Gardeners and midden workers in leaf-cutting ants learn to avoid plants unsuitable for the fungus at their worksites. *Animal Behaviour*, 115: 167-174.
- Azevedo, D.L.O. (2009) *O papel das rotas e da obtenção de informações sobre a eficiência no forrageamento de Dinoponera quadriceps em ambiente natural*. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia), Natal - RN, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, 83p.
- Burd, M., Howard, J.J. (2005) Global optimization from suboptimal parts: Foraging sensu lato by leaf-cutting ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59 (2):234–242.
- Camazine S. (1993) The regulation of pollen foraging by honey bee: how foragers assess the colony's need for pollen. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32: 265-272.

- Cherrett J.M. (1972) Some Factors Involved in the Selection of Vegetable Substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in Tropical Rain Forest. *Journal of Animal Ecology*, 41 (3): 647-660.
- Choe D.H., Millar J.G., Rust M.K. (2009) Chemical signals associated with life inhibit necrophoresis in Argentine ants. *PNAS*, 106 (20): 8251–8255.
- Dyer F.C. (2002) The biology of the dance language. *Annual Review of Entomology*, 47: 917-949.
- Forti L.C., Andrade A.P.P. (1999) Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera, Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. *Naturalia*, 24: 61-63.
- Guerrieri, F.J., d’Ettorre, P. (2010). Associative learning in ants: Conditioning of the maxilla-labium extension response in *Camponotus aethiops*. *Journal of Insect Physiology*, 56(1), 88-92.
- Herz H., Hölldobler B., Roces F. (2008) Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Behavioral Ecology*, 19: 575-582.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1990) *The Ants*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 732 p.
- Howard J.J. (1987) Leafcutting ant diet selection: the role of nutrients, water, and secondary chemistry. *Ecology*, 68(3): 503-515.
- Howard J.J. (1988) Leafcutting ant diet selection: relative influence of leaf chemistry and physical features. *Ecology*, 69(1): 250-260.
- Hubbel, S.P., Howard, J.J., Wiemer, D.F. (1984) Chemical leaf repellency to a Attine ant: seasonal distribution among potential host plant species. *Ecology*, 65(4): 1067-1076.
- Jaccoud, D.B., Hugles, W.O.H., Jackson, C.W. (1999). The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 93: 51-61.
- Loeck, A.E., Rosenthal, M., Brancher, N., Gusmão, L.G., Botton, M. (1991). *Nova metodologia para estudos de biologia e comportamento de formigas saúvas em laboratório*. Resumo do Congresso Brasileiro de Entomologia, 13, Recife, Brasil, 74 p.

- Loeck, A.E., Rosenthal, M.D., Gusmão, L.G. (1994) Mini formigueiro: método de criação de formigas cortadeiras na ausência da rainha. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 23: 359-362.
- Molinero E.H.S., Marques L.D., Jafelice R.S.M. (2007) O Estudo Matemático do Comportamento das Abelhas. *FAMAT em Revista*, 9: 447-458.
- Nickele M.A., Pie M.R., Filho W.R., Penteado S.R.C. (2013) Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 73 (33): 53-72.
- Nonimato F.C. (2015) *Análise do efeito de inseticidas neonicotinóides sobre a orientação e coleta de alimento de operárias de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae)*. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP, 57 p.
- North R.D., Jackson C.W., Howse P.E. (1999) Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate choice of substrate for the fungus. *Physiological Entomology*, 24: 127-133.
- Ridley, P., Howse, P.E., Jackson, C.W. (1996) Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their 'symbiotic' fungus. *Experientia*, 52: 631-635.
- Saverschek, N., Roces, F. (2011) Foraging leafcutter ants: olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Animal Behaviour*, 82(3):453-458.
- Skinner B.F. (1966) Operant behavior. In: Honig W (ed) *Operant behavior*. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Sobol S.H. (2015) *Associative learning in ants: odor learning vs. color learning in novomessor cockerelli*. Thesis Bachelor's - The University of Arizona, Department of Neuroscience and Cognitive Science, 25 p.
- Verza S.S., Forti L.C., Lopes J.F.S., Camargo R.S., Matos C.A.O. (2007) Influence of physical and chemical factors during foraging and culture of the symbiont fungus in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Science*, 14: 295-300.
- Viana-Bailez, A.M., Bailez, O., Malaquias, K.S. (2011) Comunicação química em formigas-cortadeiras. In: Della Lucia T. M. C. (Ed.), *Formigas Cortadeiras da bioecologia ao manejo*. Viçosa: Editora UFV, 141-164 p.

Von Frisch K. (1967) *The dance language and orientation of bees*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Wilson E.O. (1962) Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima* (F. SMITH) 1. The organization of mass-foraging. *Animal Behaviour*, 10: 134-138.

3.2 INTERAÇÃO FORMIGA-FUNGO SIMBIONTE NA SELEÇÃO DE SUBSTRATO VEGETAL POR OPERÁRIAS DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA : FORMICIDAE)

RESUMO

As formigas-cortadeiras são capazes de cortar uma grande diversidade de plantas. Apesar de serem polívoros, esses insetos selecionam as plantas que servem de substrato para o cultivo do fungo simbiote. Os fatores que regem essa seletividade ainda não estão bem esclarecidos. Dessa forma, esse trabalho tem o objetivo de determinar se a preferência das forrageadoras de *Atta sexdens* por um recurso está associada a um melhor desenvolvimento do fungo simbiote com alguma característica nutricional do recurso vegetal transportado. Folhas de *Acalypha wilkesiana* (acalifa); *Gallesia integrifolia* (pau d'alho); *Ligustrum japonicum* (ligustrum); *Ricinus communis* (mamona); *Rosa alba* (rosa branca) e *Syzygium cumini* (jamelão) foram utilizadas como recursos vegetais. Testes de escolha, onde foram oferecidos fragmentos de folhas simultaneamente na arena de forrageamento de cada colônia foram realizados para estabelecer preferências por recursos. O crescimento do fungo simbiote foi avaliado em meio de cultivo artificial incrementado com extratos aquosos das folhas a partir de medições do diâmetro do micélio em placas de Petri. A qualidade nutricional das folhas das distintas espécies foi determinada mediante análises físico-químicas. Determinou-

se o teor de umidade, minerais (cinzas), lipídios, proteínas e carboidratos. Uma relação positiva foi estabelecida entre o transporte de recurso e o crescimento do fungo. O nutriente que foi relacionado positivamente com o transporte pelas formigas e crescimento do fungo foi o carboidrato. A única exceção foram as folhas de jamelão que apesar do alto teor de carboidrato e do excelente resultado como substrato para o desenvolvimento do fungo, não foi bem transportado pelas forrageadoras para o ninho. O menor crescimento do fungo em meio de cultivo ocorreu com extrato de mamona e de pau d'alho. O forrageamento de determinado recurso provavelmente é consequência de interações formiga-fungo simbiote e não somente de processos de decisão exclusivos da formiga. A preferência das formigas pelo recurso vegetal está relacionada com a adequabilidade do recurso para um bom desenvolvimento do jardim de fungo e com o nível de carboidratos da planta.

ABSTRACT

The leaf cutter ants are able to cutting a large diversity of plants. Although they are polyphagous, these insects select the plants that serve as substrate for the maintenance of the fungus symbiotic. However, the factors that command this selection are still unclear. Thus, this work aims to determining the preference foragers of *Atta sexdens* by a resource associated with a better development of the fungus symbiotic with some nutritional feature of the transported plant resource. Leaves of *Acalypha wilkesiana*, *Gallesia integrifolia*, *Ligustrum japonicum*, *Ricinus communis*; *Rosa alba* and *Syzygium cumini* were used as plant resources. Tests of choice where leaf fragments were offered simultaneously in the foraging arena of each colony were made to establish resource preferences. The growth of the fungus symbiont was evaluated in culture media artificial increased with aqueous extracts from the leaves from measurements of the mycelial diameter in Petri dishes. The nutritional quality of the leaves of different species was determined from physico-chemical analyzes. It was determined the humidity content, minerals (ashes), lipids, proteins and carbohydrates. A positive

relation was established between resource transport and fungus growth. The nutrient that was positively related to transport by the ants and growth of the fungus was carbohydrate. The only exception was the leaves of *S. cumini* that presented in spite of the high carbohydrate content and the excellent result as substrate for the development of the fungus, was not well transported by the foragers to the nest. The lowest growth of the fungus in culture media occurred with extract *R. communis* and *G. integrifolia*. The foraging of a given resource is probably a consequence of symbiotic ant-fungal interactions and not only of ant-exclusive decision processes. The preference of the ants for the vegetal resource is related to the suitability of the resource for a good development of the fungus garden and with the level of carbohydrates of the plant.

INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras cultivam o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer, fornecendo como substrato material vegetal fresco. Por serem capazes de explorar uma grande variedade de espécies vegetais e pela intensidade de danos que ocasionam a culturas agrícolas são consideradas pragas de grande importância (Della Lucia, 2003). São insetos herbívoros dominantes na Região Neotropical e estima-se que apenas o gênero *Atta* seja responsável pela desfolha de aproximadamente 15% das florestas tropicais da América (Hölldobler e Wilson, 1990) e de 17% da vegetação do cerrado brasileiro, isto corresponde a quase três vezes o dano causado por todos os outros herbívoros (Costa et al., 2008).

Apesar de serem polípagos, esses insetos selecionam o recurso que serve de substrato para o cultivo do fungo simbiote (Marinho et. al., 2006) e cortam diferentes espécies de plantas (Boaretto, 2000; Vitória, 2002). A seletividade do material vegetal pode ser consequência da presença no recurso de substâncias tóxicas ao fungo simbiote, às formigas ou a ambos (Hubbel e Wiemer, 1983). Mas, os fatores que regem essa seleção continuam mal compreendidos. Alguns autores sugerem que barreiras físicas (Cherret, 1972), assim como metabólitos

secundários defensivos (Hubbel et al., 1984; Howard 1987, 1988) repelentes ou tóxicos (flavonoides, alcaloides, quinolonas, óleos essenciais e glicosídeos) seriam a causa da seletividade das formigas (Raven et al., 2001 apud Carlos, 2013). Esta seletividade poderia também estar vinculada aos nutrientes requeridos pelo fungo simbiote para seu desenvolvimento (Howard, 1988) ou a presença no recurso de compostos prejudiciais a este (Herz et al., 2008). Entretanto, ainda se discute qual é a participação do fungo na seleção de substratos pelas operárias (Noronha Júnior, 2006).

Segundo Quinlan e Cherrett (1978), as formigas *Acromyrmex octospinosus* não selecionam necessariamente substratos que propiciam o melhor crescimento do fungo simbiote em meio de cultivo. Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) resultou muito atrativa às operárias de *Atta capiguara*, mas foi desfavorável ao crescimento do fungo (Boaretto, 2000). Noronha Júnior (2006), também não constatou correlação entre preferência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* por *Alchornea triplinervea* (tapiá), *Faramea cyanea*, *Croton floribundus* (Capixingui), *Actinostemon communis* (laranjeira-brava), e o nível de desenvolvimento do fungo simbiote. O autor sustenta que, a seletividade de recurso parece estar mais relacionada com a preferência específica da formiga pela planta que com a adequabilidade do substrato para promover maior crescimento do fungo simbiote.

Por outro lado, Mudd e Bateman (1979) observaram que plantas mais preferidas por operárias de *Atta cephalotes* promoveram maior crescimento do fungo simbiote em meio de cultivo com extratos das mesmas. No mesmo sentido, Lapointe et al. (1996) verificaram que plantas pouco atrativas às operárias de *Acromyrmex landolti* e *Atta laevigata*, como *Brachiaria* spp., proporcionaram menor crescimento do fungo nos meios de cultura com extrato. Alguns autores sugerem que, o crescimento do fungo pode ser mais afetado por inibidores de crescimento do fungo do que pela disponibilidade de nutrientes que favoreçam seu desenvolvimento (Mudd e Bateman, 1979; Lapointe et al., 1996). Porém, nestes trabalhos não foram realizadas análises nutricionais para relacionar o nível de nutrientes nas plantas com o nível de preferência das formigas e de crescimento do fungo simbiote.

Na década de 80, Howard publicou dois trabalhos onde ele avaliou o teor de nutrientes de 50 espécies de plantas. Em Howard (1987), ele avaliou o teor de

umidade, carboidrato e nitrogênio, mas não verificou relação entre o valor nutricional e a preferência das formigas *Atta cephalotes*. Em um segundo trabalho, Howard (1988) verificou que o teor de nitrogênio correlacionou positivamente com o número de fragmentos de folhas coletadas pelas formigas e sugeriu que metabólitos secundários e a disponibilidade de nutrientes interagem determinando a palatabilidade do recurso para as formigas.

O objetivo deste trabalho é estabelecer se a preferência das forrageadoras está relacionada com o crescimento do fungo simbiote e com a qualidade nutricional das folhas exploradas.

MATERIAL E MÉTODOS

Ninhos de Atta sexdens

Quatro colônias de *A. sexdens* coletadas no Município de São Francisco de Itabapoana (Rio de Janeiro - Brasil) foram instaladas em recipientes de plástico de 4000 mL no interior de bandejas plásticas (55 x 40 x 18cm) com talco inodoro nas paredes para evitar o escape das formigas. A sala de criação foi mantida a $80 \pm 10\%$ de umidade e a 25 ± 2 °C. Cada ninho foi constituído por uma câmara de jardim de fungo (4000 mL) e uma de lixo.

Diariamente folhas de plantas consideradas atrativas ao corte como, *Acalypha wilkesiana* (acalifa), *Ligustrum japonicum* (ligustrum), *Mangifera indica* (manga) e esporadicamente pétalas de *Hibiscus rosa-sinensis* (hibisco), *Rosa* spp. e flocos de milho foram oferecidas às formigas.

Material vegetal

Folhas de seis espécies de plantas (*Acalypha wilkesiana* (acalifa); *Gallsia integrifolia* (pau d'alho); *Ligustrum japonicum* (ligustrum); *Ricinus communis* (mamona); *Rosa alba* (rosa branca) e *Syzygium cumini* (jamelão)) foram coletadas no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy

Ribeiro (UENF) e no Asilo Monsenhor Severino, no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro. A coleta das folhas ocorreu no período matutino, de oito às dez horas.

Foram selecionadas plantas atrativas às operárias, como rosa, ligustrum (Camargo et al., 2008) e acalifa (Nagamoto et al., 2009), e plantas que são tóxicas às formigas ou ao fungo simbiote, como a mamona (Hebling et al., 1996; Bigi et al., 2004), o jamelão (observações de campo) e o pau d'alho (sugerido por Della-Lúcia).

As colônias foram privadas das espécies de plantas que fariam parte do teste durante os sete dias que antecederam o experimento.

Experimento 1. Teste de preferência

Cada ninho foi conectado por meio de uma ponte feita com material PVC (1m x 10cm) a uma arena de forrageamento. Constituída por uma bandeja plástica (55 x 40 x 18cm), na qual foram colocadas seis placas de Petri ($\varnothing = 5$ cm) contendo cada uma 20 fragmentos circulares de folhas ($\varnothing = 5$ mm) (Fig. 1). As placas foram distribuídas aleatoriamente e sua posição modificada a cada repetição de teste.

O número de fragmentos de cada espécie transportados para a câmara do fungo foi quantificado após 30 min de observação ou depois que todos os fragmentos de uma das placas foram coletados. O teste foi repetido 5 vezes em cada um dos quatro ninhos utilizados no experimento. Entre uma e outra repetição de ninho se estabeleceu um intervalo de dois dias. Os testes foram realizados no período vespertino, entre 15 e 17 horas.

O número de fragmentos de cada espécie coletados foi comparado mediante análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey.



Figura 1. Ninho de *A. sexdens* (à esquerda) conectado por meio de uma ponte feita em PVC a uma arena de forrageamento (à direita) com as placas de Petri com os fragmentos de folha de seis espécies de plantas

Experimento 2. Desenvolvimento do fungo em meio de cultivo com extrato vegetal

Isolamento e manutenção do fungo simbiote

O fungo simbiote foi isolado a partir de amostras retiradas do jardim de fungo dos ninhos de formigas. O isolamento foi feito sob microscópio estereoscópio (Lambda[®]). Gongilídeos (dilatações nas extremidades das hifas) do fungo foram removidos com alfinete entomológico e implantados em placa de Petri (9 cm) com uma película de meio de cultivo preparado conforme metodologia descrita por Pagnocca et al., (1990). As placas foram mantidas em câmaras B.O.D. a 25 ± 1 °C em ausência de luz.

Preparação dos extratos de folhas

Extratos vegetais foram preparados a partir de folhas frescas das seis espécies de plantas citadas anteriormente. As folhas (6 g) foram maceradas em bécker (100 mL) com bastão de vidro sobre 12 mL de água destilada. O extrato resultante foi filtrado em papel filtro e 5 mL foram depositados em erlenmeyer (125 mL). O volume do erlenmeyer foi completado com meio de cultivo e tampado com algodão e papel alumínio antes de ser autoclavado a 121°C por 20 minutos. Foram preparados meios de cultivo com extratos de cada uma das seis espécies

vegetais utilizadas nos experimentos. Um controle (branco) foi preparado apenas com meio de cultivo (Pagnocca et al., 1990) sem adição de extrato vegetal. O meio foi posteriormente vertido nas placas de Petri (5 cm) dentro de uma câmara de fluxo laminar.

Inoculação do fungo no meio de cultivo

O fungo inoculado foi previamente isolado e mantido por 30 dias em placa de Petri (9 cm). Seções circulares (0,5 cm) do fungo foram retiradas com furador e transferidas para as placas de Petri (5 cm) contendo o meio com extrato e sem extrato (controle). As placas foram mantidas em câmaras B.O.D. a 25 ± 1 °C no escuro por 21 dias.

Crescimento do fungo nos meios de cultivo

O desenvolvimento do fungo nos meios de cultivo incrementados com extratos vegetais foi avaliado semanalmente através do crescimento radial do micélio.

No fundo das placas de Petri foram traçadas duas linhas perpendiculares dividindo o círculo em 4 seções idênticas com epicentro no local de inoculação do fungo. Registrando o crescimento do fungo nas linhas perpendiculares obtendo-se duas medidas de diâmetro de cada placa, com as quais se estabeleceu uma média. As medições foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação do fungo.

Foram feitos sete tratamentos, dos quais, seis espécies de plantas e um controle. Para cada tratamento realizou-se quatro repetições (quatro placas).

As medições de crescimento do fungo foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Experimento 3. Valor nutricional das plantas

Umidade

Para determinar a umidade, folhas de cada espécie foram cortadas separadamente em fragmentos menores (0,20 cm²). Pesou-se 3g de amostra em cadinho de porcelana (50 mL) previamente secado em estufa a 105 °C por 1h. Foram feitas triplicatas de cada espécie vegetal e as amostras levadas à estufa,

onde permaneceram 24h a 105 °C. Após este período, as amostras foram transferidas para um dessecador e mantidas por 30 min até atingirem temperatura ambiente, em seguida foram pesadas. Para verificar se o peso da matéria seca estava estabilizado, as amostras foram levadas novamente à estufa por 1h, resfriadas no dessecador por 30 min e novamente pesadas em balança analítica (Shimadzu[®]) (Zenebon et al., 2008). O cálculo de umidade das folhas de cada espécie foi feito com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{ umidade da amostra} = N \times 100 / P$$

Onde:

N = n° de gramas de umidade (diferença entre a primeira (3 g) e última leitura);

P = n° de gramas da amostra.

Resíduo mineral fixo (cinzas)

O teor de cinzas foi determinado sobre as amostras surgidas da determinação de umidade. Os cadinhos com a massa seca foram colocados dentro de uma mufla a 550 °C até serem incineradas durante 7 horas. Quando as cinzas atingiram coloração branca, foram retiradas e deixadas para resfriar em dessecador por 30 min antes de serem pesadas em balança analítica (Shimadzu[®]) (Zenebon et al., 2008).

Cálculo:

$$\% \text{ cinzas na amostra} = N \times 100 / P$$

Onde: N = n° de gramas de cinzas;

P = n° de gramas da amostra.

Proteína

O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl, que consiste em 3 etapas: digestão; destilação e titulação.

1ª Etapa - Digestão: Foram pesadas 2g de amostra de folhas de cada espécie em tubo de ensaio para digestão de proteínas (100 mL). Na capela de exaustão foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico H₂SO₄ (Quimex[®]), 3 mL de peróxido de hidrogênio H₂O₂ (Vertec[®]) e 1g de mistura catalítica (1g de sulfato de cobre CuSO₄, 100g de sulfato de sódio Na₂SO₄ e 0,8g de selênio em pó). Em seguida, os tubos contendo as amostras foram colocados no bloco digestor a 100 °C, e

elevou-se gradativamente a temperatura até atingir 400 °C. As amostras permaneceram nessas condições até a solução se tornar azul-esverdeada e translúcida. Após atingirem essa coloração, as amostras foram mantidas por mais 1h a 400 °C. Após concluído o processo de digestão, o bloco foi desligado e os tubos resfriados em temperatura ambiente. Adicionou-se 15 mL de água destilada em cada amostra (Gomes e Oliveira, 2011).

2ª Etapa - Destilação: A destilação foi realizada no aparelho de Kjeldahl, onde foi colocada uma solução saturada de hidróxido de sódio NaOH (Proquímicos[®]) (50%) no reservatório do aparelho. Foram conectados ao aparelho, o tubo com a amostra (que recebeu previamente 3 gotas do indicador fenolftaleína) e um erlenmeyer com ácido bórico H₃BO₃ (Proquímicos[®]) a 3% para receber o destilado. Cada erlenmeyer continha 20 mL da solução de ácido bórico, 4 gotas dos indicadores vermelho de metila e 6 gotas de verde de bromocresol para visualização do ponto de viragem. Após a amostra ser neutralizada pela solução de hidróxido de sódio (ficou com coloração rosa devido à fenolftaleína), ligou-se o aquecimento do aparelho para começar a destilação. Deixou-se destilando até que o volume do erlenmeyer contendo ácido bórico atingisse aproximadamente 75 mL, quando ao receber o destilado a cor do ácido bórico passou de laranja para verde. (Neste processo, quando o tubo com a amostra é aquecido, o íon de amônio NH₄⁺ se converte em amônia NH₃ que sendo volátil é transferida para a fase gasosa, a amônia é em seguida condensada e desce em forma de gotas para o ácido bórico que está com H⁺ e irão reagir com a amônia, convertendo-se a amônio, que não é volátil e não irá evaporar) (Gomes e Oliveira, 2011).

3ª Etapa - Titulação: Utilizou-se uma solução de ácido clorídrico HCl 0,1mol/L (Vertec[®]) previamente padronizada e com seu respectivo fator de correção anotado. A solução de HCl foi adicionada vagarosamente no erlenmeyer contendo o destilado, a coloração passou de verde para laranja. O volume de HCl gasto na titulação foi registrado (Gomes e Oliveira, 2011).

Cálculo:

$$\% \text{ Nitrogênio Total} = (V \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100) / P;$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrogênio Total} \times 6,25*;$$

* Valor utilizado para converter o teor de nitrogênio em proteína bruta.

Onde:

V= Mililitros de solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L gastos na titulação;

F= Fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L;

P = n° de gramas da amostra.

Gordura total (lipídios)

Para determinação do teor de lipídios foi utilizado o método de Bligh e Dyer. As amostras foram secas em estufa a 55°C com ventilação e trituradas em liquidificador até virar pó. Pesou-se 3 g de amostra em tubo de ensaio (90 mL) com tampa e adicionou-se 15 mL de clorofórmio (Vertec[®]), 30 mL de metanol (Vertec[®]) e 6 mL de água destilada. As amostras foram agitadas por 30 min em agitador de tubos vortex (Quimis[®]). Em seguida, foram adicionados nas amostras 15 mL de clorofórmio, 15 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% e agitados durante 2 min. As amostras foram deixadas de repouso por um período de 24h para total separação de duas fases, cuja a camada inferior foi composta por clorofórmio e lipídios. Foram recolhidos 10 mL da camada inferior com uma pipeta e transferidos para uma placa de Petri (5 cm) previamente seca em estufa e pesada. As placas contendo as amostras foram levadas para estufa a 105°C e deixadas por 1h para evaporação do solvente. Em seguida foram transferidas para dessecador, onde permaneceram por 30 min e posteriormente pesadas em balança analítica (Shimadzu[®]) (Gomes e Oliveira, 2011).

Cálculo:

$$\% \text{ lipídios na amostra} = N \times 3 \times 100 / P$$

Onde:

N = n° de gramas de lipídios;

P = n° de gramas da amostra.

Carboidratos

O teor de carboidratos totais (mono, di e polissacarídeos) foi determinado pela diferença entre 100 e o somatório das porcentagens obtidas de umidade, cinzas, proteínas e lipídios totais (ANVISA,2003).

Análise estatística

Os dados de três amostras de cada espécie de vegetal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS

Experimento 1. Teste de preferência

As operárias transportaram para o ninho fragmentos de folhas de rosa, ligustrum e acalifa enquanto que a maioria dos fragmentos de folhas de jamelão, mamona e pau d'alho foi deixada nas placas ($F_{(0,05; 5)} = 36,215$; $p < 0,001$) (Fig. 2). De acordo com a análise estatística não houve diferença entre ninhos, nem interação significativa entre tratamentos e ninhos ($F_{(0,05; 20)} = 0,677$; $p = 0,838$).

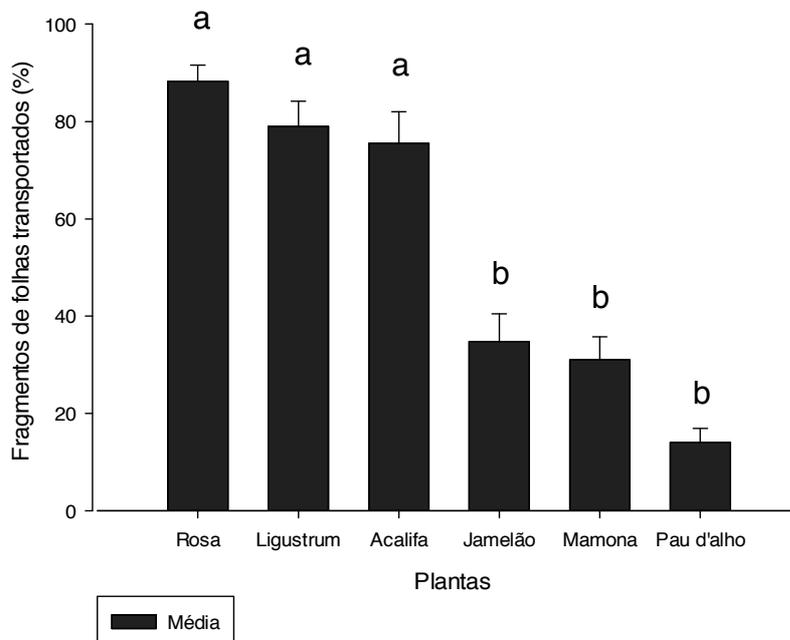


Figura 2. Porcentagem de fragmentos de folhas de rosa (*R. alba*), ligustrum (*L. japonicum*), acalifa (*A. wilkesiana*), jamelão (*S. cumini*), mamona (*R. communis*) e pau d'alho (*G. integrifolia*) transportados ao ninho por operárias de *A. sexdens*. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

Experimento 2. Desenvolvimento do fungo em meio de cultivo com extrato vegetal

O fungo simbiote teve maior crescimento em meio de cultivo incrementado com extratos de folhas de ligustrum, jamelão e rosa, e o crescimento foi menor em meio com extratos de folhas de mamona e pau d'alho em comparação com o controle que foi o meio de cultura sem nenhum extrato (branco) (Fig. 3).

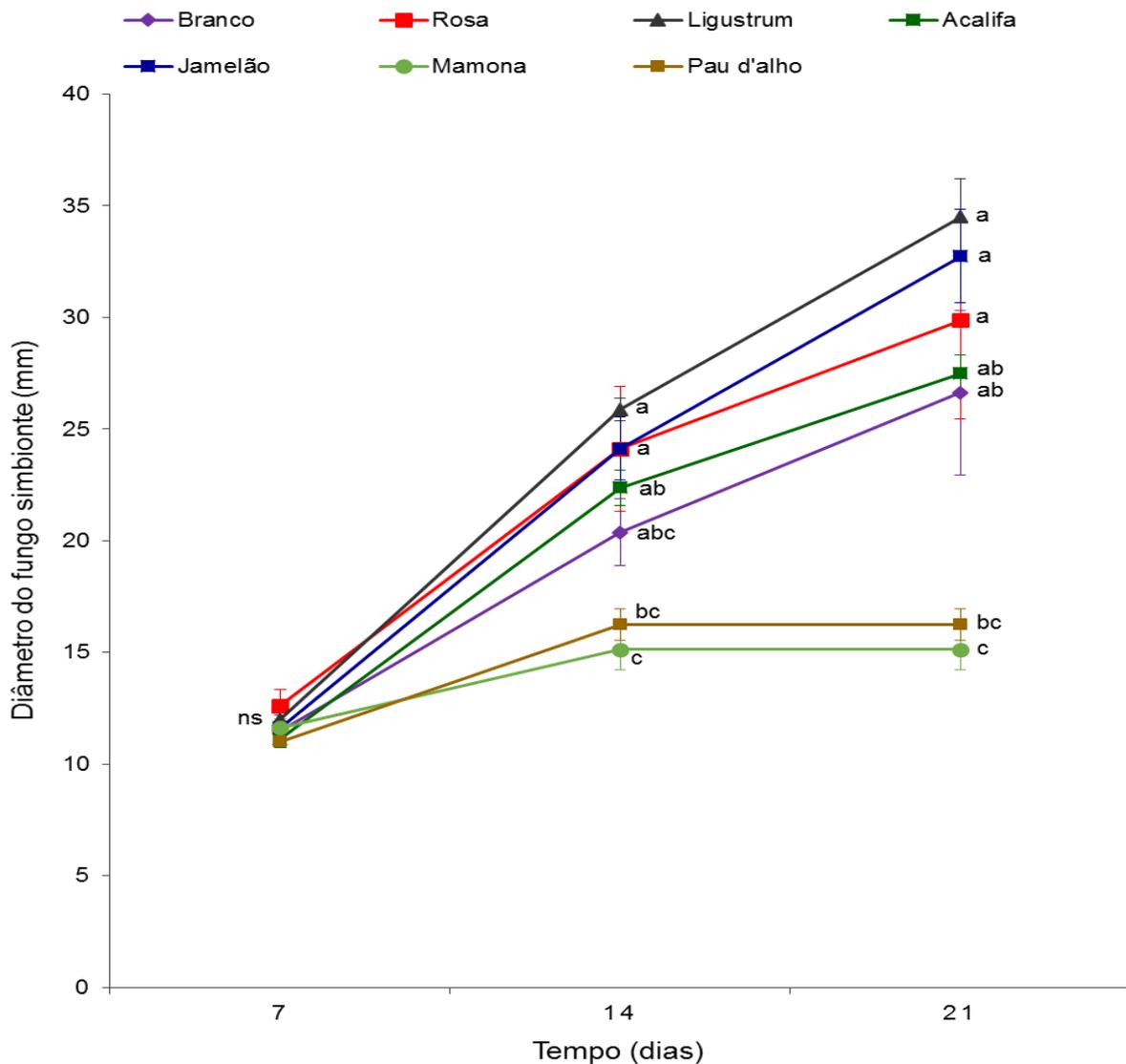


Figura 3. Crescimento radial (mm) do fungo simbiote de *A. sexdens* isolado em placa de Petri contendo meio de cultivo incrementado com extratos de folhas de diferentes espécies de plantas, avaliado no decorrer de 7, 14 e 21 dias após a inoculação.

Experimento 3. Valor nutricional das plantas

As folhas de acalifa, pau d'alho e mamona apresentaram maior teor de umidade e o menor de carboidrato, enquanto que folhas de rosa, ligustrum e jamelão tiveram níveis mais altos de carboidrato e menores de umidade. O teor de cinzas (minerais) foi maior em folhas de pau d'alho e menor em folhas de jamelão. Os teores de lipídios e de proteínas não diferiram significativamente entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Composição centesimal dos nutrientes (Média ± Erro padrão) presentes em folhas de rosa, acalifa, ligustrum, jamelão, mamona e pau d'alho

PLANTAS	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL (g/100g)				
	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
Rosa	64,00 ± 0,6 c	2,01 ± 0,06 cd	0,37 ± 0,02 ns	4,06 ± 0,5 ns	29,56 ± 0,5 a
Ligustrum	67,53 ± 0,04 b	2,46 ± 0,1 bc	0,43 ± 0,05 ns	3,93 ± 0,3 ns	25,65 ± 0,3 ab
Acalifa	71,95 ± 0,04 a	2,12 ± 0,09 cd	0,91 ± 0,2 ns	4,72 ± 0,5 ns	20,3 ± 0,5 bc
Jamelão	66,94 ± 0,1 b	1,72 ± 0,09 d	0,69 ± 0,05 ns	2,10 ± 0,4 ns	28,55 ± 0,5 a
Mamona	70,90 ± 0,2 a	2,87 ± 0,1 b	1,13 ± 0,01 ns	3,69 ± 1,2 ns	21,41 ± 1,6 bc
Pau d'alho	70,98 ± 0,2 a	3,61 ± 0,1 a	1,15 ± 0,4 ns	5,31 ± 1,8 ns	18,95 ± 2,3 c

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

A formiga *A. sexdens* selecionou recursos vegetais apresentados em situação de escolha. As forrageadoras preferiram coletar folhas de rosa, ligustrum e acalifa. Essas espécies são comumente utilizadas no abastecimento de ninhos artificiais mantidos em laboratório (Marinho et al., 2005; Camargo et al., 2008; Nagamoto et al., 2009; Terezan et al., 2010) por serem bem aceitas pelas formigas cortadeiras. Folhas da mamona foram pouco coletadas, esta espécie provoca alta taxa de mortalidade nas operárias, por isso é muito utilizada em

pesquisas que visam controle biológico de pragas (Hebling et al., 1996; Bigi et al., 2004). Segundo Bigi et al., (2004), a propriedade formicida da mamona é consequência da presença de ricinina em suas folhas. Outra planta pouco coletada foi o pau d'álho, que popularmente é utilizada no controle de carrapatos e pulgas (Silva et al., 2013). Sánchez (2005) cita que essa espécie atua como repelente natural aos insetos, mas, não existe comprovação da sua eficiência para repelir e/ou controlar pragas (inclusive formigas). Outra espécie pouco coletada foi jamelão, a eficiência de extrato de folhas desta espécie como repelente à *Periplaneta americana* (barata) (Vicente, 2014) e ao *Callosobruchus chinensis* (besouro) (Hasanuzzaman et al., 2015) já foi comprovada, entretanto, não existem estudos sobre a ação repelente às formigas-cortadeiras.

O fungo simbiote desenvolveu melhor nos meios de cultivo com extratos de folhas de ligustrum, jamelão e rosa. Extratos de mamona e pau d'álho parecem ter inibido o desenvolvimento do fungo, pois, mantiveram o mesmo diâmetro entre 14 e 21 dias de observação. Segundo Bigi et al., (2004), a folha da mamona possui uma mistura de ácidos graxos (composta por 81% de ácido palmítico) que tem ação fungicida e inibe o crescimento do fungo simbiote. Apesar de não ter sido encontrado na literatura trabalho que abordasse a atividade antifúngica do pau d'álho ao fungo simbiote, sua capacidade antifúngica já foi relatada (Freixa et al., 1998; Rodrigues et al., 2011). Segundo Mudd e Bateman (1979), as plantas mais atrativas poderiam promover maior crescimento do fungo, entretanto, o desenvolvimento do fungo pode ser afetado mais pela presença de inibidores de crescimento que pela disponibilidade de nutrientes. Lapointe et al. (1996) observaram baixo crescimento do fungo simbiote de *Acromyrmex landolti* e *Atta laevigata* em meios de cultura com extrato de plantas pouco atrativas (e.g. *Brachiaria* spp.), para os autores, isso se deve a fatores inibitórios ao fungo simbiote presentes na planta. De acordo com os nossos resultados, as plantas atrativas às operárias de *A. sexdens* favoreceram o crescimento do fungo, enquanto que, as menos atrativas inibiram o desenvolvimento deste. As forrageiras são capazes de discriminar uma planta nociva ao fungo simbiote e este mecanismo aparentemente envolve a percepção de sinais químicos (odores) presentes nas plantas que seriam associados pelas formigas as consequências que a planta causa no jardim de fungo.

O alto teor de umidade e cinzas nas folhas não está relacionado positivamente com a preferência das formigas pelo recurso vegetal nem com o crescimento do fungo. As plantas com maior teor de umidade e de cinzas (pau d'alho e mamona) foram pouco coletadas pelas forrageiras e o fungo simbiote teve pouco desenvolvimento. Por outro lado, folhas de rosa e ligustrum com baixo teor de umidade foram mais coletadas. A preferência por recurso com baixo teor de umidade poderia estar relacionada a uma maior concentração de nutrientes e a uma redução de substâncias repelentes (Vasconcelos e Cherrett, 1996; Meyer et al., 2006). Como os teores de lipídios e de proteínas não diferiram estatisticamente entre as plantas, não deveriam ser um fator determinante na preferência. Em contrapartida, o teor de carboidrato pode ter determinado a preferência, uma vez que, plantas como rosa e ligustrum de alto teor de carboidrato foram mais transportadas ao ninho que as outras espécies e favoreceram o crescimento do fungo.

De acordo com Silva et al., (2003), os carboidratos são atrativos às forrageadoras devido à sua importância nutricional. Segundo Siqueira et al., (1998), os polissacarídeos presentes nas folhas (como amido, xilana, pectina e celulose) favorecem o crescimento do fungo e são metabolizados por ele, sendo importantes fontes de carbono na dieta das formigas. Roces e Núñez (1993), observaram que fragmentos de filme plástico com 10% de açúcar foram transportados mais rápido para o ninho do que fragmentos com 1% de açúcar.

Folhas de jamelão também apresentaram alto teor de carboidrato e propiciaram o crescimento do fungo, porém foram pouco coletadas pelas formigas. É provável que o jamelão possa conter metabólitos secundários com ação repelente às formigas. De acordo com Hubbell et al., (1984), as formigas evitam plantas impalatáveis, mesmo quando contêm nutrientes que favoreçam o crescimento do fungo.

Em observações no campo, verificamos que forrageadoras de *A. sexdens* cortam folhas de jamelão em fragmentos menores e deixam debaixo da planta ou perto dos olheiros e somente depois de secos são transportados ao interior do ninho. De acordo com Vasconcelos e Cherrett, (1996), a preferência por folhas secas está relacionada à redução de substâncias repelentes nessas folhas. Em laboratório as folhas de jamelão foram pouco transportadas pelas formigas, mas

proporcionaram bom crescimento do fungo. É provável que folhas de jamelão possuam substâncias químicas repelentes ou tóxicas às próprias formigas.

Segundo Vizzotto e Fetter (2009), Hasanuzzaman et al., (2015), Sami e Shakoori (2007), o jamelão possui compostos secundários repelentes aos insetos que protegem a planta do ataque de pragas. Sami e Shakoori (2007) verificaram que extratos de folhas de jamelão contêm flavonoides que inibem a atividade da enzima celulase, impossibilitando a digestão do material vegetal. Entretanto, Erthal et al., (2004) observaram ausência de celulase no intestino médio de formigas-cortadeiras da espécie *Acromyrmex subterraneus*, o que indica que não estão adaptadas para degradar componentes da parede celular das plantas. Isso sugere que o mecanismo de repelência das folhas de jamelão às formigas-cortadeiras poderia ser diferente do de outros insetos. Por outro lado, ação repelente por flavonoides, foi comprovada em *Atta cephalotes* (Roussis et al., 1987).

Acalifa foi muito coletada pelas forrageadoras no teste de preferência, mas, apresentou baixo teor de carboidrato e proporcionou crescimento do fungo próximo ao controle. Esta preferência das operárias por folhas de acalifa pode estar relacionada às propriedades antifúngicas que minimizam os efeitos de microrganismos entomopatogênicos presentes na colônia (como *Aspergillus flavus*), favorecendo uma maior taxa de sobrevivência das operárias (Lacerda et al., 2010). Por outro lado, Carlos (2013), atribuiu a preferência das operárias de *A. sexdens* por acalifa à presença de compostos químicos atrativos não identificados nas ceras epicuticulares das folhas e a possível ausência de compostos repelentes.

Neste cenário, acreditamos que o forrageamento de determinado recurso provavelmente é consequência de interações formiga-fungo simbiote e não somente de processos de decisão exclusivos da formiga. A preferência das formigas pelo recurso vegetal está relacionada com a adequabilidade do recurso para um bom desenvolvimento do jardim de fungo e com o teor de carboidratos da planta.

RESUMO E CONCLUSÕES

As forrageadoras manifestaram preferência por folhas de determinadas espécies. A seleção de recursos vegetais pode estar relacionada com os requisitos nutricionais exigidos pelo fungo para seu melhor desenvolvimento ou devido a substâncias não identificadas que podem inibir seu crescimento. Plantas como mamona e pau d'álho tiveram este efeito de inibição do crescimento fúngico e foram também evitadas pelas formigas. O teor de carboidrato presente nas folhas pode influenciar a escolha de substrato pelas formigas. Pois, as plantas com maior teor deste nutriente foram as que proporcionaram maior crescimento do fungo. As folhas de jamelão apresentaram alto teor de carboidrato e seu extrato serviu como ótimo substrato para o desenvolvimento do fungo em placa de Petri, entretanto as formigas evitaram coletar os fragmentos desta planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003) Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003: Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial da União, Poder Executivo, 26 de dezembro de 2003.
- Bigi M.F.M.A., Torkomian V.L.V., de Groote S.T.C.S, Hebling M.J.A., Bueno O.C., Pagnocca F.C., Fernandes J.B., Vieira P.C., Silva M.F. G.F. (2004) Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Pest Management Science*, 60 (9): 933-938.
- Boaretto, M.A.C. (2000) *Seleção de substratos com potencial para uso em iscas granuladas para as saúvas Atta capiguara Gonçalves, 1944 e Atta bisphaerica Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) e isolamento do fungo*

- simbionte*. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciência Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 161 p.
- Camargo, R.S., Forti L.C., Lopes J.F.S., Matos C.A.O. (2008) Growth of populations and fungus gardens of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae) response to foraged substrates. *Sociobiology* 52(3): 633-643.
- Carlos A.A. (2013) *Semioquímicos e comunicação sonora em formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)*. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Biociências - Rio Claro/SP, 159 p.
- Cherrett J.M. (1972) Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forest. *Journal of Animal Ecology*, 41, 647-660 .
- Costa A.N., Vasconcelos, H.L., Veira-neto, E.H.M. & Bruna, E.M. (2008) Do herbivores exert top-down effects in neotropical savannas? Estimates of biomass consumption by leaf-cutter ants. *Journal of Vegetation Science*, 19: 849-854.
- Della Lúcia, T.M.C. (2003) Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: Fernández, F. (Ed.) *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 398 p.
- Erthal Jr. M., Silva C.P., Samuels R.I. (2004) Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). *Journal of Insect Physiology*, 53 (11): 1101-1111.
- Freixa B., Vila R., Vargas L., Lozano N. , Adzet T., Cañigueral S. (1998) Screening for antifungal activity of nineteen latin American plants. *Phytotherapy Research*, 12: 427-430.
- Gomes J.C., Oliveira, G.F. (2011) *Análises físico-químicas de alimentos*. Viçosa: Editora UFV, 303 p.
- Hasanuzzaman Md., Islam W., Parween S. (2015) Repellent activities of *Syzygium cumini* L. (Myrtaceae) extracts against *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae). *University journal of zoology*, 34: 33-38.
- Hebling M.J.A., Maroti P.S., Bueno O.C., Silva O.A., Pagnocca F.C. (1996) Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests

- of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 86 (3): 253-256.
- Herz H., Holldobler B., Roces F. (2008) Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Behavioral Ecology* 19: 575-582.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1990) *The ants*. Harvard University Press, Cambridge, Mass, 732 p.
- Howard, J.J. (1988) Leafcutting ant diet selection: relative influence of leaf chemistry and physical features. *Ecology*, 69, 250-260.
- Howard, J.J. (1987). Leafcutting ant diet selection: the role of nutrients, water and secondary chemistry. *Ecology*, 68: 503-515.
- Hubbell, S.P., Howard, J.J., Wiemer, D.F. (1984) Chemical repellency to an attini ant: seasonal distribution among potential host plant species. *Ecology*, 65: 1067- 1076.
- Hubbel, S.P., Wiemer, D.F. (1983) Host plant selection by an Attini ant. In: Jaisson, P. (Ed.) *Social Insects in the tropics*. University of Paris, 2: 133-154.
- Lacerda F.G., Della Lucia T.M.C., Pereira O.L., Peternelli L.A., Tótola M.R. (2010) Mortality of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers in contact with colony waste from different plant sources. *Bulletin of Entomological Research*, 100 (1): 99-103.
- Lapointe, S.L., Serrano, M.S., Corrales, I.J. (1996) Resistance to leaf- cutter ants (Hymenoptera: Formicidae) and inhibition of their fungal symbiont by tropical forage grasses. *Journal of Economic Entomology*, 3: 757- 765.
- Marinho, C.G.S., Della Lucia, T.C.M., Picanço, M.C. (2006) Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. *Bahia Agrícola*, 7: 18-22.
- Marinho C. G.S., Della Lucia T.M.C., Guedes R.N.C., Ribeiro M.M.R., Lima E.R. (2005) beta-eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 117: 89 - 93.
- Meyer S.T., Roces F., Wirth R. (2006) Selecting the drought stressed: effects of plant stress on intraspecific and within-plant herbivory patterns of the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Functional Ecology*, 20, 973-981.
- Mudd, A., Bateman, G.L. (1979) Rates of growth of the food fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) on different

- substrates gathered by the ants. *Bulletin of Entomological Research*, 69: 141-148.
- Nagamoto N.S., Carlos A.A., Moreira S.M., Verza S.S., Hirose G.L., Forti L.C. (2009) Differentiation in Selection of Dicots and Grasses by the Leaf-Cutter Ants *Atta capiguara*, *Atta laevigata* and *Atta sexdens rubropilosa*. *Sociobiology*, 54 (1): 127-138.
- Noronha Junior, N.C. (2006) *Interferência dos fatores físicos, químicos e do desenvolvimento do fungo simbiote de Atta sexdens rubropilosa Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) na seleção de substratos e localização da desfolha*. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônomicas Câmpus de Botucatu, SP, 78 p.
- Pagnocca, F.C., Silva, O. A., Hebling-Beraldo, M.J., Bueno, O.C. (1990) Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf cutting ants. *Bulletin of Entomological Research*, 80: 349-352.
- Quinlan, R.J.; Cherrett, J.M. (1978) Aspects of the symbiosis of the leaf cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecological Entomology*, 3: 221-231.
- Roces F., Núñez J.A. (1993) Information about food quality influences load-size selection in recruited leaf-cutting ants. *Animal Behaviour* 45 (1):135-143.
- Rodrigues M.S., Jardimetti V.A., Schwanestrada K.R.F., Cruz M.E.S., Jesus L.S. (2011) Atividade fungitóxica de hidrolatos de plantas medicinais. *Cadernos de Agroecologia*, 6 (2): 1-4.
- Roussis V., Ampofo S.A.; Wiemer D.F. (1987) Flavanones from *Lonchocarpus miniflorus*. *Phytochemistry*, 26: 2371-2375.
- Sami A.J., Shakoori A.R. (2007) Extracts of plant leaves have inhibitory effect on the cellulase activity of whole body extracts of insects – a possible recipe for bioinsecticides. *Pakistan journal of zoology*, 27: 105-118.
- Sánchez V.A.A. (2005) *Aplicación de tres insecticidas naturales en el control del tujo (Atta spp.) en el cultivo de cacao en la region de alto Beni*. Tesis de Grado, Universidad Mayor de San Andres Facultad de Agronomía, La Paz-Bolivia, 77 p.

- Silva A., Bacci J.R.M., Siqueira C.G., Bueno O.C., Pagnocca F.C., Hebling M.J.A. (2003) Survival of *Atta sexdens rubropilosa* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology* 9: 307-313.
- Silva W.M.O., Souza G.F.X.T., Vieira P.B., Sanavria A. (2013) Uso popular de plantas medicinais na promoção da saúde animal em assentamentos rurais de Seropédica – RJ. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 20 (1): 32-36.
- Siqueira, C.G.; Bacci M. Jr., Pagnocca F.C., Bueno O.C., Hebling M.J.A. (1998) Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied and environmental microbiology*, 64 (12): 4820-4822.
- Terezan A.P., Rossi R.A.; Almeida R.N.A., Freitas T.G., Fernandes J.B., Silva M.F.G.F.; Vieira P.C., Odair C. Bueno O.C., Pagnocca F.C., Pirani J.R. (2010) Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21 (5): 882-886.
- Vasconcelos H.L., Cherrett J.M. (1996) The effect of wilting on the selection of leaves by the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 78:1, 215-220.
- Vicente R.R. (2014) *Avaliação da repelência de extratos vegetais sobre a barata *Periplaneta americana* (L.) visando controle alternativo de pragas e a redução de impactos ambientais*. Monografia de Especialização - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira/PR, 21 p.
- Vitório, A.C. (2002) *Avaliação da seletividade de *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae) por diferentes gramíneas*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 103 p.
- Vizzotto M., Fetter M.R. (2009) Jambolão: o poderoso antioxidante. *EMBRAPA Clima Temperado*, Pelotas/RS, 1-2.
- Zenebon O., Pascuet N.S., Tiglea P. (2008) *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed. 1ª ed. digital, 1020 p.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

As formigas aprendem a evitar um recurso que é nocivo ao fungo simbiote. Os odores das plantas seriam os sinais associados às consequências produzidas pelo fungicida no jardim de fungo. Alterações quantitativas nos compostos voláteis emitidos pelo do jardim de fungo, podem explicar alterações na preferência das forrageadoras. Desta forma, substâncias inadequadas contidas no substrato forrageado pelas formigas podem alterar as emissões de compostos voláteis do jardim de fungo que são associadas pelas formigas ao odor do substrato forrageado por processos de condicionamento associativo alterando a preferência de um substrato.

Existe uma relação positiva, onde geralmente as folhas preferidas ao transporte são as que proporcionam maior crescimento do fungo e as que têm maior teor de carboidrato. É possível que a inibição do crescimento do fungo simbiote em meio de cultivo com extrato de folhas de mamona e pau d'alho seja devido a presença de substâncias fungicidas provenientes destas plantas. E que folhas de jamelão contenham compostos que causam repelência às formigas, mas sugerimos que forrageadoras alteram seu comportamento de forrageamento deixando os fragmentos das folhas secarem para em seguida o disponibilizarem ao fungo simbiote. Porém, experimentos futuros com folhas de jamelão frescas e secas seriam necessários para confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boaretto, M.A.C. (2000) *Seleção de substratos com potencial para uso em iscas granuladas para as saúvas Atta capiguara Gonçalves, 1944 e Atta bisphaerica Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) e isolamento do fungo simbiote*. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciência Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 161 p.
- Burd, M., Howard, J.J. (2005) Global optimization from suboptimal parts: Foraging sensu lato by leaf-cutting ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59 (2):234-242.
- Camargo R.S., Forti L.C., Matos C.A.O., Andrade A.P.P. (2004) Physical resistance as a criterion in the selection of foraging material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *Journal of Entomology and Nematology*, 128:5, 329-331.
- Camargo R.S., Forti L.C., Matos C.A.O., Lopes J.F., Andrade A.P.P., Ramos V.M. (2003) Post-selection and return of foraged material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 42:1, 93-102.
- Cherrett J.M. (1972) Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forest. *Journal of Animal Ecology*, 41, 647-660.

- Della Lúcia, T.M.C. (2003) Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: Fernández, F. (Ed.) *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 398 p.
- Diehl-Fleig, E. (1995) *Formigas: organização social e ecologia comportamental*. UNISINOS, São Leopoldo, 168 p.
- Dussutour A., Deneubourg J.L., Beshers S., Fourcassié V. (2009) Individual and collective problem-solving in a foraging context in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Anim Cogn*, 12: 21-30.
- Forti L.C., Andrade A.P.P. (1999) Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera, Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. *Naturalia*, 24: 61-63.
- Herz H., Holldobler B., Roces F. (2008) Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Behavioral Ecology* 19: 575-582.
- Hölldobler, B.; Wilson, E.O. (1990) *The ants*. Harvard University Press, Cambridge, Mass, 732 p.
- Howard, J.J., Grenn, T.P., Wiemer, D.F. (1989) Comparative deterrence of two terpenoids to two genera of attini ants. *Journal of Chemical Ecology* 15: 2279-2288.
- Howard, J.J. (1988) Leafcutting ant diet selection: relative influence of leaf chemistry and physical features. *Ecology*, 69, 250-260.
- Howard, J.J. (1987). Leafcutting ant diet selection: the role of nutrients, water and secondary chemistry. *Ecology*, 68: 503-515.
- Hubbell, S.P., Howard, J.J., Wiemer, D.F. (1984) Chemical repellency to an attini ant: seasonal distribution among potential host plant species. *Ecology*, 65: 1067-1076.
- Lapointe, S.L., Serrano, M.S., Corrales, I.J. (1996) Resistance to leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae) and inhibition of their fungal symbiont by tropical forage grasses. *J. Econ. Entomol.*, 3: 757-765.
- Laranjeiro, A.J., Zanúncio, J.C. (1995) Avaliação da Isca à Base de Sulfluramida no Controle de *Atta sexdens rubropilosa* pelo Processo Dosagem Única de Aplicação. *Nota Técnica IPEF* nº 48/49, 144 – 152.

- Little, A.E.F., Murakami, T., Mueller, U.G., Currie, C.R. (2006) Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biology Letters*, 2: 12-16.
- Littledyke M., Cherrett J.M. (1976) Direct ingestion of plant sap from cut leaves by leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bulletin of entomological research*, 66: 205-217.
- Marinho, C.G.S., Della Lucia, T.C.M., Picanço, M.C. (2006) Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. *Bahia Agrícola*, 7: 18-22.
- Michels K., Cromme N., Glatzle A., Schultz-Kraft R. (2001) Biological control of leaf-cutting ants using forage grasses: Nest characteristics and fungus growth. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 187: 259-267.
- Mudd, A., Bateman, G.L. (1979) Rates of growth of the food fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) on different substrates gathered by the ants. *Bull. Entomol. Res.*, 69: 141-148.
- Mueller, U.G., Currie, C.R., Adams, R.M.M., Malloch, D. (2001) The origin of the attine ant-fungus symbiosis. *The Quarterly Review of Biology* 76: 169-197.
- Mueller, U.G. (2002) Ant versus Fungus versus mutualism ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *The American Naturalist* 160: 568-598 pp.
- Nickele M.A., Pie M.R., Filho W.R., Penteado S.R.C. (2013) Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 73 (33): 53-72.
- Noronha Junior, N.C. (2006) *Interferência dos fatores físicos, químicos e do desenvolvimento do fungo simbiote de Atta sexdens rubropilosa Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) na seleção de substratos e localização da desfolha*. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas Câmpus de Botucatu, SP, 78 p.
- North R.D., Jackson C.W., Howse P.E. (1999) Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate choice of substrate for the fungus. *Physiological Entomology*. 24: 127-133.

- North, R.D., Jackson, C.W., Howse, P.E. (1997) Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Trends in Ecology & Evolution* 12: 386-389.
- Oliveira, M.F.S.S. (2006) *Controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) com produtos naturais*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Rio Claro – SP, Universidade Estadual Paulista – USP, 119 p.
- Oliveira, H.G., Lacerda, F.G., Marinho, C.G.S., Della Lucia, T.M.C. (2004) Atratividade de *Atta sexdens rubropilosa* por plantas de eucalipto atacadas previamente ou não por *Thyreoxena arnobia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 3, 285-287.
- Pagnocca, F.C. (1997) Microbiota associada aos ninhos de formigas cortadeiras. In: Encontro de Mimercolgia, 13, Anais, Ilhéus, BA, 24 p.
- Quinlan, R. J.; Cherrett, J. M. (1978) Aspects of the symbiosis of the leaf cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecological Entomology*, 3: 221-231.
- Ribeiro M.R.R., Marinho C.G.S. (2011) Seleção e forrageamento em formigas cortadeiras. In: Della Lucia T.M.C. (ed.) *Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo*. UFV, Viçosa, MG, 421 p.
- Ridley, P., Howse, P. E., Jackson, C. W. (1996) Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their 'symbiotic' fungus. *Experientia*, 52: 631-635.
- Roces F., Hölldobler B. (1994) Leaf density and a trade-off load-size selection and recruitment behaviour in the ant *Atta cephalotes*. *Oecologia*, 97: 1-8.
- Silva A. (2004) *Alfa-amilase e maltase nos simbiosites Leucoagaricus gongylophorus Singer (Möller) (Leucocoprineae: Agaricaceae) e Atta sexdens Linnaeus (Attini: Formicidae)*. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, SP, 77 p.
- Silva A., Bacci J.R. M., Siqueira C.G., Bueno O.C., Pagnocca F.C., Hebling M.J.A. (2003) Survival of *Atta sexdens rubropilosa* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology* 9: 307-313.
- Silva P. S. D., Bieber A. G. D., Knoch T. A., Tabarelli M., Leal I. R., Wirth R. (2013) Foraging in highly dynamic environments: leaf-cutting ants adjust foraging trail networks to pioneer plant availability. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 147: 110-119.

- Sugayama R. L., Salatino, A. (1997) Influence of rutin and quercetin on substrate selection by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Revista Brasileira de Biologia* 57: 121-125.
- Vasconcelos H.L., Cherrett J.M. (1996) The effect of wilting on the selection of leaves by the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 78:1, 215-220.
- Verza, S.S., Forti, L.C., Matos, C.A.O., Garcia M.G., Nagamoto, N.S. (2006) Attractiveness of Citrus Pulp and Orange Albedo Extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 47: 2, 391-399.