

MARIA RAQUEL FELLET GUIMARÃES

POLIETISMO E EXPECTATIVA DE VIDA EM OPERÁRIAS DE *Atta
laevigata*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

MARIA RAQUEL FELLET GUIMARÃES

POLIETISMO E EXPECTATIVA DE VIDA EM OPERÁRIAS DE *Atta laevigata*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de fevereiro de 2010.

Prof. Cristiano Lopes-Andrade

Dr. Danival José de Souza

Prof. Robert Weingart Barreto

Prof^a. Terezinha M.C. Della Lucia
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Simon Luke Elloit
(Orientador)

DEDICO ESSA CONQUISTA À MINHA MÃE, AO MEU PAI E AO MEU IRMÃO.

AGRADECIMENTOS

À Deus que se fez presente em todos momentos e fez com que a jornada fosse mais tranqüila.

À minha mãe, Cristina, o incentivo, a dedicação, a amizade, os conselhos, enfim, o amor incessante.

Ao meu pai, César, a torcida, a admiração, o apoio e o amor.

Ao meu irmão, Luiz Fernando, a torcida, o incentivo, a amizade e o amor.

À minha família que esteve sempre torcendo por mim em cada etapa da vida, em especial, Tia Ana Maria, Tio Carlos Alberto e Ana Elisa.

Aos amigos de Viçosa a companhia na alegria e na tristeza, os estudos, as farras, enfim, por me fazerem adorar Viçosa, em especial, Antônia, Alex, Aline, Claudinei, Daniel, Eduardo, Elisangela, Felipe, Lívia, Luiza, Marcelo, Poul, Rafael, Raquel, Silma, Sílvia e Vinícius.

Aos amigos de Belo Horizonte a amizade, o incentivo, a torcida organizada e as bagunças, em especial, Bruna, Bruninho, Esther e Jujú, Felipe, Ga, Jú, Laurinha, Lú, Marcão, Marcela, Mirella e Paty.

Às minhas cadelas, parte da minha família, que sempre me deram tantas alegrias.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) a oportunidade, a concessão do espaço físico e a importância como instituição de ensino em nível mundial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia a competência e a disponibilidade dos funcionários e professores.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) a concessão da bolsa de estudo e o apoio financeiro ao projeto no. número APQ-0652-5.03/07.

Ao meu orientador e professor da UFV, Sam Elliot os incentivos que se iniciaram antes mesmo de minha aprovação no mestrado, os ensinamentos gerais que me fará

uma melhor profissional, por me mostrar que é possível fazer muitas atividades simultâneas e por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava.

À minha co-orientadora Terezinha Maria Castro Della Lucia a orientação, a disponibilidade de espaço físico para execução dos experimentos e o carinho.

Ao meu co-orientador Arne Janssen as sugestões, as colaborações e os auxílios indispensáveis.

Aos membros da banca, Cristiano, Danival, Robert e Terezinha, a disponibilidade e as contribuições.

Aos professores da UFV os ensinamentos.

Aos professores que tive ao longo de minha vida, principalmente os de Ciências que tanto me inspiraram e estimularam à escolha da Biologia e a seguir a carreira acadêmica.

Aos colegas e estagiários da Entomologia da UFV o auxílio e a boa convivência.

Aos meus ex-orientadores da Embrapa Milho e Sorgo, Fernando Hercos Valicente e Ivan Cruz, o incentivo à pesquisa e por me ensinarem a enxergar as oportunidades.

Aos meus amigos da Embrapa Milho e Sorgo por me ensinarem a trabalhar em equipe e pela diversão até durante o trabalho, em especial, Edmar e Rafael Pena.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da UFV, Dona Paula e Miriam os esclarecimentos, as lembranças de prazos e os auxílios indispensáveis.

Ao Seu Manoel por me ajudar em tantas situações de “desespero”, principalmente nas coletas das formigas no campo e laboratório e a atenção e carinho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista.

BIOGRAFIA

MARIA RAQUEL FELLET GUIMARÃES Filha de Maria Cristina Fellet e César Fernando Rodrigues Guimarães e irmã de Luiz Fernando Fellet Guimarães. Nasceu em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil, no dia 13 de junho de 1983.

Graduou-se em Ciências Biológicas, em 13 de julho de 2006, obtendo o título de Bacharel Licenciada, pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas), em Belo Horizonte.

Desenvolveu estágio na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Milho e Sorgo), em Sete Lagoas, Minas Gerais, como bolsista de iniciação científica (PIBIC-CNPq), de agosto de 2004 a dezembro de 2007, atuando, principalmente, no controle biológico de pragas.

Em março de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, onde desenvolveu a dissertação intitulada Polietismo etário, risco de doença e tempo de vida em formigas cortadeiras, defendendo a dissertação em 12 de fevereiro de 2010.

Em março de 2010, iniciará um novo capítulo de sua história: o doutorado em Ciências da Saúde, ênfase em Doenças Infecciosas e Parasitárias, no Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz em Belo Horizonte.

Índice

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO	1
DIVISÃO DE TRABALHO - POLIETISMO EM INSETOS SOCIAIS.....	5
FORMIGAS CORTADEIRAS	8
ORGANIZAÇÃO SOCIAL DAS FORMIGAS CORTADEIRAS	10
VIDA EM GRUPO – RISCO DE DOENÇA	11
CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS E OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	13
MODELO ESTEIRA.....	17
METODOLOGIA	20
COLETA DE FORMIGAS NO CAMPO	20
OBTENÇÃO DE FORMIGAS EM LABORATÓRIO.....	20
MORTALIDADE DE FORMIGAS NAS 24 HORAS PÓS-COLETA.....	21
MEDIÇÃO DAS CÁPSULAS CEFÁLICAS	21
PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FUNGO	22
INOCULAÇÃO DAS FORMIGAS DE CAMPO E LABORATÓRIO	23
RESULTADOS.....	24
EXPERIMENTO COM FORMIGAS DE CAMPO.....	24
EXPERIMENTO COM FORMIGAS DE LABORATÓRIO	26
DISCUSSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

GUIMARÃES, Maria Raquel Fellet, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Polietismo e Expectativa de Vida em Operárias de *Atta laevigata*.** Orientador: Simon Luke Elliot. Co-orientadores: Terezinha Maria Castro Della Lucia e Arnoldus Rudolf Maria Janssen.

O polietismo etário é a mudança nas atividades exercidas pelos membros de uma colônia ao longo da sua vida. Os indivíduos mais velhos teriam menor valor futuro para a colônia, seria então melhor se realizassem tarefas fora do ninho e não retornassem ao interior do mesmo. Isso diminuiria o risco de trazerem patógenos para dentro da colônia, o que consequentemente, aumentaria a expectativa de vida da colônia. A primeira hipótese desse trabalho é que as operárias de fora do ninho de formigas cortadeiras morrem antes das de dentro sugerindo que sejam mais velhas. Uma hipótese alternativa é que as formigas que forrageiam são operárias mais fracas, previamente escolhidas pela colônia, para realizarem tarefas mais perigosas, já que as perdas das mesmas não acarretariam tantos prejuízos. Para testá-las, operárias de dentro e fora do ninho da formiga cortadeira *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) foram coletadas de ninhos no campo (Viçosa, Minas Gerais, Brasil) e também de colônias provenientes de laboratório. Formigas de mesmo tamanho foram individualizadas em placas de Petri e supridas com água e solução de mel 1:1. Para testar a segunda hipótese, formigas foram inoculadas com o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., com objetivo de comparar a sobrevivência dessas com formigas controle. As operárias de fora morreram antes das de dentro tanto no experimento de campo quanto no de laboratório. Isto sugere que sejam mais velhas, apoiando a primeira hipótese, que essa espécie utilize o polietismo dependente da idade. No experimento com formigas do campo, não houve diferença nas curvas de sobrevivência das de fora do ninho, inoculadas ou não; mas com as formigas de laboratório houve. O primeiro experimento indica que as formigas externas não são previamente mais fracas, mas o segundo indica que sim. Isso pode ter ocorrido pela diferença entre as condições naturais (onde têm mais contato com patógenos e indivíduos mais suscetíveis seriam eliminados) e as condições de laboratório (menos patógenos). Esse estudo foi o primeiro passo para se testar o modelo esteira de Schmid-Hempel. Estudos adicionais serão importantes para entender os mecanismos, extrínsecos e intrínsecos, mediadores das mudanças nas atividades internas ao ninho para atividades externas, com a passagem da idade.

ABSTRACT

GUIMARÃES, Maria Raquel Fellet, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Polyethism and Lifespan in *Atta laevigata* Workers.** Adviser: Simon Luke Elliot. Co-advisers: Terezinha Maria Castro Della Lucia and Arnoldus Rudolf Maria Janssen.

Age polyethism is the change in activities carried out by members of a colony during its life. Older individuals have lower future value to the colony, so it would be better for the colony if they could perform more dangerous tasks outside the nest and not return to its interior. Thus, the risk of bringing pathogens into the colony is reduced, protecting internal individuals and thereby increasing the life expectancy of the colony. The first hypothesis of this study is that external ants are older than internal ones and therefore die earlier. A complementary hypothesis is that external workers are weaker, having been previously selected by the colony to carry out dangerous tasks, since the losses would be less prejudicial to the colony. To test these hypotheses, internal and external workers of the leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) were collected from nests in the field (Viçosa, Minas Gerais State, Brazil) and also from laboratory colonies. Ants of the same size were placed individually in Petri dishes and supplied with water and honey solution 1:1. To test the second hypothesis, ants were inoculated with the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill to compare their survival to controls. In both the field and laboratory experiments, the external workers died before the gardeners, suggesting that they are older, supporting the first hypothesis, that this species use age-dependent polyethism. In the experiment with ants from the field, there was no difference in the survival curves of external ants, inoculated or not. There was a difference in the laboratory ants. The first experiment indicates that external workers are not previously weaker, but the second suggests they are. This could be the difference between natural conditions (where they have more contact with pathogens so more susceptible individuals may be eliminated) and laboratory conditions (less pathogens). This study is the first step to test the conveyor belt model of Schmid-Hempel. Additional studies will be important to understand the intrinsic and extrinsic mechanisms mediating progression from internal to external activities, during aging.

INTRODUÇÃO

Para os insetos, assim como para outros grupos de organismos, a vida em grupo tem muitos benefícios em relação ao estilo de vida solitário. Para insetos sociais cooperação entre os indivíduos pode aumentar a eficiência das atividades de forrageamento, defesas e cuidado com a rainha e a prole (Wilson, 1971; Cremer et al., 2007). Por outro lado, em insetos sociais que vivem em grupo espera-se que eles sejam mais suscetíveis aos patógenos devido às elevadas densidades populacionais e alta frequência de contato entre os indivíduos, além do alto grau de parentesco (Alexander, 1974; Schmid-Hempel, 1998; Hughes et al., 2004).

Como em outros insetos sociais, as formigas cortadeiras são eficientes em reconhecerem materiais potencialmente nocivos às colônias. Elas apresentam defesas comportamentais que neutralizam ou minimizam os efeitos danosos de parasitas e patógenos. Podem, por exemplo, evitar o patógeno; a lambedura de si mesma, das irmãs, das folhas e do jardim de fungos, com finalidade higiênica e a retirada de resíduos dos ninhos (Diehl-Fleig & Lucchese, 1991; Boomsma et al., 2005; Chapuisat et al., 2007; Fernandez-Marin et al., 2006). Entretanto, a lambedura entre coespecíficas pode protegê-las mas, ao mesmo tempo, ser uma desvantagem, pois pode fazer com que uma operária infectada infecte outra sadia. Além disso, poderiam teoricamente se proteger por viverem em grupo como propõe a hipótese da Profilaxia Densidade Dependente (PDD).

Entretanto, Pie et al. (2005), estudando cupins, encontraram pouco suporte nessa hipótese. De acordo com Elliot & Hart (2010), como as formigas mudam de atividades mais seguras para outras mais perigosas com o passar da idade, as interações entre os indivíduos provavelmente exercem um papel mais importante no risco de adquirirem doenças do que a densidade de indivíduos em si. Mas se a interação entre indivíduos infectados e suscetíveis juntamente com a PDD levarem a maiores chances de adquirirem doença, então seria esperado um maior investimento em defesas imunológicas.

O polietismo etário, ou seja, a transição de tarefas com o passar da idade é uma das mais elaboradas formas de divisão de trabalho nos insetos sociais (Wilson, 1985a). De acordo com Hölldobler & Wilson (1990), cada espécie tem seu próprio padrão de polietismo temporal. Na maioria dos Hymenoptera sociais, os indivíduos jovens realizam tarefas mais críticas para a segurança da colônia, como cuidado com a rainha e com as formas imaturas, no centro do ninho, e os indivíduos mais velhos trabalham na periferia ou externamente ao ninho, realizando tarefas como o forrageamento (Hölldobler & Wilson, 1990).

O polietismo etário já é bem conhecido em abelhas (Lindauer, 1953; Seeley & Kolmes, 1991; Robinson, 1994; Huang & Robinson, 1996), onde ocorrem mudanças comportamentais com a idade. Em operárias, é associado a mudanças fisiológicas, com a ativação e regressão das glândulas endócrinas, modificações na produção de feromônios e em resposta aos estímulos relacionados aos desempenhos de tarefas (revisado em Robinson, 1992; Gracioli-Vitti et al., 2004). Em formigas cortadeiras sabe-se muito pouco sobre a dinâmica do polietismo etário. Os trabalhos publicados sobre esses organismos são pouco conclusivos e isso, aumenta a importância de se testar hipóteses que explicariam e auxiliariam num maior entendimento do polietismo etário nesse grupo. Se, de fato esses organismos utilizam o polietismo etário, então as operárias forrageadoras deveriam ser mais velhas e, portanto, ter uma menor expectativa de vida. Em decorrência, deveriam também ser menos resistentes a fatores de estresse como, por exemplo, doenças. Uma das maneiras de se testar a idade e a resistência de indivíduos é sujeitando-os aos fatores de estresse. Sabe-se que as doenças são fatores de estresse que afetam mais os indivíduos mais fracos. É possível que a infecção por patógenos ocorra de maneira diferente entre as castas, já que essas devem mudar ao longo de seu envelhecimento.

As formigas cortadeiras são as principais pragas em áreas de reflorestamento nos neotrópicos. O principal método utilizado para o controle dessas pragas é o controle

químico, com a utilização de pós-secos, termonebulização e iscas tóxicas (Della Lucia, 2003). As normas prescritas pela Forest Steward Council (2002), dizem que os gestores florestais devem adotar medidas de controle de pragas que causem menos danos ao meio ambiente e devem buscar controlar as pragas sem a utilização de inseticidas químicos e/ou demonstrarem esforços para alcançar esses objetivos. As empresas de reflorestamento vêm buscando técnicas alternativas de controle de formigas cortadeiras para substituição do controle químico, principalmente devido às questões econômicas, normativas e ambientais.

O estudo da dinâmica patógeno-formigas poderá fazer com que esses insetos sejam controlados e/ou preservados. Se, de fato, como se supõe as formigas cortadeiras que realizam tarefas fora da colônia forem indivíduos mais velhos em uma colônia que atuam como forrageadoras. Sendo que, quando jovens realizavam tarefas internas no ninho e com o passar da idade passaram a atividades externas, não retornando a áreas mais importantes da colônia, às câmaras de fungo e berçário. A utilização, por exemplo, de iscas tóxicas poderia não ser uma boa alternativa de controle. Se as formigas de fora não entram nas áreas alvo para o produto, talvez antes das iscas atingi-las, elas sejam eliminadas pelas operárias lixeiras. No entanto, iscas têm sido um meio eficiente no controle de formigas cortadeiras.

Schmid-Hempel (1998) fez uma analogia do polietismo etário a uma linha de montagem ou esteira em uma indústria. Nesse modelo, os operários, ao emergirem, entrariam na “esteira” de um lado, com tarefas como cuidar da rainha (e rei, no caso de cupins) e da prole, no centro do ninho. Com o passar da idade, o valor desses indivíduos para a colônia diminui e eles têm mais chance de adquirirem infecção. Os operários passariam com a idade para a outra posição na “esteira” com tarefas mais perigosas e concentradas na periferia do ninho, particularmente o forrageamento e a defesa da colônia, e não retornariam às áreas mais sensíveis da colônia, como o jardim de fungos e o

berçário, saindo da esteira com a morte. Dessa maneira, os indivíduos que realizam tarefas externas ao ninho não trariam possíveis patógenos às áreas mais importantes da colônia, preservando, dessa forma, as formas imaturas, as operárias mais jovens e, principalmente, a rainha, o que contribuiria para o aumento do valor adaptativo da colônia. O polietismo etário poderia constituir então, uma possível estratégia de defesa comportamental contra os patógenos que ameaçam a colônia.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se formigas cortadeiras, utilizando-se a espécie *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) como modelo, conformam com o modelo esteira do polietismo etário.

A primeira hipótese é que as formigas cortadeiras que realizam tarefas fora do ninho morreriam mais rápido que as que realizam dentro, por se encontrarem no final da esteira. A hipótese complementar é que em situação de estresse, neste caso, a presença de um patógeno, o fungo *B. bassiana*, formigas de fora inoculadas morram ainda mais rapidamente que as de dentro inoculadas, o que sugere que sejam mais fracas e consequentemente mais suscetíveis. Sabe-se que uma infecção causa danos ao hospedeiro e diminui a expectativa de vida dos mesmos. Para testar essa hipótese foram realizados experimentos com formigas coletadas no jardim de fungos e com formigas forrageando em colônias de campo e de laboratório.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DIVISÃO DE TRABALHO - POLIETISMO EM INSETOS SOCIAIS

O polietismo está entre os aspectos fundamentais na evolução das colônias de insetos sociais (Hinze & Leuthold, 1999), é a divisão de trabalhos entre os membros de uma sociedade (Wilson, 1980). Essa divisão de trabalho proporciona a diminuição de repertórios comportamentais de um único indivíduo (Hinze & Leuthold, 1999). O polietismo pode ser etário, em função da idade e da experiência individual, físico em decorrência da morfologia e do tamanho (Diehl-Fleig, 1994), ou a combinação desses (Hinze & Leuthold, 1999).

Em algumas subcastas de operárias, em cupins e nas de algumas formigas, ocorre o polietismo morfológico (Oster & Wilson, 1978; Beshers & Fewell, 2001), mas existem poucos trabalhos publicados em cupins relacionados ao polietismo (Crossland et al., 1997; Hinze & Leuthold, 1999). As mais visíveis especializações morfológicas em insetos sociais é para defesa, como o que ocorre em soldados e operárias maiores, que possuem mandíbulas mais fortes para defesa contra possíveis invasores e forrageamento, mas podem ocorrer especializações também para o processamento e estoque do alimento (Holldobler & Wilson, 1990; Beshers & Fewell, 2001).

A hipótese do tamanho e idade dos indivíduos como importantes determinantes no desempenho de tarefas é a chave para a eficiência das colônias de insetos sociais. (Holldobler & Wilson, 1990; Schmid-Hempel, 1991; Naug & Gadagkar, 1999; Johnson, 2002; Johnson, 2005; Seid & Traniello, 2006). Seid & Traniello (2006), estudando operárias pequenas de *Pheidole dentata* Mayr (Hymenoptera: Formicidae), encontraram que o repertório de tarefas aumenta à medida que as operárias menores ficam maduras, um mecanismo de organização de tarefas não incluído em trabalhos anteriores de polietismo temporal, ou etário, em insetos sociais. Eles perceberam que operárias pequenas mais velhas tinham maior número e frequência de tarefas

comparadas às mais novas e propuseram que as operárias mais velhas poderiam ter capacidades sensoriais que permitiriam a elas responderem a maior número de tarefas.

O polietismo etário é comum nos insetos sociais, como abelhas, cupins, formigas e vespas (Wilson, 1971; Hölldobler & Wilson, 1990; Robinson, 1992) e está relacionado com o aumento dos riscos de mortalidade em atividades externas, forrageamento e defesa do ninho por indivíduos mais velhos. Operárias que realizam tarefas de risco mais tardiamente aumentam a expectativa de vida das operárias jovens que trabalham em atividades internas na colônia (Wakano et al., 1998; Tofilski, 2006; Moron et al., 2008). Ao aumentar a longevidade das operárias, aumenta-se o valor adaptativo da colônia (Schmid-Hempel, 1987; Schmid-Hempel & Wolf, 1988; Woyciechowski & Kozłowski, 1998; Moron et al., 2008). O polietismo etário é centrífugo, ou seja, as operárias dos insetos sociais iniciam a vida com tarefas, como cuidado com a rainha e com os imaturos no centro do ninho e depois se deslocam para a periferia da colônia ou fora do mesmo, com funções como, guardiões da colônia e forrageadores (Wilson, 1985b; Hölldobler & Wilson, 1990). Na maioria dos insetos sociais, dentro dos Hymenoptera estudados até hoje, esse padrão ocorre e sugere que quando as operárias são jovens e com alto valor reprodutivo, se mantêm protegidas no centro do ninho para fazerem posturas de ovos. Com o passar da idade, com o declínio do valor reprodutivo e com a morte tendo menos custo, a melhor estratégia para essa operária seria ajudar na defesa e forrageamento. Isso se aplica para espécies que possuem operárias reprodutivas, mas não para as espécies com operárias estéreis, a não ser que isso seja apenas uma arquiomorfia, ou seja, uma plesiomorfia antiga (Bourke, 1988).

As formigas cortadeiras apresentam polimorfismo e polietismo etário, ou seja, indivíduos morfologicamente diferentes que desempenham distintas tarefas ou sequência de atos comportamentais na colônia de acordo com a idade (Della Lucia et

al., 1993b). Segundo Wilson (1985a), o conjunto de membros de uma colônia que se especializam em tarefas particulares por um período de tempo denomina-se casta. A divisão de trabalho entre as castas de operárias é encontrada em quase todos os insetos sociais (Oster & Wilson, 1978; Robinson, 1992) e, é considerado um dos principais fatores do sucesso ecológico dos mesmos (Wilson, 1985b; Robinson, 1992; Bourke & Franks, 1995; Beshers & Fewell, 2001; Kay & Rissing, 2005).

Numa colônia de insetos eussociais, há uma divisão do trabalho entre as castas femininas, sendo a rainha responsável pela postura e ficando para as operárias todas as outras tarefas da colônia. Em abelhas, a divisão de trabalho está baseada na capacitação do indivíduo em exercer determinada tarefa. O polietismo nesse grupo é bem conhecido (Lindauer, 1953; Seeley & Kolmes, 1991; Robinson et al. 1994; Huang & Robinson, 1996). A mudança comportamental que ocorre com a idade, em operárias, é associada com mudanças fisiológicas, que incluem ativação e regressão das glândulas endócrinas, mudanças na produção de feromônios e mudanças em resposta aos estímulos relacionados às performances de tarefas (revisado em Robinson, 1992; Gracioli-Vitti et al., 2004). À medida que vão ficando mais velhas, as operárias de abelhas vão trocando de tarefas dentro do ninho para tarefas fora do ninho (Robinson et al., 1994; Gordon et al., 2005). Dentre as modificações que ocorrem nessa transição de tarefas, um exemplo, está a redução da atividade das glândulas hipofaríngeas e de cera que eram bastante importantes em tarefas dentro do ninho, enquanto há um aumento na atividade das glândulas labiais para a realização do forrageamento, modificação que ocorre num período de aproximadamente duas semanas. Em vespas eussociais primitivas, da espécie *Polistes dominulus* (Christ), sabe-se que o hormônio juvenil acelera a mudança de atividades dentro do ninho para o forrageamento (Shorter & Tibbetts, 2009). Os insetos da ordem Hymenoptera possuem desenvolvimento por holometabolia, em que os adultos não crescem mais e podem ser de diferentes tamanhos e da mesma idade ou

de mesmo tamanho e idades diferentes. Diferentemente, em Isoptera, um grupo filogeneticamente não relacionado com Hymenoptera, em cupins basais, a idade e o tamanho são interligados e foram encontrados cupins pequenos mais jovens, cupins médios com idade intermediária e grandes, mais velhos (Crosland et al., 1997). Ao estudar o cupim *Macrotermes bellicosus* (Smeathman), Hinze & Leuthold (1999), encontraram uma clara mudança nas tarefas realizadas dentro no ninho para as fora do ninho com o aumento da idade. Garnier-Sillam (1983) também encontrou mudanças nas atividades em operários de *Reticulitermes lucifugus* Rossi (Isoptera: Rhinotermitidae) com o passar da idade. Por outro lado, em cupins basais onde os recursos são próximos ao ninho, o polietismo etário não ocorre (Rosengaus & Traniello, 1993; Crosland et al., 1997; Traniello & Rosengaus, 1997). Os princípios do polietismo idade-dependente foram descritos em formigas por Wilson (1980) e por Hölldobler & Wilson (1990). Em formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex versicolor* (Pergande) e na abelha *Apis mellifera* Linnaeus, a idade de início do forrageamento suporta a hipótese de que há um efeito genético no polietismo etário (Julian & Fewell, 2004; Calderone & Page, 1988, respectivamente).

FORMIGAS CORTADEIRAS

As formigas cortadeiras de folhas são abundantes e são encontradas na maioria dos habitats naturais ou seminaturais nos Neotrópicos (Beattie & Hughes, 2002). São pertencentes à ordem Hymenoptera, família Formicidae, subfamília Myrmicinae e tribo Attini. Estão organizadas em doze gêneros (*sensu* North et al., 1998) que ocorrem na América Central e do Sul e no México (Wilson, 1971). As saúvas, pertencentes ao gênero *Atta* e as quenquéns, pertencentes ao gênero *Acromyrmex*, são conhecidas pela sua abundância, tanto em densidade de colônias quanto ao número elevado de indivíduos por colônia, chegando a milhões no caso de *Atta*. A diversidade e

abundância de *Atta* e *Acromyrmex* são maiores entre latitudes 20° e 30° Sul (Fowler & Claver, 1991). No estado de Minas Gerais (que fica nesse intervalo de latitude) possui quatro espécies de *Atta* (*Atta bisphaerica* Forel, *Atta capiguara* Gonçalves, *Atta laevigata* F. Smith e *Atta sexdens rubropilosa* Forel) e onze de *Acromyrmex* (*Acromyrmex coronatus* Fabricius, *Acromyrmex landolti* Emery, *Acromyrmex laticeps* Forel, *Acromyrmex níger* F. Smith, *Acromyrmex rugosus* F. Smith, *Acromyrmex multicinodus* Forel, *Acromyrmex subterraneus molestans* Santschi, *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, *Acromyrmex crassipinus* Forel, *Acromyrmex aspersus* F. Smith, *Acromyrmex disciger*) descritas (Della Lucia et al., 1993b).

As formigas cortadeiras forrageiam em uma variedade de substratos. Causam desfolha em vários tipos de plantas, como eucalipto, gramíneas e plantas nativas (Zanuncio et al., 2002; Zanetti et al., 2008). Utilizam as folhas para o cultivo de um micélio vegetativo do fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Möller, 1893). O fungo produz estruturas especializadas ricas em proteínas que fornecem nutrientes essenciais às larvas (Quinlan & Cherrett, 1979) e operárias (Silva et al., 2006; Weber *apud* Pagnocca, 2008), enquanto as formigas fornecem plantas como substratos para crescimento da colônia fúngica e protegem-na de micófagos e micoparasitas (Currie, 2001; Muller, 2002). As formigas cortadeiras desempenham funções ecológicas fundamentais nos ambientes onde ocorrem, pois recolhem e degradam materiais vegetais, auxiliam na aeração, e conseqüentemente, na drenagem do solo, e também participam da reciclagem de nutrientes do mesmo (Hölldobler & Wilson, 1990; Farji-Brener & Ghermandi, 2004). São também de grande importância econômica, como pragas na agricultura, em pastagens, e principalmente na silvicultura. Têm ampla distribuição geográfica e possuem grande voracidade no ataque às plantas (Della Lucia & Araújo, 2000). O controle das formigas cortadeiras tem sido feito há décadas por utilização de grandes quantidades de inseticidas, que além de serem

métodos onerosos, causam danos ao meio ambiente. Muitas pesquisas buscam novas alternativas de controle, como a utilização de agentes de controle biológico (Jaccoud et al., 1999).

ORGANIZAÇÃO SOCIAL DAS FORMIGAS CORTADEIRAS

As formigas cortadeiras vivem em formigueiros subterrâneos e possuem uma organização típica, com poucas diferenças interespecíficas em seus modos de vida. A espécie *A. laevigata*, também chamada de saúva-de-vidro, ou saúva cabeça de vidro, pode ser considerada a segunda espécie mais comum no Brasil, tendo ampla distribuição ao longo dos estados. Possui saúveiros, ou ninhos, arredondados com olheiros que se abrem diretamente ao nível da terra solta (Anjos et al., 1998, Zanuncio et al., 1999). A espécie foi escolhida como modelo para as experimentações, por ser facilmente encontrada abundantemente onde foi realizado o presente estudo.

As formigas de um mesmo formigueiro são todas filhas de uma única rainha (em colônias monogínicas), caso da espécie alvo desse estudo e são, portanto, irmãs e já emergem da pupa com tamanho fixo. (Gordon, 2002). Entretanto, as rainhas do gênero *Atta* são poliândricas, ou seja, copulam normalmente com mais de um macho, chegando a três ou até mais (Fjerdingstad & Boomsma, 2000). Alguns autores encontraram resultados que sugerem que as rainhas podem se beneficiar da poliandria, que reduz o grau de parentesco entre membros da colônia, sendo a força motriz da evolução e manutenção do comportamento social (Hamilton, 1964), já que ao produzir colônias geneticamente mais diversas essas seriam mais resistentes a adversidades, tais como, doenças. Os suportes para essa hipótese, de que as rainhas podem se beneficiar da poliandria foram encontrados em abelhas e formigas (Schmid-Hempel, 1991; Shykoff & Schmid-Hempel, 1991; Palmer & Oldroyd, 2000; Hughes & Boomsma, 2004) e

poderia explicar também a ocorrência da poliandria em *A. laevigata*, espécie aqui estudada.

A divisão de trabalho pode ser organizada em dois grupos principais, as operárias que cuidam da rainha e da prole e operárias forrageadoras (Peixoto et al., 2008), esse padrão pode ser observado também em formigas não cortadeiras. King & Trager (2007) observaram em laboratório formigas não cortadeiras, de três espécies do gênero *Formica* (*Formica archboldi* F. Smith, *F. dolosa* Buren e *F. pallidefulva* Latreille) e três subespécies de *Polyergus lucidus* Mayr. Perceberam que operárias jovens de todas essas espécies tendem a estar próximas da rainha e de imaturos, enquanto operárias mais velhas tendem a se localizarem na periferia do ninho, perto da entrada ou forrageando, o que sugere um sistema de operárias com tarefas temporárias e apoia o polietismo etário.

Como as colônias de formigas são entidades biológicas dinâmicas, o tamanho e a estrutura da população de operárias se modificam o tempo todo (quantidade de ovos, larvas, pupas e adultos). Essas mudanças estão associadas com a fase de desenvolvimento da colônia, a época do ano, os recursos alimentares, a pressão de predadores, parasitas e competidores e das condições climáticas (Oster & Wilson, 1978; Robinson, 1992). Outro fator que pode modificar a dinâmica de uma colônia é o risco de adquirirem doenças infecciosas, que podem ocasionar morbidade e mortalidade em populações naturais e podem ser importantes fatores de seleção, promovendo a evolução de sociedades (Schmid-Hempel, 1998; Fernández-Marín et al., 2007).

VIDA EM GRUPO – RISCO DE DOENÇA

A vida de indivíduos em grupo tem muitos benefícios quando comparado ao estilo de vida solitário. A eficiência no cuidado com a prole, forrageamento ou defesas contra inimigos naturais podem aumentar com a cooperação (Wilson, 1971; Cremer et al.,

2007). Mas, por outro lado, espera-se que insetos sociais sejam mais suscetíveis ao ataque de patógenos devido ao estilo de vida de grupo, com elevadas densidades e taxa de interações, e alto grau de parentesco entre os indivíduos (Alexander, 1974; Schmid-Hempel, 1998; Hughes et al., 2004). Apesar da abundância e diversidade de patógenos e parasitas potencialmente capazes de atacá-los, há relativamente poucos exemplos relevantes para os insetos sociais (Schmid-Hempel, 1998). Pode ser que os insetos ao perceberem a presença do parasita, reduzam as interações coespecíficas (Wilson et al., 2003), ou se defendam, devido ao estilo de vida em grupo, por exemplo, com a Profilaxia Densidade Dependente (PDD), que relaciona a densidade de indivíduos com o investimento em defesa. O termo PDD (Wilson & Reeson, 1998), é utilizado em situações em que a resistência a doenças aumenta com o aumento na densidade de insetos. Entre os insetos que demonstram tal tipo de resposta, densidades altas freqüentemente parecem estar associadas com outras características como melanização cuticular, tamanho pequeno e rápido desenvolvimento (Wilson et al., 2001). Insetos que vivem em altas densidades populacionais poderiam apresentar mais investimentos relativos à resistência do que aqueles que vivem em baixas densidades. (Reeson et al., 1998; Barnes & Siva-Jothy, 2000; Wilson et al., 2002; Hughes et al., 2004), apesar de estudos em insetos sociais terem dado pouco suporte a PDD (Pie et al., 2005). Pode ser, ainda, que as formigas apresentem comportamentos e/ou defesas antimicrobianas no grupo contra possíveis doenças (Hughes et al., 2002; Traniello et al., 2002). Sabe-se, por exemplo, que formigas de 26 espécies e cinco subfamílias movimentam as pernas nas aberturas das glândulas metapleurais (que secretam substâncias antimicrobianas) para se protegerem de microrganismos patogênicos. Na ausência de infecções fúngicas a taxa de lambedura das glândulas metapleurais diminui e as operárias se lambem após contato com a glândula (Fernandez-Marin et al., 2006). As formigas cortadeiras apresentam comportamentos de defesas para neutralizar ou minimizar os efeitos

danosos de parasitas e patógenos, tais como, evitar o patógeno; a lambedura de si mesma, das coespecíficas, das folhas e do jardim de fungos, com finalidade higiênica e a retirada de resíduos dos ninhos, como por exemplo, possíveis esporos de fungos (Diehl-Fleig & Lucchese, 1991; Giorgi et al., 2001; Boomsma et al., 2005; Fernandez-Marin et al., 2006; Chapuisat et al., 2007). No entanto, a lambedura entre operárias, pode ser desvantagem, pois pode fazer com que uma operária infectada infecte sua irmã sadia. Em formigas que desempenham tarefas mais perigosas, como o forrageamento, com o passar da idade, as interações comportamentais talvez sejam fatores mais importantes que a densidade em si, em determinar o risco de adquirir doenças (Elliot & Hart, 2010).

A infecção tem um impacto no hospedeiro que depende tanto da patogenicidade quanto da interação entre a infecção e outros fatores intrínsecos e extrínsecos, como temperatura, umidade, nutrição, confinamento e estresse do hospedeiro (Esch, 1975; Scott, 1988). Segundo Holmes (1996) diante de uma situação de estresse, o indivíduo fica mais suscetível às doenças. Há uma crescente evidência de que, ao se aumentar o nível de estresse, se aumente também as chances de infecções, dependendo do organismo.

CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS E OS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

As formigas cortadeiras são as principais pragas em áreas de reflorestamento nos neotrópicos. O principal método de controle dessas pragas é o controle químico utilizando-se principalmente de pós-secos, termonebulização (Couto et al., 1978) e iscas tóxicas (Della Lucia, 2003). Os pós-secos consistem em um pó contendo o princípio ativo, talco como inerte e são aplicados com polvilhadeiras. A termonebulização consiste na utilização de um gás para o controle de formigas cortadeiras. A técnica é muito eficaz, mas exige mão de obra especializada, tem periculosidade para o aplicador,

é danosa ao meio ambiente e tem um custo elevado (Anjos et al., 1993). As iscas granuladas compreendem uma mistura de um princípio ativo tóxico, sobretudo as sulfuramidas, o fipronil e os organofosforados em um substrato atrativo (Della Lucia, 2003), sendo que a utilização da sulfuramida está limitada aos próximos cinco anos. As iscas são consideradas eficientes, práticas e econômicas, além de oferecerem maior segurança ao operador, dispensarem mão-de-obra e equipamentos especializados (Anjos et al., 1993).

A Forest Stewardship Council (FSC) (2002) é uma organização sem fins lucrativos que apoia a gestão ambiental adequada e economicamente viável das florestas do mundo. De acordo com as normas prescritas pela FSC, esses gestores têm o dever de controlar as pragas sem a utilização de pesticidas químicos e/ou demonstrarem seus esforços para alcançar esses objetivos. A redução gradativa do uso de controle químico pode ser um bom caminho para atingir esse objetivo. Todo esse planejamento deve ser expresso em estratégias e em documentos. Normas regionais devem orientar os gestores, dependendo do caso, sobre a redução e até a eliminação dos químicos.

Devido às questões econômicas, normativas (proibição de alguns inseticidas) e ambientais, as empresas de reflorestamento vêm buscando novas técnicas e alternativas de controle de formigas cortadeiras para substituição do controle químico. Com isso, tem aumentado o interesse e o número de estudos em áreas como o controle biológico, principalmente com a utilização de microrganismos (Boaretto & Forti, 1997).

Alguns microrganismos, bactérias, vírus, nematóides e fungos, vêm sendo utilizados no controle de insetos de importância médica, veterinária, agrícola e silvicultural. Dentre esses, os fungos se destacam por serem os que ocorrem com maior frequência atacando insetos (Silva, 2001). Os fungos são organismos de tamanho e formas variáveis. Podem ser unicelulares, como no caso de leveduras, ou constituídos por um conjunto filamentoso de micélio composto de células denominadas hifas, com

parede constituída quimicamente principalmente de quitina e/ou celulose. Reproduzem-se sexualmente ou assexualmente, através de esporos (Inglis et al., 2001).

Diferente de outros microrganismos, os fungos podem infectar os insetos pela cutícula externa (Inglis et al., 2001), possibilitando a infecção independentemente de sua atividade alimentar. A maioria dos fungos entomopatogênicos tem o ciclo de vida sincronizado com os estágios do inseto hospedeiro e com as condições ambientais (Shah & Pell, 2003). O ciclo fungo-hospedeiro em hifomicetos se inicia, primeiramente, com o contato do patógeno com o hospedeiro pela cutícula externa, que ocorre geralmente passivamente, após o transporte de conídios pelos agentes de disseminação bióticos e abióticos. Após o contato ocorre a adesão na superfície do inseto e posteriormente a germinação. Caso os conídios encontrem condições favoráveis como temperatura, umidade, pH e nutrientes (quitina, glucose e outros), germinam, em aproximadamente 12 horas e produzem um tubo germinativo ou estrutura de penetração. A penetração ocorre devido às ações mecânica e química e ocorre na maioria das vezes através das membranas intersegmentais, mas pode ocorrer também via aparelho bucal, ânus ou espiráculos (Alves, 1998a; Fellet & Elliot, 2009). Após a penetração, já na hemocele, como o que ocorre com outros antígenos, o inseto pode responder a infecção utilizando-se de mecanismos humorais (fenoloxidase, lectinas e peptídeos microbianos do hospedeiro) e/ou celulares (fagocitose e/ou encapsulação). O fungo pode, por sua vez, superar essas defesas imunológicas, como por exemplo, não sendo reconhecido pelas lectinas humorais ou mimetizando a superfície dos hemócitos dos insetos. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales) produz vários compostos tóxicos, incluindo beauvericina e bassianolida (Inglis et al., 2001). Após superar as barreiras imunológicas, inicia-se a colonização do fungo no hospedeiro. As hifas se ramificam como micélio (na fase de levedura), mas o crescimento micelial intenso ocorre após a morte do inseto. Após 72 a 120 horas da

inoculação, o inseto apresenta-se totalmente colonizado, iniciando-se provavelmente pelo tecido gorduroso, chegando ao sistema digestivo e tubos de Malpighi e passando, em seguida, à hipoderme, sistema nervoso, músculos e traquéia. A morte do inseto, que acontece de dois a oito dias após a inoculação (dependendo da concentração e virulência do fungo), ocorre em função da falta de nutrientes e/ou do acúmulo de micotoxinas e é seguida do início da esporulação pelo fungo. Sobre o cadáver ocorre a formação de grande quantidade de conidióforos e conídios. Logo depois, ocorre a disseminação dos propágulos e há o encontro do patógeno com novos hospedeiros, iniciando-se um novo ciclo, quando ocorre a infecção naturalmente (Inglis et al., 2001; Fellet & Elliot, 2009).

Os fungos *Metarhizium* e *Beauveria* (Ascomycota: Hypocreales) estão entre os agentes entomopatógenos que vêm sendo mais utilizados para o controle de insetos (Evans, 1989; Hajek & St. Leger, 1994). São virulentos e bem conhecidos por infectarem uma ampla quantidade de insetos não sociais, mas existem também alguns relatos desses microrganismos infectando insetos sociais (Evans, 1974; Samson et al., 1988; Evans, 1989; Schmid-Hempel, 1998). Em 1835, Agostino Bassi, considerado o pai da patologia de insetos, comprovou que o fungo *B. bassiana* era o causador de uma doença chamada “muscardine branca”, muito importante em criações de “bicho da seda”. Ele demonstrou que essa doença poderia ser transmitida de diversas maneiras, sendo o primeiro pesquisador a provar a natureza infecciosa de um agente microbiano para um animal (Alves, 1998b).

Beauveria bassiana, um clássico fungo entomopatogênico, ocorre em todo mundo e provavelmente tem uma das maiores gamas de hospedeiros entre todos os fungos de insetos conhecidos (Schmid-Hempel, 1998). No Brasil, *B. bassiana* ocorre enzooticamente (baixa prevalência) em diversas regiões do país, sendo considerado um microrganismo de solo com considerável potencial contra pragas que habitam o solo

devido sua resistência e persistência no meio ambiente (Inglis et al., 2001). Estudos em laboratório e em campo indicam que esse fungo tem potencial para ser utilizado em programas de controle biológico, desde que exista suficiente quantidade de inóculo para induzir o processo de doença (Fernandes et al., 1985; La Rosa, 2000; Neves & Hirose, 2005).

É de extrema importância conhecer, não somente o microrganismo a ser utilizado em programas de controle biológico, mas também, o organismo alvo. O estudo da dinâmica patógenos-formigas poderá fazer com que esses insetos sejam controlados e/ou preservados. Se, de fato, como se supõe as formigas cortadeiras que realizam tarefas fora da colônia forem indivíduos mais velhos em uma colônia que atuam como forrageadoras. Sendo que, quando jovens realizavam tarefas internas no ninho e com o passar da idade passaram a atividades externas, não retornando às câmaras de fungo e berçário. A utilização, por exemplo, de iscas tóxicas poderia não ser uma boa alternativa de controle. Se as formigas de fora não entram nas áreas alvo para o produto, talvez antes das iscas atingí-las, elas sejam eliminadas pelas operárias lixeiras. No entanto, iscas têm sido um meio eficiente no controle de formigas cortadeiras.

MODELO ESTEIRA

Em ninhos de insetos sociais, as operárias estão em muito maior número do que os outros indivíduos (rainhas, machos, larvas) sendo, portanto, alvos mais prováveis de ataque de parasitas. Realizam diversas atividades, inclusive aquelas em que envolvem a saída do ninho, e isso, aumenta as chances de serem infectadas. Formigas cultivadoras de fungos (tribo Attini) se confrontam com diversos patógenos, inclusive os que podem atacar os jardins de fungos (Schmid-Hempel, 1998). Esse autor fez uma analogia do polietismo etário a uma linha de montagem ou esteira. Neste modelo, as formigas ao emergirem, entrariam na “esteira” de um lado, com a tarefa de cuidar da rainha e das

formas imaturas. Com o tempo, esses indivíduos adquiririam, gradativamente, menos valor futuro para a colônia e mais chance de serem infectados. Desta forma, eles progrediriam com a idade para a outra posição na “esteira” com tarefas mais na periferia do ninho e também mais perigosas, como o forrageamento e defesa da colônia, e não retornariam às áreas mais importantes da colônia, o jardim de fungos e o berçário e sairiam da esteira com a morte. As operárias que poderiam ser capazes de transmitir patógenos à rainha, não teriam acesso a ela, principalmente em colônias onde há apenas uma rainha. Essas organizações sociais, que são divididas em compartimentos, podem mais eficientemente impedir a transmissão de parasitas. Esse modelo da divisão de tarefas com o passar da idade serviria para diminuir a possibilidade de infecção das áreas prioritárias da colônia, fazendo, por exemplo, com que a rainha fique protegida de infecções. Se tal sistema de organização de uma colônia reduzisse a probabilidade da transmissão de um parasita, então poucos parasitas seriam capazes de se estabelecer dentro dessas, o que reduziria o impacto dos mesmos (Schmid-Hempel, 1998). O modelo de Schmid-Hempel (1998) (Figura 1) é a base para a estrutura desse trabalho e sua validação envolve o teste de algumas hipóteses.

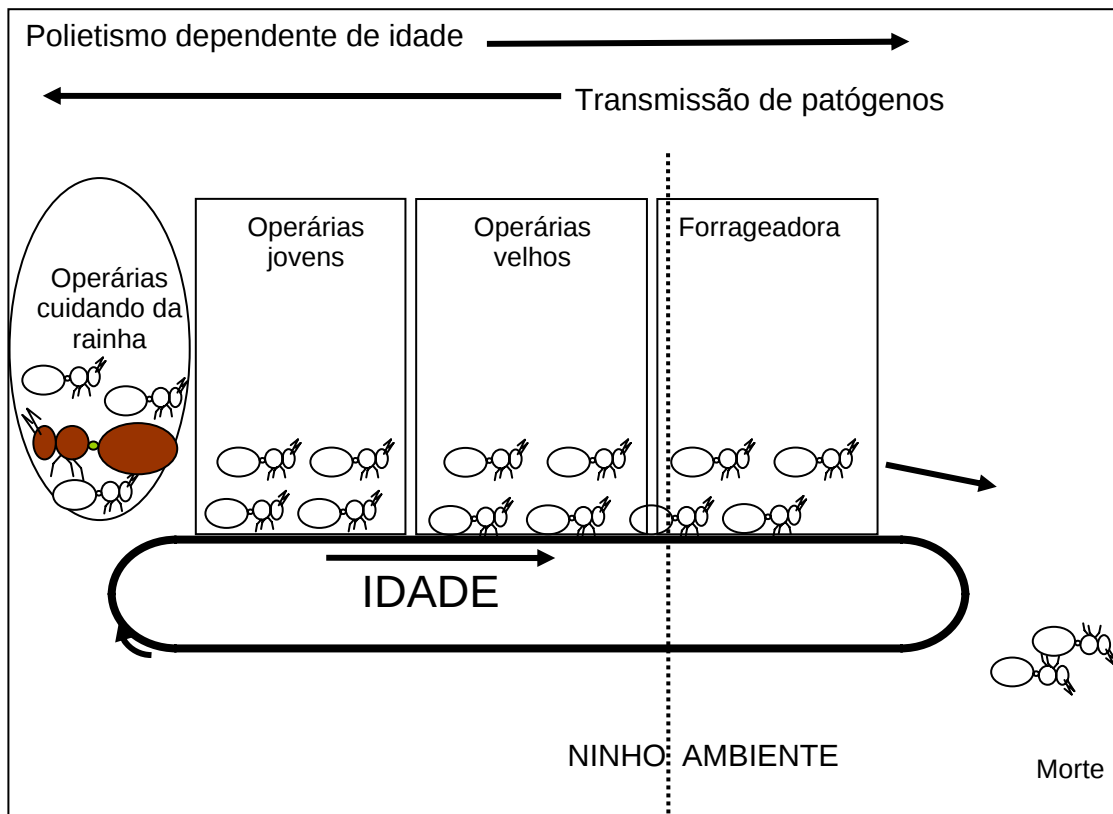


Figura 1 - O Modelo Esteira proposto por Schmid-Hempel (1998) para visualizar a importância da divisão de tarefas e a transmissão de infecção no valor adaptativo da colônia. Operárias jovens começam a vida cuidando da rainha, depois migram para a periferia do ninho, finalmente saem para forragear e depois morrem. Dessa maneira, é mais provável que as operárias de fora da colônia sejam infectadas, mas a chance delas trazerem a infecção para dentro do ninho é reduzida, protegendo indivíduos mais jovens.

METODOLOGIA

COLETA DE FORMIGAS NO CAMPO

Formigas da espécie *A. laevigata* foram coletadas em abril de 2009 na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil (20°45'14" S; 42°52'54" W; altitude de 649m). Foram coletados 320 indivíduos forrageando em trilhas, aqui denominadas de formigas externas, e 320 formigas encontradas internamente, no jardim de fungos, aqui denominadas de formigas internas, para cada um de três ninhos. As coletas dos ninhos foram realizadas em três dias consecutivos, entre às 8:30 e 10:45 horas. De cada ninho, as formigas externas foram coletadas em duas trilhas e as internas de uma ou duas painéis de fungos, dependendo da quantidade de formigas encontradas no jardim de fungos. Para a coleta foram utilizadas pinças e recipientes de plástico tratados com Fluon (resina de fluoroetileno) produto utilizado para evitar a fuga das mesmas. A fim de se evitar enganos na captura de formigas, somente formigas do interior do ninho e presentes no jardim de fungos (no caso das internas) e carregando folhas (no caso das externas) foram coletadas. Para as coletas das formigas no interior dos ninhos foram necessárias escavações dos mesmos. Foram capturadas quatro vezes mais formigas do que as necessárias para condução do experimento, para posterior descarte de indivíduos danificados. Tanto para as formigas internas quanto para as externas à colônia foram selecionadas visualmente indivíduos dentro de cada grupo de tamanhos semelhantes para minimizar o efeito do tamanho dos indivíduos.

OBTENÇÃO DE FORMIGAS EM LABORATÓRIO

Formigas da espécie *A. laevigata* foram coletadas em junho e julho de 2009, de três colônias previamente estabelecidas de acordo com metodologia proposta por Della Lucia et al. (1993a), e mantidas no Laboratório de Formigas Cortadeiras – UFV. As coletas foram realizadas entre 14:00 e 15:00 por três dias consecutivos. Com o auxílio

de uma pinça, foram retiradas 320 formigas que estavam forrageando nas areias de forrageamento (tábuas de madeira contendo folhas de *Ligustrum* sp. Privet - Oleaceae e *Acalypha wilkesiana* Muell. Arg. - Euphorbiaceae). Outras 320 formigas foram coletadas do jardim de fungo, com uma colher, de aproximadamente, 500 ml do fungo simbionte. Foram escolhidas colônias que possuíam colônias fúngicas com semelhantes estruturas e volumes de fungo simbionte (três vidros com aproximadamente 3l de fungo). Como no experimento com formigas de campo, foram selecionadas formigas de tamanhos semelhantes para a padronização.

MORTALIDADE DE FORMIGAS NAS 24 HORAS PÓS-COLETA

Em experimentos pilotos foram verificados que nas primeiras 24 horas pós-coleta, e em laboratório, várias formigas morrem ou ficam fragilizadas, provavelmente devido ao estresse ou danos durante a coleta e transporte para o laboratório. Após a coleta, tanto as formigas externas quanto as internas, dos experimentos de campo e laboratório foram mantidas em laboratório por 24 horas antes da montagem do experimento. Esse procedimento foi feito a fim de minimizar a utilização de formigas afetadas pela coleta e verificar se a mortalidade é decorrente das coletas ou de indivíduos previamente mais fracos. As operárias foram colocadas em bandejas de plástico (80 x 40 cm) com talco nas bordas, para impedir a fuga das mesmas. As formigas externas foram mantidas nas bandejas juntamente com folhas de *Ligustrum* sp. e *A. wilkesiana*, enquanto as internas, foram mantidas junto com a amostra do fungo simbionte coletado.

MEDIÇÃO DAS CÁPSULAS CEFÁLICAS

Na montagem dos experimentos com formigas do campo e de laboratório foram selecionadas visualmente, dentro de cada grupo, formigas de tamanhos semelhantes. Após a morte das formigas, as cápsulas cefálicas de algumas formigas (pelo menos 40

indivíduos de cada casta em cada ninho) foram medidas com uma micrométrica ocular com 0,05 mm de precisão, acoplada a um microscópio estereoscópico, para certificar se os tratamentos e os ninhos possuíam formigas de tamanhos semelhantes. Esse procedimento foi realizado para que após a inoculação de *B. bassiana* o tamanho não pudesse ser mais um fator que pudesse alterar os resultados de mortalidade.

Em relação ao experimento com formigas provenientes do campo, não houve diferenças no tamanho das cápsulas cefálicas entre os grupos em nenhum dos ninhos (1: média $2,63 \pm 0,329$ mm, teste t bilateral (t)=0,444, df =82, p =0,658; 2: $2,64 \pm 0,277$ mm, t =0,686, df =80, p =0,495; 3: $2,52 \pm 0,318$ mm, t =-0,527, df = 91, p =0,599)

O mesmo ocorreu para formigas provenientes de colônias de laboratório para os ninhos (4: $2,55 \pm 0,244$ mm, teste t bilateral (t)=-0,558, df =93, p =0,578; 5: $2,67 \pm 0,266$ mm, t =0,448, df =89, p =0, 655; 6: $2,63 \pm 0,286$ mm, t =-0,36, df =86, p =0,971).

Como não houve diferenças no tamanho das cápsulas cefálicas entre os grupos, em ambos os experimentos, o tamanho não foi considerado nas análises estatísticas dos experimentos.

PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FUNGO

O isolado do fungo *B. bassiana* utilizado no experimento envolvendo infecção das formigas, foi originalmente isolado de um indivíduo de *A. sexdens rubropilosa* encontrado na Mata do Paraíso, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil em 2008. O fungo foi cultivado em placas contendo o meio de cultura caldo vegetais-ágar (Pereira et al., 2003). O fungo foi repicado para várias placas de Petri contendo este o meio e incubado em 25°C por aproximadamente dez dias. Após esse período obteve-se uma esporulação abundante. Adicionou-se 4 ml de água estéril por placa de Petri colonizada pelo fungo e raspou-se a superfície com alça de Drigalski para liberar e suspender os conídios. Posteriormente, a suspensão filtrada em gaze para remoção do micélio e conidióforos

da suspensão. A concentração dos conídios na suspensão foi avaliada em câmara de Neubauer e ajustada para a concentração de 2×10^5 conídios/ml conforme estabelecido em experimentos prévios e a esse foi adicionado 1 µl de Tween 80 - Polisorbato 80.

INOCULAÇÃO DAS FORMIGAS DE CAMPO E LABORATÓRIO

Para inoculação com *B. bassiana*, depositou-se no tórax de cada formiga 0,5 µl da suspensão de conídios conforme descrito acima. A concentração de inoculo utilizada escolhida em experimentos prévios e que se determina uma dose que não fosse letal em curto prazo para as formigas, a fim de verificar se há diferença entre as duas castas de formigas em presença ou não do fungo entomopatogênico. Após a inoculação, as formigas foram individualizadas em placa de Petri de plástico de 15 cm de diâmetro. O controle consiste de formigas sobre as quais foram depositadas 0,5 µl de solução de água destilada estéril contendo TWEEN 80. Em cada placa de Petri foram feitos dois orifícios onde foram introduzidos dois tubos cilíndricos de plástico previamente autoclavados que continham algodão em seu interior. Em um tubo foi colocado água destilada e em outro, através de uma seringa, solução de mel 1:1 *ad libitum*, para hidratação e alimentação das formigas, respectivamente. Os tubos contendo algodão com água foram molhados a cada três dias e trocados quando houve a presença de qualquer vestígio de mofo. Os tubos que continham mel + água foram trocados uma vez por semana para evitar contaminação por fungos ou bactérias.

RESULTADOS

EXPERIMENTO COM FORMIGAS DE CAMPO

Considerando, em primeiro lugar as formigas que não foram infectadas (controle), o tempo de sobrevivência das formigas de fora do ninho foi muito menor que o das de dentro (Fig. 2 – medianas: $8 \pm 0,81$ dias *versus* $28 \pm 2,42$ dias, respectivamente, log-rank= 145,32; n= 119; $p < 0,00001$).

A inoculação das formigas com o fungo *B. bassiana* não afetou significativamente a sobrevivência das formigas de fora do ninho (Fig. 2 – com fungo - mediana: $9 \pm 0,97$ dias; Figura 2 – controle: $8 \pm 0,81$ dias; log-rank= 1,2; n= 120; $p = 0,2741$). No entanto, para as de dentro, a infecção diminuiu o tempo de vida (mediana: $17 \pm 1,80$ dias) quando comparado ao grupo controle (mediana: $28 \pm 2,42$ dias) (log-rank= 16,29; n= 119; $p = 0,0001$), (Figura 2).

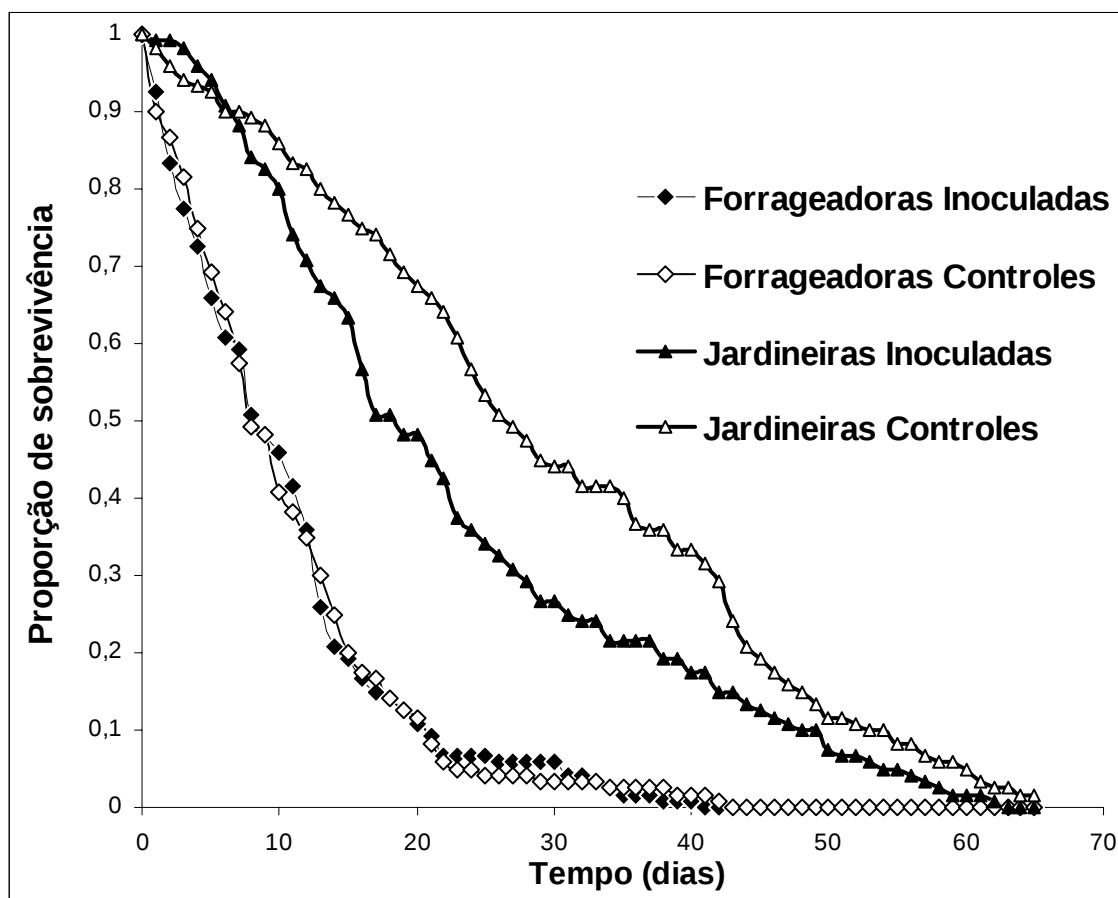


Figura 2 – Sobrevivência de operárias de colônias de *Atta laevigata* de campo inoculadas ou não com o fungo. Os losangos fechados representam formigas de dentro

do ninho inoculadas com o fungo *B. bassiana* (N= 120); os losangos abertos formigas formigas de dentro do ninho controle (N= 119); os triângulos fechados representam formigas de dentro do ninho inoculadas com o fungo *B. bassiana* (N= 119) e os triângulos abertos formigas de dentro do ninho controles (N= 119). Houve diferenças significativas entre as curvas, exceto entre as forrageadoras com e sem fungo (detalhes no texto).

Nas primeiras 24 horas em que as formigas foram mantidas em laboratório, somente formigas de fora do ninho morreram. Nenhuma formiga de dentro do ninho morreu nas 24 horas de permanência em laboratório antes da montagem do experimento. Nos ninhos 1, 2 e 3 a mortalidade das formigas de fora de 18 (das quais 11 apresentaram crescimento de fungo), 12 (das quais 7 apresentaram crescimento de fungo) e 11 indivíduos (contendo 8 com crescimento de fungo), respectivamente em aproximadamente 320 indivíduos coletados de cada ninho (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de operárias de *Atta laevigata*, mortas nas primeiras 24 horas pós-coleta e antes da montagem do experimento em laboratório. Também constam os números das formigas mortas que apresentaram crescimento de fungo. Ninhos 1, 2 e 3 e formigas de fora e de dentro do ninho (N aproximado.=320)

Ninho	Casta	No. formigas mortas – 24h	No. formigas com fungo (micélio)
1	Forrageadora	18	11
1	Jardineira	0	0
2	Forrageadora	12	7
2	Jardineira	0	0
3	Forrageadora	11	8
3	Jardineira	0	0

Entre as formigas que foram inoculadas, 53,33 % (64 de 120) das de fora do ninho e 47,9 % (57 de 119) das de dentro apresentaram crescimento de fungo. Nas formigas controles, 54,62 % (65 de 119) das de fora e 34,45 % (41 de 119) das de dentro apresentaram crescimento de fungo.

EXPERIMENTO COM FORMIGAS DE LABORATÓRIO

Comparando-se as formigas de fora do ninho com as de dentro do ninho que não foram inoculadas (controles), houve tempo menor de sobrevivência entre as de fora (Figura 3 – medianas: $15 \pm 1,17$ dias; $n= 120$ versus $29 \pm 1,36$ dias; $n= 119$, respectivamente, log-rank= 92,67; $n= 120$; $p< 0,00001$).

Tanto as formigas de fora quanto as de dentro apresentaram diferentes tempos de sobrevivência quando foram comparadas dentro de cada grupo, as que receberam o inóculo de *B. bassiana* e as controles. Houve diferença no tempo de sobrevivência, entre as forrageadoras inoculadas com o fungo e as controles (Figura 3 – com fungo – mediana: $12 \pm 0,86$ dias; controle: $15 \pm 1,17$ dias, respectivamente; log-rank= 5,50; $n= 120$; $p= 0,0191$). Quando foram comparadas as jardineiras que receberam o inóculo com as controles também foi encontrada diferença no tempo de sobrevivência (Figura 3 – com fungo – mediana: $21 \pm 0,96$ dias; controle: $29 \pm 1,36$ dias, respectivamente; log-rank= 28,37; $n= 120$; $p= 0,00001$).

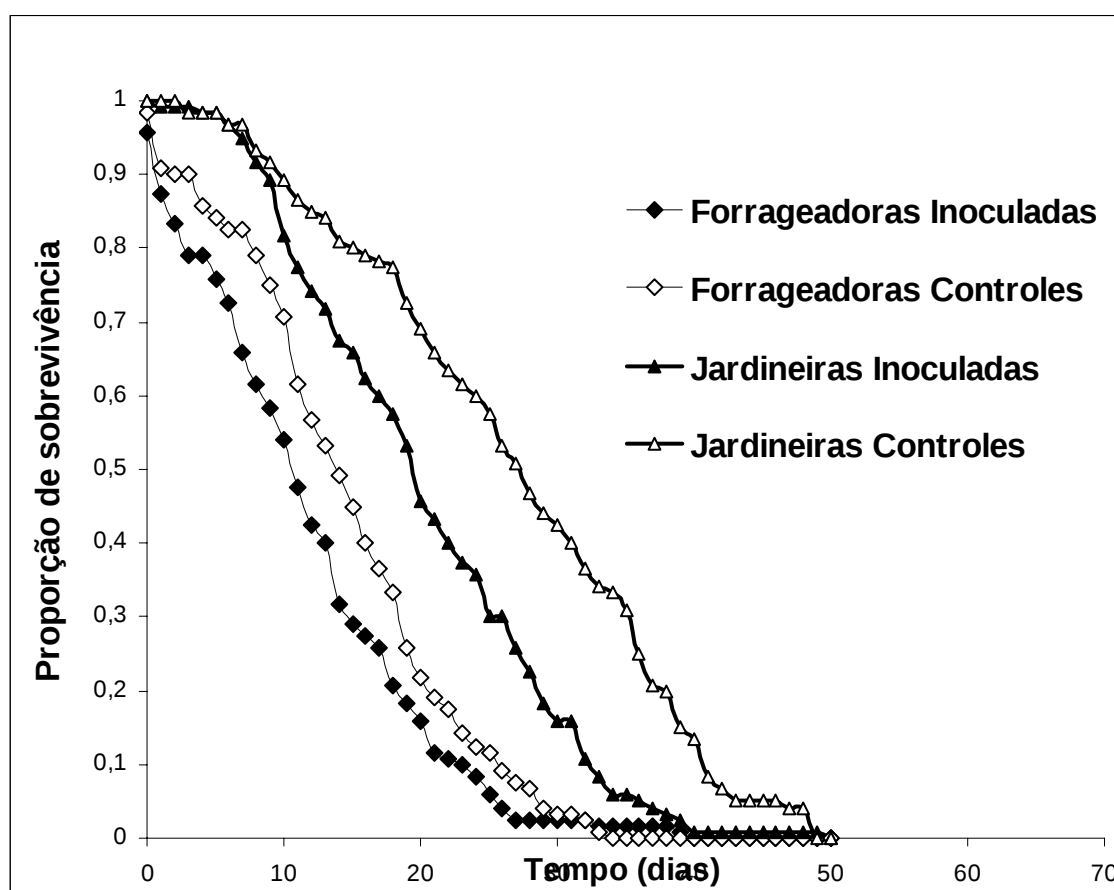


Figura 3 - Sobrevivência de operárias de colônias de *Atta laevigata* de laboratório inoculadas ou não com o fungo. Os losangos fechados representam formigas forrageadoras inoculadas com o fungo *B. bassiana* (N= 120); os losangos abertos formigas forrageadoras controle (N= 120); os triângulos fechados representam formigas jardineiras inoculadas com o fungo *B. bassiana* (N= 120) e os triângulos abertos formigas jardineiras controles (N= 119). Houve diferenças significativas entre as curvas.

Durante as primeiras 24 horas pós-coleta que as formigas permaneceram em laboratório, em todos os ninhos amostrados, só houve morte na casta das forrageadoras. A mortalidade foi de uma formiga (que apresentou crescimento de fungo) no ninho 4; duas (das quais uma apresentou crescimento de fungos) no ninho 5 e cinco (das quais duas apresentaram crescimento de fungo) no ninho 6 (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de operárias de *Atta laevigata* mortas nas primeiras 24 horas pós-coleta e antes da montagem do experimento em laboratório. Também constam os números das formigas mortas que apresentaram crescimento de fungo. Ninhos 4, 5 e 6 e formigas de fora e de dentro do ninho (N aproximado.=320)

Ninho	Casta	No. formigas mortas – 24h	No. formigas com fungo (micélio)
4	Forrageadora	1	1
4	Jardineira	0	0
5	Forrageadora	2	1
5	Jardineira	0	0
6	Forrageadora	5	2
6	Jardineira	0	0

Entre as formigas que foram inoculadas com *B. bassiana*, ambas as de fora e de dentro do ninho apresentaram esporulação de 52,5 % (63 de 120) por algum fungo. Das formigas que não receberam o inóculo, 32,5% (39 de 120) das de fora do ninho e 40,34% (48 de 119) das de dentro apresentaram esporulação.

DISCUSSÃO

Os dois experimentos demonstraram que as formigas coletadas no exterior do ninho, em trilhas, morreram antes das formigas coletadas internamente no ninho, no jardim de fungos, sugerindo que sejam mais velhas. Os resultados apóiam a hipótese de que *A. laevigata* apresente o polietismo dependente da idade, que foi a primeira hipótese desse trabalho, que se adequa ao modelo “esteira” proposto por Schmid-Hempel (1998). A espécie também utiliza o polietismo morfológico, evidenciado principalmente, pela existência de soldados que defendem o ninho.

A longevidade pode ser negativamente afetada pelo esforço do forrageamento, sendo assim, pode acontecer aumento na taxa de mortalidade em indivíduos mais velhos à medida que alcançam os limites fisiológicos (Cartar, 1992). Acredita-se que operárias de abelhas possam ter um pacote de energia fixo durante a vida, de maneira que a sobrecarga de trabalho resulte em menor tempo de vida (Schmid-Hempel & Wolf, 1988; Wolf & Schmid-Hempel, 1989). Esse mesmo fenômeno poderia ocorrer em formigas. As formigas que realizam tarefas fora do ninho, por terem energia limitada durante a vida, utilizariam seus estoques finais de energia em trabalhos mais custosos, o que faria com que diminuíssem ainda mais seus tempos de vida. Existem evidências também que, mesmo na ausência de predadores e patógenos, indivíduos morrem mais rapidamente se forem mais ativos e esse mecanismo pode ser sustentado em abelhas (Neukirch, 1982) e, possivelmente, em formigas.

Além disso, em ambos os experimentos, durante as primeiras 24 horas pós-coleta das formigas, em que as mesmas foram mantidas em bandejas antes da montagem dos experimentos, somente formigas de fora do ninho, em todos os ninhos, morreram. Nenhuma de dentro do ninho morreu durante o processo, indicando que as de fora, sendo mais velhas, podem ser mais frágeis que as jardineiras e talvez sofram mais com a coleta e o transporte. Outra alternativa é que as formigas de fora, como são

coletadas com a utilização de pinça, podem ter sofrido mais que as de dentro que foram coletadas com a escavação até a chegada na panela de fungos e captura em potes. Esse artefato experimental é menos provável, pois as pinças utilizadas eram pinças especiais para coleta de insetos frágeis e de corpo mole. Não é o caso das formigas que possuem cutículas esclerotizadas, duras e, que consequentemente, as protegem de impactos.

No experimento com formigas de campo, enquanto as formigas de dentro do ninho inoculadas morreram mais rapidamente do que as controle, as de fora inoculadas ou não com o patógeno apresentaram curvas de sobrevivência semelhantes. Provavelmente decorrente do esforço maior no campo, já que são maiores as distâncias de forrageamento, com isso a presença do fungo não fez diferença. Isso corrobora a hipótese de que seriam mais velhas e não previamente mais fracas que as de dentro do ninho. Se as curvas fossem diferentes, poderia indicar que as de dentro seriam alocadas pela colônia para realizar tarefas mais perigosas, como forrageamento, já que as perdas das mesmas não acarretariam em tantos prejuízos para a colônia. Entretanto, a mortalidade acelerada nas formigas de dentro inoculadas com o patógeno não foi vista para as de fora. É de se esperar que as formigas que se encontram no exterior do ninho sejam mais expostas e estejam em maior risco devido à presença de predadores, competidores e patógenos quando comparados com as operárias dentro do ninho (Hölldobler & Wilson, 1990). Talvez, por isso, as de fora encontradas na trilha já representam os indivíduos que conseguiram sobreviver a esses fatores de mortalidade. Se isso for o caso, essas seriam mais resistentes aos patógenos, o que explicaria a ausência de um efeito do patógeno na sobrevivência delas.

Quando operárias realizam tarefas de risco mais tardiamente, a longevidade média das operárias de uma colônia aumenta (Wakano et al., 1998; Tofilski, 2006). Ao aumentar a longevidade dessas operárias, o valor adaptativo da colônia é maximizado

(Schmid-Hempel, 1987; Schmid-Hempel & Wolf, 1988; Woyciechowski & Kozłowski, 1998; Moron et al., 2008). Outros trabalhos corroboram essa hipótese e a hipótese de que em formigas (Morón et al., 2008) e em abelhas (Woyciechowski & Morón, 2009), ao se diminuir a expectativa de vida de operárias, essas começam a forragear mais cedo. Muitos fatores podem diminuir a longevidade de um indivíduo, por exemplo, os patógenos. Por outro lado, a hipótese da existência de imunosenescência, i.e., a redução sistêmica da eficiência da imunidade com a idade (Amdam et al., 2005) vai contra os achados do experimento com formigas provenientes do campo. Pois, se assim fosse, era esperado que forrageadoras tivessem a sobrevivência ainda menor com a presença de *B. bassiana* do que as forrageadoras que não receberam o inóculo, como o que ocorreu com formigas provenientes do laboratório. As teorias evolucionárias de envelhecimento propõem que forrageadoras deveriam reduzir seus investimentos imunológicos quando sofrem por fatores extrínsecos que reduzem a probabilidade de sobrevivência (Rose, 1991). Diferentemente do encontrado por Adam et al. (2005), Bocher et al. (2007), estudando formigas, verificaram que a atividade da fenoloxidase i.e., maior fator de resistência contra parasitas, é mais alta nas forrageadoras quando comparada com operárias que realizam tarefas no interior do ninho. Além disso, a remoção de forrageadoras não afetou o nível da atividade da fenoloxidase das formigas de dentro da colônia. Caso alterasse positivamente, era esperado que esses indivíduos com maior atividade da fenoloxidase fossem mais prováveis ao forrageamento. A “hipótese da exposição ao risco” prediz o oposto da hipótese da senescência, ou seja, as operárias que realizam tarefas fora do ninho, por estarem fora do mesmo, sofrem mais risco de infecção o que pode favorecer o aumento do investimento em imunidade.

No experimento com formigas provenientes de colônias de laboratório, tanto formigas de fora do ninho quanto as de dentro apresentaram menor sobrevivência

quando receberam o inóculo quando comparadas com formigas controle. As colônias de laboratório provavelmente estão menos expostas aos patógenos. Neste caso, as operárias mais suscetíveis não seriam eliminadas por este fator de mortalidade. Outra possibilidade é que, em colônias de laboratório, as divisões de trabalho não são tão bem definidas quanto em colônias de campo. Esse pode ser outro motivo pelo qual formigas de fora morreram ainda mais rapidamente quando estressadas. Como as formigas de fora, das colônias de laboratório não estão em maior contato com patógenos, como o que ocorre nas colônias de campo, talvez sofram efeito do fator estressante, de maneira semelhante às de dentro, que trabalham no jardim de fungo. Operárias podem ser expostas a maior risco de contrair doenças com o passar da idade e quando mudam de atividades internas para atividades externas ao ninho (Schmid-Hempel, 1998). Pode ser ainda que as formigas de fora não invistam tanto em defesa imune, já que estão em pouco contato com microrganismos patogênicos (em ambiente de laboratório) ou porque de qualquer maneira já estavam no fim da vida. De acordo com Sheldon & Verhulst (1996), o investimento em imunidade deve variar sobre uma ampla gama de indivíduos e quando há pressões de parasitas. Os insetos respondem às infecções através de seu sistema imune. Moret & Schmid-Hempel (2009), estudando mamangavas, encontraram que a densidade de hemócitos e fenoloxidase responsáveis pela defesa constitutiva ou inata, declina com o passar da idade, mas que a produção induzida de peptídeos antimicrobianos aumenta com a idade em insetos controle e se mantém alta em insetos manipulados com bactéria, simulando uma infecção bacteriana. Ou seja, a resposta imune inata é afetada pela idade, mas a defesa induzida é mantida estável ou até pode aumentar com o passar da idade, o que corrobora com os trabalhos citados acima.

As formigas que realizam tarefas dentro do ninho, por sua vez, são operárias que realizam tarefas no interior do ninho e têm, provavelmente, menos contato com

patógenos. Independente da presença ou não do fator estresse (fungo), em ambos os experimentos, as operárias internas tiveram sobrevivência maior que as externas. Na presença do inóculo as de dentro tiveram a sobrevivência ainda menor. Isso ocorreu, possivelmente, pois como o sistema imune induzido das formigas se desenvolve com o passar da idade, já que passam a realizar tarefas mais periféricas e perigosas no ninho, necessitariam de defesas mais eficientes. Pode ser que a defesa imune induzida, ainda não tenha se desenvolvido defesas contra a infecção por *B. bassiana*.

No experimento com formigas de campo, as formigas de fora do ninho apresentaram maior crescimento por fungos (micélio) do que as de dentro, independente se receberam ou não o inóculo. Isso provavelmente se deve ao fato delas realizarem tarefas no ambiente externo e estarem mais em contato com possíveis patógenos. Já as de dentro apresentaram maior crescimento por fungo quando inoculadas. Nos experimentos, utilizou-se uma dosagem de *B. bassiana* intermediária – uma que causaria infecções, mas que não mataria todos os insetos infectados rapidamente – considerou-se esta situação mais próxima à realidade do campo. É possível que, após uma infecção em baixa virulência por *B. bassiana*, outros fungos que já estavam nas formigas desde a captura no campo tenham encontrado condições favoráveis para esporular. O patógeno inoculado pode ter reduzido as defesas do hospedeiro e o enfraquecido, indiretamente contribuindo para a infecção do patógeno proveniente do campo. Pode ter havido ainda, uma competição desse fungo com o fungo inoculado. Thomas e colaboradores (2003), utilizando o gafanhoto do deserto *Schistocerca gregaria* (Forsk.) e duas espécies de fungos entomopatogênicos, demonstraram como uma infecção mista com um patógeno não virulento pode alterar a virulência e a reprodução de um segundo patógeno muito virulento.

Já no experimento com formigas de laboratório, as de fora do ninho e as de dentro que receberam o inóculo (*B. bassiana*) apresentaram a mesma porcentagem de

infecção por fungos. Isso ocorreu, pois, é possível que em colônias de laboratório, o ambiente interno do ninho (jardim de fungos) e o externo (arena de forrageamento) não são bem divididos em compartimentos como as colônias naturais de campo. As formigas de dentro, então, podem ter mais contato com patógenos, como o que ocorre com as de fora, do que as de dentro de colônias de campo, o que fez com que a porcentagem de infecções se apresentasse igual. Em colônias de laboratório esperava-se que as infecções fúngicas se apresentassem em porcentagens bem menores do que as infecções ocorridas em formigas provenientes do campo, pois se supunha que nas colônias de laboratório ocorressem menos patógenos devido às condições não naturais para os mesmos se multiplicarem. No entanto, não foi o que ocorreu. Em formigas controle (que não receberam o inóculo) provenientes de laboratório, a infecção foi mais alta em formigas de dentro do ninho, esse também não foi um resultado esperado. Pode ser que como as formigas de dentro estão um pouco mais protegidas de microrganismos, tenham sofrido mais o impacto deles que as de fora que se encontram mais frequentemente em contato com os mesmos. Como não houve diferenças no tamanho entre formigas de fora e de dentro, em todos os ninhos amostrados, as mortes prematuras das de fora confirmam ainda mais o modelo esteira e excluem a possibilidade do tamanho ter influenciado os resultados de sobrevivência, inclusive na presença do patógeno.

Pode-se concluir que esse trabalho está de acordo com o polietismo etário e o modelo “esteira” proposto por Schmid-Hempel (1998). De acordo com os resultados obtidos, em ambos os experimentos de campo e de laboratório, as formigas que exerciam funções externamente ao ninho morreram antes do que as que trabalhavam no interior do ninho, em todos os seis ninhos amostrados. Esse estudo foi o primeiro passo para se testar o modelo “esteira”, e os resultados obtidos podem dar bases para futuros trabalhos.

A divisão de trabalho mediada pela idade é um dos comportamentos responsáveis pela organização das atividades das operárias em vários insetos eussociais (Wilson, 1980). Estudos adicionais merecem considerações e serão importantes para entender os mecanismos, extrínsecos e intrínsecos, mediadores das mudanças nas atividades internas ao ninho para atividades externas, com a passagem da idade e a evolução da divisão de trabalho nos insetos sociais. Será importante em futuros estudos, um trabalho que verifique se há diferença no investimento em defesa imune entre as formigas de dentro e de fora do ninho, através da marcação dessas formigas, para um melhor entendimento do polietismo etário e dos riscos de doença. O conhecimento da dinâmica do polietismo etário juntamente com outros estudos paralelos poderá contribuir para o controle e/ou conservação desses insetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, R.D. 1974. The evolution of social behavior. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5: 325-383.
- Alves, S.B. 1998a. Fungos entomopatogênicos, In: S.B. Alves (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, p. 289-381.
- Alves, S.B. 1998b. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: S.B. Alves (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 21-37.
- Amdam, G.V.; A.L.T.O. Aase; S.C. Seehuus; M.K. Fondrk; K. Norberg; K. Hartfelder. 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.* 40: 939-947.
- Anjos, N.; T.M.C. Della Lucia & A.J. Mayhé-Nunes 1998. Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamentos. Ponte Nova, MG, Graffcor. 97 p.
- Anjos, N.; D.D.O. Moreira & T.M.C. Della Lucia. 1993. Manejo integrado de formigas cortadeiras em reflorestamentos. In: T.M.C. Della Lucia (Ed.). As formigas cortadeiras. Ed. Folha de Viçosa, p.212-241.
- Barnes, A.I. & M.T. Siva-Jothy. 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanisation is an indicator of investment in immunity. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267, 177-182.
- Beattie, A.J. & L. Hughes. 2002. Ant-plant interactions. In: C.M. Herrera & O. Pellmyr (Eds.), *Plant-Animal Interactions*. Oxford, Blackwell Publishing, 211-235.
- Beshers, S.N. & J.H. Fewell. 2001. Models of division of labor in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* 46: 413-440.
- Boaretto, M.A.C. & L.C. Forti. 1997. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*: 11, n. 30, p. 31-46.
- Bocher, A.; C. Tirard & C. Doums. 2007. Phenotypic plasticity of immune defence linked with foraging activity in the ant *Cataglyphis velox*. *J. Evol. Biol.* 20: 2228-2234.
- Boomsma, J.J.; P. Schmid-Hempel & W.O.H. Hughes. 2005. Life histories and parasite pressure across the major groups of social insects. In: M.D.E. Fellowes, G.J. Holloway & J. Rolff (Eds.) *Insect evolutionary ecology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 139-175.
- Bourke, A.F.G. 1988. Worker reproduction in the higher eusocial Hymenoptera. *Quart. Rev. of Biol.* 63: 291-311.
- Bourke, A.F.G. & N.R. Franks. 1995. *Social evolution in ants*. Princeton, New Jersey, USA, Princeton Univ. Press.
- Calderone, N.W. & R.E.Jr. Page. 1988. Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 22: 17-25.
- Camargo, R.S.; L.C. Forti; J.F.S. Lopes; A.P.P. Andrade & A.L.T. Ottati. 2007. Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entomol.* 131: 139-145.
- Cartar, R.V. 1992. Morphological Senescence and longevity: an experiment relating wing wear and life span in foraging wild bumble bees. *J. Anim. Ecol.* 61: 225-231.
- Chapuisat, M.; A. Oppliger ; P. Magliano & P. Christe. 2007. Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. *Proc Biol Sci.* 274: 2013-2017.

- Couto, L.; J.C. Zanuncio; J.E.M. Alves; E. Campinhos; L. Soresini; J.A. Vargas, J. 1978. Avaliação da eficiência e custo do controle de *Atta sexdens rubropilosa* através do sistema termo-nebulizador, na região de Aracruz, ES. Árv. 2: 8-16.
- Cremer, S.; S.A.O. Armitage; & P. Schmid-Hempel. 2007. Social immunity. Current Biol. 17: 693-702.
- Crosland, M.W.J.; C.M. Lok; T.C. Wong; M. Shakarad; J.F.A. Traniello. 1997. Division of labor in the lower termite *Reticulitermes fukienenses*. Naturwis. 84: 208-211.
- Currie, C.R. 2001. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. Annu. Rev. Microbiol. 55: 357-380.
- Della Lucia, T.M.C. 2003. Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: F. Fernández. (Ed.) Introducción a las hormigas de la región Neotropical, Bogotá, Colombia :Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 337-349.
- Della Lucia, T.M.C. & M.S. Araújo. 2000. Formigas cortadeiras: Atualidades no combate. In: L. Zambolim (Ed.), Manejo Integrado - Doenças, Pragas e Plantas Daninhas. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 245-273.
- Della Lucia, T.M.C.; Vilela, E.F. & Anjos, N. 1993a. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: T.M.C. Della Lucia (Ed.), As Formigas Cortadeiras. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 151-162.
- Della Lucia, T.M.C.; H.G. Fowler. & D.D.O. Moreira 1993b. Espécies de formigas cortadeiras no Brasil. In: T.M.C. Della Lucia (Ed.), As Formigas Cortadeiras. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 26-31.
- Diehl-Fleig, E. 1994. Estrutura genética e social de *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) e de *A. striatus* (Roger, 1863) (Hymenoptera: Formicidae). Porto Alegre: UFRGS. (Tese de Doutorado em Ciências). 233 p.
- Diehl-Fleig, E. & M.E. Lucchese. 1991. Reações comportamentais de operárias de *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, Formicidae) na presença de fungos entomopatogênicos. Ver. Brás. Entomol. 35: 101-107.
- Elliot, S.L. & A.G. Hart. 2010. Density-dependent prophylactic immunity reconsidered in the light of host group living and social behavior. Ecology 91: 65-72.
- Esch, G.W.; J.W.Gibbons & J.E. Bourque. 1975. Na analysis of the relationship between stress and parasitism. Am. Midl. Nat. 93: 339-353.
- Evans, H.C. 1974. Natural control of arthropods, with special reference to ants (Formicidae), by fungi in the tropical high forest of Ghana. J. Appl. Ecol. 11: 37-49.
- Evans, H.C. 1989. Mycopathogens of insects in epigeal and aerial habitats. In: N. Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond & J.F. Weber (Eds.), Insect-Fungus Interactions. London Academic Press, London, p. 205-238.
- Farji-Brener, A.G. & L. Ghermandi. 2004. Seedling recruitment in a semi-arid Patagonian steppe: Facilitative effects of refuse dumps of leaf-cutting ants. J. Veget. Sci. 15: 823-830.
- Fellet, M.R. & S.L. Elliot. 2009. Emprego de Fungos no Controle Biológico de Pragas. In: L. Zambolin & M.C. Picanço (Eds.), Controle Biológico de Pragas e Doenças – Exemplos práticos. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 211-250.
- Fernandes, P.M.; R.E. Lecuona & S.B. Alves. 1985. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill à broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera: Scolytidae). Ecossistema 10: 176-182.
- Fernández-Marín, H.; J.K. Zimmerman; S.A. Rehner & W.T. Wcislo. 2006. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. Proc. R. Soc. B. 273 : 1689-1695.

- Fernández-Marín, H.; J.K. Zimmerman & W.T. Wcislo. 2007. Fungus garden platforms improve hygiene during nest establishment in *Acromyrmex* ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Insect. Soc.* 54: 64-69.
- Fjerdingstad, E.J. & J.J. Boomsma. 2000. Queen mating frequency and relatedness in young *Atta sexdens* colonies. *Insect. Soc.* 47: 354-356.
- Forest Stewardship Council. 2002. Chemical pesticides in certified forests: Interpretation of the FSC principles & criteria, Oaxaca, México.
- Fowler, H.G. & S. Claver. 1991. Leaf-cutter assemblies: effects of latitude, vegetation and behaviour. In: C.R. Huxley & D.F. Cutler (Eds.), *Ant-Plant Interactions*. Oxford, Oxford Univ. Press, p. 51-59.
- Garnier-Sillam, E. 1983. Le polyéthisme chez *Reticulitermes lucifugus* (Isoptera-Rhinotermitidae). A: Différence d'activités des ouvriers en fonction des stades. *Insect. Soc.* 30: 9-26.
- Gordon, D.M.; J. Chu; A. Lillie; M. Tissot & N. Pinter. 2005. Variation in the transition from inside to outside work in the red harvester ant *Pogomyrmex barbatus*. *Insect. Soc.* 52: 212-217.
- Gordon, D.M. 2002. Formigas em ação: Como se organiza uma sociedade de insetos. Rio de Janeiro: Zahar. 144 p.
- Gracioli-Vitti, L.F.; F.C. Abdalla & C.da Cruz-Landim. 2004. Characterization of the mandibular glands in different adult types of *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). *Neotrop. Entomol.* 33: 703-708.
- Hajek, A.E. & R.J.S. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- Hamilton, W.D. 1964. The genetical evolution of social behaviour. I and II. *J. Theor. Biol.* 7: 1-52.
- Hinze, B. & R.H. Leuthold. 1999. Age related polyethism and activity rhythms in the nest of the termite *Macrotermes bellicosus* (Isoptera, Termitidae). *Insect. Soc.* 46: 392-397.
- Hölldobler, B. & E.O. Wilson. 1990. *The Ants*. The Belknap University Press of Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts. 732 p.
- Holmes, J.C. Parasites as threats to biodiversity in shrinking ecosystems. 1996. *Biodiv. Conserv.* 5: 975-983.
- Huang, Z.Y. & G.E. Robinson. 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 39: 147-158.
- Hughes, W.O.H. & J.J. Boomsma. 2004. Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. *Evolution* 58: 1251-1260.
- Hughes, W.O.H.; L. Thomsen; J. Eilenberg & J.J. Boomsma. 2004. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 85: 46-53.
- Hughes, W.O.H.; J. Eilenberg & J.J. Boomsma. 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 1811-1819.
- Inglis, G.D.; M.S. Goettel; T.M. Butt; H. Strasser. 2001. Use of Hyphomycetes Fungi for Managing Insect Pests. In: T.M. Butt; C.W. Jackson; N. Magan. (Eds.) *Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potencial*, Wallingford, UK: CABI Publishing, p.23-69.
- Jaccoud, D.B.; W.O.H. Hughes & C.W. Jackson. 1999. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomol. Exp. Appl.* 93: 51-61.
- Johnson, B.R. 2005. Limited flexibility in the temporal caste system of the honey bee. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 58: 219-226.

- Johnson, B.J. 2002. Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labor and behavioural flexibility. *Proc. R. Soc. Lond.B.* 270: 147-152.
- Julian, G.E. & J.H. Fewell. 2004. Genetic variation and task specialization in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex vesicolor*. *Anim. Behav.* 68: 1-8.
- Kay, A. & S.W. Rissing. 2005. Division of foraging labor in ants can mediate demands for food and safety. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 58: 165-174.
- King, J.R. & J.C. Trager. 2007. Natural history of the slave making ant, *Polyergus lucidus*, *sensu lato* in northern Florida and its three *Formica pallidefulva* group hosts. *J. Insect Sci.* 7: 1-14.
- La Rosa, W. De; R. Alatorre, J.F. Barrera & C. Toriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *J. Econ. Entomol.* 93: 1409-1414.
- Lacey, L. A. & W. M. Brooks. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. In: L.A. Lacey (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, London., p. 1-15.
- Lindauer, M. Division of labour in honeybee colony. 1953. *Bee World* 34: 63-90.
- Möller, A. 1893. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. *Botanische Mittheilungen aus den Tropen* 6: 127p.
- Moret, Y. & P. Schmid-Hempel. 2009. Immune responses of bumblebee workers as a function of individual and colony age: senescence versus plastic adjustment of the immune function. *Oikos* 118: 371-378.
- Morón, D.; M. Witek & M. Woyciechowski. 2008. Division of labour among workers with different life expectancy in the ant *Myrmica scabrinodis*. *Anim. Behav.* 75: 345-350.
- Mueller U.G. 2002. Ant versus fungus versus mutualism: antcultivar conflict and the deconstruction of the attine antfungus symbiosis. *Am. Nat.* 160: 67-98.
- Naug, D. & R. Gadagkar. 1999. Flexible division of labor mediated by social interactions in ant insect colony- a simulation model. *J. Theor. Biol.* 197: 123-133.
- Neves, P.M.O.J & E. Hirose. 2005. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 77-82.
- Neurkirch, A. 1982. Dependence of the life span of the honey bee (*Apis mellifera*) upon flight performance and energy consumption. *J. Comp. Physiol.* 146: 35-40.
- North, R.D.; C.W. Jackson & P.E. Howse. 1997. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Trends Ecol. Evol.* 12: 386-389.
- Oster, G.F. & E.O. Wilson. 1978. *Caste and ecology in the social insects*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press, 352 p.
- Pagnocca, F.C.; A. Rodrigues; N.S. Nagamoto & M. Jr. Bacci. 2008. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 517-526.
- Palmer, K.A. & B.P. Oldroyd. 2000. Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. *Apidologie* 31: 235-248.
- Peixoto, A.V.; S. Campiolo; T.N. Lemes; J.H.C. Delabie & H.R. Riviane. 2008. Comportamento e estrutura reprodutiva da formiga *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera, Formicidae). *Rev. Bras. Entomol.* 52: 88-94.
- Pereira, J.M.; R.W. BARRETO; C. ELLISON & L.A. Maffia. 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. *Biological Control* 26: 21-31.

- Pie, M.R.; R.B. Rosengaus; D.V. Calleri & J.F.A. Traniello. 2005. Density and disease resistance in group-living insects: Do eusocial species exhibit density-dependent prophylaxis? *Ethol. Ecol. Evol.* 17: 41-50.
- Quinlan, R.J. & J.M. Cherrett. 1979. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecol. Entomol.* 4: 151-160.
- Reeson, A.F.; K. Wilson; A. Gunn; R.S. Hails & D. Goulson. 1998. *Baculovirus* resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 1787-1791.
- Robinson, G.E.; R.E. Page Jr. & Z.Y. Huang. 1994. Temporal polyethism in social insects is a developmental process. *Anim. Behav.* 48: 467-469.
- Robinson, G.E. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 637-665.
- Rose, M.R. 1991. *Evolutionary biology of aging*. Oxford University Press, New York.
- Rosengaus, R.B. & J.F.A. Traniello. 1993. Temporal polyethism in incipient colonies of the primitive termite *Zootermopsis angusticollis*: A single multi-age caste. *J. Insect Behav.* 6: 237-252.
- Samson, R.A.; H.C. Evans & J.P. Latgé. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlag, Berlin, 187 p.
- Schmid-Hempel, P. 1998. *Parasites in social insects*. Princeton, New Jersey, USA, Princeton Univ. Press, 409 p.
- Schmid-Hempel, P. 1991. The ergonomics of worker behavior in social Hymenoptera. *Adv. Study Behav.* 20: 87-134.
- Schmid-Hempel, P. & T. Wolf. 1988. Foraging effort and life span of workers in a social insect. *J. Anim. Ecol.* 57: 509-521.
- Schmid-Hempel, P. 1987. Efficient nectar-collecting by honey bees. I. Economic models. *J. Anim. Ecol.* 56: 209-218.
- Scott, M.E. 1988. The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation biology. *Conserv. Biol.* 1: 40-56.
- Seeley, T.D. & S.A. Kolmes. 1991. Age polyethism for hive duties in honey bees: illusion or reality? *Ethology* 87: 284-297.
- Seid, M.A. & J.F.A. Traniello. 2006. Age-repertoire expansion and division of labor in *Pheidole dentate* (Hymenoptera: Formicidae) a new perspective on temporal polyethism and behavioral plasticity in ants. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60: 631-644.
- Shah, P.A. & J.K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 413-423.
- Sheldon B.C & S. Verhulst. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11: 317-321.
- Shorter, J.R. & E.A. Tibbetts. 2009. The effect of juvenile hormone on temporal polyethism in the paper wasp *Polister dominulus*, *Insect. Soc.* 56: 7-13.
- Shykoff, J.L. & P. Schmid-Hempel. 1991. Parasites and the advantage of genetic variability within social insect colonies. *Proc. R. Soc. Lond. B* 243: 55-58.
- Silva A.; M. Jr. Bacci; F.C. Pagnocca; O.C. Bueno & M.J.A. Hebling. 2006. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Microbiol. Res.* 161: 299-303.
- Silva, C.A.D. 2001. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 36: 243-247.
- Statistical Package for the Social Sciences 8.0 for Windows. 2001. Chicago: SPSS Inc.
- Thomas, M.B.; E.L. Watson; P. Valverde-Garcia. 2003. Mixed infections and insect-pathogen interactions. *Ecol. Lett.* 6: 183-188.
- Tofilski, A. 2006. Influence of caste polyethism on longevity of workers in social insects colonies. *J. Theor. Biol.* 238: 527-531.

- Traniello, J.F.A. & R.B. Rosengaus. 1997. Ecology, evolution and division of labour in social insects. *Anim. Behav.* 53: 209-213.
- Traniello, J.F.A.; R.B. Rosengaus & K. Savoie. 2002. The development of immunity in a social insect: evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6838-6842.
- Wakano, J.N.; K. Nakata & N. Yamamura. 1998. Dynamic model of optimal age polyethism in social insects under stable and fluctuating environments. *J. Theor. Biol.* 193: 153-165.
- Wilson, K.; R. Knell; M. Boots & J. Koch-Osborne. 2003. Group living and investment in immune defence: an interspecific analysis. *J. Anim. Ecol.* 72: 133-143.
- Wilson, K.; M.B. Thomas; S. Blanford; M. Doggett; S.J. Simpson & S.L. Moore. 2002. Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5471-5475.
- Wilson, E.O. 1985a. The principles of caste evolution. In: B. Hölldobler & M. Lindauer (Eds.). *Experimental Behavioral Ecology and Sociobiology*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 307-324.
- Wilson, E.O. 1985b. The sociogenesis of insect colonies. *Science*. 228: 1489-1495.
- Wilson, E.O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). I: The overall pattern in *A. sexdens*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 7: 143-156.
- Wilson, E.O. 1971. The Ants. In: E.O. Wilson (Ed.). *The Insect Societies*. The Belknap University Press of Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts, p. 27-74.
- Wilson, K.; S.C. Cotter; A.F. Reeson & J.K. Pell. 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecol. Lett.* 4: 637-649.
- Wilson, K. & A.F. Reeson. 1998. Density-dependent prophylaxis: evidence from Lepidoptera-baculovirus interactions. *Ecol. Entomol.* 23: 100-101.
- Wolf, T.J. & Schmid-Hempel, P. 1989. Extra loads and foraging life-span in honeybee workers. *J. Anim. Ecol.* 58: 943-954.
- Woyciechowski, M.; D. Morón. 2009. Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). *Insect Soc.* 56: 193-201.
- Woyciechowski, M. & J. Kozłowski. 1998. Division of labor by division of risk according to worker life expectancy in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 29: 191-205.
- Zanetti, R.; J.C. Zanuncio; Souza-Silva, A.; L.A. Mendonça; J.O.S. Mattos & M.S. Rizenal. 2008. Eficiência de produtos termonebulígenos no controle de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em plantio de eucalipto. *Ciênc. Agrotec.* 32: 1313-1316.
- Zanuncio, J.C.; M.F. Sossai; H.N. Oliveira & J.S. Zanuncio Junior. 2002. Influência das iscas formicidas Mirex-S e Blitz na paralisação de corte e no controle de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Rev. Árv.* 26: 237-242.
- Zanuncio, J.C.; T.V. Zanuncio; J.M.M. Pereira & H.N. de Oliveira. 1999. Controle de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) com a isca Landrin-F, em área anteriormente coberta com *Eucalyptus*. *Cienc. Rural* 29: 573-576.